

Growth of four tomato (*Solanum lycopersicon* L.) accessions infected with *Tomato Venezuela Virus* (ToVEV).

Crecimiento de cuatro accesiones de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) infectados con Virus del Tomate de Venezuela (ToVEV)

C. Fernández¹, J. Chirinos, J. Mejías, A. Gómez, F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos y G. Romay

Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. Código postal 4005.

Abstract

In order to evaluate the effect of ToVEV infection on tomato plants, an essay was conducted, in pots and at full sun exposure. Healthy plants of four accessions of tomato, Rio Grande hybrid, El Cid, Rio Orinoco hybrid and Rio Grande variety were infected using reared whiteflies (*Bemisia tabaci* Gennadius) as vector. Leaf area of leaves number 3 and 5, vegetative organs dry mass, fruit dry mass, plant fresh and dry mass were evaluated 22, 44 and 66 days after inoculation (DAI). Significant statistical reduction of all evaluated parameters was detected in infected plants after 44 DAI. El Cid showed the most marked symptoms and greatest reduction in growth among evaluated accessions.

Keywords: ToVEV, growth, tomato, infection, accesiones.

Resumen

Con la finalidad de evaluar el efecto de la infección con *Tomato Venezuela virus* (ToVEV) en plantas de tomate, se realizó un experimento en macetas y a plena exposición solar. Plantas sanas de cuatro accesiones de tomate, Río Grande híbrido, El Cid, Río Orinoco híbrido y Río Grande variedad, se infectaron usando moscas blancas (*Bemisia tabaci* Gennadius) criadas como vector. Se evaluó el área foliar de la hoja 3 y 5, masa seca de los órganos vegetativos y de los frutos, masa fresca y seca de la planta a los 22, 44 y 66 días después de la

Recibido el 30-6-2010 • Aceptado el 5-9-2011

Autor de correspondencia e-mail: cfernandez@fa.luz.edu.ve

Financiado por FONACIT (G-2000001610).

inoculación (DAI). Se detectó una reducción significativa de los parámetros evaluados después de 44 DAI. Entre todas las accesiones evaluadas, El Cid mostró los efectos más marcados del ToVEV.

Palabras clave: ToVEV, crecimiento, tomate, infección, accesiones.

Introduction

ToVEV is a widely distributed begomovirus in Venezuela, and field observations have detected high levels of incidence in tomato (Geraud, F., *unpublished data*). This virus was described by Guzman *et al.* (1997) as *Venezuela Tomato Virus Av1* and AC1 genes, and also named *Tomato Venezuela virus* (ToVEV AF026464) (Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano 2001). Availability of commercial tomato materials resistant to begomovirus of the new world is limited. Some research groups initiatives to overcome these, consisted in evaluation of Tomato Yellow Leaf curl Virus (TYLCV) resistant or tolerant materials to bipartite new world begomovirus (Giordano *et al.*, 1999; Boissot *et al.*, 2008), in which some promising results have been obtained. However, these essays are limited to detect symptom appearance in a short period, but do not consider whole plant performance. In this study we pretend to evaluate tomato plant growth (including vegetative organs and fruits) of extended commercial used materials and one TYLCV resistant material, when infected with ToVEV.

Materials and methods

Seedlings of four commercial tomato materials were used: Rio

Introducción

ToVEV es un begomovirus ampliamente distribuido en Venezuela, observaciones de campo han detectado altos niveles de incidencia en tomate (Geraud, F., *datos no publicados*). Este virus fue descrito por Guzman *et al.*, (1997) como *Tomato Venezuela virus Av1* y genes AC1, y también como *Tomato Venezuela virus* (ToVEV AF026464) (Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano 2001). La disponibilidad de materiales de tomate comercial resistentes a begomovirus del Nuevo mundo es limitado. Algunas iniciativas de grupos de investigación consistieron en evaluar materiales Tomato Yellow Leaf curl Virus (TYLCV) resistente o tolerante a begomovirus del nuevo mundo (Giordano *et al.*, 1999; Boissot *et al.*, 2008), en el cual algunos resultados promisorios han sido obtenidos. Sin embargo, estos ensayos están limitados a detectar la aparición de síntomas en un periodo corto, pero no consideran el desempeño de la planta completa. En este estudio se pretende evaluar el crecimiento de la planta de tomate (incluyendo órganos vegetativos y frutos) de materiales comerciales y un material resistente a TYLCV resistente infectado con ToVEV.

