

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS



USO DE UN MARCADOR MOLECULAR EN LA SELECCIÓN DE
PLANTAS RESISTENTES A NEMATODOS FORMADORES DE
NUDOS RADICULARES EN UN PROGRAMA DE MEJORA
GENÉTICA DE TOMATE

ANA CAROLINA ROSALES ZAMORA DE ZEA

GUATEMALA, ABRIL DE 2004

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**USO DE UN MARCADOR MOLECULAR EN LA SELECCIÓN DE PLANTAS
RESISTENTES A NEMATODOS FORMADORES DE NUDOS RADICULARES
EN UN PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA DE TOMATE**

TESIS SOMETIDA A LA CONSIDERACIÓN DE LA HONORABLE JUNTA
DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE
SAN CARLOS DE GUATEMALA, PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS.

ANA CAROLINA ROSALES ZAMORA DE ZEA

GUATEMALA, ABRIL DE 2004

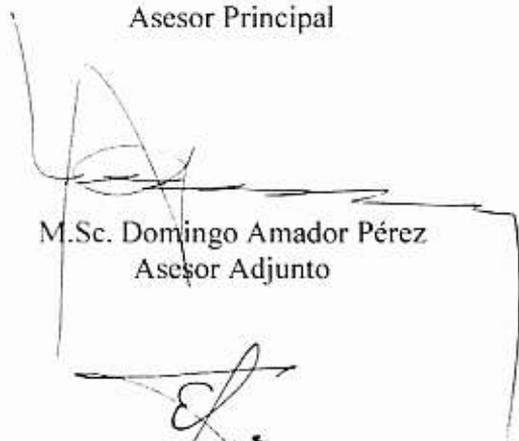
ESTA TESIS FUE ACEPTADA POR EL CONSEJO ACADÉMICO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA Y APROBADA POR EL COMITÉ ASESOR DE LA INVESTIGACIÓN, COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS.



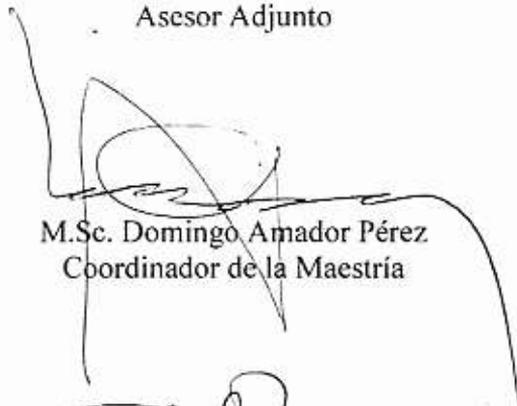
Ph.D. Luis Mejía De León
Asesor Principal



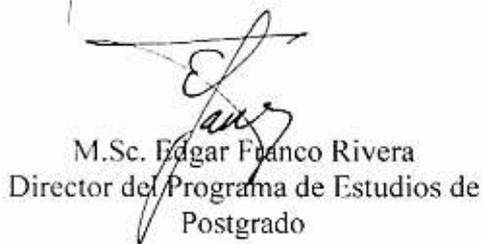
M.Sc. Sergio Melgar Valladares
Asesor Adjunto



M.Sc. Domingo Amador Pérez
Asesor Adjunto



M.Sc. Domingo Amador Pérez
Coordinador de la Maestría



M.Sc. Edgar Franco Rivera
Director del Programa de Estudios de Postgrado



Ph.D. Ariel Abderramán Ortiz
DECANO
Imprimase

Guatemala, abril de 2004

RESUMEN

Se utilizó el marcador molecular codominante REX-1, estrechamente ligado al gen *Mi*, como un indicador de la resistencia a nematodos del género *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate. Para estandarizar la técnica basada en PCR, se comparó la efectividad de dos kits comerciales en la amplificación del fragmento de 750 pb correspondiente a REX-1. Sólo uno de los kits, el de PCR Beads, permitió la amplificación efectiva del fragmento en los materiales estudiados. Este kit fue también el único que permitió el corte efectivo de la enzima Taq I de Promega para obtener los fragmentos de restricción que permiten identificar los alelos para este marcador.

Luego de estandarizada la técnica, se estudió el genotipo REX-1 de 99 materiales, dentro de los cuales se incluyó la población híbrida H44 (60 individuos), sus parentales y líneas relacionadas. Fue posible determinar el genotipo REX-1 para este grupo, no obstante, uno de los parentales de esta población híbrida, la línea GF1, presentó un genotipo homocigoto resistente aun cuando sus ancestros son susceptibles a la infección por nematodos. Aparentemente el marcador resistente REX-1 está asociado al gen *Mi* susceptible en esta línea y en otras asociadas al híbrido FAV19, presentándose falsos positivos. Este hecho ha sido corroborado por estudios recientes realizados por Maxwell y Williamson (2004). En relación a la población híbrida H44 se determinó que los individuos presentan un genotipo heterocigoto y homocigoto resistente y de acuerdo con el método estadístico de Ji-cuadrada no se pudo determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:1.

