

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE SEIS GENOTIPOS PROMISORIOS DE TOMATE OBTENIDOS EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO PARA LA RESISTENCIA AL TYLCV

Yailen Arias*, Ivonne González*, Oriela Pino**, Yaima Sánchez**, Ileana Miranda**, Yamila Martínez*, Belkis Peteira*

*Grupo de Fitopatología, **Grupo Plagas Agrícolas, División Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
Correo electrónico: yailenav@censa.edu.cu

RESUMEN: El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importante a nivel mundial. El virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) es uno de los patógenos más agresivos para esta hortaliza. La obtención de variedades resistentes para su manejo, depende de la disponibilidad de materiales promisorios para ser empleados como parentales. Aspectos relacionados con la resistencia de los hospedantes y el efecto de los patógenos sobre el metabolismo de los mismos, han sido estudiados a nivel bioquímico, a través del empleo de las isoenzimas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar seis genotipos de tomate obtenidos en programas de mejoramiento a partir de la determinación de las actividades específicas de tres sistemas enzimáticos y el contenido de compuestos fenólicos. Según los resultados obtenidos, el genotipo 3 parece ser el más promisorio para estos propósitos.

(Palabras clave: peroxidasa; polifenoloxidasas; fenilalanina amonio-liasa; compuestos fenólicos; *Solanum lycopersicum*; TYLCV)

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SIX PROMISSORY TOMATO GENOTYPES OBTAINED IN IMPROVEMENT PROGRAMS TO TYLCV RESISTANCE

ABSTRACT: Tomato is one of the most important crops of the world. The tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the most aggressive pathogen to this vegetable. The resistant varieties for the TYLCV control depend on the availability of promissory genotypes. The isoenzymes have been used to investigate the aspects related to the host resistance and the pathogens effect on host metabolism at a biochemical level. The aim of this work was to characterize six promissory tomato genotypes obtained in breeding programs for TYLCV resistance by means of enzymatic activities and phenolyc compound determination. The results showed that the 3 genotypes could be the most promissory for these purposes.

(Key words: peroxidase; polyphenoloxidase; phenylalanine ammonium-lyase; phenolyc compounds; *Solanum lycopersicum*; TYLCV)

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L), es uno de los cultivos hortícolas más relevantes a nivel mundial, considerado como el segundo en importancia dentro del género (1). En Cuba, ocupa el 50% del área destinada a estos cultivos (2) y goza de gran aceptación para consumo fresco o como condimento (3).

Se plantea que este cultivo es susceptible a más de 200 fitopatógenos entre bacterias, hongos y virus (4), siendo el virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) uno de los patógenos más agresivos para la hortaliza a nivel global (5).

Una de las alternativas más empleadas en la actualidad para el control de este fitopatógeno, es el uso

de variedades resistentes (6,7). En tal sentido, los marcadores isoenzimáticos cumplen una función muy importante y han sido reconocidos como un medio para investigar, a nivel bioquímico, aspectos relacionados con la resistencia de los hospedantes y el efecto de ciertos patógenos sobre el metabolismo de los mismos (8). Entre los sistemas enzimáticos que más se emplean con este fin se encuentran las peroxidases (PO), polifenoloxidasas (PPO) (9) y fenilalanina amoniliasas (PAL) (10).

Estas enzimas están relacionadas con procesos involucrados en la respuesta de defensa de las plantas como son el reforzamiento de las paredes celulares mediante la formación de lignina y suberina; el efecto antinutritivo de las plantas, como consecuencia de la generación de sustancias citotóxicas que resultan peligrosas para los patógenos y la inhibición de las enzimas hidrolíticas que los mismos emplean para la infección y el establecimiento. Además, se han asociado con la desintegración de las células hospedantes y tienen una importante participación en procesos metabólicos vegetales como la síntesis de fenilpropanoides, compuestos que son necesarios para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas, y la síntesis de compuestos relacionados con la defensa de las mismas, como son los compuestos fenólicos (11).

