

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

MEJORA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA AL VIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)

GONZALO TORRES CANDELA

DICIEMBRE 2007



TESIS DE MÁSTER EN GENÉTICA Y MEJORA VEGETAL
TUTORA: Dra. MARÍA JOSÉ DIÉZ NICLÓS

RESUMEN

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (Tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) fue descrita por primera vez en Israel en 1939, encontrándose actualmente distribuida por las zonas cálidas y templadas de todo el mundo. La enfermedad está causada por un complejo de virus pertenecientes al género *Begomovirus* familia *Geminiviridae* y que es transmitido por el vector *Bemisia tabaci*. Hasta la fecha sólo se han conseguido cultivares tolerantes. Dicha tolerancia se ve fácilmente superada si la presión del inóculo es elevada. Se han encontrado resistencias en diversas entradas de especies silvestres de *Solanum*, la más utilizada ha sido la derivada de *S. chilense* y concretamente el gen *Ty-1*, que ha sido el más utilizado en híbridos comerciales. El objeto del presente trabajo es la obtención de líneas resistentes a partir de resistencias encontradas en *S. chilense* y *S. habrochaites*, la determinación de su control genético, la obtención de marcadores moleculares ligados a la resistencia procedente de ambas fuentes y la obtención de materiales altamente resistentes mediante la acumulación de genes de resistencia de distintas fuentes.

ABSTRACT

The tomato yellow leaf curl disease (TYLCD) was described for the first time in Israel in 1939, nowadays it is worldwide distributed. The disease is caused by a group of viruses of the genus *Begomovirus* family *Geminiviridae*, and it is transmitted by the vector *Bemisia tabaci*. Just tolerant cultivars have been developed although it is easily overcome when the quantity of inoculus is high. Several resistance have been found in wild species of *Solanum*, the most successful one is *Ty-1* which is used in the development of commercial hybrids. The goal of this project is the obtention of resistant lines using the natural resistance of *S. chilense* and *S. habrochaites*, its genetic control, the obtention of molecular markers linked to the resistance of both sources and the obtention of high resistant staff by the unification of the resistance genes of different sources.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD
- 1.2 AGENTE CAUSAL DEL TYLCD
- 1.3 SINTOMATOLOGÍA PRODUCIDA EN TOMATE POR LOS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS A TYLCD
- 1.4 TRANSMISIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS A TYLCD
- 1.5 GAMA DE HOSPEDANTES DE LOS BEGOMOVIRUS
- 1.6 LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN ESPAÑA
- 1.7 ESTRATEGIAS DEL CONTROL DE LA ENFERMEDAD

2. OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA

4. PLAN DE TRABAJO

5. CRONOGRAMA

6. BIBLIOGRAFÍA

7. ANEJOS

1. INTRODUCCIÓN

1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad del rizado amarillo del tomate (tomato yellow leaf curl disease, TYLCD) fue descrita por primera vez en Israel en 1939. En 1959 arrasa por completo la producción de tomate del Valle del Jordán y en 1964 se publica por vez primera la naturaleza vírica de la enfermedad (Cohen y Harpaz, 1964) y su asociación su vector natural la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius). En 1983 se determina que el agente causal es un geminivirus (Cherif y Ruso) y se aísla la partícula viral en 1988 (Czosnek *et al.*).

En 1991 se publicó la secuencia del virus. Actualmente se sabe que TYLCD está causado por un complejo de virus pertenecientes al género *Begomovirus* familia *Geminiviridae*. La enfermedad se encuentra distribuida en la actualidad por las zonas cálidas y templadas de todo el mundo, de Israel se extendió a Oriente Medio, norte y centro de África y sudeste asiático (Cohen y Antignus, 1994; Czosnek y Laterrot, 1997). En el sur de Europa se detectó en Italia (Credi *et al.*, 1989), España (Moriones *et al.*, 1993), Portugal (Louro *et al.*, 1996), Francia (Dalmon *et al.*, 2000) y Grecia (Avgelis *et al.*, 2001). La enfermedad fue introducida con material vegetal importado desde Israel en la República Dominicana y de ahí pasó probablemente al resto del caribe. La enfermedad, bien procedente de esta introducción o de otra, ha sido detectada en México (Brown *et al.*, 1986), EEUU (Mogol *et al.*, 1999), Argentina (Czosnek y Laterrot, 1997) y Venezuela (Zambrano *et al.*, 2007). También se ha encontrado la enfermedad en otros países como Australia (Nahkla *et al.*, 1993), Japón (Kato *et al.*, 1998), China (Zeidan *et al.*, 1998), otras zonas del lejano oriente (Green *et al.*, 1998), Marruecos (Peterschmit *et al.*, 1999a), Isla Reunión (Peterschmit *et al.*, 1999b), Madagascar (Delatte *et al.*, 2002), Etiopia (Shih *et al.*, 2006), Indonesia (Tsai *et al.*, 2006)...

2. AGENTE CAUSAL DEL TYLCD

La enfermedad del rizado amarillo del tomate está causada por un complejo de virus de la familia *Geminiviridae* género *Begomovirus*. Los geminivirus poseen una cápsida viral formada por dos unidades cuasicosaédricas unidas por una de sus caras. Dicha

cápsida está constituida por una única clase de proteína. La mayoría de los geminivirus presentan un genoma constituido por una molécula de ADN circular monocatenario de entre 2,5 y 3 kb. Existen especies bipartitas que presentan dos moléculas de ADN, como en el caso del aislado de Tailandia.

La familia *Geminiviridae* está formada por cuatro géneros, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* y *Topocuvirus*. El género *Begomovirus* es el más numeroso incluyendo más de 80 especies. Su vector natural es la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) aunque también la mosca blanca *Trialeurodes ricino Misra* (Hemiptera: Aleyrodidae) puede actuar como vector de alguna especie de begomovirus, concretamente se ha citado como posible vector del aislado TYLCV-Is. Aunque la mayoría de las especies asociadas a TYLCD poseen un genoma monopartito, los begomovirus en general presentan un genoma bipartito. Poseen una molécula de ADN circular que codifica 6 proteínas.

Se han identificado 9 especies virales causantes del TYLCD (Fauquet y Stanley, 2005): *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCChV), *Tomato leaf curl Guandong virus* (TYLCGuV), *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV), *Tomato yellow leaf curl Málaga virus* (TYLCMaV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCThV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Además hay otras seis especies propuestas: *Tomato yellow leaf curl Nigeria virus* (TYLCNV), *Tomato yellow leaf curl Kuwait virus* (TYLCKwV), *Tomato yellow leaf curl Saudi Arabia virus* (TYLCSAV), *Tomato yellow leaf curl Tanzania virus* (TYLCTzV), *Tomato yellow leaf curl Yemen virus* (TYLCYV), *Tomato yellow leaf curl Indonesia virus* (TYLCIdV).

Recombinantes

La recombinación es un mecanismo adaptativo que permite aumentar la diversidad genética del virus así como su evolución y adaptación a nuevas condiciones. Dos de las especies virales descritas hasta la fecha causantes de TYLCD proceden de recombinaciones ocurridas entre las especies TYLCSV y TYLCV, concretamente la especie TYLCMaV es el resultado de la recombinación de los aislados TYLCV-(ES72/97) y TYLCSV- ES (1) y la especie TYLCAxV de la recombinación entre los aislados TYLCV-(Alm) y TYLCSV-ES (1) (García-Andrés *et al.*, 2006). Mediante la infección mixta de plantas de tomate con las especies TYLCV y TYLCSV se ha

comprobado que, tras períodos prolongados de coinfección, se producen frecuentemente recombinantes, siendo éstos además capaces de competir con las especies de las que provienen y ser transmitidos por *Bemisia tabaci*.

