

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS DE TOMATE PROMISORIOS OBTENIDOS EN EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO FRENTE AL TYLCV

Yailen Arias¹, Belkis Peteira², Ivonne González², Yomaris Fraga², Belkis Pino², Yamila Martínez², Ileana Miranda², Oriela Pino²

1. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba, yailenav@censa.edu.cu

2. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.

Introducción.

El TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) constituye en la actualidad uno de los patógenos virales más devastadores del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) (1,2). Por la importancia que tiene esta hortaliza en los hábitos alimenticios de gran parte de la población mundial (3), se han establecido programas de manejo que incluyen tanto la aplicación de métodos tradicionales, el control físico, químico y biológico sobre el vector (4), como el empleo de variedades resistentes, siendo éste último método una alternativa más amigable para la salud del hombre y para el medio ambiente, en general (5,6).

Con el propósito de obtener nuevas variedades que sean altamente resistentes al TYLCV, en nuestro país se han establecido importantes programas de mejoramiento genético (7), los cuales dependen, en gran medida, de la disponibilidad de una amplia variabilidad genética (8,9).

En la actualidad, los marcadores moleculares constituyen una herramienta útil por su aplicación tanto en la identificación de accesiones como en la caracterización de la diversidad genética con fines mejoradores (10,11). Los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) y las enzimas, particularmente, constituyen una técnica poderosa para la identificación de variaciones en la secuencia de ADN entre individuos (11,12).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la variabilidad genética existente entre seis genotipos promisorios de tomate, obtenidos en programas de mejoramiento genético frente al TYLCV, mediante el empleo de los RAPD y diferentes sistemas enzimáticos.

Materiales y Métodos.

Los genotipos empleados en el análisis se muestran en la tabla 1 y son procedentes del programa de mejoramiento desarrollado en el Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova (IIHLD), en la provincia de La Habana, Cuba. La extracción de ADN se realizó por el método de Dellaporta y colaboradores (13) a partir de una mezcla de hojas jóvenes frescas, recolectadas de cinco individuos para cada genotipo, en plantas completamente sanas y con cuatro semanas de germinadas, las cuales habían sido mantenidas en condiciones semicontroladas de casa de cristal. Los precipitados finales obtenidos fueron disueltos en solución amortiguadora TE, conservados a - 20°C y la concentración de ADN total se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (14).

TABLA 1: Genotipos de tomate empleados en la determinación de variabilidad genética.

No.	Genotipos (Origen)
1	13/8/2 (Parental susceptible)
2	13/8/1 (Parental resistente)
3	(13/8/1 x 13/8/2) F2
4	(13/8/1 x 13/8/2) F1 x 13/8/2
5	(13/8/1 x 13/8/2) F1 x 13/8/1
6	(13/8/1 x 13/8/2) F1

Para el desarrollo de la técnica RAPD se utilizaron los siguientes cebadores arbitrarios: OPA2, OPA3, OPA4, OPA5, OPA8, OPA9, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA20, OPF1, provenientes de la firma comercial Operon Technologies INC, Alameda, California. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25µL que contenía: 10mM Tris-HCl a pH 8.3; 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0,001% de gelatina, 100µM de cada dNTPs, 0,2µM de cebador, 50ng de ADN genómica y 1U de Taq ADN polimerasa (Amplicen). La amplificación se produjo en un termociclador marca Master Cycler, programado para 45 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C, y un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora TBE (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA), y se tiñeron con bromuro de etidio (14). El peso molecular de los fragmentos amplificados se estimó usando el marcador 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Los productos de la PCR se informaron como presentes [1] o como ausentes [0] en cada genotipo, creando así una matriz de valores binarios. Se analizaron las bandas más intensas y con los datos obtenidos se calculó el índice de similitud entre cada par de genotipos, según Jaccard (15), los que fueron empleados para la construcción de un dendrograma. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el empleo del programa InfoStat (16).

Para las enzimas, a los 45 días de edad de las plántulas, se realizaron las determinaciones de proteínas totales, compuestos fenólicos, actividades enzimáticas PO, PPO y PAL, así como las isoenzimas PO y PPO (según Arias 2007). Para las determinaciones de proteínas totales, fenoles y actividades enzimáticas, se realizaron tres réplicas. Todos los datos fueron comparados a través de un Análisis de Varianza Factorial y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan con una $p < 0,05$, usando el programa InfoStat versión 2009 (InfoStat 2009).

