



IDENTIFICACIÓN DEL GEN *Ty-3*, DE RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS, EN ACCESIONES DE *Solanum lycopersicum* L.

Identification of the *Ty-3* gene, of resistance to begomovirus, in accessions of *Solanum lycopersicum* L.

Francisco Dueñas Hurtado[✉], Marta Álvarez Gil, Carlos Moya López y Yamila Martínez Zubiaur

ABSTRACT. *Tomato Yellow Leaf Curl* disease is one of the most important problems affecting tomato cultivation in most part of the Cuban growing areas and in other countries. The casual agent is the *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV). At the moment several genes related with the resistance have been described. The genes *Ty-1*, *Ty-2* and *Ty-3* are those that more they have been used in the plant breeding programs of the species. In Cuba, *Vyta* is only variety that had *Ty-1* gene and other accessions carrying the *Ty-2* gene. The amplification of the gene *Ty-3* was carried out for PCR and were used the specific primers FLUW-25R and FLUW-25F. In this work the presence of the band related with the resistant pattern of the gene *Ty-3* was identified in one that six characterized accessions.

Key words: geminivirus, tomato yellow leaf curl, genetic resistance

RESUMEN. La enfermedad del rizado amarillo del tomate, cuyo agente causal es el *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) constituye, uno de los principales problemas para el cultivo en las regiones productoras de Cuba y el mundo. En la actualidad se han descrito varios genes relacionados con la resistencia. Los genes *Ty-1*, *Ty-2* y *Ty-3* son los que más se han empleado en los programas de mejoramiento genético de la especie. En Cuba, solo se cuenta con una variedad portadora del gen *Ty-1* y otras accesiones portadoras del gen *Ty-2*. La amplificación del gen *Ty-3* se realizó por RCP y se utilizaron los cebadores específicos FLUW-25R y FLUW-25F. En este trabajo se identificó la presencia de la banda relacionada con el patrón resistente del gen *Ty-3* en una de las seis accesiones caracterizadas.

Palabras clave: geminivirus, rizado amarillo del tomate, resistencia genética

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del encrespamiento y amarillamiento de la hoja, causada por *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV), constituye la mayor afectación del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a nivel internacional (1). En Cuba, las pérdidas por esta virosis representan hasta el 100 % de la producción, a nivel nacional, cuando se emplean cultivares susceptibles (2).

Con el objetivo de obtener plantas resistentes a los begomovirus la mayoría de los trabajos de mejoramiento del tomate se han realizado en el Viejo Mundo, a pesar de que esta especie vegetal es oriunda de América donde, además, se ha encontrado la mayoría de los geminivirus que azotan a las plantaciones (1).

Hasta la actualidad, en relación con los programas de mejora genética a TYLCV, se ha trabajado en la incorporación de genes de resistencia en tomate, los que han sido detectados en accesiones de especies silvestres, que van desde las más cercanas hasta las más alejadas de *S. lycopersicum* L. (3). Esto ha permitido que, a nivel internacional se esté utilizando la combinación de varios de estos genes en un mismo material vegetal, en función de lograr una resistencia más duradera (4).

En Cuba solo se cuenta con el cultivar *Vyta*, portador del gen *Ty-1* (5) en las áreas de producción, mientras que a nivel internacional diversos genotipos que portan los genes *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-4*, *Ty-5*, *tcm-1* y *tgr-1* de resistencia a begomovirus están siendo utilizados en los programas de mejoramiento para la enfermedad (6, 7, 8, 9, 10, 11).

El *Ty-3* es un gen de efecto mayor que está siendo empleado por los programas de mejoramiento genético de la Florida, por el espectro de resistencia que ofrece a begomovirus de genoma monopartito y bipartito que afectan al cultivo (7).

El locus de resistencia a begomovirus, *Ty-3*, se localizó sobre el brazo largo del cromosoma 6. Este locus se introdujo en líneas avanzadas de tomate, en la Florida, EE.UU., provenientes de un cruzamiento con *S. chilense*, accesiones LA2779 y LA1932 (7, 12).