3. SINTOMATOLOGÍA PRODUCIDA EN TOMATE POR LOS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS A TYLCD

Tras la inoculación por *Bemisia tabaci* los síntomas aparecen en 2-4 semanas, principalmente en los 12-15 primeros días o los 20-25 en función de la temperatura. El máximo contenido viral en la planta se alcanza a los 12-15 días. Estos síntomas varían lógicamente en función del estado de desarrollo de la planta, su fondo genético, las condiciones medioambientales y el aislado del virus. Los síntomas que presentan las plantas infectadas incluyen una reducción de la superficie foliar y curvatura de los folíolos hacia arriba, dándoles un aspecto acucharado. Ocasionalmente pueden aparecer amarillamientos en los márgenes foliares y coloración violácea en el envés. Los folíolos más jóvenes presentan una disminución importante de la superficie foliar llegando a reducirse prácticamente al nervio central. Infecciones en fases tempranas provocan una parada del crecimiento y dan un aspecto arbustivo a la planta. En lo que se refiere a la producción, las infecciones pueden producir abscisiones de flores, falta de cuajado y frutos de tamaño y color no comerciales (Figuras 1 a 4). Las pérdidas pueden alcanzar el 100%



Figura 1. Amarilleo y fruncido de los folíolos



Figura 2. Acucharado y rizado de los foliolos



Figura 3. Amarilleo, rizado y acucharamiento de los foliolos. Detención del crecimiento.



Figura 4. Amarilleo y rizado leves

4. TRANSMISION DE LOS BEGOMOVIRUS ASOCIADOS A TYLCV

Como ya se ha apuntado anteriormente, los begomovirus son transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Figura 5).



Figura 5. Adulto de *Bemisia tabaci*

Existen descritos 20 biotipos de este insecto que difieren en sus características genéticas o biológicas ya que morfológicamente son idénticos (Brown *et al.*, 1995). De estos 20 se han detectado en la península ibérica solamente los biotipos B,Q y S, siendo el mayoritario el Q en España y el B a nivel mundial. El biotipo Q se localizó inicialmente en la cuenca mediterránea y mas recientemente en otras áreas como China (Dong *et al.*, 2005), Arizona (Dennehy *et al.*, 2006) y Japón (Ueda y Brown, 2006). El biotipo S se ha detectado en Málaga sobre plantas de *Ipomoea indica*. El virus es adquirido por la mosca al alimentarse en plantas de tomate infectadas. El insecto transmite el virus de manera muy eficiente y de forma circulativa, debiendo pasar por el tracto digestivo

hasta alcanzar las glándulas salivares. El virus, para evitar ser degradado, se une específicamente a una proteína de la familia de las chaperonas que es producida por bacterias endosimbiontes. Experimentalmente los tiempos mínimos de adquisición y transmisión del virus están en 15-30 minutos siendo más eficiente la transmisión a mayores tiempos de exposición. El tiempo de latencia desde el inicio de la adquisición es de 17-20 horas y la mosca es infectiva durante 7-20 días. El virus puede ser transmitido por vía sexual (Ghanim y Czosnek, 2000) y a su descendencia en al menos dos generaciones (Ghanim *et al.*, 1998) aunque no parece que sea así en todas las especies causantes de TYLCD. En el aislado de Cerdeña se observó que existía infectividad sólo en la primera generación, perdiéndose posteriormente (Bosco *et al.*, 2004). Existen diferencias incluso entre aislados de una misma especie viral, en una cepa de TYLCV de Portugal no se observó transmisión a la primera generación (Bosco *et al.*, 2004). La hembra es más eficiente en la transmisión que el macho y el virus afecta negativamente a su vector, las moscas que tienen el virus son menos longevas y presentan una menor tasa de fecundidad (Rubinstein y Czosnek, 1997), hecho que está relacionado con la capacidad del virus de replicarse en el interior del insecto (Czosnek *et al.*, 2001).

Otras vías de transmisión del virus son: agroinoculación (Kheyr-Pour *et al.*, 1991), transmisión mecánica (sin importancia en condiciones naturales) (Makkouk *et al.*, 1979; Andel-Sahun, 1990) y por injerto. No se han detectado hasta la fecha infecciones por suelo o por semilla (Cohen y Nitzany, 1966; Makkouk *et al.*, 1979; Credi *et al.*, 1989).

5. GAMA DE HOSPEDANTES DE LOS BEGOMOVIRUS

Los estudios sobre la gama de hospedantes se limitan a las especies TYLCV y TYLCSV. Ambas especies no tienen una gama amplia de hospedantes (Harrison, 1985), lo que es corriente en la familia de los begomovirus, siendo capaces de infectar solamente algunas especies de varias familias (*Asclepidaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Solanaceae* y *Umbelliferae*)(Cohen y Nitzani, 1966; Cohen y Antignus, 1994). Se ha detectado en las siguientes especies cultivadas: Tomate (*Solanum lycopersicon*), berenjena (*Solanum melongena* L.) (Abou-Jawdah *et al.*, 1999), judía (*Phaseolus vulgaris* L.)(Navas-Castillo *et al.*, 1999), pimiento (*Capsicum annum* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. y *C. frutescens* L.)(Reina *et al.*, 1999; Roye *et al.*, 1999; Salati *et al.*, 2002; Morilla *et al.*, 2005; Polston *et al.*, 2006), lisiantus

(*Eustoma grandiflorum* L.)(Cohen et al., 1995), calabacín (*Cucurbita pepo* L.) (Martínez-Zubiaur et al., 2004) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Font et al., 2005). El aislado de Cerdeña (TYLCSV) solo ha sido detectado de forma natural infectando tomate. De forma natural infecta a las siguientes especies: *Cynanchum acutum* L., *Datura stramonium* L., *Malva parviflora* L., *Solanum nigrum*, *Solanum luteum* L., *Euphorbia spp* (Bosco et al.,1993; Davino et al., 1994; Bedford et al., 1998; Sánchez-Campos et al., 2000), *Convolvulus* sp.,*Cúscuta* sp. y *Chenopodium murale* L (Jordá et al.,2001). La gama de hospedantes depende también del aislado, por ejemplo *S. nigrum* es infectada por el aislado TYLCV de la República Dominicana (Salati et al., 2002) y de Israel detectado en España (TYLCV-(Alm)) (Monci et al., 2002) pero no por el aislado TYLCV-(Es72/97)(Monci et al.,2002). La especie recombinante TYLCMaIV es capaz de infectar tomate, judía, *S. nigrum* y *S. luteum* mientras que las especies de las que procede infectan tomate, *S. nigrum* y *S. luteum* en el caso de TYLCSV y tomate y judía solamente en el caso de TYLCV (Monci et al., 2002). En el caso del otro recombinante detectado TYLCAxV los resultados son muy similares (García-Andrés et al., 2006)

6. LA ENFERMEDAD DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN ESPAÑA

En España es detectado por primera vez en 1992 en cultivo de invernadero de Almería (Reina et al., 1994) y Murcia (Moriones et al., 1993) extendiéndose rápidamente a Málaga y Granada. Estos dos primeros focos detectados estaban causados por la especie procedente de Cerdeña (TYLSCV). En 1997 se detecta otra forma viral correspondiente a la cepa Mild de TYLCV con sintomatología mas grave de lo habitual (Navas-Castillo et al., 1999). Dicha cepa afecta también gravemente a los cultivos de judía en Málaga y Almería y pimiento en los invernaderos de Almería. Ambos cultivos entran frecuentemente en las rotaciones con tomate dificultando aun más su control al ofrecerse al virus reservorios donde permanecer a lo largo de todo el año. La enfermedad se encuentra extendida tanto por la península (Barcelona, Valencia, Castellón, Alicante, Murcia, Almería, Granada y Málaga) como por las Islas Canarias y Baleares (Font et al., 2002). La cepa inicialmente detectada (TYLCSV, aislado procedente de Cerdeña) ha sido paulatinamente desplazada por el aislado procedente de Israel (TYLCV-Is) el cual presenta una mayor adaptación ecológica. A pesar de que ambas cepas presentan la misma adaptación en tomate y coexisten en las infecciones en

la planta, la cepa TYLCV es transmitida más eficientemente por los biotipos de *B. tabaci* predominantes en España (biotipo Q principalmente). Por otro lado, el cultivo de judía es un reservorio para TYLCV pero no para TYLCSV que como ya se ha indicado es un cultivo que se intercala con el de tomate (Sánchez-Campos *et al.*, 1999). También ha tenido incidencia en este desplazamiento el hecho de estar el aislado TYLCV mas adaptado a las resistencias introducidas en tomate.