El resto de materiales incluidos en el estudio incluyen al híbrido 2305-1, los cultivares Sun Coast, Rodade, Very Firm, Lignon y M-82 así como las líneas Ty- 197, Ty- 198, Fla 024623-y3, Fla 024524-5, Fla 024525-9, GS16 y las variedades Money Maker 1 y 5 que presentaron un genotipo susceptible para el marcador REX-1. Para las líneas Fla 024652-y1 y GS9 no se pudo determinar el genotipo REX-1 por haber amplificado ambas 3 bandas de 320, 230 y 160 pb. Es posible que este patrón de bandas sea específico para introgresiones

de la especie silvestre *L. chilense* en el tomate cultivado puesto que D. Maxwell (2004) también ha observado este patrón en la línea GS9.

Una segunda técnica fue incluida en el estudio para estudiar la segregación del marcador molecular REX-1. Con la colaboración del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin en Madison se hizo la secuenciación del fragmento REX-1 para 22 individuos que constituyen la progenie de una planta híbrida H44 que previamente se había determinado heterocigota para el marcador. El análisis de las secuencias permitió determinar por medio de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) su genotipo REX-1. El método estadístico de Ji-cuadrada no permitió determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:2:1.

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede afirmarse que es factible implementar el uso del marcador REX-1 para asistir regularmente la selección de plantas resistentes a nematodos, pero no se recomienda en el caso particular del programa de mejora genética de tomate de la Facultad de Agronomía, ya que el mismo está basado en las líneas derivadas de FAVI 9 y las líneas de la Universidad de Florida que pueden presentar respectivamente falsos positivos y patrones de bandeo diferentes a los esperados.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a los Doctores Luis Mejía y Douglas Maxwell la oportunidad y el apoyo que me brindaron para realizar este estudio, por sus enseñanzas y por permitirme conocer el mundo de la mejora genética.

A mis asesores adjuntos MSc. Sergio Melgar y MSc. Domingo Amador por sus valiosos comentarios y por su amistad.

A la Junta Directiva de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su apoyo en la realización de este estudio.

En la parte experimental de laboratorio y de campo quiero agradecer la colaboración de mis amigos: Ing. Agr. Amílcar Sánchez, MSc. Daisuke Furusawa, MSc. Reiko Sazaki, Dr. Akio Ueno, Ing. Agr. Luis Rodolfo Montes, Ing. Agr. Rudy Teni, Ing. Agr. Rony Roma y a mi esposo MV Mario Zea Gobern.

Un agradecimiento especial para mi madre y mi esposo por su apoyo en el logro de esta meta.

INDICE

Importancia y Objetivos del Estudio	01
Capítulo 1. Los nemátodos formadores de nudos radiculares como patógenos del tomate cultivado y otras enfermedades.	04
1.1 Importancia económica del tomate	04
1.2 Los nemátodos como agentes de enfermedad en el tomate	05
1.3 Otros patógenos importantes en el tomate	17
Capítulo 2. El gen <i>Mi</i> desde la perspectiva de la genética molecular	20
2.1 Generalidades de la mejora genética en el tomate	20
2.2 Origen del gen <i>Mi</i>	22
2.3 Marcadores moleculares ligados a <i>Mi</i> utilizados para identificación rutinaria (<i>Aps-1</i> y REX-1)	23
2.4 Mapeo del gen <i>Mi</i>	27
2.5 Clonación y caracterización del gen <i>Mi</i>	29
2.6 Estudios sobre termoestabilidad del gen <i>Mi</i> en <i>L. peruvianum</i>	34
2.7 Resistencia Afidos-nemátodos	36
Capítulo 3. Materiales y Procedimientos usados para la identificación del marcador REX-1 en el ADN de plantas de tomate usando la técnica de PCR y la secuenciación de ADN	39
3.1 Sitio de Colecta. Unidad de Riego Sansirisay –URS-	39
3.2 Cultivares, híbridos, líneas y variedades estudiados	39
3.3 Toma de muestras	44
3.4 Procedimiento para la extracción del ADN de tejido vegetal	46
3.5 Procedimiento para la amplificación del marcador PCR REX-1 con los kits Promega y PCR Beads Amersham Biotech	48
3.6 Procedimiento para el corte del fragmento REX-1 con la enzima de restricción Taq I	53
3.7 Análisis de resultados	53
3.8 Secuenciación de REX-1 en la progenie de una planta híbrida H44	54
Capítulo 4. Identificación del marcador REX-1 en el ADN de plantas de tomate por PCR y secuenciación de ADN	57
4.1 Comparación de los Kit Promega y PCR Beads de Amersham Pharmacia Biotech en la amplificación de REX-1	57
4.2 Efectividad del corte con la enzima Taq I de Promega	59
4.3 Genotipo REX-1 de los controles positivos y negativos	59
4.4 Genotipo REX-1 de la población híbrida H44 y sus parentales, usando la técnica de PCR y secuenciación de ADN	62

