

GENES DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS EN GERMOPLASMA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) COLECTADO EN PANAMÁ¹

Carmen Bieberach Forero²; Zanya Aguilar Reyes³; Rita González Herrera⁴

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue identificar genes de resistencia a begomovirus en 78 cultivares criollos y 11 variedades mejoradas de tomate, mediante marcadores moleculares. Los cultivares estudiados fueron colectados como parte del proyecto FTG-7086/07/2007. La amplificación de los genes Ty-1, Ty-2 y Ty-3 se realizó por PCR utilizando los iniciadores específicos JB-1, T0302 y P6-25, respectivamente. En 40 cultivares criollos y seis variedades se identificó la banda del marcador JB-1 de 400 pb (ty-1/ty-1). En 60 cultivares criollos y 10 variedades se identificó la banda del marcador T0302 de 800 pb (ty-2/ty-2). No hubo cultivares portadores de los alelos dominantes Ty-1 y Ty-2. Cincuenta y ocho cultivares criollos presentaron solo una banda del marcador P6-25 de 320 pb (ty-3/ty-3). El gen de resistencia Ty-3 fue identificado en los cultivares criollos 24, 65, 67, 70, 71, así como en las variedades Anabella F₁ e IDIAP T9m; estos tienen las bandas P6-25 630 y 320 pb (Ty-3a/ty-3). La variedad Se 122 mostró tres bandas de 320, 450 y 630 pb (Ty-3/Ty-3a). El análisis de las secuencias nucleotídicas de los cultivares criollos 65, 67, 70 y 71, así como de las variedades Anabella F₁ e IDIAP T9m confirman la identidad del alelo Ty-3a.

PALABRAS CLAVES: Cultivares criollos, variedades mejoradas, marcadores moleculares, genes Ty-1, Ty-2 y Ty-3.

¹Recepción: 30 de septiembre de 2013. Aceptación: 15 de noviembre de 2013. Investigación financiada por IDIAP y FONTAGRO a través del Proyecto FTG-7086/07/2007-*Identificación y selección de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), tolerantes al complejo de virosis transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn (Aleyrodidae), en América Central.*

²M.Sc. en Cultivos Tropicales. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC) "Ing. Carlos Vernon Wynter". e-mail: cybieberach@gmail.com

³M.Sc. en Agricultura Ecológica. IDIAP. CIAC. e-mail: reyesaguilarzi@gmail.com

⁴Lic. en Biotecnología. IDIAP. CIAC. e-mail: ritacarolinagonzalez@gmail.com

BEGOMOVIRUS RESISTANCE GENES IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) GERMPLASM COLLECTED IN PANAMA

ABSTRACT

The aim of this study was to identify begomovirus resistance genes in 78 wild cultivars and 11 improved varieties of tomato, using molecular markers. The studied cultivars were collected as part of the project FTG-7086/07/2007. The amplification of the genes Ty-1, Ty-2 and Ty-3 was performed by PCR using specific primers JB-1, T0302 and P6-25, respectively. The JB-1 marker band of 400 bp (ty-1/ty-1) was identified in 40 wild cultivars and six varieties and the T0302 marker band of 800 bp (ty-2/ty-2) was identified in 60 wild cultivars and 10 varieties. No cultivars carrying the dominant alleles Ty-1 and Ty-2 were found. Fifty-eight wild cultivars had only one P6-25 marker band 320 bp (ty-3/ty-3). Resistance gene Ty-3 was identified in wild cultivars 24, 65, 67, 70, 71; as well as in the varieties Anabella F₁ and IDIAP T9m, carrying the bands P6-25 630 and 320 bp (Ty-3a/ty-3). The variety Se 122 showed three bands of 320, 450 and 630 bp (Ty-3/Ty-3a). The analysis of the nucleotide sequences of the wild cultivars 65, 67, 70 and 71, as well as the varieties Anabella F₁ and IDIAP T9m confirmed the identity of the allele Ty-3a.

KEYWORDS: Wild cultivars, improved varieties, molecular markers, genes Ty-1, Ty-2 and Ty-3.

INTRODUCCIÓN

En América Latina, el cultivo de tomate es afectado por geminivirus pertenecientes al género Begomovirus (Zúñiga-Vega y Ramírez 2002).