Teniendo en cuenta que es de vital importancia contar con nuevos materiales promisorios para ser empleados como parentales en la obtención de variedades más resistentes al TYLCV, el objetivo de este trabajo se centra en la caracterización de seis genotipos de tomate, obtenidos en el programa de mejoramiento del Instituto de Investigaciones Hortícolas Lilianna Dimitrova (IIHLD), mediante la determinación de las actividades enzimáticas PO, PPO y PAL, el contenido total de fenoles y el análisis de la isoenzimas PO y PPO.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Las semillas de los genotipos empleados (procedentes del programa de mejoramiento genético del IIHLD) (Tabla 1) fueron sembradas en cepellones y en el estadio de dos hojas verdaderas, fueron transplantadas a macetas que contenían suelo ferralítico rojo esterilizado. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de casa de cristal a una temperatura de 23°C aproximadamente, humedad relativa entre el 80 y el 85% y fotoperíodo natural.

A los 45 días de edad de las plantas, se realizaron las determinaciones de proteínas totales, compuestos fenólicos, actividades enzimáticas PO, PPO y PAL,

TABLA 1. Genotipos de tomate empleados en el estudio./ *Tomato genotypes used in the study*

No.	Genotipos
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

así como las isoenzimas PO y PPO en hojas, según el método descrito por Peteira *et al.* (11).

Análisis estadístico

Para las determinaciones de proteínas totales, fenoles y actividades enzimáticas, se realizaron tres réplicas y tres repeticiones. Todos los datos fueron comparados a través de un Análisis de Varianza Factorial y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$), usando el programa InfoStat versión 2009 (12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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. 1).

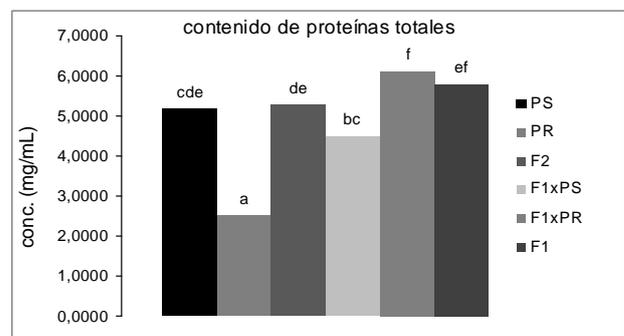


FIGURA 1. Contenido de proteínas totales para los genotipos de tomate estudiados./ *Total protein content for the tomato genotypes studied.*

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. 2).

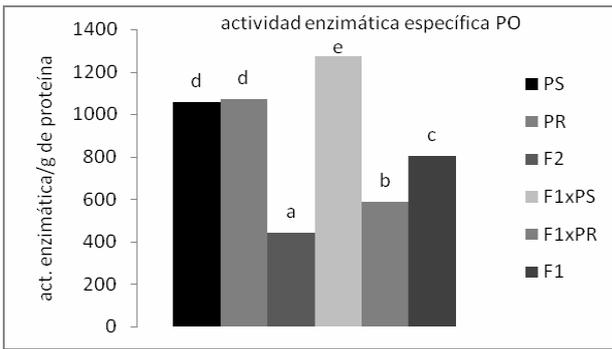


FIGURA 2. Actividad enzimática específica PO para los genotipos de tomate estudiados./ *Specific enzymatic activity PO for the tomato genotypes studied.*

El análisis de la actividad específica PPO (Fig. 3) 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 significativamente superiores, mientras que el genotipo 5 alcanzó los niveles más bajos de actividad PPO.

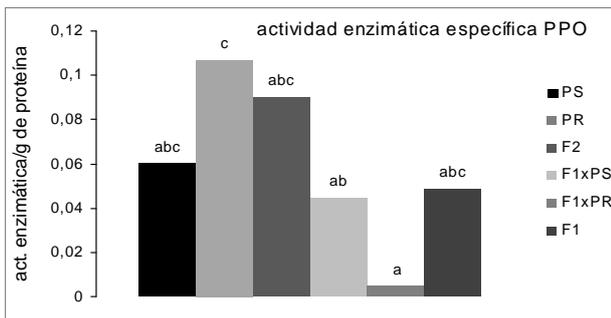


FIGURA 3. Actividad enzimática específica PPO para los genotipos de tomate estudiados./ *Specific enzymatic activity PPO for the tomato genotypes studied.*

