

Detección de genes de resistencia a TYLCV-IL y TSWV en genotipos de tomate en Cuba

Detection of resistance genes to TYLCV-IL and TSWV in tomato genotypes in Cuba



<https://eqrcode.co/a/Ms4jTI>

Heidy González-Alvarez¹, Yaniel Castro Reyes², Lidia Chang Sidorchuk¹, Yamila Martínez-Zubiaur^{1*}

¹Grupo de Fitopatología. Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera de Tapaste km 3½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los genes *Ty.1*, *Ty.2* y *Ty.3* para la resistencia a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y el *SW5* para *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), son los genes que más se han utilizado en los programas de mejoramiento genético de tomate. El estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de estos genes en genotipos de tomate conservados en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba. En el estudio se utilizaron 12 cultivares a los que se les realizó la extracción de ADN y la amplificación de los genes se realizó por PCR con los cebadores específicos correspondientes. Se identificó la presencia de la banda relacionada con el patrón resistente del gen *Ty.3* en tres de las muestras analizadas (201, 205, 210) y fue similar el resultado para el gen *Ty.1* (201, 203, 205). El gen *SW5* amplificó en dos de las muestras analizadas (205, 207). A partir de los resultados obtenidos se sugirió el uso del cultivar 205 en los programas de mejora genética teniendo en cuenta que presenta genes de resistencia para TYLCV y TSWV. Se confirma, además, la importancia del uso de marcadores moleculares para lograr el avance en la obtención de variedades con resistencia a las enfermedades de mayor impacto en la producción.

Palabras clave: genes de resistencia, Begomovirus, Orthotospovirus, pirimidización de genes.

ABSTRACT: The genes *Ty.1*, *Ty.2*, and *Ty.3* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *SW5* for *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) are the most widely used in the tomato breeding programs. This study was aimed at determining the presence of these genes in tomato genotypes preserved in the germplasm bank of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), Cuba. The study used 12 cultivars from which DNA was extracted. Gene amplification was carried out by PCR with the corresponding specific primers. The presence of the band related to the resistant pattern of the *Ty.3* gene was identified in 3 of the samples analyzed (201, 205, 210), being similar the result for the *Ty.1* gene (201, 203, 205). The gene *SW5* was amplified in 2 of the samples analyzed (205, 207). From the results obtained, it was suggested the use of the cultivar 205 in the genetic improvement programs, considering that it presents resistance genes for TYLCV and TSWV. It was also confirmed the importance of the use of molecular markers to achieve the advance in obtaining varieties resistant to the diseases of greater impact on production.

Key words: resistance genes, Begomovirus, Orthotospovirus, pirimidización of genes.

*Autor por correspondencia: Yamila Martínez-Zubiaur. E-mail: yamila@censa.edu.cu

Recibido: 19/06/2020

Aceptado: 11/07/2020

INTRODUCCIÓN

La productividad del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se ve limitada por la incidencia de numerosas plagas y enfermedades (1); el Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y los Orthotospovirus (2) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato chlorotic spotted virus* (TCSV) y *Grounud ring spotted virus* (GRSV) son las entidades virales que provocan mayores pérdidas económicas a nivel mundial en el cultivo (3,4).

En Cuba, desde su aparición en la década de los 80, la enfermedad ocasionada por TYLCV es la que mayores daños ocasiona en las producciones de tomate (5). En los últimos años también se han visto afectados los rendimientos por la presencia de Orthotospovirus (TCSV) en el cultivo (6).

Una alternativa para contrarrestar estas enfermedades ha sido la búsqueda de fuentes de resistencia a estos patógenos. Para ello se implementó en el país un programa de mejora genética para la obtención de líneas o variedades, que presentaran un comportamiento resistente ante los efectos negativos provocados por TYLCV-IL (7).

Mediante el programa de mejora genética fue posible obtener el cultivar 'Vyta', con la introgresión del gen *Ty.1* (8), a partir de la accesión LA 1969 de *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, con características que permitieron su explotación comercial en todas las áreas productoras del país (7). En los últimos años, se han incluido en este programa introgresiones de los genes *Ty.2*, accesión B6013 de *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner (9) y *Ty.3* a partir de las accesiones LA2779 y LA1932 de *Solanum chilense* (10) para conferir resistencia a TYLCV. Además, se ha trabajado en la obtención de cultivares que presenten diferentes combinaciones de los genes *Ty.1*, *Ty.2* o *Ty.3* para aumentar así la resistencia a Begomovirus (2) y en la introgresión de fuentes de resistencia, tanto para TYLCV como para Orthotospovirus, en un mismo material vegetal mediante la pirimidización de genes. Esta alternativa se ha utilizado en función de lograr una resistencia más amplia y duradera (11).