La coexistencia de ambos aislados en la misma planta ha posibilitado la aparición de recombinantes frecuentemente, en concreto se han identificado TYLCMV (*Tomato yellow leaf curl Malaga virus*) y TYLCAxV (*Tomato yellow leaf curl Axarquiai virus*) (García-Andrés *et al.*, 2006) los cuales presentan una gama mayor de de hospedantes que las especies de las que proceden siendo en algunos casos los síntomas incluso mas severos. Se ha constatado también la dispersión de dichos recombinantes.

- *Estructura de las poblaciones*

De los tres estudios realizados en nuestro país sobre la estructura y diversidad de las poblaciones de begomovirus asociadas a TYLCD se concluye que:

- La estructura de la población de la especie TYLCSV es elevadamente estable y genéticamente muy uniforme durante los 8 primeros años tras la primera detección del virus (Sánchez-Campos *et al.*, 2002)
- Las poblaciones de TYLCSV y TYLCV tanto en la costa mediterránea como en las islas Baleares estaban compuestas por un único haplotipo predominante siendo la diversidad genética baja, a excepción de la región de Murcia en donde la población era más heterogénea y compuesta de tres haplotipos principales (Font *et al.*, 2007)
- Las poblaciones estudiadas en tomate y judía en España e Italia están estructuradas según el hospedante y la zona geográfica, presentando variaciones con el tiempo. La diversidad genética encontrada es baja. (García-Andrés *et al.*, 2007b)

7. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD

a. METODOS PREVENTIVOS

La transmisión del virus prácticamente sólo puede ser manejada mediante el control de las poblaciones de *B. tabaci*. El uso de insecticidas en campo crea poblaciones resistentes además del perjuicio medioambiental que implica su uso. En cultivo de invernadero el control con insecticidas resulta algo más eficaz. También se usan mallas anti-insectos que evitan su dispersión aunque disminuyen la ventilación, incrementan la temperatura dentro del invernadero y no resultan muy efectivos. El conocimiento de la incidencia de infección vírica podría ser útil para elegir épocas favorables de plantación aunque la influencia de los precios que se obtienen en función de la fecha de transplante también tendrían que tenerse en consideración. Una adecuada rotación de cultivos que incluya especies no susceptibles al virus, el control de las malas hierbas que pudieran constituir un reservorio para el virus y el uso de planta libre de virus en fases tempranas son prácticas que ayudarían al control de la enfermedad. Sin embargo recientemente se ha comprobado que cepas del virus son capaces de infectar judía (*Phaseolus vulgaris*) y pimiento (*Capsicum annum*), especies ambas que entran con frecuencia en las rotaciones. Por otro lado, las especies de malas hierbas susceptibles al TYLCV son escasas, aunque en Israel se ha propuesto la eliminación de *C. acutum* como medida preventiva. Es importante tener en cuenta en cualquier caso que *B. tabaci* actúa por sí misma como reservorio del virus. Recientes ensayos realizados en Israel con plásticos que filtran la luz ultravioleta han puesto de manifiesto que la mosca tiene dificultades para desplazarse en ausencia de ésta, registrándose disminuciones de las poblaciones de hasta el 50%. También se han utilizado himenópteros parasitoides naturales de los géneros *Eretmocerus* (Urbaneja *et al.*, 2007) y *Encarsia* (Gerling *et al.*, 2001) que en número adecuado son capaces de controlar con cierta eficacia las poblaciones de mosca blanca, aunque la especie *Eretmocerus mundos* necesita la luz ultravioleta para localizar a las moscas, así que no es compatible su utilización con el uso de mallas que filtren dicha longitud de onda. El uso de cultivos trampa ha proporcionado resultados positivos, comprobándose que disminuye el porcentaje de plantas con síntomas en cultivos de tomate rodeados de cultivo de pepino (Al-Hitty y Sharif, 1987) o calabaza (Schuster, 2004). En cualquier caso ninguno de estos métodos resulta por sí solo

totalmente eficiente siendo fundamental combinar varios para reducir a largo plazo las poblaciones de *B. tabaci*, incluyendo el desarrollo de variedades resistentes.

b. MEJORA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A TYLCD

La mejora de la resistencia está basada en la búsqueda e introgresión de resistencias desde especies silvestres hacia *Solanum lycopersicon*, aunque hasta la fecha sólo se han conseguido cultivares tolerantes. Dicha tolerancia se ve fácilmente superada si la presión del inóculo es elevada. Se han encontrado resistencias en diversas entradas de *S. pimpinellifolium* L. (Zakay *et al.*, 1991; Hassan y Andel-Ati 1999; Picó *et al.*, 2000), *S. peruvianum* L. (Hassan *et al.*, 1982; Hassan *et al.*, 1987; Kasrawi *et al.*, 1998; Pilowsky y Cohen 1990; Zakay *et al.* 1991), *S. hirsutum*, *S. chilense* (Zakay *et al.*, 1991; Czosnek *et al.*, 1993; Picó *et al.*, 1998), *S. habrochaites* (Hassan *et al.*, 1982, 1984a; Zakay *et al.* 1991; Channarayappa *et al.*, 1992; Czosnek *et al.*, 1993; Kasrawi *et al.*), y *S. galapagense* (Hassan *et al.*, 1982; 1984a). De todas ellas las más usadas han sido *S. peruvianum* y *S. chilense*, siendo en esta última especie en la que se han identificado las mejores fuentes de resistencia. La excepción es el híbrido comercial Marmande cuya fuente de resistencia es una raza local de *S. lycopersicon* originaria de Cabo Verde (comercializada por Royal Sluis).

La primera especie que se empleó fue *S. pimpinellifolium*, en concreto la entrada LA121 (Pilowsky y Cohen, 1974). Las líneas derivadas, a pesar de presentar síntomas atenuados, mostraban una reducción importante tanto del rendimiento como de la enfermedad (Pilowsky y Cohen, 1974). Los trabajos desarrollados a partir de *S. peruvianum* han tenido más éxito. A partir de la entrada PI126935 de *S. peruvianum* se desarrolló el primer híbrido comercial (TY20), el cual presenta un retraso en la aparición de los síntomas y acumulación viral con rendimientos aceptables. Otras entradas (PI126926, PI126930, PI390681 y LA441) han sido utilizadas en el desarrollo de líneas con mayores niveles de resistencia, tales como “TY172” y “TY197” (Lapidot *et al.*, 1997; Friedmann *et al.*, 1998). La entrada PI126944 presenta buenos niveles de resistencia no sólo frente a TYLCD (Picó *et al.*, 1998; Pilowsky y Cohen, 2000) sino también frente al virus del bronceado del tomate (*Tomato spotted kilt virus*, TSWV) (Paterson *et al.*, 1989), al virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) (Yamakawa y Nagata, 1975), al virus del rizado del tomate (*Tomato leaf curl virus*, ToLCV) (Muniyappa *et al.*, 1991) y a *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-lycopersici*

(Rowe y Farley, 1981). Se han desarrollado también líneas tolerantes a partir de *S. habrochaites* como la línea H24 procedente de la entrada B6013, eficaz frente a los aislados de Taiwán y sur de India (Hanson *et al.*, 2000), o como la línea 902 derivada de las entradas LA386 y LA1777 (Vidavsky y Czosnek, 1998) y que impide la replicación del virus y no muestra síntomas incluso tras inoculaciones masivas con mosca blanca.