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

En la Figura 5 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 isoenzimas PPO (Fig. 6), mostraron también la expresión de tres isoformas comunes para todos los genotipos, aunque el genotipo 1 mostró la expresión de una banda adicio-

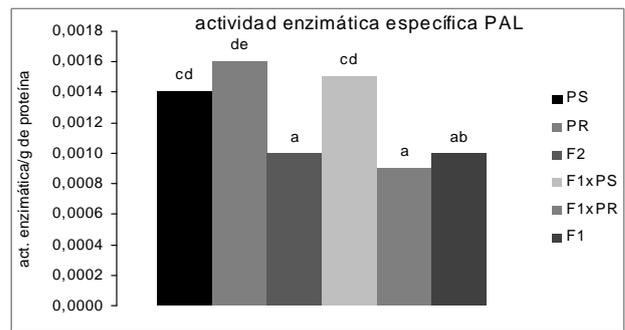


FIGURA 4. Actividad enzimática específica PAL para los genotipos de tomate estudiados./ *Specific enzymatic activity PAL for the tomato genotypes studied.*

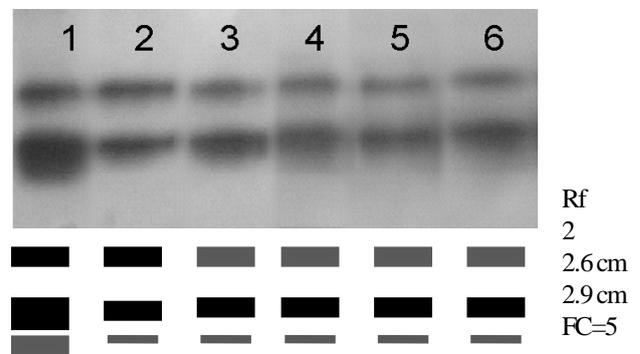


FIGURA 5. Gel de electroforesis y zimograma para las isoenzimas PO en los diferentes genotipos de tomate estudiados./ *Electrophoresis gel and zimogram of PO isoforms for the tomato genotypes studied (1-PS; 2-PR; 3-F2; 4-F1xPS; 5-F1xPR; 6-F1).*

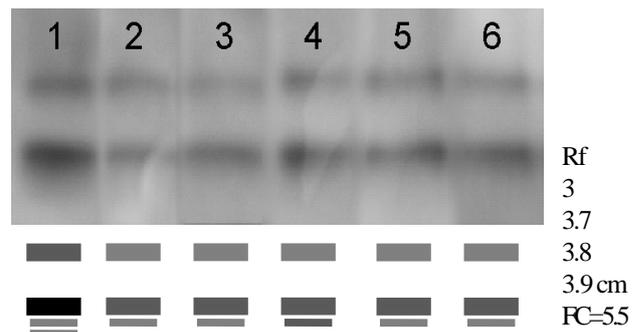


FIGURA 6. Gel de electroforesis y zimograma para las isoenzimas PPO en los diferentes genotipos de tomate estudiados./ *Electrophoresis gel and zimogram of PPO isoforms for the tomato genotypes studied (1-PS; 2-PR; 3-F2; 4-F1xPS; 5-F1xPR; 6-F1).*

nal, destacándose nuevamente por la intensidad de sus bandas.

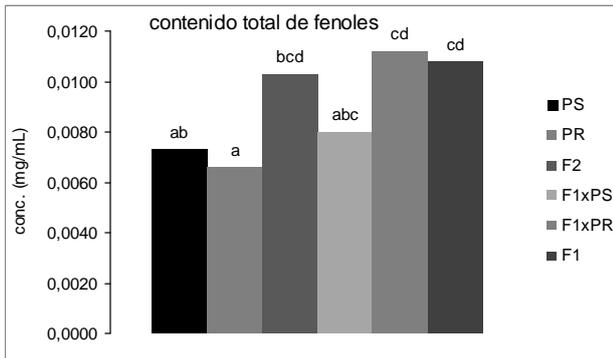


FIGURA 7. Contenido total de fenoles para los genotipos de tomate estudiados./ *Total content of phenolic compounds for the tomato genotypes studied.*

Resultados en estudios anteriores, donde se analizaron otros genotipos de tomate, también mostraron la expresión de tres isoformas comunes para todos los genotipos en ambos sistemas enzimáticos (11).