Los begomovirus del tomate en Centroamérica se reportaron entre 1983 y 1989 (Polston y Anderson 1997). Mediante la secuenciación de productos de PCR, fueron identificados ocho begomovirus en tomate en Guatemala, Honduras, Nicaragua y Costa Rica, éstos son: el virus del enrollamiento severo de

la hoja del tomate (*Tomato severe leaf curl virus*, ToSLCV), el virus del moteado amarillo del tomate (*Tomato golden mottle virus*, ToGMoV), el virus del moteado leve del tomate (*Tomato mild mottle virus*, ToMiMoV), el virus del moteado amarillo del tomate (*Tomato yellow mottle virus*, ToYMoV), el virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV), el virus del mosaico Havana del tomate (*Tomato mosaic Havana virus*, ToMHV), el virus del enrollamiento de la hoja de tomate de Sinaloa (*Tomato leaf curl Sinaloa virus*,

ToLCSinV) y el virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV) (Nakhla et al. 2005). Ponciano y Morales (2012a), confirmaron la presencia de siete de estos virus en Guatemala; el virus del moteado amarillo del tomate (ToYMoV), no fue detectado.

En Centroamérica no se ha reportado la presencia del virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), begomovirus monopartito, que ocasiona grandes pérdidas en la producción de tomate en otras regiones.

En Panamá, en 1983 se observaron síntomas de virosis asociados a la mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn., en parcelas de tomate en Azuero. Los síntomas observados fueron: encrespamiento de las hojas, clorosis, moteado amarillo, achaparramiento, reducción de la producción y maduración irregular de frutos. El virus fue identificado inicialmente como geminivirus (Fernández 1990, Fernández 2001). En Divisa, fue identificado un geminivirus bipartito, que fue denominado ToLCV-Pan (Engel et al. 1998). Herrera Vásquez (2013), identificó el PYMPV (*Potato Yellow Mosaic Panama Virus*), afectando

plantas de tomate en las provincias centrales de Panamá.

Zamir et al. (1994), comprobaron que las especies silvestres *Solanum pimpinellifolium*, *S. peruvianum* y *S.habrochaites* mostraron tolerancia parcial al virus del rizado amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV), mientras que *S. chilense* (accesión LA1969) presentó resistencia total. Estudios posteriores llevaron a la identificación de cinco genes de resistencia al begomovirus TYLCV: Ty-1 y Ty-3, mapeados en el cromosoma 6 de tomate (Zamir et al. 1994, Agrama y Scott 2006), Ty-2 mapeado en el cromosoma 11 (Hanson et al. 2000); Ty-4, mapeado en el cromosoma 3 (Ji et al. 2009) y Ty-5, cuyo QTL mayor se localiza en el cromosoma 4 (Anbinder et al. 2009). Otras investigaciones han aportado evidencia experimental sobre la tolerancia a begomovirus bipartitos, relacionada con la presencia de estos genes en híbridos interespecíficos.

El gen Ty-3, además de conferir resistencia a TYLCV, está asociado a la resistencia al virus del moteado del tomate (*Tomato mottle virus*, ToMoV) (Agrama y Scott 2006). En Brasil, se observó una respuesta de tolerancia a los

begomovirus: virus del mosaico rugoso del tomate (*Tomato rugose mosaic virus*, ToRMV) y virus del estriado amarillo de las venas del tomate (*Tomato yellow vein streak virus*, ToYVSV), en híbridos de tomate portadores del gen Ty-1 (Boiteux et al. 2007). Híbridos portadores de los genes Ty-2, Ty-3 y Ty-4 mostraron resistencia a los begomovirus bipartitos en evaluaciones de campo en Guatemala y Cuba (García et al. 2007, Ji et al. 2009, Mejía et al. 2009 y 2010, Dueñas-Hurtado 2012).

Los genes de resistencia han sido secuenciados y se diseñaron marcadores moleculares denominados Secuencia polimórfica amplificada y cortada (Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS), tales como JB-1 y C2_At4g17300, que amplifican Ty-1 y Ty-4; y marcadores moleculares denominados Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas (Sequence characterized amplified region, SCAR), como T0302, P6-25 y SINAC1, que permiten la identificación de Ty-2, Ty-3 y Ty-5 en cultivares silvestres y variedades de tomate. El uso de los marcadores moleculares facilita la selección de progenitores y de líneas avanzadas.

Con la finalidad de identificar fuentes de resistencia a begomovirus, que puedan ser utilizados para generar variedades resistentes, los institutos de investigación agropecuaria de América Central, desarrollaron el proyecto "Identificación y selección de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) tolerantes al complejo de virosis transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn (Aleyrodidae) en América Central". El tercer componente del proyecto incluyó la identificación y caracterización por medio de marcadores moleculares de los genes de tolerancia a begomovirus. Dentro de este componente, se desarrollaron dos actividades de investigación: la primera en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) de Guatemala, en la cual se analizaron 142 cultivares (Ponciano y Morales 2012b) y la segunda en el IDIAP, en la cual se analizaron 78 cultivares criollos y 11 variedades comerciales, cuyos resultados se describen en este artículo.