Materiales y métodos

Plántulas de cuatro materiales comerciales de tomate fueron utili-

Orinoco hybrid (ROH), Rio Grande hybrid (RGH), Rio Grande variety (RGV) and El Cid variety (CID). Inoculation with ToVEV was done using sweet potato whiteflies (*Bemisia tabaci* Gennadius) 10 days after transplant to 0.3 L pots, under controlled conditions. Healthy reared whiteflies were feed 24 hours on ToVEV infected tomato plants and liberated in individual cages with target plants for 72 hours (15 *B. tabaci* individuals per plant). Identification of ToVEV in source plants was verified by PCR using primers PAL1v1978 and PAR1c715 (Rojas *et al.*, 1993), followed by sequence of PCR product of 1300 bp, which presented 94% of similarity to Venezuela Tomato Geminivirus AV1 and AC1 genes.

Seedlings were reared in isolation, and after inoculation, plants were treated with imidacloprid (0.04% a.i. v/v) as both foliar spray and soil drench, in order to avoid non desired infections. Plants were transplanted to 6 L (sampled at 22 and 44 days after inoculation (DAI)) and 9 L (sampled at 66 DAI) pots and exposed to full sun. Pots were filled with a mix of river sand, loamy soil and organic matter (1:1:1) and irrigated daily. Plants were fertilized weekly with a complete formulae (18-18-18 and microelements, SOLUB[®]) and a soluble calcium complement (AICAFOLIAR[®]).

Infected and non infected plants were then observed for symptom development. Destructive harvests of 3 to 9 plants, were done at 22, 44 and 66 DAI (53, 75 and 97 days after sowing (DAS), respectively) for each

zados: Río Orinoco híbrido (ROH), Río Grande híbrido (RGH), variedad Río Grande (RGV) y variedad El Cid (CID). La inoculación con ToVEV fue hecha usando mosca de las frutas de la batata (*Bemisia tabaci* Gennadius) 10 días después del transplante en macetas de 0.3 L, bajo condiciones controladas. Moscas sanas fueron alimentadas durante 24 horas en plantas de tomate infectadas con ToVEV y liberadas en jaulas individuales con plantas destino por 72 horas (15 *B. tabaci* individuales por planta). La identificación de ToVEV en plantas fuente fue verificado mediante PCR usando cebadores PAL1v1978 y PAR1c715 (Rojas *et al.*, 1993), seguidos por secuencia de PCR producto de 1300 bp, la cual presentó 94% de similaridad con Venezuela Tomato Geminivirus AV1 y genes AC1.

Las plántulas fueron crecidas aisladamente y después de la inoculación las plantas fueron tratadas con imidacloprid (0.04% a.i. v/v) mediante aspersion foliar e irrigación. Las plantas fueron transplantadas a macetas de 6 L (muestreadas a los 22 y 44 días después de la inoculación (DDI)) y a macetas de 9 L (muestreadas a los 66 DDI) y expuestas a iluminación a plena luz del sol. Las macetas fueron llenadas con una mezcla de arena de río, suelo loamy y materia orgánica (1:1:1) e irrigados diariamente. Las plantas fueron semanalmente fertilizadas con una fórmula completa (18-18-18 y micro elementos, SOLUB[®]) y un complemento de calcio soluble (AICAFOLIAR[®]).