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 (11), pues los sistemas enzimáticos PO y PPO están codificados por familias de 8 y 7 genes respectivamente (13), cuya expresión y actividad constitutiva dependen del estado fenológico de la planta (14).

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. 7) y la composición para cada uno de ellos también fue muy parecida, detectándose dos manchas para todos, con iguales valores de Rf, con la excepción del genotipo 1, donde la primera de sus manchas no mostró afinidad suficiente con la fase móvil empleada (Tabla 2).

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Peteira *et al.* (11), 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 de variabilidad genética realizado anteriormente a estos genotipos, utilizando los marcadores RAPD (15). La escasa variabilidad bioquímica tam-

TABLA 2. Valores de Rf para los cromatogramas correspondientes a los compuestos fenólicos de los genotipos de tomate estudiados./ *Rf values and chromatograms of the phenolic compounds for the tomato genotypes studied*

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

bién 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. Si tenemos en cuenta las importantes funciones que cumplen, tanto los compuestos fenólicos como los sistemas enzimáticos estudiados, en los mecanismos de defensa de las plantas frente a los patógenos, pudiéramos decir que el genotipo 3 (F2) resultó ser el más promisorio para emplear como parental, por estar mejor preparado para enfrentar el ataque del TYLCV.

REFERENCIAS

1. 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 en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. La Habana, Cuba; 2007.
2. Rodríguez J, Álvarez M, Moya C, Plana D, Dueñas D, Lescay E, et al. Identificación de progenitores de tomate (*Solanum lycopersicum*) para la obtención de híbridos F1 adaptados a las condiciones de Cuba. *Cultivos Tropicales*. 2008;29(3):69-72.
3. Peralta IE. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Perú. *Syst Botany*. 2005;30:424-434.
4. Fooland M. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomic*. 2007; 1-52.

5. Pérez de Castro A, Diez MJ, Nuez F. Inheritance of tomato yellow leaf curl virus resistance derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV 16991. *Plant Dis.* 2007;91:879-885.
6. Giordano LB, Silva Lobo VL, Santana FM, Fonseca MEN, Boiteux LS. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica.* 2005;143:27-33.
7. González-Cabezuelo JM, Tomás DM, Lorente I, Abad J, Fernández-Muñoz R, Lozano R. Marcadores moleculares ligados a la resistencia a TYLCV en tomate. *Actas de Horticultura* nº 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. XI Congreso SECH. Albacete;2007.
8. Azofeifa-Delgado A. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana.* 2006;17(2): 221-242.
9. Fernández A, Solórzano E, Miranda I. Mecanismos bioquímicos de defensa en variedades de arroz infestadas con *Stenotarsonemus spinki*. *Rev. Protección Veg.* 2006;2(1):43-50.
10. Lozoya-Saldaña H, Rivera-Hinojosa R, Colinas-León MT. Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-liasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia.* 2007;41:479-489.
11. Peteira B, Dueñas F, Arias Y, Martínez Y, Pino O. Caracterización de materiales promisorios de tomate obtenidos en el Programa de Mejoramiento para la Resistencia al TYLCV. *Fitopatología.* 2008;43(3):105-119.
12. InfoStat version 2009. Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2009.
13. Florido M, Álvarez M, Lara RM, Plana D, Valera M, Shagardovsky T, et al. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp.). *Cultivos Tropicales.* 2002;23(4):61-69.
14. Pérez E, Rodríguez Y, Hernández MA, De la Noval B. Dinámica de la inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasas y polifenol oxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales.* 2004;25(2):45-52.
15. Arias Y, Peteira B, González I, Martínez Y, Miranda I. Variabilidad genética entre genotipos promisorios de tomate (*Solanum lycopersicum*) obtenidos en programas de mejoramiento frente al TYLCV. *Rev. Protección Veg.* 2010; 25(3):190-193.
16. 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 en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. INCA; 2009.

(Recibido 31-5-2010; Aceptado 29-11-2010)