El objetivo de este trabajo fue identificar genes de resistencia a begomovirus en cultivares criollos y variedades mejoradas de tomate de Panamá, mediante marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio Agrobiotecnología, del Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC), del IDIAP, ubicado en el corregimiento de Los Canelos, distrito de Santa María, provincia de Herrera, Panamá; entre junio de 2012 y mayo de 2013. Se analizaron 78 cultivares criollos colectados en Panamá y 11 variedades comerciales, dos de Guatemala (Anabella F₁ y Se 122) y nueve de Panamá (Dina Mejorado, Entero Grande, IDIAP T7, IDIAP T8, IDIAP T9m, IDIAP T9p, L4A, L4A x Multichiltilc, L5). Los cultivares criollos fueron identificados con números arábigos del 1 al 80. Los cultivares criollos designados con los números 4 y 35 no estuvieron disponibles para este estudio.

Extracción de ácido

desoxirribonucleico (ADN):

Se utilizaron para extraer el ADN, cinco plántulas de cada cultivar y variedad de tomate, 20 días después de la germinación, siguiendo el protocolo de mini preparaciones con CTAB (Harris 1996), que comprende: maceración de las hojas con nitrógeno líquido, incubación de las hojas maceradas en búfer CTAB 2X a 65 °C por 30 minutos, centrifugación, recuperación de la fase

acuosa, precipitación con cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) y precipitación del ADN con isopropanol. Se eliminaron las proteínas remanentes y ARN, con 40 µl de Proteinasa K y Ribonucleasa A (200 µg/µl) y se suspendió el ADN en TE pH 7.5 (Tris 10mM, EDTA 1 mM). La concentración del ADN se calculó tomando la lectura de espectrofotómetro 260/280 nm. Se prepararon diluciones de cada muestra de ADN de 20 ng/µl.

Reacción en cadena de la polimerasa

(PCR):

Para la identificación de los genes de resistencia se usaron los iniciadores específicos JB-1 (CAPS), T0302 y P6-25 (SCAR), en concentración final de 0.5 µM para JB-1 y T0302 y 1 µM para P6-25. Los otros componentes de la reacción fueron similares para los tres marcadores: 100 ng de ADN plantilla, 1 unidad de Taq polimerasa, 3 mM de MgCl₂, 1X búfer de Taq, 400 µM de cada desoxinucleótido. El volumen de reacción fue de 25 µl.

Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador marca Qcycler, de acuerdo a la metodología generada por el proyecto "Identificación y selección de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), tolerantes al complejo de virosis

transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn (Aleroydidae), en América Central”, a través de la Unidad de Virología del CIAT

(CIAT-FONTAGRO 2011). Las secuencias de los iniciadores y el programa de amplificación se describen en el Cuadro 1.

CUADRO 1. SECUENCIA DE LOS INICIADORES Y PROGRAMA DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES Ty-1, Ty-2 y Ty-3.

Gen	Secuencia de los iniciadores	Programa de amplificación	Producto pb
Ty-1	JB-1F AACCATTATCCGGTTCACTC	30 ciclos (94 °C x 10 s; 53 °C x 30 s; 72 °C x 70 s); extensión final 72 °C x 10 min.	400
	JB-1R TTTCCATTCTTGTCTCTCTG		
	Enzima de restricción Taq I		
		Restricción: 2 horas, 65 °C.	500
Ty-2	T0302F	94 °C x 5 min; 35 ciclos	800
	TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC	(94 °C x 30 s; 55 °C x 1 min;	900
	T0302R AGTGTACATCCTTGCCATTGACT	72 °C x 2 min); extensión final 72 °C x 5 min	
Ty-3	P6-25F2	94 °C x 3 min; 35 ciclos	320
	GGTAGTGAAATGATGCTGCTC	(94 °C x 30 s; 53 °C x 1 min;	450
	P6-25R5	72 °C x 1 min); extensión final	630
	GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC	72 °C x 10 min	660

Las reacciones de PCR se repitieron tres veces, para cada iniciador y cultivar. Los controles de referencia fueron: Ty52, H24 y CA2, para los genes Ty-1, Ty-2 y Ty-3, respectivamente, y la semilla fue provista por la Unidad de Virología del CIAT.

Restricción de los amplicones de JB-1:

Después de la amplificación, los productos de PCR obtenidos con el iniciador JB-1, fueron digeridos con la enzima de restricción Taq I, durante dos horas, a 65 °C. Cada reacción contenía 10 µl de amplicón y 5 unidades de Taq I, en un volumen total de 25 µl.