De *S. chilense* derivan las mejores fuentes de resistencia y las más ampliamente usadas a nivel comercial. Se han identificado diversas entradas con ciertos niveles de resistencia, destacando entre ellas las entradas LA1969, LA1932 y LA1938. La entrada LA1969 ha sido descrita por numerosos autores como altamente resistente (Zakay *et al.*, Scout y Schuster, 1991; Czosnek *et al.*, 1993; Michelson *et al.*, 1994; Picó *et al.*, 1998; Pérez de Castro *et al.*, 2005; Piñón *et al.*, 2005) y numerosos híbridos comerciales incorporan la resistencia derivada de dicha entrada. Los híbridos sin embargo terminan por mostrar síntomas de la enfermedad en condiciones de inóculo elevadas. Las entradas LA1932 y LA1938 (Picó *et al.*, 1999) fueron descritas inicialmente como resistentes frente a otros begomovirus y han resultado ser resistentes a algunas especies virales responsables de TYLCD. De *S. galapagense* derivada de la entrada LA1401 se ha desarrollado una línea de mejora (línea 44) en Egipto que presenta resistencia moderada a TYLCD (Moustafa y Nakhla, 1990).

Además de la resistencia basada en la restricción a la multiplicación del virus o a su movimiento dentro de la planta existen otros mecanismos, presentes en las especies silvestres cercanas al tomate, de antibiosis o antixenosis. En *S. habrochaites* los tricomas glandulares tipo IV de las hojas poseen ciertos aleloquímicos que dan resistencia a la planta (Muigai *et al.*, 2002), al igual que en *S. pennelli* Correll cuya resistencia a *Bemisia* está basada en la presencia de acilazúcares también en los tricomas glandulares tipo IV (Lawson *et al.*, 1997; Blauth *et al.*, 1998). No obstante dada la complejidad del control genético de los caracteres indeseables ligados a los genes de resistencia no ha sido posible transferir éstos caracteres a *S. lycopersicon*. Otro caso interesante es el del gen Mi introgresado a partir de *S. peruvianum* que confiere resistencia frente a nematodos del género *Meloidogyne* y a algunos aislados del áfido *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, no estando dicha resistencia relacionada con la presencia de tricomas y exudados. Dicho gen es también responsable de la resistencia a *B. tabaci* (Nombela *et al.*, 2003) aunque depende del desarrollo de la planta, de la temperatura y del biotipo de *Bemisia* de que se trate. Es un mecanismo útil en combinación con otros.

CONTROL GENÉTICO:

El control genético de la resistencia varía dentro de una misma especie en función de la entrada estudiada. Así, en *S. pimpinellifolium* se han descrito resistencias desde recesivas a dominantes y de tipo cuantitativo en la entrada LA 121 y controles más complejos en las entradas PI 407543, 407544 y PI 407555 cuyo modo de acción génica en las dos primeras es la dominancia completa y la dominancia parcial en la tercera. En el caso de la entrada LA 1969 de *S. chilense* la resistencia está controlada por un gen mayor Ty-1 parcialmente dominante con dos genes modificadores (Zamir et al., 1994) y en el caso de la entrada LA2779 por un gen mayor recesivo denominado Ty-3 (Ji et al., 2007), estando ambos genes muy ligados aunque no son alélicos (Ji y Scott, 2006; Ji et al., 2007). *S. hirsutum* presenta diversos controles en función de la entrada, dos genes actuando de forma epistática (entrada B6013), un modo de acción génica recesiva (H2-INRA) y un modelo dominante (entrada LA 386). En *S. peruvianum* encontramos la entrada PI-126935 con resistencia recesiva controlada por 5 genes, en diversas entradas hay presente una resistencia controlada por al menos tres genes que interactúan entre sí. La resistencia derivada de la entrada LA386 de *S. habrochaites* ha sido descrita por Hassan *et al.* (1984a) bajo un control poligénico. Sin embargo tras el análisis de cruzamientos entre las entradas LA386 y LA1777 Vidavsky y Czosnek (1998) concluyeron que la tolerancia estaba controlada por un gen y la resistencia por dos o tres genes aditivos.

DESARROLLO DE MATERIAL RESISTENTE:

Actualmente el gen Ty-1 procedente de *S. chilense* es la fuente de resistencia mas utilizada en el desarrollo de nuevos híbridos comerciales. El cultivar comercial de tomate TY20, desarrollado en el valle del Jordán a partir de la resistencia encontrada en la entrada PI-126935 de *S. peruvianum*, presenta tolerancia con retraso en la aparición de los síntomas y acumulación viral mediante la reducción de la multiplicación y expansión del virus a lo largo de la planta. A partir de resistencias encontradas en *S. hirsutum* también se han desarrollado líneas como la H24 que resulta prácticamente inmune frente al aislado TYLCV-Tw, la 902 que permanece asintomática incluso tras inoculaciones masivas y la 908 con elevados niveles de tolerancia, ambas con buenas

características agronómicas. A pesar de los genes de resistencia incorporados, el material comercial sólo presenta tolerancia frente a TYLCV.

c. DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A LA RESISTENCIA

Se han identificado marcadores moleculares para el gen TY-1 localizado en el cromosoma 6 (procedente de *S. chilense*) entre los marcadores RFLP TG297 y TG97 (Zamir *et al.*, 1994). También se han utilizado como marcadores para el gen TY-1 dos CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), uno basado en la secuencia del gen de la fosfatasa ácida (*Aps*) (García-Martínez *et al.*, 2004) y el marcador REX-1 asociado al gen de resistencia a nematodos Mi (Williamson *et al.*, 2004). En *S. chilense* se han identificado marcadores RAPD asociados a la resistencia de tres entradas, LA1932, LA1938 y LA2779 (Ji y Scout, 2005a), siendo la resistencia a TYLCD explicada por dos QTL en las entradas LA1932 y LA2779 y uno en la entrada LA1938 todos del cromosoma 6 (Agrama y Scout, 2005a). En la entrada Hirsute INRA de *S. pimpinellifolium* se han localizado cuatro marcadores RAPD en el mismo grupo de ligamiento que explicaba el 27,7% de la resistencia derivada de esta entrada, la cual ha sido cartografiada en el cromosoma 6. En *S. habrochaites* se ha cartografiado la resistencia en el brazo largo del cromosoma 11 (Hanson *et al.*, 2000). Se trata de un solo gen, denominado *Ty-2* (Hanson *et al.*, 2006) y no se ha logrado hasta el momento localizar un marcador estrechamente ligado. En la entrada LA1777 se ha asociado la resistencia a regiones de los cromosomas 1 y 7 aunque parece tener efectos menores sobre la misma.

2. OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

A pesar de los híbridos con resistencia parcial desarrollados hasta la fecha, no se cuenta con una oferta varietal suficiente y con resistencia elevada. En general los híbridos comerciales muestran una resistencia elevada pero parcial, dependiente en muchos casos de la presión del inóculo y de las especies virales presentes en las zonas de cultivo. Sigue siendo necesario por tanto desarrollar nuevos híbridos con niveles de resistencia más elevados. En este contexto se plantean los siguientes objetivos.

- 1.- Comprobación de las fuentes de resistencia descritas frente a los aislados españoles del virus del rizado amarillo del tomate en especies silvestres relacionadas con el tomate
- 2.- Desarrollo de líneas resistentes a partir de *S. chilense* y *S. habrochaites*
- 3.- Determinación del control genético
- 4.- Obtención de un marcador molecular ligado a la resistencia
- 5.- Obtención de materiales con elevados niveles de resistencia

3. METODOLOGÍA

3.- METODOLOGÍA

Objetivo 1.- Comprobación de las fuentes de resistencia descritas frente a los aislados españoles del virus del rizado amarillo del tomate en especies silvestres relacionadas con el tomate

Material

Se probarán las entradas LA 1969, LA 1932 y LA 1938 de *S. chilense*, PI 126935 y PI 126944 de *S. peruvianum*, ECU-566 y ECU-604 de *S. pimpinellifolium* y B-6013 de *S. habrochaites*, descritas en diversas publicaciones como resistentes en diversos grados. Se analizarán 20 plantas de cada entrada. El testigo susceptible será la variedad de tomate Fortuna C. La infección se llevará a cabo utilizando agroinoculación y también mediante el vector del virus *B. tabaci*.