Las plantas infectadas y no infectadas fueron luego observadas du-

accession and infection treatment (non infected/symptom less or infected/with symptoms). In each harvest, plants were sectioned in their organs and leaf area of leaves number 3 and 5 (AFH3, AFH5, respectively), vegetative organs dry mass (PSOVEG), fruit dry mass (PSFTP), plant fresh and dry mass (PFPC, PSPC, respectively) were determined. Leaf area was measured with a MK2 image analyzer (ΔT Decagon Devices, UK). Data were statistically processed using SAS[®] v. 8e. Analysis of variance was performed using PROC GLM. Duncan Waller test was used when significant effects were detected.

Results and discussion

Leaf area of leaves number 3 and 5. Leaf area of infected plants in all tomato materials was reduced when compared with healthy ones independently of harvest date. In AFH3, significance ($P < 0.05$) was detected between infected and non infected plants for ROH, CID and RGV at 44 DAI, and ROH and CID at 66DAI (figure 1A). Although no significance was detected in the other treatments, leaf 3 of infected plants always presented reduced areas. The exception was RGV plants at 66 DAI, which could be attributed to a localized damage caused by mites on healthy plants.

Leaf 5 presented reduced ($P < 0.05$) area at 44 DAI on CID, ROH and RGV infected plants. At 66 DAI only CID and ROH had smaller leaves ($P < 0.05$) (figure 1B). Lack of difference at 66DAI could be

rante el desarrollo de los síntomas. Las cosechas destructivas de 3 a 9 plantas, fueron hechas a los 22, 44 y 66 DDI (53, 75 y 97 días después de la siembra (DDS), respectivamente) para cada accesión y tratamiento de infección (no infectados/con menos síntomas o infectados/con síntomas). En cada cosecha, las plantas fueron seccionadas en sus órganos y área foliar de las hojas números 3 y 5 (AFH3, AFH5, respectivamente), se determinaron la masa seca de los órganos vegetativos (PSOVEG), masa seca del fruto (PSFTP), masa fresca y seca de la planta (PFPC, PSPC, respectivamente). El área foliar fue medida con un analizador de imagen MK2 (ΔT Decagon Devices, UK). Los datos fueron estadísticamente procesados usando SAS[®] v. 8e. El análisis de varianza fue ejecutado usando PROC GLM. La prueba Duncan-Walter fue usada cuando se detectaron efectos significativos.

Resultados y discusión

Área foliar de las hojas números 3 y 5. El área de las plantas en todos los materiales de tomate fue reducido cuando fue comparado con aquellos sanos sin considerar la fecha de cosecha. En AFH3, la significancia ($P < 0.05$) fue detectada entre plantas infectadas y no infectadas para ROH, CID y RGV a los 44 DDI, y ROH y CID a los 66 DDI (figura 1A). Aunque no se detectó significancia en los otros tratamientos, la hoja 3 de las plantas infectadas siempre mostró áreas reducidas. Las plantas RGV fueron la excepción a los 66 DDI, lo que pudo ser atribui-