Electroforesis:

Los productos de PCR de T0302 y P6-25 y los productos de PCR con JB-1, cortados con Taq I, se separaron en geles de agarosa al 2.5%. La electroforesis se corrió en búfer TBE 0.5 X, a 100 voltios constantes, durante 3:45 h, a 4 °C. El marcador de peso molecular de referencia de 100 pb, contiene las siguientes bandas: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 pb. Los geles se tiñeron con SYBR Safe® 10 000 X (1:10 000) y se fotografiaron en un transiluminador. Las corridas de electroforesis se repitieron tres veces, para cada iniciador y cultivar.

Análisis e interpretación de los resultados:

Se registró la presencia y peso molecular de las bandas obtenidas en cada cultivar, para cada marcador. Los cultivares que presentaron solo una banda se consideraron homocigotos, mientras que los que presentaron dos bandas de diferente peso molecular se consideraron heterocigotos para el gen analizado.

Las bandas de JB-1 de 400 pb, T0302 de 800 pb y P6-25 de 320 pb corresponden a los alelos recesivos ty-1, ty-2 y ty-3, respectivamente. Las bandas de JB-1 500 pb, T0302 900 pb y P6-25 450 pb y 630 pb corresponden a los alelos dominantes Ty-1, Ty-2 y Ty-3, respectivamente y los cultivares que poseen estas bandas en estado homocigoto o heterocigoto, se consideran resistentes a begomovirus.

Secuenciación y alineamiento:

Los productos de PCR de 630 pb del marcador P6-25 se purificaron con *ExoSap It*, y se secuenciaron con *BigDye Terminator* v3.1, en un analizador genético. Al final de las corridas, se editaron y alinearon las secuencias con *Sequencher* 5.0 (*GeneCodes*), en el

Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, en Panamá. Las secuencias resultantes se compararon con secuencias del gen Ty-3a, a través de la herramienta de búsqueda de alineamientos locales (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST), del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los cultivares criollos utilizados (68), al menos produjeron una banda, de alguno de los tres marcadores estudiados. Los alelos recesivos ty-1, ty-2 y ty-3, fueron los más frecuentes en los cultivares. No se detectaron marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia Ty-1 y Ty-2.

El gen de resistencia Ty-3 se encontró tanto en cultivares criollos, como en variedades (Cuadro 2). Los controles de referencia para Ty-2 y Ty-3 presentaron únicamente la banda característica del alelo recesivo.

CUADRO 2. NÚMERO DE CULTIVARES CON PRESENCIA DE BANDAS DE LOS MARCADORES JB-1, T0302 y P6-25.

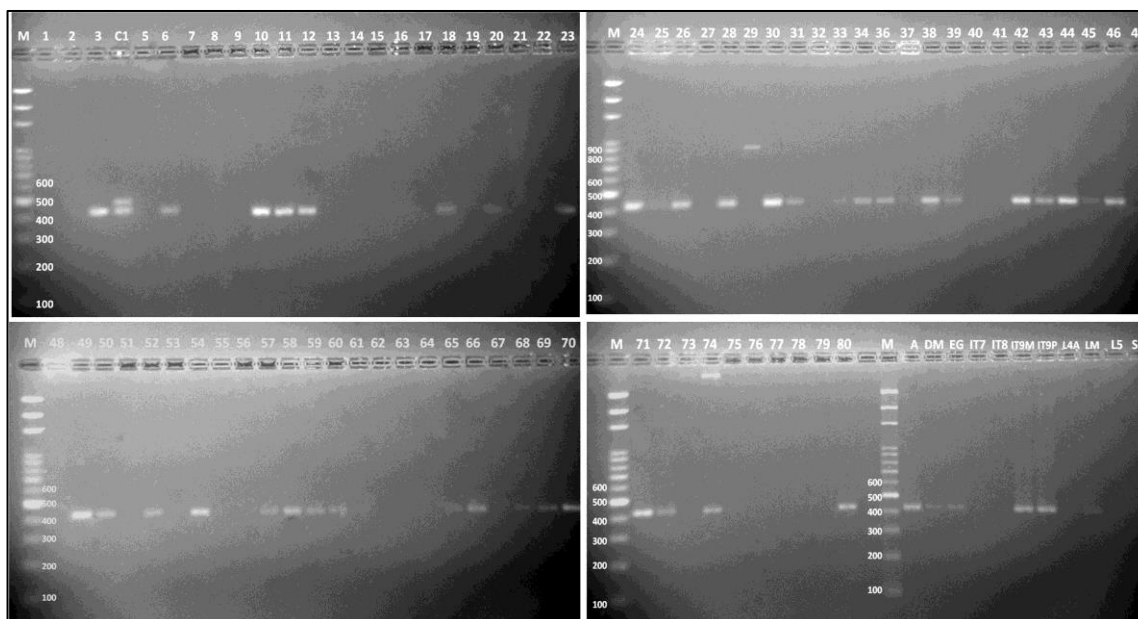
Marcador molecular	JB 1		T0302		P6-25		
Tamaño (pb)	400	500	800	900	320	450	630
Alelo	ty-1	Ty1	ty-2	Ty-2	ty-3	Ty-3	Ty-3a
Tomate criollo	40	0	60	0	58	0	5
Variedades	6	0	10	0	7	2	3
Control de referencia	1	1	1	0	1	0	0