Técnicas de inoculación

En primer lugar se llevará a cabo la agroinoculación, usando un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con un plásmido recombinante portador de una copia dimérica parcial de la especie viral TYLCV. Las bacterias se sembrarán en medio YEB para su crecimiento (ver ANEJO 1), manteniéndose 48 horas en agitador orbital a 26°C y a una velocidad de giro de 180 rpm en oscuridad. Tras este periodo se medirá la absorbancia del cultivo a 600 nm, se ajustará a una unidad de densidad óptica y se centrifugará a 4600 rpm durante 20 minutos en tubos Falcon de 50 ml. Se desechará el sobrenadante y se resuspenderán las bacterias en 0,15 volúmenes de agua destilada en relación al volumen total centrifugado. La agroinoculación se llevará a cabo en un invernadero debidamente aislado en el estado de 3-4 hojas verdaderas, inyectando el cultivo en las axilas de las tres hojas más cercanas al ápice. El testigo Fortuna C se inocula del mismo modo. Las entradas que presenten un mayor nivel de resistencia pasarán a una segunda fase en la que se inocularán con una población infectiva de *B. tabaci* (biotipo Q que es el más frecuente en las zonas de cultivo de España) portadora

de la especie TYLCV. La población se mantiene en un fitotrón en el interior de jaulas con malla antimosca (Figura 6). Para la inoculación se introducirán las plántulas en estado de tres hojas verdaderas en el interior de las jaulas, donde permanecerán durante una semana. Transcurrido este tiempo, se sacarán, se tratarán con un funguicida y se transplantarán a un invernadero debidamente aislado, donde permanecerán hasta el final del ensayo.



Figura 6. Plántulas en el interior de las jaulas con la población infectiva de *Bemisia tabaci*

Diagnóstico

El diagnóstico se llevará a cabo mediante la anotación de los síntomas y la determinación del contenido en ADN viral por hibridación molecular. Las determinaciones se realizarán, a los 15, 25, 35, 45 y 60 días después de la inoculación. Para la evaluación de los síntomas se anotará para cada planta infectada la presencia de amarilleo, rizado, acucharado, ralentización del crecimiento, reducción de la lámina foliar y hojas en forma de garra, dándose un valor global según la escala de 0 (ausencia de síntomas) a 4 (síntomas muy severos). Dado que las especies *S. peruvianum* y *S. chilense* son asintomáticas, será necesario determinar la cantidad de ADN viral mediante hibridación molecular, a fin de conocer el nivel de resistencia en cada planta.

Detección de ADN viral mediante hibridación molecular

La detección del ADN viral se realizará por hibridación molecular mediante la técnica de “dot blot”, utilizando una sonda específica para TYLCV marcadas con digoxigenina. Esta técnica consta de tres pasos:

- Toma de muestras y extracción de ADN
- Hibridación molecular
- Cuantificación del ADN viral

Toma de muestras y extracción de ADN

Se tomará de cada planta una muestra de 150 mg de tejido vegetal de hojas apicales en cada una de las 4 tomas de muestras, efectuadas a los 15, 25, 35 y 50 días después de la inoculación. Las muestras recogidas se congelarán en nitrógeno líquido y se mantendrán en congelador a -80° C hasta el momento de su análisis.

Posteriormente, se extraerá el ADN de cada muestra según el protocolo de extracción descrito por Crespi *et al.* (1991), con modificaciones (Ver ANEJO 2):

Una vez extraído el ADN, se cargará en membranas de nylon cargadas positivamente, siguiendo estos pasos:

1° Desnaturalización de la muestra extraída y de su dilución 1:10, con un tampón compuesto de 30 mM NaOH y 1 mM EDTA, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2° Depositar en la membrana 5 µl de cada muestra desnaturalizada y de su dilución desnaturalizada correspondiente.

El ADN de las muestras se fijará a la membrana mediante la exposición de las mismas a luz UV (UVC 500 UV crosslinker).

Hibridación molecular

El proceso de hibridación molecular consta de tres pasos:

- Marcaje de las sondas
- Hibridación
- Cuantificación

Marcaje de las sondas

La digoxigenina es una molécula que se encuentra en estado natural en algunas plantas del género *Digitalis*.

Para el marcaje de ácidos nucleicos se utilizan dos formas artificiales de esta molécula. Éstas son la digoxigenina-11-dUTP y la digoxigenina-11-UTP. La primera de ellas es la que se ha utilizado en los ensayos realizados.

La digoxigenina se incorpora a la sonda de ADN que se une por homología de secuencia con el ADN del virus.

El tamaño de las sondas es de 500 pb para la especie TYLCV.

Los cebadores utilizados son:

- UIB-1: 5'-ATATGGAGATGAGGTTSCCC-3'. Este es un cebador degenerado. La "S" de la secuencia indica que en esa posición pueden aparecer indistintamente las bases C o G.
- RTL-111: 5'-GTGGGTCCCACATATTGC-3'.

Después de la reacción de marcaje, las sondas se cuantifican mediante electroforesis en gel de agarosa, por comparación con un patrón de pesos moleculares conocidos. Esta cuantificación permite utilizar la misma cantidad de sonda en cada hibridación.

Hibridación

El proceso de hibridación consta de 5 partes, que se describen en el ANEJO 3:

Cuantificación

La cuantificación del ADN viral se efectuará mediante una recta de calibrado, elaborada a partir de una serie de concentraciones de virus conocidas en un rango entre 5 ng y 20 pg. La aplicación de esta recta a las muestras positivas de las membranas hará posible el cálculo de la acumulación viral de cada una de las muestras, empleando el programa Image Gauge V.4.0.

Con el fin de minimizar las diferencias que pudiesen existir en la eficiencia del proceso de extracción, se calculará la relación existente entre la cantidad total de ADN extraído de la planta y la cantidad de ADN viral acumulado tras la infección en esa planta.

Para cuantificar la cantidad de ADN extraído en cada una de las muestras se utilizará la técnica de fluorimetría, basada en los cambios de las características de

fluorescencia de la bisbenzimidida (Hoechst 33258) en presencia de ADN. La bisbenzimidida muestra en ausencia de ADN, un pico en su espectro de excitación a 356 nm y otro en su espectro de emisión a 492 nm, los cuales se desplazan a 365 y 458 nm respectivamente cuando se une al surco menor del ADN. Se utilizará un fluorímetro Hoefler DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences) en el que, una vez calibrado con “Calf thymus DNA standard”, se expondrán las muestras (a las que previamente se había incorporado el colorante Hoechst 33258) a la luz de una lámpara de mercurio de 365 ± 7 nm. La intensidad de esta luz causa la excitación del complejo ADN-colorante dando lugar a un pico en la emisión de luz a 458 nm. En el fluorímetro se detecta sólo la fluorescencia a 460 ± 15 nm, debido a un filtro de emisión situado delante del fotodetector, y su cuantificación permite conocer la concentración de ADN.

Determinación de la resistencia o susceptibilidad de cada entrada

La caracterización de cada planta como resistente o susceptible se realizará en base a la manifestación y severidad de los síntomas y/o a la cantidad de ADN viral contenida.

Objetivo 2.- Desarrollo de líneas resistentes a partir de *S. chilense* y *S. habrochaites*

Basándonos en resultados previos obtenidos por el equipo del COMAV elegiremos como fuentes de resistencia las entradas LA 1932 de *S. chilense* y B-6013 de *S. habrochaites*, ambas con elevados niveles de resistencia. Asumimos, basándonos en la bibliografía, que la resistencia en ambas fuentes es dominante. El método a seguir para la introgresión de los genes de resistencia en la especie cultivada será el retrocruzamiento. Para el estudio del control genético es necesario introgresar los genes de resistencia en el fondo genético de *S. lycopersicum*, ya que las grandes diferencias fenotípicas entre las especies que se cruzan dan lugar a elevada segregación para gran número de caracteres morfológicos de la planta, dificultando enormemente la evaluación de los síntomas y consiguientemente la caracterización de cada planta como resistente o susceptible.