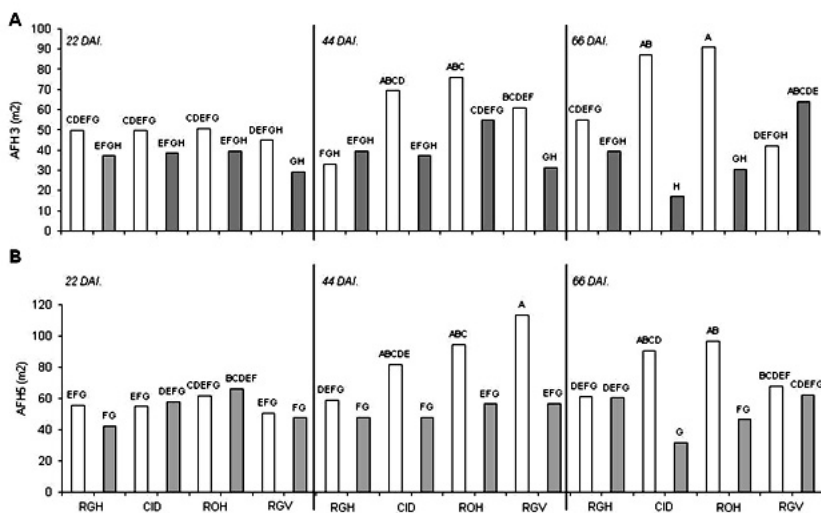


Figure 1. Leaf area of leaves 3(A) and 5(B) (AFH3 and AFH5, respectively) for infected and uninfected plants of Rio Orinoco hybrid (ROH), Rio Grande hybrid (RGH), Rio Grande variety (RGV) and El Cid variety (CID) tomato accessions 22, 44 and 66 days after inoculation (22DAI, 44 DAI and 66DAI, respectively). Shaded columns, infected plants; open columns, uninfected plants. Means with different letters indicate significant differences by Duncan-Waller test ($P < 0.05$).

Figura 1. Área foliar de las hojas 3(A) y 5(B) (AFH3 y AFH5, respectivamente) para plantas del híbrido Río Orinoco (ROH), híbrido Río Grande (RGH), variedad Río Grande (RGV) y variedad El Cid (CID) en accesiones de tomate infectadas y no infectadas a los 22, 44 y 66 días después de la inoculación (22 DDI, 44 DDI y 66 DDI, respectivamente). Columnas sombreadas, plantas infectadas; columnas abiertas, plantas no infectadas. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Duncan-Waller ($P < 0.05$).

associated to mite damage in RGH and RGV plants. Although the percentage of yellowing was not measured, it was present in all infected plants, being most serious in CID, in which leaves turned almost completely white when the disease advanced. Sampol *et al.* (2003), observed a 52% leaf area reduction of

do al daño localizado causado por ácaros a las plantas sanas.

La hoja 5 mostró área reducida ($P < 0.05$) a los 44 DDI en las plantas infectadas CID, ROH y RGV. A los 66 DDI sólo CID y ROH tuvieron hojas más pequeñas ($P < 0.05$) (figura 1B). La falta de diferencia a los 66 DDI puede estar asociada al daño por ácaros en

grapevine plants infected with grapevine fan leaf virus (GFLV), and grapevine leaf roll-associated virus (GLRaV), associated to a reduction in net photosynthesis of 45.2%, but Funayama and Terashima (2006) also observed photosynthesis reduction in *Eupatorium makinoi* but no effects on leaf area of plants infected with *Eupatorium* yellow vein virus.

Vegetative organs and fruits dry mass. figure 2A shows dry mass of plant vegetative organs of each material at the three different harvests. At 22 DAI, no differences were observed between infected and no infected plants. Statistical differences ($P < 0.05$) were observed at 44 and 66 DAI for CID and RGV infected plants, with a reduction of 30 and 45%, respectively. Hybrid materials (ROH and RGH) showed similar values for healthy and infected plants, which can be explained by their more determined growth habit. In determined plants a reduction in photoassimilates directed to new vegetative growth occurs at a certain age, while partitioning to fruits is enhanced. Considering the age of plants at inoculation, and time between infection and symptom appearance, reduced effects on hybrid - determined accessions were as expected.

Significative ($P < 0.05$) reduction (approximately 80%) in dry matter accumulation could be observed in fruits of infected plants (figure 2B) for all materials evaluated at the third harvest (66DAI). This reduction could be explained by the reduced photosynthesis in infected leaves and the changes in source sink relationships in these plants (Biemelt

las plantas RGH y RGV. Aunque el porcentaje de amarillamiento no fue medido, estuvo presente en todas las plantas infectadas, siendo más serio en CID, donde las hojas se volvieron casi totalmente blancas cuando la enfermedad avanzó. Sampol *et al.*, (2003), observó 52% de la reducción del área foliar de las plantas de uva de mesa infectadas con el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV), y el virus asociado al síndrome del enrollado de la vid (GLRaV), asociado con la reducción en la fotosíntesis neta of 45.2%, pero Funayama y Terashima (2006) también observaron reducción en la fotosíntesis en *Eupatorium makinoi* pero no hubo efectos en el área foliar de las plantas infectadas con el virus de la vena amarilla *Eupatorium*.