Resultados y discusión.

Los 12 cebadores empleados fueron capaces de amplificar un total de 92 bandas, con un promedio de 7 bandas por cebador, destacándose el OPA2 con 11 bandas amplificadas, mientras que el OPA11 solo amplificó 5 bandas. También es importante señalar que de las 92 bandas amplificadas, solo 20 permitieron encontrar diferencias, en lo cual influyó principalmente el cebador OPA2 con 6 bandas polimórficas de las 11 amplificadas.

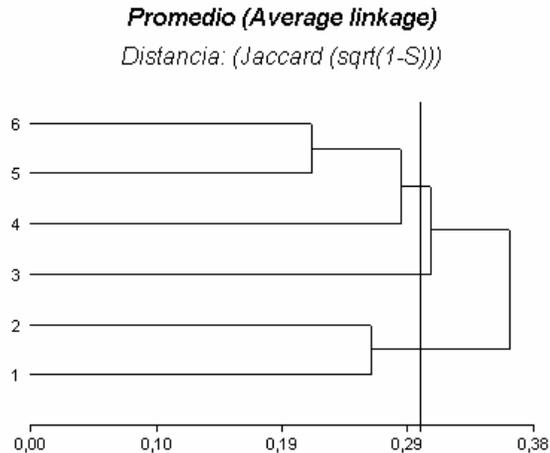


FIGURA 1: Análisis de agrupamiento entre los genotipos de tomate estudiados.

El dendrograma resultante de las distancias genéticas (Fig.1) mostró la formación de tres grupos para un 70% de similitud aproximadamente. Un de ellos quedó formado por los parentales, los cuales son genotipos que provienen del mismo cruzamiento, por lo que tienen progenitores en común. Sin embargo, se conoce que difieren en cuanto a la resistencia frente al *TYLCV* (17). Debido a esto es posible que los cebadores empleados no hayan sido capaces de amplificar las regiones que codifican para esta diferencia. En otra rama se agruparon la F1 y los dos retrocruzamientos, resultados que no son sorprendentes si tenemos en cuenta el nivel de parentesco entre los progenitores. El tercer grupo quedó formado solamente por la F2, que aunque también forma parte de la descendencia, existen mayores probabilidades de recombinación y segregación, lo que pudo influir en el hecho de que formara un grupo por separado.

Los marcadores RAPD pueden conducir, en ocasiones, a una subestimación de la cantidad de polimorfismo existente entre individuos debido a, entre otros elementos, que ellos son dominantes, por lo que no tienen posibilidad de diferenciar heterosis de homocigosis (18). Sin embargo a pesar de este inconveniente siguen siendo ampliamente usados como una primera aproximación en los estudios de variabilidad genética en las plantas (11).

De forma general se puede decir que se encontró escasa variabilidad entre los genotipos estudiados, lo que no resulta contradictorio ya que todos los genotipos están estrechamente emparentados. Resultados similares de baja variabilidad en el cultivo del tomate, mediante el empleo de los RAPD, han sido informados con anterioridad (19), atribuyendo la escasez de diferencias, principalmente, al proceso de desarrollo de variedades comerciales (19,9). Estos resultados han sido corroborados además, con el uso de marcadores isoenzimáticos, a través de los cuales se ha encontrado una gran homogeneidad dentro del género *Lycopersicon* (20) y también utilizando técnicas moleculares como los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (21) y los SSR (Simple Sequence Repeat) (9).

No obstante, recomendamos ampliar el número de cebadores a utilizar en este tipo de estudio, seleccionando aquellos que rinden mas bandas producto de la amplificación.

Los niveles de proteínas totales alcanzados por los genotipos fueron estadísticamente diferentes, destacándose los genotipos 5 y 6 con los mayores niveles, mientras que el genotipo 2, a pesar de ser el parental resistente, alcanzó los valores más bajos (Fig. 2). Esto no quiere decir que al estar en contacto con el *TYLCV*, no aumenten los niveles de proteínas inducidas y

la planta pueda responder de forma más eficiente ante la presencia del patógeno. Los genotipos 1 y 3 también mostraron valores significativos en los niveles de proteínas totales.