M.Sc. Francisco Dueñas Hurtado, Investigador Agregado; Dra.C. Marta Álvarez Gil y Dr.C. Carlos Moya López, Investigadores Titulares del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque; Dra.C. Yamila Martínez Zubiaur, Investigadora Titular del departamento de Fitopatología, División de protección de plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

✉ franko@inca.edu.cu

Los autores identificaron un segmento largo (27 cM), introgresado de LA2779 y uno más corto (6 cM), introgresado de LA1932 donde con el estudio de una progenie F_2 , se pudo evidenciar que el locus *Ty-3* explicaba el 65 % de la varianza para la resistencia al TYLCV, y el 30 % para la resistencia al virus del moteado del tomate (ToMoV).

En Cuba se desconoce de la presencia de accesiones que porten este gen de resistencia y que sean utilizadas para el mejoramiento genético de la enfermedad. Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, la necesidad de contar con diversas fuentes genéticas para contrarrestar los efectos nocivos del virus y el espectro de resistencia que ofrece *Ty-3*, se plantea como objetivo identificar la presencia de este gen de resistencia a Begomovirus y determinar el grado de homocigosis en estos cultivares a evaluar, lo cual sería de gran importancia para incorporar a la estrategia de mejoramiento genético del cultivo en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal empleado en la investigación (Tabla I), fueron líneas obtenidas a partir de materiales híbridos con niveles de resistencia a TYLCV, provenientes del Volcani Center del Israel (13). Se empleó el cultivar Campbell 28 como testigo susceptible.

Tabla I. Accesiones de *S. lycopersicum* L. utilizados para la identificación del gen

Accesiones	Fuente de resistencia	Referencia
STY2	<i>S. lycopersicum</i> cv. "8484"	13
STY3	<i>S. lycopersicum</i> cv. "Fiona"	13
STY4	<i>S. lycopersicum</i> cv. "3761"	13
STY5	<i>S. lycopersicum</i> cv. "Tyking"	13
STY6	<i>S. peruvianum</i> (PI 126930, PI 390681 y LA 441)	14
STY7	<i>S. peruvianum</i> (PI 126930, PI 390681 y LA 441)	14
Campbell 28 ¹	----	2

¹ cultivar susceptible que porta los alelos susceptibles del gen

Las semillas, seis de cada accesión y del cultivar Campbell 28, fueron sembradas en bandejas de poliestireno que contenían un sustrato compuesto por suelo Ferralítico Rojo compactado: cachaza: zeolita, en proporción 1:2:1, siendo la capacidad de cada alveolo de 32,5 cm³. Las plántulas se mantuvieron en casa de posturas, de manera protegida hasta alcanzar el estadio fenológico de cuatro hojas verdaderas.

Para detectar la presencia del gen *Ty-3*, el ADN se extrajo a partir de 5 g de cada material vegetal. Las muestras se maceraron en mortero con ayuda de nitrógeno líquido siguiendo la metodología de extracción del ADN de plantas (15). Se procesaron un total de tres réplicas con tres repeticiones para cada caso y la calidad del ADN se determinó con una lectura a los 260 nm en un espectrofotómetro (*Ultrospec Plus Spectrophotometer*, Pharmacia LKB).

Para su identificación se emplearon los cebadores, mezclas de reacción y el programa específico para este gen, utilizando un termociclador (*MJ Research, Inc.*) y los cebadores específicos FLUW-25F y FLUW-25R para su identificación (16).

El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min., seguido por 35 ciclos de reacción (30s a 94°C de desnaturalización, 1 min. a 53°C de anillamiento de los cebadores y 1 min. a 72°C de extensión), seguido por un paso de extensión final durante 10 min. a 72°C. Las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 ul. Se utilizó 1U de la enzima Taq ADN Polimerasa, con 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 mM de tampón de reacción 10X (Promega), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 2,5 μM de cada cebador y 15 ng de la muestra.