Masa seca de órganos vegetativos. La figura 2A presenta la masa seca de los órganos vegetativos de la planta de cada uno de los materiales en las tres diferentes cosechas. A los 22 DDI, no hubo diferencias entre las plantas infectadas y las no infectadas. Se observaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) a los 44 y 66 DDI para plantas infectadas CID y RGV, con una reducción de 30 y 45%, respectivamente. Los materiales híbridos (ROH y RGH) mostraron valores similares para plantas sanas e infectadas, lo cual puede ser explicado por su hábito de crecimiento más determinado. En determinadas plantas una reducción en la fotosíntesis dirigida a nuevo crecimiento vegetativo ocurre en cierto momento, mientras la división en los frutos es mejorada. Considerando la edad de las plantas en la inoculación y el tiempo entre la infección y la

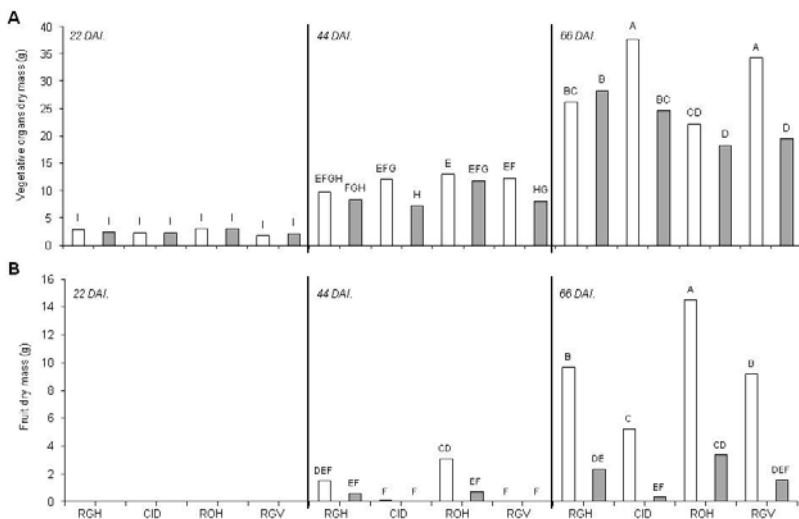


Figure 2. Plant vegetative organs (A) and fruit (B) dry mass for infected and uninfected plants of Rio Orinoco hybrid (ROH), Rio Grande hybrid (RGH), Rio Grande variety (RGV) and El Cid variety (CID) tomato accessions, 22, 44 and 66 days after inoculation (22DAI, 44 DAI and 66DAI, respectively). Shaded columns, infected plants; open columns, uninfected plants. Means with different letters indicate significant differences by Duncan-Waller test (P<0.05).

Figure 2. Masa seca de los órganos vegetativos de la planta (A) y fruto (B) para plantas del híbrido Río Orinoco (ROH), híbrido Río Grande (RGH), variedad Río Grande (RGV) y variedad El Cid (CID) en accesiones de tomate infectadas y no infectadas a los 22, 44 y 66 días después de la inoculación (22 DDI, 44 DDI y 66 DDI, respectivamente). Columnas sombreadas, plantas infectadas; columnas abiertas, plantas no infectadas. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Duncan-Waller (P<0.05).

and Sonniewald, 2006). At 44 DAI hybrid materials (RGH, ROH) reached fruit set, and both presented reduced fruit dry mass on infected plants (45 and 70%, respectively when compared to non infected), although only infected ROH statistically differs from healthy plants. Infected hybrid-more determinated growth accessions (RGH, ROH) presented great

aparición de los síntomas, se esperaban los efectos reducidos en híbrido-accesiones determinadas.

Una reducción significativa (P<0.05 -aproximadamente 80%) en la acumulación de materia seca puede ser observada en los frutos de las plantas infectadas (figura 2B) para todos los materiales evaluados en la tercera cosecha (66 DDI). Esta reducción

reductions in fruit dry mass although their vegetative organ dry mass were similar to healthy plants.