En Cuba, la búsqueda constante de fuentes de resistencia a especies virales constituye una prioridad de todos los programas de mejora genética del cultivo del tomate que se ejecutan actualmente, debido a que una de las principales causas de sus pérdidas productivas es la presencia de los géneros virales Begomovirus y Orthotospovirus. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de los genes *Ty.1*, *Ty.3* y *SW5* en genotipos de tomate conservados en el germoplasma del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) para su uso en los programas de mejora genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 12 genotipos de tomate conservados en el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba, para detectar la presencia de los genes de resistencia a TYLCV (*Ty.1*, *Ty.3*) y a TSWV (*SW5*).

La extracción de ADN se realizó según el protocolo propuesto por Permingeat (12). Se colectaron hojas asintomáticas de cada uno de los genotipos y fueron analizadas dos réplicas por cada genotipo.

La identificación de cada uno de los genes de resistencia se realizó mediante PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) en el termociclador TOUCH T960. Para ello se utilizaron cebadores específicos para los genes *Ty.1*, *Ty.3* y *SW5*. (Tabla 1)

Las reacciones de amplificación se ajustaron a un volumen final de 25 μ l. Se utilizó GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) con una concentración final de 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M para cada uno de los dNTPs y cebadores utilizados y 15 ng de la muestra.

El programa de amplificación para detectar el gen *Ty.3* consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante tres minutos, seguido por 35 ciclos de reacción (30 s 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. Un programa similar se utilizó para el gen *Ty.1* teniendo en cuenta que la desnaturalización inicial fue de cinco minutos, seguido de 30 ciclos de reacción (30 s a 94°C de

Tabla 1. Cebadores utilizados para detectar los alelos (o locus) correspondientes a la presencia de los genes *Ty.1*, *Ty.3* y *SW5*, relacionados con la resistencia a begomovirus y orthotospovirus. / *Primers used to detect the alleles (or locus) corresponding to the presence of the genes Ty.1, Ty.3 and SW5, related to resistance to begomovirus and orthotospovirus.*

Gen	Cebador y secuencia	Referencia
<i>Ty.1</i>	UWTy1F 5' ATA AGC ATT TCA TGT CAG ATG TCT AGA C 3'	13
	UWTy1R 5' CTA GAT CCT GGA TGA CTT CAA TAG C 3'	
<i>Ty.3</i>	FLUW-25F 5' CAAGTGTGCATATACTTCATATTCACC 3'	14
	FLUW-25R 5' CCATATATAACCTCTGTTTCTATTTTCGAC 3'	
<i>SW5</i>	Sw421F 5' GAC TTG TTG CCA TAG GTT CC 3'	15
	Sw421R 5' GCC CAC CCC GAA GTT AAT CC 3'	

desnaturalización, 1 min a 55°C de anillamiento de los cebadores y 1 min a 72°C de extensión) y un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

El programa de PCR para la amplificación del gen *SW5* consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por un minuto, seguido de 34 ciclos de reacción (30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s a 56°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.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa a 1 %, en tampón TE 0.5X pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), corridos durante 30 minutos a 110 volt y teñidos con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml) (equipo DOC-PRINT VX5). En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, Madison, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar la presencia del gen *Ty.3*, de los 12 cultivares analizados, solo tres genotipos (201, 205 y 210) mostraron el alelo correspondiente a dicho gen que confiere resistencia a TYLCV-IL ([Tabla 2](#)); mientras que, el resto de los cultivares presentaron el patrón susceptible. La banda que se relacionó con el patrón resistente presentó un tamaño de 640 pb. El resultado coincidió con los obtenidos por Salus *et al.* ([14](#)), al comprobar la presencia del locus *Ty.3* en líneas e híbridos de tomate obtenidos por el programa de mejoramiento a Begomovirus en Guatemala.