Marcador JB-1:

La variedad Ty52, control de referencia para Ty-1, tuvo las bandas de 400 y 500 pb, de acuerdo a lo esperado. La banda de 400 pb estuvo presente en 40 cultivares criollos y en seis variedades. Ni los cultivares criollos, ni las variedades presentaron la banda de 500 pb (Figura 1).

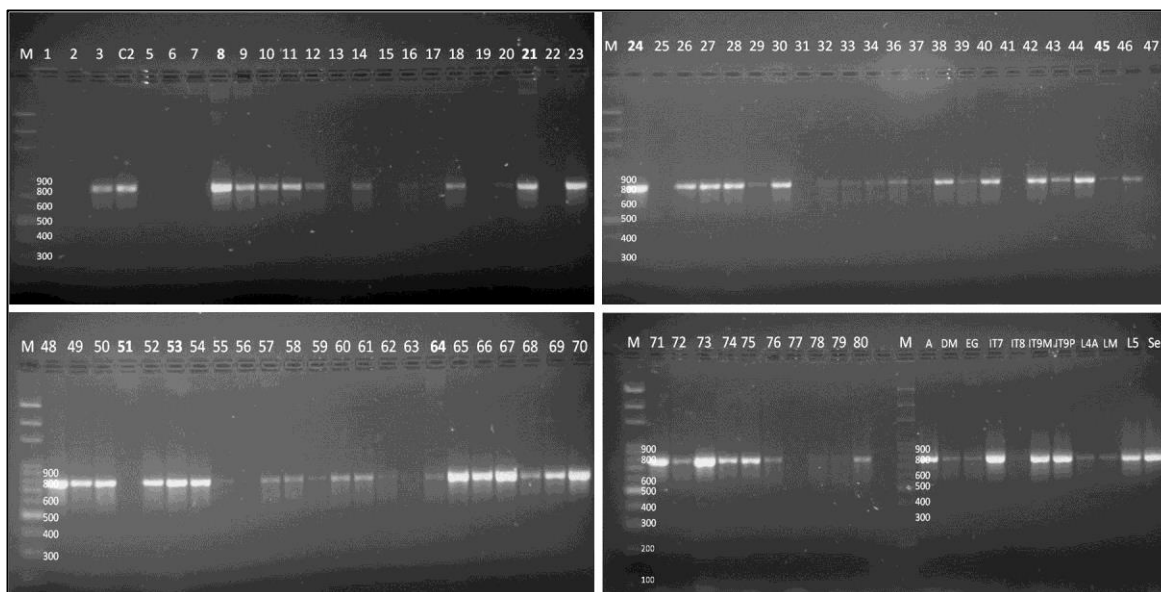
Marcador T0302:

La variedad H24, control de referencia para el gen Ty-2, presentó solo la banda de 800 pb, al igual que 60 cultivares criollos y 10 variedades de tomate. No se detectó el alelo Ty-2 de 900 pb en ninguno de los materiales analizados. El genotipo ty-2/ty-2, homocigoto recesivo para el gen Ty-2, fue el más abundante en la población estudiada (Figura 2).



Clave de las variedades: Dina Mejorado (DM), Entero Grande (EG), IDIAP T7 (IT7), IDIAP T8 (IT8), IDIAP T9m (IT9m), IDIAP T9p (IT9p), L4A, L4A x Multichiltylc (LM), L5, Anabella F₁ (A), Se 122 (Se).

Figura 1. Bandas del marcador JB-1 en cultivares criollos y variedades de tomate.



Clave de las variedades: Dina Mejorada (DM), Entero Grande (EG), IDIAP T7 (IT7), IDIAP T8 (IT8), IDIAP T9m (IT9m), IDIAP T9p (IT9p), L4A, L4A x Multichiltylc (LM), L5, Anabella F₁ (A), Se 122 (Se).