Plant fresh and dry mass.

Whole plant fresh and dry mass were severely affected by virus infection, in the case of fresh mass reductions were 50 to 70% (figure 3A), and in dry mass

puede explicarse a través de la fotosíntesis reducida en las hojas infectadas y los cambios en las relaciones de fuente de disminución en estas plantas (Biemelt y Sonnewald, 2006). A los 44 DDI, los materiales híbrido (RGH, ROH) alcanzaron el establecimiento del fruto, y ambos presentaron reduc-

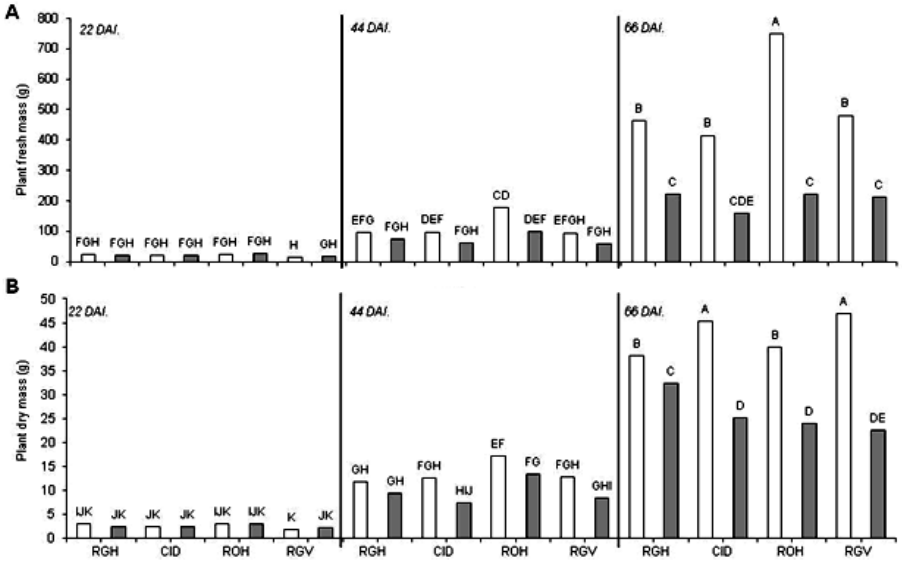


Figure 3. Plants fresh (A) and dry (B) mass for infected and uninfected plants of Rio Orinoco hybrid (ROH), Rio Grande hybrid (RGH), Rio Grande variety (RGV) and El Cid variety (CID) tomato accessions, 22, 44 and 66 days after inoculation (22DAI, 44 DAI and 66DAI, respectively). Shaded columns, infected plants; open columns, uninfected plants. Means with different letters indicate significant differences by Duncan-Waller test ($P < 0.05$).

Figura 3. Masa fresca (A) y seca (B) de plantas del híbrido Río Orinoco (ROH), híbrido Río Grande (RGH), variedad Río Grande (RGV) y variedad El Cid (CID) en accesiones de tomate infectadas y no infectadas a los 22, 44 y 66 días después de la inoculación (22 DDI, 44 DDI y 66 DDI, respectivamente). Columnas sombreadas, plantas infectadas; columnas abiertas, plantas no infectadas. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Duncan-Waller ($P < 0.05$).

were 15 to 55% at 66 DAI (figure 3B). Differences were significant ($P < 0.05$) for all materials. Greatest reduction was observed on RGV while RGH showed the least. Although reduction was observed at 44DAI, no significant differences were detected at this age. ROH showed contrasting behaviour between fresh and dry mass. ROH plants presented the higher fresh mass of all materials, but in dry mass it was reduced to the third place. That fact that this accession presented the higher proportion of fruits may explain it, considering the high water content of these organs. Growth of plants is an expression of photosynthesis and ability of plants to harmonically allocate assimilates produced by this process. Viral effects on photosynthesis and assimilate transport might affected growth of all materials evaluated in this experiment. Although previous results showed resistance of CID plants to TYLCV (Geraud *et al.*, 2009), symptom development and growth reduction reveals its susceptibility to ToVEV.