Para el caso de la actividad específica PO, el genotipo 4 se destacó con valores significativamente superiores al resto de los genotipos, mientras que el genotipo 3 alcanzó los menores niveles de actividad enzimática. Los genotipos 1 y 2 mostraron también valores elevados de actividad para esta enzima (Fig. 3).

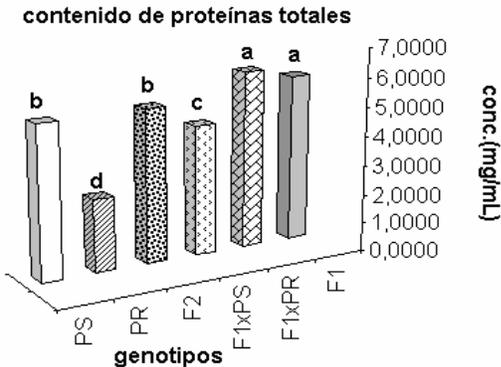


FIGURA 2: Contenido de proteínas totales para los genotipos de tomate estudiados.

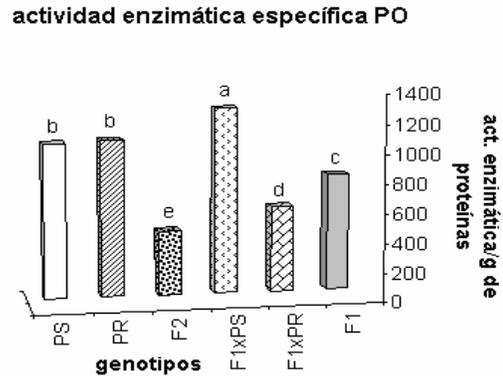


FIGURA 3: Actividad enzimática específica PO para los genotipos de tomate estudiados.

El análisis de la actividad específica PPO (Fig. 4) mostró al genotipo 2 con los mayores niveles de actividad para esta enzima, diferenciándose estadísticamente del resto de los genotipos. En este caso se destaca también el genotipo 3 con valores significativos, mientras que el genotipo 5 alcanzó los niveles más bajos de actividad PPO.

En el análisis de la actividad para la enzima PAL (Fig. 5), se observó poca diferencia entre los genotipos estudiados, aunque los genotipos 1, 2 y 4 alcanzaron los mayores niveles de actividad para esta enzima.

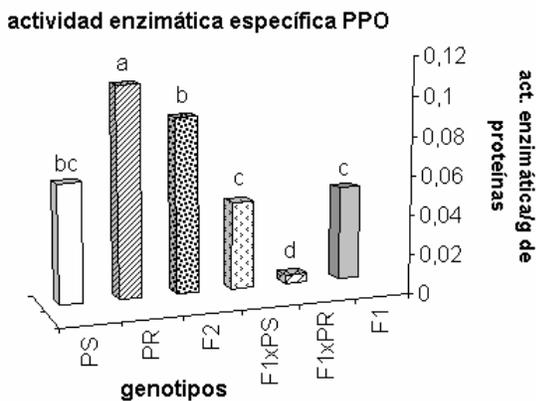


FIGURA 4: Actividad enzimática específica PPO para los genotipos de tomate estudiados.

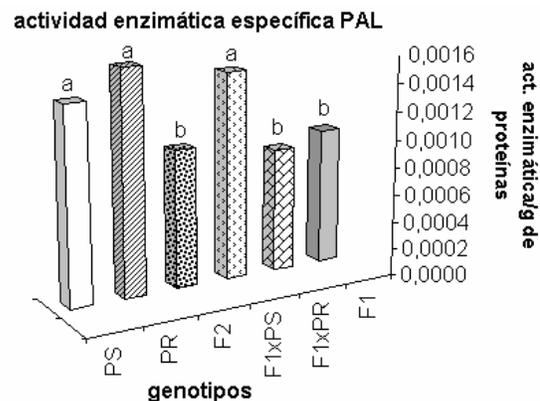


FIGURA 5: Actividad enzimática específica PAL para los genotipos de tomate estudiados.