Los productos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), se analizaron en geles de agarosa al 1,5 %, utilizándose como patrón de peso molecular un marcador de 100 pb (Gibco). Los geles se observaron en un tras iluminador UV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las accesiones evaluadas se expresó una homocigosis recesiva (patrón susceptible), para la presencia del *Ty-3* (Tabla II); solamente el genotipo STY4, mostró la presencia del gen (patrón resistente), en condiciones de homocigosis dominante el cual se observó en los patrones electroforéticos para todas las plantas evaluadas de este material (Figura 1). La banda que se relacionó con el patrón resistente presentó un tamaño de 640 pb y la del patrón susceptible un tamaño de 480 pb aproximadamente, resultado que coincidió con los obtenidos en la comprobación de la presencia del locus *Ty-3* en líneas e híbridos de tomate obtenidos por el programa de mejoramiento a Begomovirus en Guatemala (16).

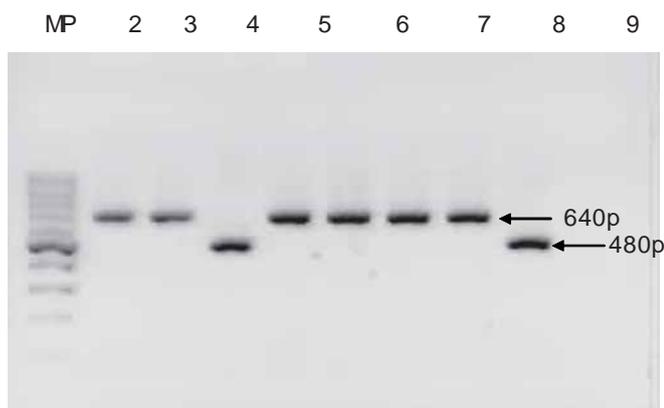
Tabla II. Genotipificación de las accesiones evaluadas, según los resultados detectados a partir de la técnica de RCP

Accesiones	Combinación de alelos		
	<i>Ty-3/Ty-3</i>	<i>Ty-3/ty-3</i>	<i>ty-3/ty-3</i>
STY2			+
STY3			+
STY4	+		
STY5			+
STY6			+
STY7			+
Campbell 28			+

+ presencia de la combinación

El patrón susceptible del cultivar Campbell 28 comprobó la susceptibilidad de este material a TYLCV y su empleo acertado como control susceptible en los programas de mejoramiento a la enfermedad en el país.

Este material no solo carece de este gen sino de otros genes (*Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-4* y *Ty-5*), descritos y utilizados para la resistencia al TYLCV (5, 6, 7, 8, 9, 10, 17).



Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carriles 2, 3, 5, 6, 7, 8: Patrón resistente del gen *Ty-3* en plantas de la accesión STY4. Carriles 4 y 9: Patrón susceptible del gen *Ty-3* en plantas del cultivar Campbell 28. Carril 9: Control negativo de la reacción

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de fragmentos amplificados por RCP con los cebadores FLUW-25F y FLUW-25R (16)

A diferencia del fenotipo que mostró el cultivar STY6 en los análisis moleculares y utilizándose una misma combinación de cebadores para la amplificación del gen, se encontró en una línea seleccionada en Marruecos, obtenida a partir de la cruce de STY6 con el híbrido Daniella, que presentó el gen *Ty-3* en heterocigosis (16). Este hallazgo pudo estar favorecido por la combinación de esta línea con el híbrido, pues estudios anteriores a estos resultados enunciaron que la resistencia de STY6 estaba mediada por la acción combinada de varios genes de resistencia introgresados a partir de *S. peruvianum* (13). Esta es una accesión que ha tenido un buen comportamiento ante los aislados de begomovirus presentes en Guatemala, y que ha sido utilizada por los programas de mejoramiento genético de la hortaliza en este país que es afectado por, al menos, siete begomovirus de genomas bipartitos (18).

Esta accesión, además, ha sido utilizada en los trabajos de resistencia a begomovirus, presentes en Brasil (19), donde en todas las plantas inoculadas no se observó afectaciones provocadas por begomovirus, luego de ser infectadas con mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gen.), lo cual indicó que constituía una fuente de resistencia a emplear ante los aislados circulantes en ese país.

El fenotipo susceptible para el gen *Ty-3* en la accesión STY7, se corresponde con los estudios de genética de la resistencia de este material al ser inoculado con el aislado de Israel del TYLCV.