El esquema del método es como sigue:

Se retrocruzarán una variedad susceptible de tomate (Fortuna C) con las entradas resistentes seleccionadas de *S. chilense* y *S. habrochaites*, siendo el proceso análogo en

ambos casos. Fortuna C se empleará como parental femenino, dada la existencia de incompatibilidad unilateral entre *S. lycopersicum* y las especies *S. chilense* y *S. habrochaites*, lo que provoca el fallo del desarrollo del tubo polínico de *S. lycopersicum* en los estilos de *S. chilense* y *S. habrochaites* si éstas se emplearan como parentales femeninos. En la F1 resultante no se realizará selección de plantas resistentes, ya que debido a la dominancia de los genes todas las plantas serán resistentes. Se realizarán una serie de retrocruzamientos hacia la variedad Fortuna C (hasta RC5), seleccionando en cada ciclo las plantas resistentes. Una vez logrado el RC5 se realizarán dos ciclos de autofecundación para identificar los individuos homocigóticos.

Objetivo 3.- Determinación del control genético

Para conocer el control genético de la resistencia al TYLCV derivada de *S. chilense* y *S. habrochaites* se estudiarán las familias formadas a partir del cruce inicial entre las líneas resistentes Fortuna C-Ch y Fortuna C-Ha (derivadas de *S. chilense* LA1932 y *S. habrochaites* B-6013) y la línea susceptible de tomate Fortuna C, constituidas por las generaciones F1, F2 y los retrocruces hacia el parental susceptible (RC1) y hacia los parentales resistentes (RC2). Dado el elevado número de plantas a manejar, serán necesarias hasta 5 jaulas diferentes con poblaciones infectivas de *B. tabaci* para las inoculaciones. Para evitar que las posibles diferencias de densidad de las poblaciones de *B. tabaci* empleadas puedan enmascarar los resultados, se distribuirán en cada jaula un número proporcional de plantas de cada parental, F1, F2 y retrocruces. El número de plantas a probar de cada generación será: 20 de cada parental y de la F1, 150 de la F2 y 100 de cada retrocruce. Por tanto en cada jaula se introducirán 4 plantas de los parentales y de la F1, 30 de la F2 y 20 de cada uno de los retrocruces. Además se incluirán en el ensayo la variedad TY-1, portadora del gen *Ty-1* y la línea H-24 desarrollada a partir de *S. habrochaites*. El esquema para el estudio del control genético será análogo para las familias formadas a partir de *S. chilense* y *S. habrochaites*

Análisis de los resultados

En el caso de estar ante un caso de dominancia total o parcial los resultados esperados en la F1 sería una descendencia completamente resistente igual al parental resistente (dominancia total) o un gran número de resistentes con valores intermedios entre ambos parentales (dominancia parcial). La presencia en el parental resistente de individuos susceptibles indicaría una penetración incompleta del gen. La F2 presentará mayor segregación y en el caso de dominancia incompleta la distribución se verá desplazada hacia los susceptibles. El RC1 hacia el parental susceptible (F1xVe) producirá una distribución muy desplazada hacia valores susceptibles mientras que el retrocruzamiento hacia el resistente (F1xLA1932) producirá una distribución desplazada hacia valores resistentes. Se realizará con los datos la prueba de χ^2 para ver si el control genético se ajusta a un modelo monogénico. En caso de no ajustarse se usarán modelos génicos capaces de estimar la penetración incompleta del gen y el efecto de dosis génica.

Objetivo 4.- Obtención de un marcador molecular ligado a la resistencia

Para la consecución de un marcador molecular ligado a los genes de resistencia emplearemos la técnica de los bloques segregantes desarrollada por Michelmore *et al.* (1991), que permite la identificación de un marcador molecular ligado a un gen en una generación segregante. El método, que también puede ser aplicable a progenies derivadas de un retrocruzamiento (BC1, por ejemplo) consiste en construir dos conjuntos de individuos F2 (bulks) que difieran sólo para el gen al cual se quieren buscar marcadores ligados. De esta forma los conjuntos de individuos se convierten en NILs virtuales, donde cualquier región genómica no ligada al gen para el que difieren los conjuntos será idéntica en ambos. Por el contrario, cualquier marcador molecular que muestre un patrón diferente entre los conjuntos debe estar localizado en la región adyacente al gen de interés. Es muy importante considerar el número óptimo de individuos que deben componer los conjuntos. A mayor número de individuos, menor es el tamaño de la región genómica para la que difieren, y por tanto, los marcadores identificados deberán estar estrechamente ligados. Independientemente del tamaño de los conjuntos se necesitan generaciones F3 para comprobar el correcto genotipado de

los individuos F2 y poder seleccionar individuos F2 homocigóticos para los dos alelos del gen para el que difieren los conjuntos.

Teniendo lo anterior en cuenta, se cruzarán la variedad susceptible de tomate Fortuna C con las líneas de mejora obtenidas después del proceso de retrocruzamiento, conteniendo los genes de resistencia de *S. chilense* y *S. habrochaites*, Fortuna C-Ch y Fortuna C-Ha. Los híbridos obtenidos se autofecundarán para obtener la F2. Las plantas de las dos F2 se inocularán empleado una población infectiva de *Bemisia tabaci*, estableciendo de esta manera dos bloques, uno constituido por 30 plantas resistentes y otro constituido por 40 plantas susceptibles. Se conseguirá semilla de autofecundación de las plantas resistentes para, a partir de la segregación observada seleccionar las plantas resistentes homocigóticas de la F2. Los grupos establecidos de plantas resistentes y susceptibles se genotiparán con marcadores RAPD, seleccionando aquellos que cosegreden con la resistencia o susceptibilidad. Los marcadores RAPD ligados a la resistencia se convertirán en marcadores SCAR, más reproducibles y de fácil manejo.

Objetivo 5.- Obtención de materiales con elevados niveles de resistencia

Todos los genes de resistencia a la enfermedad del rizado amarillo del tomate empleados hasta la fecha confieren una resistencia parcial. Una estrategia para aumentar los niveles de resistencia en los híbridos puede basarse en el empleo conjunto de más de un gen de resistencia procedentes de distintas especies. En nuestro caso pretendemos obtener un híbrido que contenga en heterocigosis el gen procedentes de *S. chilense* (al que llamaremos *Ch*) y *S. habrochaites* (al que llamaremos *Ha*) que hemos introducido en las líneas desarrolladas, con el fin de conocer si la unión de estos dos genes aumenta la resistencia conferida por cada uno de ellos por separado. Para ello será necesario realizar los siguientes cruces y comparar el nivel de resistencia para las siguientes combinaciones de genes:

Genes de resistencia en homocigosis:

Ch Ch

Ha Ha

Adicionalmente compararemos el efecto de estos genes con el gen *Ty-1*

Genes de resistencia en heterocigosis:

Ch ch

Ha ha

Ty-1 ty-1

Combinaciones entre distintos genes:

Ch Ch x Ha Ha

Ch Ch x Ty-1 Ty-1

Ha Ha x Ty-1 Ty-1

Una vez realizados los cruzamientos necesarios y conseguidos los materiales con distintas combinaciones de los genes tanto en homocigosis como en heterocigosis, se realizará un ensayo de inoculación empleando una población infectiva de *B. tabaci*, de forma similar a como se ha descrito anteriormente. El ensayo se realizará en un invernadero, en la campaña de primavera-verano, con un diseño de dos bloques al azar y 20 plantas de cada genotipo por bloque. Se añadirán testigos susceptibles e híbridos resistentes, para poder comparar los niveles de resistencia alcanzados por las nuevas combinaciones de genes.

4.- PLAN DE TRABAJO

Objetivo 1.- Comprobación de las fuentes de resistencia descritas frente a los aislados españoles del virus del rizado amarillo del tomate en especies silvestres relacionadas con el tomate

AÑO 1A

Ensayo de inoculación de las entradas LA 1969, LA 1932 y LA 1938 de *S. chilense*, PI 126935 y PI 126944 de *S. peruvianum*, ECU-566 y ECU-604 de *S. pimpinellifolium*, B-6013 de *S.habrochaites* y la variedad de tomate susceptible Fortuna C. En total se agroinocularán 180 plantas.