En la Figura 6 aparece el gel de poliacrilamida y el zimograma obtenido para las isoenzimas PO. En él se observa la expresión de tres isoformas comunes para todos los genotipos

estudiados, diferenciándose fundamentalmente, el genotipo 1 por la intensidad de sus bandas en comparación con el resto de los genotipos.

El gel y el zimograma para las osienzimas PPO (Fig. 7), mostraron también la expresión de tres isoformas comunes para todos los genotipos, aunque el genotipo 1 mostró la expresión de una banda adicional, destacándose nuevamente por la intensidad de sus bandas.

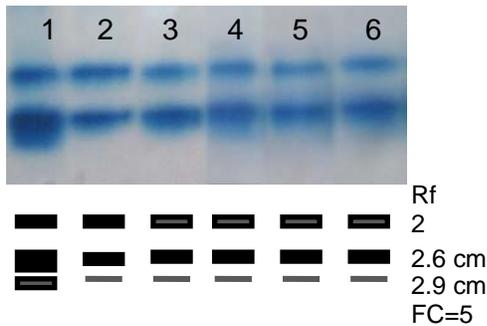


FIGURA 6: Gel de electroforesis y zimograma de las isoenzimas PO para los genotipos de tomate estudiados.

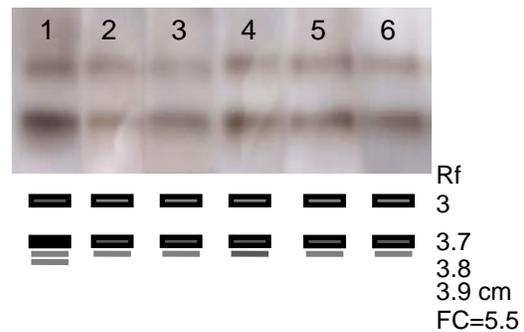


FIGURA 7: Gel de electroforesis y zimograma de las isoenzimas PPO para los genotipos de tomate estudiados.

Resultados en estudios anteriores, donde se analizaron otros genotipos de tomate, mostraron también la expresión de tres isoformas comunes para todos los genotipos en ambos sistemas enzimáticos. La no correspondencia entre las intensidades de las bandas y las actividades enzimáticas mostradas por los genotipos pudiera deberse a que no siempre existe una relación directamente proporcional entre la intensidad y el número de bandas con la actividad de las isoformas detectadas, pues los sistemas enzimáticos PO y PPO están codificados por familias de 8 y 7 genes respectivamente, cuya expresión y actividad dependen del estado fenológico de la planta (Arias 2007tesis).

En relación al contenido de fenoles, tanto el análisis cuantitativo como el cualitativo, mostró escasas diferencias entre los genotipos estudiados, pues en todos se observaron valores similares en los niveles de compuestos fenólicos (Fig. 8) y la composición para cada uno de ellos también fue muy parecida, detectándose dos manchas para todos, con iguales valores de Rf, exceptuándose el genotipo 1, donde la primera de sus manchas no mostró afinidad suficiente con la fase móvil empleada (Tabla 2).

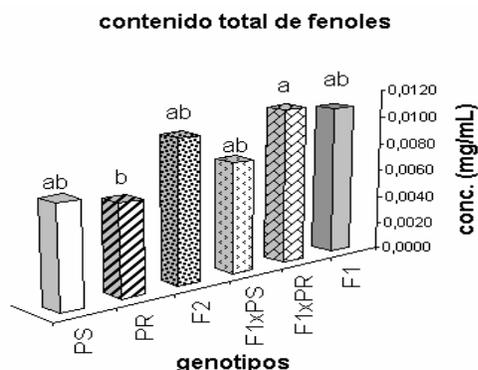


FIGURA 8: Contenido total de compuestos fenólicos para los genotipos de tomate estudiados.

Genotipos	Mancha 1	Mancha 2
PS	0 cm	0.7 cm
PR	0.1 cm	0.7 cm
F2	0.1 cm	0.7 cm
F1xPS	0.1 cm	0.7 cm
F1xPR	0.1 cm	0.7 cm
F1	0.1 cm	0.7 cm

TABLA 2: Rf de los cromatogramas de los compuestos fenólicos en los genotipos de tomate estudiados.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Arias (2007), donde se detectaron siete manchas iguales para todos los genotipos estudiados.