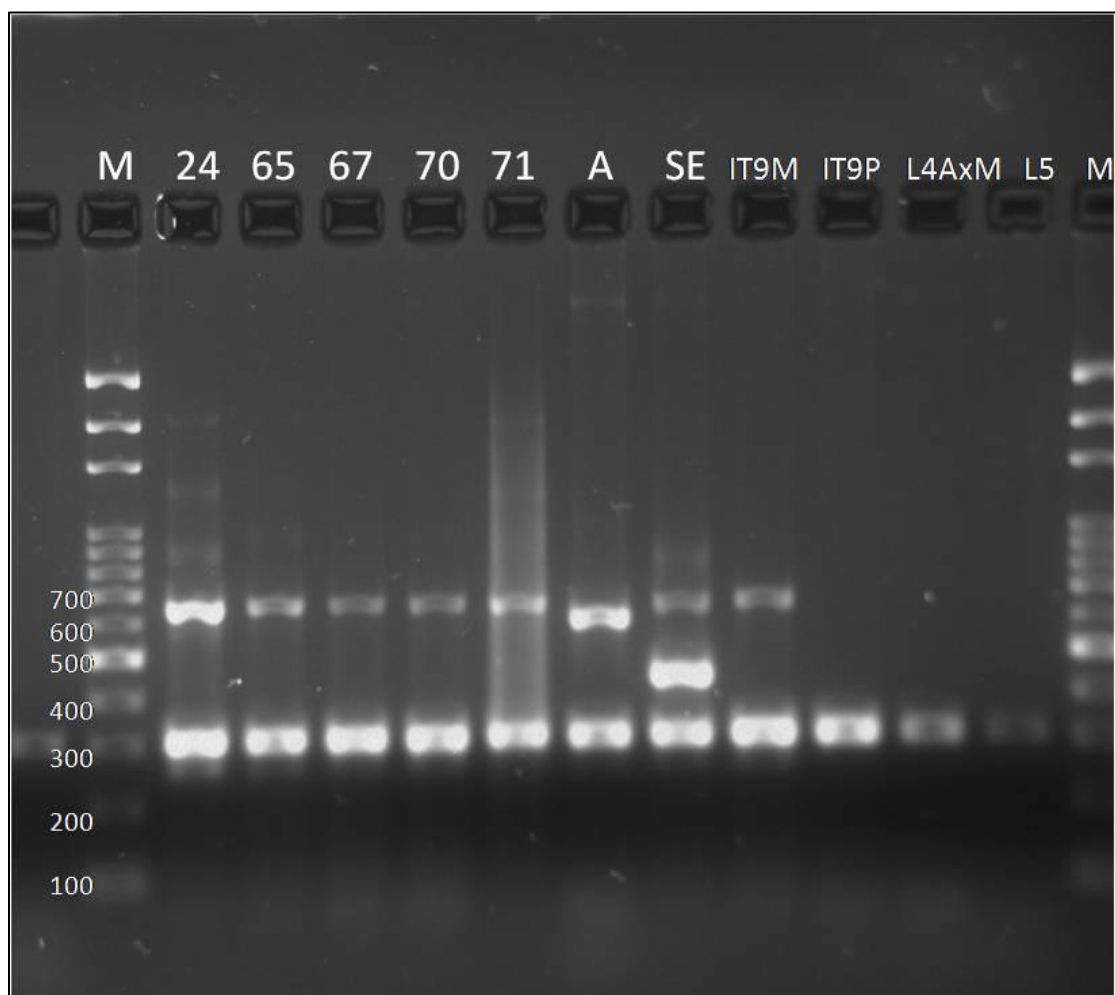
Figura 2. Bandas del marcador T0302 en cultivares criollos y variedades de tomate.

Marcador P6-25:

Los cultivares criollos identificados como 24, 65, 67, 70 y 71 y las variedades Anabella F₁ e IDIAP T9m mostraron bandas de 320 y 630 pb; estos cultivares tienen un genotipo Ty-3a/ty-3. La variedad Se 122 exhibió bandas de 320, 450 y 630 pb y su genotipo es Ty-3/Ty-3a. Las líneas avanzadas L5 y L4A x Multichiltylc solo presentaron la banda de 320 pb. El resultado del análisis con el marcador P6-25 se muestra en la Figura 3.

De acuerdo a Ji et al. (2007), la banda de 320 pb es característica de

los cultivares de *S. lycopersicum* L., y los genes de resistencia Ty-3 se obtienen, por introgresión, de la especie *S. chilense* (Dunal) Reiche: la banda de 450 pb proviene de la accesión de *S. chilense* LA2779 y la banda de 630 pb de la accesión de *S. chilense* LA1932. Estos autores aseguran que el iniciador P6-25 puede identificar un tercer alelo de resistencia, que procede de *S. chilense* LA1969, el cual se ha denominado Ty-3b, cuyo tamaño es 660 pb. En los geles analizados en este trabajo, no fue posible establecer diferencias en el tamaño de las bandas superiores a 600 pb.