Selección de las mejores entradas y obtención de semilla de autofecundación en el caso de que las entradas sean de *S. pimpinellifolium*, ya que esta especie es autocompatible. En el caso de las otras especies será necesario cruzar las plantas

seleccionadas como más resistentes para obtener descendencia de ellas, ya que estas especies son autoincompatibles.

AÑO 1B

Ensayo de inoculación de la descendencia de las plantas seleccionadas en el ensayo anterior. Las plantas que se seleccionen serán las que se utilizarán para introgresar los genes de resistencia en el tomate.

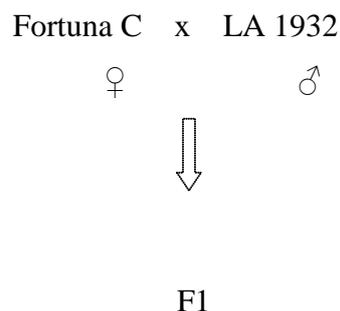
Objetivo 2.- Desarrollo de líneas resistentes a partir de *S. chilense* y *S. habrochaites*

Paralelamente a la introducción en la variedad de tomate Fortuna C, de los genes de resistencia al TYLCV procedentes de *S. chilense* y *S. habrochaites*, se llevará a cabo el mismo proceso para introducir el gen *Ty-1* en el fondo genético de la variedad Fortuna C. Esto se realizará para tener los tres genes en el mismo fondo genético y poder comparar el efecto que la combinación de distintos genes tiene sobre la expresión de la resistencia.

Esquema de uno de los programas de retrocruzamiento (ambos son análogos):

Se realizarán dos cultivos al año (A: cultivo de primavera, B: cultivo de otoño), para lo cual se requerirá un invernadero con calefacción y ventilación.

Año 1B



AÑO 2A

Fortuna C x F1



RC1

En el primer retrocruce se obtendrán plantas resistentes y susceptibles, por lo que se llevará a cabo un ensayo de inoculación, y se seleccionarán las plantas resistentes

AÑO 2B

Retrocruce de cada planta resistente (Rn), cuyo genotipo será heterocigótico, hacia Fortuna C,

Fortuna C X R1, R2 R3.....Rn



RC2

AÑO 3A

Ensayo de inoculación con mosca de las plantas RC2 para seleccionar las resistentes. Sobre dichas plantas se realiza un nuevo retrocruzamiento (RC3)

Fortuna C X R1, R2 R3.....Rn



RC3

Se continua el plan de retrocruzamiento hasta el 6° retrocruce, que será obtenido al final del 4° año.

AÑO 5A

Sembramos la semilla de la autofecundación de cada planta, inoculándose con mosca, para eliminar los homocigotos recesivos y seleccionar los genotipos resistentes, los cuales se autofecundan

AÑO 5B

Se siembra una parte de la semilla de cada autofecundación, guardándose el resto, por familias. Se inocula y se observan las familias que segreguen y las que no, seleccionando estas últimas que serán homocigóticas para la resistencia

Como resultado del programa de retrocruzamiento se obtendrán líneas Fc-ch y Fc-ha, portadoras de los genes de resistencia de las especies *S. chilense* y *S. habrochaites* respectivamente.

Objetivo 3.- Determinación del control genético

Es análogo en ambos casos

Año 5B Fortuna C-Ch x Fc



F1

Año 6A Sembramos 40 plantas de F1 y realizamos el RC1 con Fortuna C, el RC2 con Fortuna C-*Ch* y autofecundamos para obtener la F2. Se reserva suficiente semilla de la F1 para sembrar en el año siguiente

Año 6B Se siembran ambos parentales, la F1, F2, RC1 y RC2 en jaulas como se indicó en el apartado de metodología y se caracteriza cada planta como resistente o susceptible.

Análisis estadístico de los resultados.

Objetivo 4.- Obtención de un marcador molecular ligado a la resistencia

AÑO 5B

Fortuna C-*Ch* x Fc



F1

AÑO 6A

Obtención de la F2 mediante autofecundación de la F1. Inoculación de la F2. Selección de plantas resistentes y susceptibles. Recogida de material vegetal y congelación del mismo. Genotipado de las plantas susceptibles de la F2.

AÑO 6B

Obtención de descendencia mediante autofecundación (F3) de las plantas resistentes de la F2. Inoculación de las plantas de las familias F3. Genotipado de las plantas resistentes homocigóticas de la F2. Análisis de resultados. Conversión de los marcadores RAPD ligados a los genes de resistencia en marcadores SCAR.

Objetivo 5.- Obtención de materiales con elevados niveles de resistencia

AÑO 5B

Obtención de los genes de resistencia en heterocigosis:

Cruces entre las líneas portadoras en homocigosis de los tres genes de resistencia y la línea Fortuna C:

Ch Ch x ch ch

Ha Ha x ha ha

Ty-1 Ty-1 x ty-1 ty-1

Cruces entre las distintas líneas para obtener las diferentes combinaciones de genes:

Ch Ch x Ha Ha

Ch Ch x Ty-1 Ty-1

Ha Ha x Ty-1 Ty-1

AÑO 6A

Ensayo de inoculación con todos los materiales obtenidos para comparar la resistencia conferida por los tres genes en estudio en homocigosis, en heterocigosis y en las posibles combinaciones entre ellos.

5. CRONOGRAMA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Avgelis AD, Roidakis N, Dovas CI, Katis NI, Varveri C, Vassilakos N, Bem F.2001. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* on tomato crops in Greece. *Plant disease* 85: 678
- Bosco D, Mason G, Accotto GP. 2004. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology* 323:276-283
- Brown JK, Goldstein DE, Nelson MR. 1986. Partial characterization of a geminivirus isolated from tomato with yellow leaf curl symptoms. *Phytopathology* 76:842.
- Brown JK, Fröhlich DR, Rosell RC. 1995. The sweet-potato or Silverleaf Whiteflies-Biotypes of *Bemisia tabaci* or a Species Complex. *Annual Review of Entomology* 40:511-534
- Cherif C, Russo M. 1983. Cytological evidence of the association of a geminivirus with the tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Journal of Phytopatology* 108: 221-225
- Cohen, Antignus Y, 1994 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* 10: 259-288
- Cohen S, Harpaz I. 1964. Periodic, rather than continual adquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) *Entomologia Experimentalis et Applicata* 7: 155-166
- Credi R, Betti L, Canova A. 1989. Association of a geminivirus with a severe disease of tomato in Sicily. *Phytopathologia Mediterranea* 28: 223-226
- Czosnek H, Laterrot H, 1997. 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142: 1391-1406.
- Czosnek H, Ber R, Navot N, Zamir D. 1988. Detection of Tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridation with a viral DNA probe. *Plant Disease* 72: 949-951
- Czosnek H, Ghanim M, Morin S, Rubinstein G, Fridman V, Zeidan M. 2001. Whiteflies: vectors or victims? – of geminiviruses. *Advances in Virus Research* 57:291-321.
- Dalmon A, Peterschmitt M, Cailly M, Dufour O, Jean M, Baguet A.2000. Yellow leaf curl of tomatos: a serius virus caused by TYLCV, accidentally introduced into France. *Phytoma* 2000: 10-13
- Delatte H, Reynaud B, Lett JM, Peterschmitt M, Granier M, Ravololonandrianina J, Goldbach WR.2002. First molecular identification of a begomovirus isolated from tomato in Madagascar. *Plant Disease* 86:1404
- Dennehy TJ, De Gain B, Harpold G, Brown JK, Byrne F, Morin S, Nichols R. 2006. First New Worl report of Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius). Reveals high levels of resistance to insecticides. *Resistant Pest Management Newsletter* 15:18-202006
- Dong C, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu-QJ, Zhu G R.2005. Sequence analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Scientia Agricultura Sinica* 38: 76-85 2005
- Font MI, Rubio L, Martínez-Culebras PV, Jordá C. 2007. Genetic structure and evolution of natural populations of virases causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. *Virus Research* 2007. DOI 10.1016/j.virusres.2007.04.003
- Ghanim M, Czosnek H. 2000. *Tomato yellow leaf curl geminivirus* (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *Journal of Virology* 74:4738-4745
- Green SK, Tsai WS, Shih SL, Black LL, Rezaian A, Rashid MH, Roff MMN, Myint YY, Hong LTA. 2001. Molecular characterization of begomoviruses associated with

leaf curl diseases of tomato in Bangladesh, Laos, Malaysia, Myanmar and Vietnam. *Plant Disease* 85:1286