De forma general, los genotipos mostraron poca variabilidad en cuanto a su comportamiento, concordando plenamente con los resultados obtenidos durante el estudio molecular (15). La escasa variabilidad bioquímica también puede deberse, a que los genotipos 1 y 2, parentales del resto, tienen progenitores comunes y solo se diferencian en cuanto a la resistencia frente al TYLCV (16). No obstante, la F2 mostró un comportamiento más estable para todas las variables analizadas, en comparación con la F1 y los dos retrocruzamientos.

REFERENCIAS

1. Péres de Castro A, Díez MJ y Nuez F. Inheritance of tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV 16991. *Plant Disease*.2007; 91: 879-885.
2. Raj SK, Singh R, Pandey SK y Singh BP. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and generation of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TYLCV infection. *Curr. Science*. 2005; 88(10):1674-1679.
3. Florido M. Evaluación de la tolerancia al calor en muestras de germoplasma de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *ex situ* en Cuba. [Tesis de Doctorado]. La Habana, Cuba; 2007.
4. Martínez Y, Quiñónes M, Fonseca D y Miranda I. Prospección nacional de begomovirus presentes en el cultivo del tomate en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2003; 18(3):168-175.
5. Martínez AK, Morales FJ y Vallejo FA. Caracterización molecular de un begomovirus del tomate en el Valle del Cauca, Colombia, y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. *Acta Agron.* 2008; 57(3):167-173.
6. González-Cabezuelo JM, Tomás DM, Lorente I, Abad J, Fernández-Muñoz R y Lozano R. Marcadores moleculares ligados a la resistencia a TYLCD en tomate. *Actas de Horticultura n° 48*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. XI Congreso SECH. Albacete 2007.
7. F. Dueñas, Martínez Y, Álvarez M, Moya C, Peteira B y Arias Y. Identificación de los genes *ty-2* y *ty-3* de resistencia a *begomovirus* y su grado de homocigosis en nuevas accesiones de tomate. *Cultivos Tropicales*. 2009; 30(1): 61-64.

8. Paredes W. Mejoramiento genético en plantas [monografía en Internet]. Universidad Nacional de San Agustín Arequipa – PERÚ 2007[citado 27 Enero 2010]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos53/mejoramiento-plantas/mejoramiento-plantas.shtml>
9. Jia Chen, Hui Wang, Houlin Shen, Min Chai, Jisuo Li, Mingfang Oi y col. Genetic variation in tomato population from four breeding programs revealed by single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*. 2009; 122: 6-16.
10. Azofeifa-Delgado A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 2006; 17(2): 221-242.
11. Venkatachalam L, Sreedhar RV y Bhagyalakshmi N. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008; 47: 974-985.
12. González O, Fernández A, Fraga Y, Pino B, Hernández MM y Silava J J. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en plantas de *Ipomoea batatas*. *Cultivos tropicales*. 2007; 28(2):39-43.
13. Dellaporta SL, Wood J y Hichs JR. A plant molecular DNA minipreparation, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983; 1:19-21.
14. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: N Y, USA; 1989.
15. Jaccard. Etude comparative de la distribution florale dans one partion des Alpes et des Jura. *Bull. Soc. Vaudoise. Sci. Nat.* 1901; 37:547-579.
16. InfoStat (2009). *InfoStat version 2009*. Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
17. Piñón, M. Obtención de líneas de tomate (*Solanum lycopersicon* L) resistentes al Virus del Encrespamiento Amarillo de la Hoja del Tomate (TYLCV) en Cuba. [Tesis de Doctorado]. INCA; 2009.
18. Méndez A, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, y Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 2005; 13(1):30-42.
19. Florido, M. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfo-bioquímicas y tolerancia al calor. [Tesis de Maestría en Biología Vegetal]. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana; 1999.
20. Florido, M, Álvarez M, Lara R M, Plana D, Valera M, Shagarodsky T y Moya C. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon spp*). *Cultivos Tropicales*. 2002; 23(4); 61-69.
21. Florido M, Arencibia A, Plana D, Álvarez M, López J y Lara RM. Análisis de la diversidad genética en tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) utilizando AFLP. *Cultivos tropicales*. 2007; 28(3): 83-87.