Esta accesión proviene de la especie silvestre *S. peruvianum* y presentó una resistencia determinada por una dominancia parcial y oligogénica. Los resultados sugirieron el modelo de dos genes, uno parcialmente dominante (AA) y otro recesivo (bb), donde cada uno puede contribuir a la resistencia, pero ambos genes controlados de manera dominante y epistática por un tercer gen

recesivo (cc) (20). Investigaciones recientes, describieron que la resistencia a TYLCV, en STY7, está mediada por un QTL mayor al que llamaron *Ty-5*, localizado en el cromosoma 4 de la especie. La acción de este QTL es modificada, a su vez, por otros QTL menores situados en los cromosomas 1, 7 y 11 (9), siendo diferentes a los encontrados en los cromosomas 1 y 11 ya descritos por su resistencia al TYLCV (5, 21).

Los resultados de la RCP para la accesión STY5 no mostraron la presencia del gen. Un estudio genético en una línea F₆ derivada del híbrido comercial Tyking, manifestó resistencia a un begomovirus bipartito en Brasil *Tomato chlorotic mottle virus*, la que estuvo condicionada por un solo gen recesivo, del que se desconoce su localización en el genoma y fue llamado *tcm-1* (10), argumento que pudiera explicar la no presencia de *Ty-3* en este material. Otras investigaciones destacaron, que una línea portadora del gen *tcm-1* mostró un buen comportamiento ante el TYLCV, aislado de Israel (21), lo que amplía el espectro de resistencia de este gen.

Las accesiones STY2 y STY3 mostraron el mismo patrón susceptible que las accesiones STY5, STY6 y STY7. Estos genotipos provienen de otras fuentes de resistencia (Tabla I), y han sido utilizados por los programas de mejoramiento en el Volcani Center desde la validación de sus líneas resistentes a TYLCV-IL (14) hasta la confección de una escala internacional de severidad para la evaluación de los síntomas causados por este begomovirus (13).

El locus *Ty-3*, también se ha encontrado en otras especies silvestres así como, en líneas avanzadas derivadas de las especies *S. peruvianum* y *S. habrochaites*, que presentaron un alto nivel de resistencia a begomovirus bipartitos en Guatemala (7).

El incremento del nivel de resistencia a begomovirus a nivel internacional se podrá obtener por la combinación de diferentes genes de resistencia en un solo cultivar; para lograr el éxito, es necesario combinar los genes de resistencia a distintos virus. Por ello, es importante distinguir los genes en los genotipos resistentes, lo cual puede efectuarse por la caracterización mediante marcadores moleculares (4, 21).

El desarrollo de marcadores relacionados con los genes de resistencia descritos para la especie viral TYLCV y basados en la técnica de RCP, permite la selección asistida de aquellos híbridos, líneas y cultivares portadores de estos genes en los estados de homocigosis adecuados para su utilización por los programas de mejoramiento genético. Esta técnica permite a un costo muy bajo, con un alto nivel de reproducibilidad y baja complejidad el avance por selección asistida de aquellos materiales élites que combinen más de dos genes de resistencia.

La detección del gen *Ty-3* en una de las accesiones caracterizadas, propiciará su aprovechamiento en los programas de mejoramiento genético de la hortaliza para begomovirus en el país y en la consolidación del programa de manejo integrado de plagas (MIP), que se desarrolla en Cuba.