Clave de las variedades: Anabella F₁ (A), Se 122 (Se), IDIAP T9m (IT9m), IDIAP T9p (IT9p), L4aXMultichiltylc (LM), L5.

Figura 3. Bandas del marcador P6-25 en cultivares criollos y variedades de tomate.

Ty-3 es un locus mayor que explica un alto grado de variación fenotípica en las dos accesiones de *S. chilense* que aportan este gen de resistencia. Mientras que los genes Ty-1 y Ty-2 expresan dominancia completa, Ty-3 es un gen de herencia aditiva (Ji et al. 2009).

En evaluaciones de campo llevadas a cabo en Sanarate, Guatemala, Mejía et al. (2010), demostraron que la introgresión de los alelos Ty-3 y Ty-3a en híbridos experimentales, confirió un alto nivel de resistencia, similar al de las líneas parentales resistentes, frente al complejo de begomovirus bipartitos presentes en el área. También, la introgresión de

Ty-3a en condición heterocigoto, otorgó resistencia moderada.

Los cultivares criollos 24, 65, 67, 70 y 71, que tienen el alelo Ty-3a de 630 pb, deben ser evaluados para verificar si éste aporta resistencia a los begomovirus encontrados en las zonas de producción de Panamá y América Central, y si es posible su utilización por los proyectos de mejora genética, para el desarrollo de nuevas variedades de tomate.

La variedad IDIAP T9m (fruto redondo), muestra un producto de amplificación con el iniciador P6-25 de 630 pb, que está ausente en la variedad IDIAP T9p (fruto de tipo pera), generada del mismo cruzamiento y proyecto de mejoramiento y que es la variedad que sustenta actualmente la producción de tomate industrial en Panamá, por su alta productividad y tolerancia a marchitez bacteriana. Es recomendable ampliar el estudio de los tomates criollos y variedades con iniciadores específicos para identificación de otros genes de resistencia a begomovirus, tales como Ty-4 y Ty-5.

Secuenciación:

La secuenciación de los productos amplificados P6-25 de 630 pb produjo seis secuencias parciales, de los cultivares criollos 65, 67, 70, 71 y las variedades Anabella F₁ e IDIAP T9m. Las seis secuencias tienen 100% de identidad con la secuencia genómica del clon 56B23 del cromosoma 6 de *S. lycopersicum*, accesión gb|AY678298.1. El alineamiento con la secuencia publicada en NCBI del gen Ty-3a (454 pb) accesión gb|JQ929641.1, reveló identidad de 87%. También, el alineamiento de las secuencias obtenidas en este trabajo, con la secuencia del gen Ty-3a (623 pb) de la línea Gc 171 resistente a begomovirus (Ji et al. 2007), indicó una identidad de 91%. Estos resultados confirman que los cultivares criollos 65, 67, 70 y 71 y las variedades IDIAP T9m y Anabella F₁ poseen el alelo Ty-3a.

CONCLUSIONES

- Mediante técnicas de PCR y secuenciación se identificaron cultivares criollos y variedades de tomate de Panamá, portadoras del gen de resistencia Ty-3, en estado heterocigoto.

- La secuenciación de los fragmentos de 630 pb del marcador molecular P6-25 confirmó la identidad del alelo Ty-3a.
- Los cultivares criollos y variedades estudiados no mostraron fragmentos relacionados con los genes de resistencia Ty-1 y Ty-2.

Horticultura Brasileira (Brasil) 25: 20-23.

CIAT-FONTAGRO (Centro Internacional de Agricultura Tropical - Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria). 2011. Capacitación: Identificación de virus transmitidos por mosca blanca y uso de marcadores moleculares para el control genético de begomovirus en tomate. Unidad de Virología, CIAT. Palmira, CO. Marzo 14 -18 de 2011. 27 p.

BIBLIOGRAFÍA

Agrama, HA; Scott, JW. 2006. Quantitative trait loci for tomato yellow leaf curl virus and tomato mottle virus resistance in tomato. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 131: 267-272.

Anbinder, I; Reuveni, M; Azari, R; Paran, I; Nahon, S; Shlomo, H; Chen, L; Lapidot, M; Levin, I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* 119(3): 519-530.