El locus correspondiente al gen *Ty.1* se detectó en los genotipos 201, 203 y 205 ([Tabla 2](#)), mediante la amplificación específica de un

fragmento de 750 pb. Estos resultados coinciden con Aragon *et al.* ([3](#)), que comprobó que al utilizar el marcador TG231, el gen *Ty.1* presenta un alelo homocigoto de 750 pb que confiere resistencia a Begomovirus. Además, en estudios previos se ha determinado que el gen *Ty.1* presenta un efecto de dominancia incompleta y que la mayoría de los cultivares comerciales de tomate con resistencia a TYLCV, poseen dicho gen ([3](#)).

La detección del gen *Ty.3* en tres de los genotipos estudiados sugiere la posibilidad de la utilización de los mismos para el avance de los programas de mejoramiento genético del tomate. Además, al menos en dos genotipos (201 y 205) existe la combinación de los de los genes *Ty.1* y *Ty.3*. Este resultado sugiere la presencia de genotipos con genes pirimidizados para la resistencia a TYLCV-IL, lo cual se ha demostrado que constituye una estrategia útil para el incremento de la resistencia a TYLCV-IL ([16,11](#)).

La amplificación de un fragmento (o locus) de 940 pb evidenció la presencia del gen *SW5* que confiere resistencia al Orthotospovirus TSWV, en los genotipos 205 y 207 ([Fig. 1](#)). Estos resultados coinciden con los tamaños de banda obtenidos por Gabriel *et al.* ([17](#)) al estudiar la resistencia de híbridos de tomate a los virus GRSV, TSWV y TCSV en Bolivia, mediante la detección de la presencia de alelos del gen *SW5*.

Debido a la gran variabilidad de especies virales existentes, a nivel internacional, numerosos son los trabajos en los que se reconoce la incorporación de varios genes/alelos como una estrategia apropiada en la búsqueda de

una resistencia estable y amplia a estas enfermedades. Hoy en día, la piramidación de genes de resistencia en una línea o cultivar ha devenido como una estrategia potente que permite incrementar la durabilidad y estabilidad de la resistencia, además de que ha propiciado un avance considerable en las etapas del programa de mejoramiento genético de tomate (18).

Tabla 2. Detección de alelos para los genes de resistencia *Ty.1* y *Ty.3* en 12 genotipos de tomate mantenidos en la colección del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba / *Allele detection for Ty.1 and Ty.3 resistance genes in 12 tomato genotypes kept in the collection of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), Cuba.*

Muestras	Gen <i>Ty.1</i>	Gen <i>Ty.3</i>
201	+	+
202	-	-
203	+	-
204	-	-
205	+	+
206	-	-
207	-	-
208	-	-
209	-	-
210	-	+
211	-	-
212	-	-

Estos resultados permiten sugerir el uso de los genotipos 205 y 201 para obtener cultivares con genes pirimidizados para la resistencia a TYLCV-IL. Particularmente importante es la presencia en el genotipo 205 de los tres genes estudiados, lo que lo señala como un genotipo promisorio con genes pirimidizados para la resistencia a las principales enfermedades virales que afectan el cultivo del tomate en Cuba. Además, se confirmó la importancia del uso de marcadores moleculares para lograr el avance en la obtención de variedades con resistencia a las enfermedades de mayor impacto en la producción.

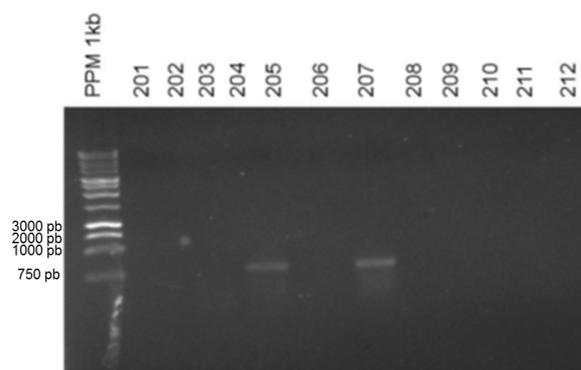


Figura 1. Patrón electroforético de las amplificaciones del gen *SW5* (cebadores Sw421F/R), donde: carril 1 PPM, patrón de peso molecular de 1kb; carril 2 al 13 cultivares 201-212. / *Electrophoretic pattern of SW5 gene amplifications (primers Sw421F/R): lane 1 PPM, 1 kb molecular weight marker; lanes 2 to 13, cultivars 201-212.*