Conclusion

ToVEV reduced growth and fruit production in tomato accession evaluated in this experiment. Growth reduction was more severe as plant age after inoculation advanced.

Literature cited

Argüello-Astorga, G and R. Ruiz-Medrano. (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of

ción de la masa seca del fruto en las plantas infectadas (45 y 70%, respectivamente cuando se comparó con las no infectadas), aunque sólo las ROH infectadas difirieron estadísticamente de aquellas plantas sanas. Las plantas híbrido infectadas – con más accesiones de crecimiento determinado (RGH, ROH) presentaron grandes reducciones en la masa seca del fruto aunque su masa seca de órgano vegetativo fue similar a las plantas sanas.

Masa seca y fresca de la planta. La masa fresca y seca de la planta completa fueron severamente afectadas por la infección del virus, en el caso de las reducciones de masa fresca fueron 50 a 70% (figura 3A), y en el caso de la seca fueron 15 a 55% a los 66 DDI (figura 3B). Las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) para todos los materiales. La mayor reducción fue observada en RGV, mientras que RGH mostró el más bajo. A pesar que la reducción fue observada a los 44 DDI, no hubo diferencias significativas en este momento. ROH evidenció un comportamiento contrastante entre las masas fresca y seca. Las plantas ROH presentaron la mayor masa fresca de todos los materiales, pero en la masa seca se redujo al tercer lugar. Este hecho puede explicarse considerando el mayor contenido de agua en estos órganos. El crecimiento de las plantas es una expresión de la fotosíntesis y la habilidad de las plantas para ubicar armoniosamente los asimilados producidos por este proceso. Los efectos virales en la fotosíntesis y el transporte de los asimilados pudo afectar

geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol.* 146: 1465-1485.

Biemelt, S., and U. Sonnewald. 2006. Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163(3): 307-318.

Boissot, N., C. Urbino, J. Dintinger and C. Pavis. 2008. Vector and graft inoculations of *Potato yellow mosaic virus* reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Ann Appl Biol.* 152(2):263-269.

Funayama, S. and I. Terashima. 2006. Effects of *Eupatorium* yellow vein virus infection on photosynthetic rate, chlorophyll content and chloroplast structure in leaves of *Eupatorium makinoi* during leaf development. *Funct Plant Biol.* 33:165-175.

Geraud, F., D.T. Chirinos, G. Romay, M.A. Santana, L. Bastidas, C. Fernández and L. Flores. 2009. Transmisión del TYLCV a diferentes materiales de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) mediado por el Biotipo B del complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Venezuela. *Bioagro.* 21(1): 21-33.

Giordano, L.B., I.C. Bezerra, P.T.O. Ferreira and C.R. Borges-Neto. 1999. Breeding tomatoes for resistance to whiteflies transmitted geminivirus with bipartite genome in Brazil. *Acta Hort.* (ISHS). 487: 357-360.

Guzman, P., C.R. Arredondo, D. Emmatty, R.J. Portillo and R.L. Gilbertson. 1997. Partial characterization of two whitefly-

el crecimiento de todos los materiales evaluados en este experimento. Aunque resultados previos mostraron la resistencia de las plantas CID al TYLCV (Geraud *et al.*, 2009), el desarrollo de los síntomas y la reducción del crecimiento muestran su susceptibilidad al ToVEV.

Conclusión

El ToVEV redujo el crecimiento y la producción del fruto de las accesiones de tomate evaluadas en este experimento. La reducción del crecimiento fue más severa con la edad de la planta después de una inoculación avanzada.

Fin de la versión en español

transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant. Dis.* 81(3): 312.

Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and D.P Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant. Dis.* 77: 340-347.

Sampol, B., J. Bota, D. Riera, H. Medrano, and J. Flexas. 2003. Analysis of the virus induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist.* 160:403-412.