REFERENCIAS

1. Barbieri, M.; Acciarri, N.; Sabatini, E.; Sardo, L.; Accotto, G. P. y Pecchioni, N. Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing tomato yellow leaf curl virus into a valuable traditional tomato variety. 2010. *Journal of Plant Pathology*. 92 (2), p. 485-493.
2. Gómez, O.; Piñón, M.; Martínez, Y.; Quiñones, M.; Fonseca, D. y Laterrot, H. Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. *Plant Breeding*, 2004, vol. 123, p. 275-279.
3. Czosnek, H.; Lapidot, M.; Polston, J. y Maxwell, D. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease. Management, molecular biology, breeding for resistance. Netherlands: *Springer*. 2007, p. 439. ISBN: 978-1-4020-4768-8.
4. Lapidot, M. y Polston, J. E. Resistance to Tomato yellow leaf curl virus in tomato. En: *Natural Resistance Mechanism of Plant Viruses*. Netherlands: *Springer*. 2007, p. 503-520.
5. Piñón, M.; Gómez, O. y Cornide, M. T. RFLP analysis of Cuban tomato breeding lines with resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Acta Hort.*, 2005, vol. 695, p. 273-276.
6. Hanson, P. M.; Green, S. K. y Kuo, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Rept. Tomato Genet Coop Rep.*, 2006, vol. 56, p. 17-18.
7. Ji, Y. F.; Schuster, D. J. y Scott, J. W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*. 2007, vol. 20, no. 3. p. 271-284.
8. Ji, Y.; Scott, J. W.; Schuster, D. J. y Maxwell, D. P. Molecular mapping of *Ty-4*, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2009, vol. 134, p. 281-288.
9. Anbinder, I.; Reuveni, M.; Azari, R.; Paran, I.; Nahon, S.; Shlomo, H.; Chen, L.; Lapidot, M. y Levin, I. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 2009, vol. 119, p. 519-530.
10. Giordano, L. B.; Silva-Lobo, V. L.; Santana, F. M.; Fonseca, M. E. N. y Boiteux, L. S. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica*, 2005, vol. 143, p. 27-33.
11. Xue-Yu B.; Thomas, M. R.; Rasheed, M. S.; Sabed, M.; Hanson, P.; Barro, P. J. de y Rezaian, M. A. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology*, 2007, vol. 97, no. 8, p. 930-937.
12. Ji, Y. y Scott, J. W. Development of breeder friendly markers for begomovirus resistance genes derived from *S. chilense*. Proc Tomato Breeders Roundtable, Tampa, FL, USA. 2006, roundtable06.ifas.ufl.edu/schedule.htm
13. Lapidot, M.; Ben-Joseph, R.; Cohen, L.; Machbash, Z. y Levy, D. Development of scale for evaluation of *Tomato yellow leaf curl virus* resistance level in tomato plants. *Virology*, 2006, vol. 96, no. 12, p. 1404-1408.
14. Lapidot, M.; Friedmann, M.; Lachman, O.; Yehezkel, A.; Nahon, S.; Cohen, S., y Pilowsky, M. Comparison of resistance level to Tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Disease*, 1997, vol. 81, p. 1425-1428.
15. Dellaporta, S. L.; Wood, J.; Hicks, J. B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, vol. 1, p. 19-21.
16. Salus, M. S.; Martin, C. T. y Maxwell, D. P. PCR protocol for detection of introgression at 25 cM (*Ty-3* locus). *UW-Madison Team.*, 2006, p. 1-3.
17. Boiteux, L. S.; Oliveira, V. R.; Silva, C. H.; Makishima, N.; Inoue-Nagata, A. K.; Fonseca, M. E. N. y Giordano, L. B. Reaction of tomato hybrids carrying the *Ty-1* locus to Brazilian bipartite begomovirus species. *Horticultura Brasileira*, 2007, vol. 25, no. 1, p. 20-23.
18. Mejía, L.; Teni, R. E.; Vidavski, F.; Czosnek, H.; Lapidot, M.; Nakhla, M. K. y Maxwell, D. P. Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Hort.*, 2005, vol. 695, p. 251-255.
19. Martín, F.; da Graça, S.; Williams, A.; Moreira, D. J. y Brito, G. de. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. To bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica*, 2001, vol. 122, no. 1, p. 45-51.
20. Friedmann, M.; Lapidot, M.; Cohen, S. y Pilowsky, M. A novel source of resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1998, vol. 123, no. 6, p. 1004-1007.
21. García, E. La resistencia como estrategia de control de virus causantes de amarillamiento en tomate. [Tesis de Doctorado]. Universidad de Málaga. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. 2008. 233 p.

Recibido: 10 de septiembre de 2010

Aceptado: 2 de junio de 2011

¿Cómo citar?

Dueñas Hurtado, Francisco; Álvarez Gil, Marta, Moya López, Carlos y Martínez Zubiaur, Yamila. Identificación del gen *Ty-3*, de resistencia a begomovirus, en accesiones de *Solanum lycopersicum* L. *Cultivos Tropicales*, 2011, vol. 32, no. 3, p. 42-45. ISSN 0258-5936