REFERENCIAS

1. Sanches J. Generación de línea T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal. [Tesis de doctorado]. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España. 2017.
2. Peter J, Stuart G, Elliot J, Arcady R, Evelien M, Donald M, et al. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04752-x>
3. Aragón OE, Rojas A, Laguna T. Identificación de cultivares de tomate con resistencia a begomovirus utilizando marcadores moleculares tipo SCAR y CAPS. Biotecnología Vegetal. 2012; 12(2): 67-76.
4. Ferrand L. Caracterización de aislamientos argentinos de Tomato spotted wilt virus que quiebran la resistencia mediada por el gen Tsw en *Capsicum annum* L. [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina. 2017.
5. Martínez Y, Martínez MA, Quiñones M, Miranda I, Holt J, Chancellor T. Estudio de factores que influyen en la epifitología del complejo mosca blanca-geminivirus, en la

- región oriental de Cuba. Rev. Protección Veg. 2009; 24(1): 47-50.
6. Martínez-Zubiaur Y, Chang Sidorchuk L, González Álvarez H, Barboza Vargas N, González Arias G. First molecular evidence of Tomato chlorotic spot virus infecting Tomatoes in Cuba. Plant Disease. 2016; 100(9):1956.
 7. Gómez O, Piñón M, Martínez Y, Quiñones, Fonseca D, Laterrot H. Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. Plant Breeding. 2004; 123: 275-279.
 8. Piñón M, Gómez O, Cornide MT. RFLP analysis of Cuban tomato breeding lines with resistance to Tomato yellow leaf curl virus. Acta Hort. 2005; 695:273-276.
 9. Dueñas F, Álvarez M, Molina L, 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.
 10. Dueñas F, Álvarez M, Moya C, Martínez Y. Identificación del gen Ty-3, de resistencia a Begomovirus, en accesiones de Solanum lycopersicum L. Cultivos Tropicales. 2011; 32(3): 42-45.
 11. Gómez O, Piñón M, Martínez Y. Pyramiding TYLCV and TSWV resistance genes in tomato genotypes. Rev. Protección Veg. 2015; 30(2): 161-164.
 12. Permingeat HR, Romagnoli MV, Vallejos RH. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Plant Mol Biol. 1998; 16: 1-6. <https://doi.org/10.1023/A:1007466522028>
 13. García BE, Graham E, Jensen KS, Hanson P, Mejía L, Maxwell DP. Codominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from Solanum habrochaites in tomato germplasm. Tomato Genetic Cooperative Report. 2007; 57: 21-24.
 14. Salus MS, Martin CT, Maxwell DP. PCR protocol for detection of introgression at 25 cM (Ty.3 locus). UW. Madison Team. 2006: 1-3.
 15. Rodrigues Do Nascimento I, Maluf W, Figueira A, Menezes C, Vilela de Resende J, Faria M, et al. Marker assisted identification of tospovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.). 2009; 3(66):298-303.
 16. Álvarez M, Dueñas F, Fuentes A, Martínez Y, Fernández R. Resistencia al Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV-IL) en poblaciones F2 de tomate (*S. lycopersicum* L.), segregantes para los genes Ty.1 y Ty.2. Cultivos Tropicales. 2012; 33(4): 64-70.
 17. Gabriel J, Sanabria D, Veramendi S, Plata G, Angulo A, Crespo M. Resistencia genética de híbridos de tomate [*Solanum lycopersicum* L. (Mill.)] al virus del bronceado (TSWV). Agronomía Costarricense. 2013; 37(1): 61-69. ISSN:0377-9424
 18. Rodríguez A, Florido M, Dueñas F, Muñoz LJ, Hanson P, Álvarez M. Caracterización morfoagronómica en líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con resistencia a Begomovirus. Cultivos Tropicales. 2017; 38(2):70-79.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

Contribución de los autores: **Heidy González Alvarez:** Participó en la búsqueda de información, estandarización y pruebas realizadas para evaluar los resultados (amplificaciones de los ADN por PCR). Realizó en el análisis e interpretación de los resultados, así como la redacción del artículo. **Yaniel Castro Reyes:** Realizó la selección de los cultivares. Participó en las pruebas para evaluar los resultados y en la recolección de datos. **Lidia Chang Sidorchuk:** Participó en la búsqueda de información, en las pruebas para evaluar los resultados y en el análisis de los mismos. **Yamila Martínez Zubiaur:** Realizó el diseño de la investigación. Participó en la búsqueda de información, en el análisis e interpretación de los resultados, en la revisión crítica del documento y en la aprobación final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)