Boiteux, LS; Oliveira, VR; Silva, CH; Makishima, N; Inoue-Nagata, AK; Fonseca, MEN; Giordano, LB. 2007. Reaction of tomato hybrids carrying the Ty-1 locus to Brazilian bipartite Begomovirus species.

Dueñas-Hurtado, F. 2012. Identificación y aprovechamiento de fuentes de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), frente a begomovirus que afectan el cultivo (en línea). Tesis Ph.D. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas. 100 p. Consultado 2 nov. 2013. Disponible en <http://mst.ama.cu/535/1/TDE1205.pdf>.

Engel, M; Fernández, O; Jeske, H; Frischmuth, T. 1998. Molecular characterization of a new whitefly-transmissible bipartite geminivirus infecting tomato in Panama.

- Journal of General Virology 79: 2313-317.
- Fernández, O. 1990. Enfermedades virales en el tomate. Los Santos, 1987. Resultados de las investigaciones realizadas en 1987. Hortalizas, Raíces y Tubérculos. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. p. 61-62.
- Fernández, O. 2001. Evaluación de progenitores y de líneas de tomate para resistencia a geminivirus. Informes Técnicos Agrícolas 1994-1995. Hortalizas. Volumen 4. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Panamá. p. 457-460.
- García, BE; Graham, E; Jensen, KS; Hanson, P; Mejía, L; Maxwell, DP. 2007. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. Tomato Genetic Cooperative Report 57: 21-24.
- Harris, SA. 1996. Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols. Oxford, G.B. 47 p.
- Hanson, P; Bernacchi, D; Green, S; Tanksley, S; Muniyappa, V; Padmaja, AS; Chen, H M; Kuo, G; Fang, D; Chen, JT. 2000. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. Journal of the American Society of Horticultural Science 125(1):15–20.
- Herrera Vásquez, JA. 2013. Detección de *Begomovirus* mediante PCR en cultivos de tomate de Panamá. In Reunión Anual del PCCMCA 58 (2013, La Ceiba, HN). Memoria. Tegucigalpa, HN. SAG – DICTA. p. 38.
- Ji, Y; Van Betteray, B; Smeets, J; Jensen, KS; Mejía, L; Scott, JW; Havey, MJ; Maxwell, DP. 2007. Co-dominant SCAR Marker, P6-25, for Detection of *Ty-3*, *Ty-3a*, and *Ty3b* introgressions from three *Solanum chilense* accessions at 25 cM of Chromosome 6 of Begomovirus- Resistant Tomatoes (en línea). Consultado 3 jul. 2012. Disponible en: <http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/MAS-Protocols/P6-25-locus.pdf>.

- Ji, Y; Scott, JW; Schuster, DJ. 2009. Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3 of Tomato. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 134(2):281–288.
- Mejía, L; Garcia, BE; Fulladolsa, AC; Sánchez-Pérez, A; Havey, MJ; Teni, R; Maxwell, DP. 2009. Effectiveness of the Ty-3 introgression for conferring resistance in recombinant inbred lines of tomato to bipartite begomoviruses in Guatemala. *Tomato Genetics Cooperative Report* 59:42-47.
- Mejía, L; Teni, RE; García, BE; Fulladolsa, AC; Méndez, L; Melgar, S; Maxwell, DP. 2010. Preliminary Observations on the Effectiveness of five Introgressions for Resistance to Begomoviruses in Tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report* 60:41-53.
- Nakhla, MK; Sorenson, A; Mejía, L; Ramírez, P; Karkashian, JP; Maxwell, DP. 2005. Molecular Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Central America and Development of DNA-Based Detection Methods (en línea). Consultado 1 abr. 2013. Disponible en: <http://www.plantpath.wisc.edu/InVirLab/docs/Beg-CA-Final.htm>.
- Polston, JE; Anderson, PK. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* 81(12): 1358-1369.
- Ponciano Samayoa, K; Morales Montoya, MA. 2012a. Diagnóstico de Begomovirus por medio de marcadores moleculares en cultivares infectados. In LVII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA) (2012, Panamá). Memoria. Panamá, PA. p. 214.
- Ponciano Samayoa, K; Morales Montoya, MA. 2012b. Selección asistida por marcadores moleculares de cultivares de tomate con resistencia a begomovirus. In LVII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el

Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA) (2012, Panamá). Memoria. Panamá, PA. p. 213.

Zúñiga-Vega, C; Ramírez, P. 2002. Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 64: 25-33.

Zamir, D; Michelson, I; Zakay, Y; Navot, N; Zeidan, N; Sarfatti, M; Eshed, Y; Harel, E; Pleban, T; Van-Oss, H; Kedar, N; Rabinowitch, HD; Czosnek, H. 1994. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1. Theoretical and Applied Genetics 88:141-146.