- García-Andrés F, Monci F, Navas-Castillo J, Moriones E. 2006. Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350:433-442.
- Kato K, Onuki M, Fuji S, Hanada K. 1998. The first occurrence of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 64:552-559
- Louro D, Noris E, Veratti F, Accotto GP. 1996. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Portugal. *Plant Disease* 80: 1079.
- Mogol MT, Simona GW, Dankers W, Sprengel RK, Olson SM, Mogol EA, Polston JE, Hiebert E. 1999. First report of *tomato yellow leaf curl virus* in tomato in South Georgia. *Plant Disease* 83:487
- Moriones E, Arnó J, Accotto GP, Noris E, Cavallarin L. 1993. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *Assiut Journal of Agricultural Science* 21:167-184
- Nahkla MK, Mazyad HM, Maxwell DP. 1993. Molecular characterization of four *Tomato yellow leaf curl virus* isolates from Egypt and development of diagnostic methods. *Phytopathologia Mediterranea*. 32:163-173.
- Peterschmit M, Granier M, Aboulama S. 1999a. First report of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in Morocco. *Plant disease* 83:1074
- Peterschmit M, Granier M, Mekdoud R, Dalmon A, Gambia O, Vayssieres JF, Reynaud B. 1999b. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Reunion Island
- Reina J, Jiménez J, Bejarano ER, Guerra JM, Cuadrado IM, García C. 1994. El virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). *Hortofruticultura* 6: 36-40
- Rubinstein G, Czosnek H. 1997. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whiteflies vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* 78: 2683-2689
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Camero R, Soria C, Díaz JA, Moriones E. 1999. Displacement of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Sr) by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043.
- Shih SL, Green SK, Tsai WS, Lee LM, Wang JT, Tesfaye A. 2006. First report of a begomovirus associated with Tomato yellow leaf curl disease in Ethiopia. *Plant disease* 90:974

- Tsai WS, Shih SL, Green SK, Akkermans D, Jan FJ. 2006. Molecular characterization of a distinct tomato-infecting begomovirus associated with yellow leaf curl diseased tomato in Lembang, Java Island of Indonesia. *Plant Disease* 90:831.
- Ueda S, Brown JK, 2006. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in Japan by mitochondrial cytochrome oxidase I sequence analysis. *Phytoparasitica* 34: 405-411
- Zambrano K, Carballo O, Geraud F, Chirinos D, Fernández C, Marys E. 2007. First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Venezuela. *Plant Disease* 91:768
- Zeidan M, Green SK, Maxwell DP, Nakhala MK, Czosnek H. 1998. Molecular analysis of whitefly-transmitted tomato geminiviruses from southeast and East Asia. *Tropical Research and Extension* 1:107-115

7. ANEJOS

ANEJO 1. Medio de cultivo de *A. tumefaciens* utilizado en agroinoculación

MEDIO YEB BASE	TYLCSV	TYLCV
Extracto de levadura	1 g/l	1 g/l
Extracto de carne	5 g/l	5 g/l
Bacto-peptona	5 g/l	5 g/l
Sacarosa	5 g/l	5 g/l
MgSO ₄ 7 hidrato purísimo	0,244 g/l	0,492 g/l
Rifampicina	100 µg/ml	-
Tetraciclina	5 µg/ml	-
Kanamicina	-	100 µg/ml
Ajuste del pH a 7,2		

ANEJO 2. Método de extracción de ADN

- 1° Triturar mecánicamente la muestra congelada.
- 2° Añadir a la muestra 500 µl de tampón de extracción (ver al final del método).
- 3° Mantener la muestra durante 5 minutos a 65° C.
- 4° Añadir 150 µl de acetato potásico 5 M homogeneizando la muestra.
- 5° Mantener en hielo durante 10 minutos.
- 6° Centrifugar 10 minutos a 16110 xg.
- 7° Recuperar el sobrenadante.
- 8° Añadir 500 µl de isopropanol frío.
- 9° Centrifugar durante 10 minutos a 16110 xg.
- 10° Eliminar el sobrenadante y resuspender el ADN en 77 µl de agua destilada.

Tampón de extracción de ADN (Crespi *et al.*, 1991)

- 100 mM Tris HCl
- 50 mM EDTA
- 500 mM NaCl
- 10 mM β-mercaptoetanol
- 1% SDS
- Ajuste del pH a 8

ANEJO 3

Proceso de hibridación molecular

1ª Proceso de prehibridación

El proceso de prehibridación tendrá lugar en horno de hibridación. En cada tubo del horno de hibridación se pusieron las membranas con 10 ml de tampón de hibridación estándar Roche (ver al final del proceso), durante 1 h y a una temperatura de 42° C.

2ª Desnaturalización de las sondas

Para desnaturalizar las sondas se someterán a una temperatura de 68° C durante 10 minutos. Después permanecerán 2 minutos en hielo.

3ª Hibridación

Para la hibridación se reemplazó el tampón de prehibridación por tampón de hibridación al que se habrá añadido previamente sonda desnaturalizada a una concentración final de 20 ng/ml. Este paso se realizará en horno de hibridación a 42° C durante toda la noche.

4ª Lavados

Después de la hibridación se iniciará la fase de 5 lavados para eliminar las partículas inespecíficas. Los dos primeros lavados serán con 2xSSC y 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los dos lavados siguientes serán con 0,5xSSC y 0,1% SDS a 68° C durante 15 minutos. Finalmente se dará un quinto lavado con tampón de lavado TL (ver al final del proceso) 5 minutos a temperatura ambiente.

5ª Detección

Una vez lavadas, se añadirá T2 a las membranas durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se sustituirá el volumen de T2 por otro igual conteniendo 20 µl de Anti-DIG (1:10000) y se tendrá en agitación a la misma velocidad otros 30 minutos. Anti-DIG es el anticuerpo que reconoce la digoxigenina y se une a ella. Este anticuerpo lleva conjugado un enzima.

A continuación, se realizará un lavado de 15 minutos con tampón de lavado (TL) para eliminar el exceso de anticuerpo.

Para el revelado del sustrato se mantendrán las membranas con T3 durante 5 minutos. Posteriormente, se colocarán sobre láminas de acetato y se vertirá sobre ellas

T3 al que previamente se le habrá añadido el sustrato del enzima (CSPD). Tras esto se cubrieron con otra lámina de acetato 5 minutos.

Una vez limpias las membranas, se eliminará ligeramente el exceso de humedad utilizando papel de celulosa y luego se introducirán en bolsas de plástico que se sellarán.

Para la detección, las membranas se expondrán durante 60 minutos a una cámara CCD (Charge-coupled device camera, Intelligent Dark Box-II, Fujifilm).

Tampones utilizados en la hibridación molecular con digoxigeninas para la cuantificación del ADN por muestra

- Tampón de prehibridación
 - 5XSSC
 - 50% formamida, desionizada
 - 0,1% sodio-lauroilsarcosina
 - 0,02% SDS
 - 2% Blocking Reagent (Roche)
- Tampón T1
 - 0,1 M ácido maleico
 - 0,15 M NaCl
 - Ajuste del pH a 7,5
 - Esterilizar por autoclave
- Tampón TL
 - Tampón T1 + 0,3% de Tween 20
- Tampón T2
 - Tampón T1 + 1% de Blocking Reagent (Roche)
- Tampón T3
 - 100 mM Tris-HCl
 - 100 mM NaCl
 - Ajuste del pH a 9,5