4.5 Genotipo REX-1 de cultivares, híbridos, líneas y variedades de diferentes procedencias	66
4.6 Análisis del alineamiento de las secuencias de nucleótidos del marcador REX-1 en cuatro líneas de tomate	67
4.7 Utilidad de la técnica de PCR y factibilidad de implementarla como una prueba rutinaria	68
Conclusiones	73
Recomendaciones	76
Referencias	77
Anexos	83
Anexo 1	83
Anexo 2	86
Anexo 3	87
Anexo 4	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Hembra, macho y juvenil en 2º estado de <i>Meloidogyne</i> spp.	08
Figura 1.2	Ciclo patológico causado por los nematodos formadores de nudos radiculares <i>Meloidogyne</i> spp.	10
Figura 1.3	Deformación y reducción del sistema radicular en las plantas de tomate por infección de nematodos <i>Meloidogyne</i> spp	11
Figura 2.1	Distribución natural de 6 especies de <i>Lycopersicon</i>	21
Figura 2.2	Mapa genético de la región del gen <i>Mi</i> .	26
Figura 2.3	Región del cromosoma 6 donde se ubica el gen <i>Mi</i>	30
Figura 3.1	Colecta de muestras del híbrido H44 en la URS	45
Figura 3.2	Ejemplo de un cromatograma de secuencias de ADN	56
Figura 4.1	Fotografías de los geles de agarosa después de la amplificación del marcador PCR REX-1 y su corte con la enzima de restricción Taq I en 59 plantas híbridas H44.	60
Figura 4.2	Fotografías de los geles de agarosa después de la amplificación del marcador PCR REX-1 y su corte con la enzima de restricción Taq I en 39 plantas de cultivares, híbridos, líneas y variedades de diferente procedencia	61
Figura 4.3	Árbol genealógico del híbrido H44 y de la línea 902.	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Distribución de las especies de <i>Meloidogyne</i> en Centro y Sudamérica	16
Tabla 3.1	Resumen de los materiales utilizados en el estudio y su procedencia	44
Tabla 3.2	Condiciones de reacción para PCR para el marcador REX-1 utilizando el kit Promega	49
Tabla 3.3	Condiciones de amplificación evaluadas con el kit Promega	50
Tabla 3.4	Condiciones para la reacción de PCR usando Amersham PCR Beads	52
Tabla 3.5	Programación del termociclador	52
Tabla 3.6	Condiciones para la digestión por la enzima Taq I (endonucleasa) del marcador REX-1	53
Tabla 4.1	Genotipo para el marcador REX-1 de los controles positivos y negativos	62
Tabla 4.2	Genotipo para el marcador REX-1 de los parentales del híbrido H44 y líneas relacionadas	65
Tabla 4.3	Genotipo para el marcador REX-1 de otros cultivares, híbridos, líneas y variedades	67
Tabla 4.4	Alineamiento de las secuencias del marcador REX-1 obtenidas por el método dideoxi para las líneas Motelle, GF1, TY52-R2 y M82.	71

IMPORTANCIA Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Definición del problema

Alrededor de 1986, la enfermedad del enrollamiento o acolochamiento de la hoja del tomate causada por geminivirus fue detectada en Guatemala, constituyendo en los países tropicales y subtropicales del mundo un factor muy importante en la reducción de la producción. La evaluación del germoplasma de tomate en nuestro país inició en 1998 con la búsqueda de plantas tolerantes a geminivirus a través de un programa de mejoramiento genético planteado por el PhD. Luis Mejía de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La selección de plantas durante varios ciclos de crecimiento consecutivos ha permitido la producción de varias líneas que presentan decrecimiento en los síntomas de infección y alta producción. Después de cuatro años en el 2002, el principal resultado fue la producción de varias líneas de tomate resistentes a los geminivirus locales; dos de los híbridos obtenidos al cruzar estas líneas y que fueron denominados *Llanero 2* y *Llanero 7* son de particular interés para poder en un futuro cercano ofrecerlos a los agricultores locales. Los aspectos en los cuales es necesario trabajar ahora para mejorar la calidad de estos híbridos son los siguientes: la forma y dureza del fruto que actualmente no responde a lo requerido por el mercado local y el estudio e introducción de resistencias contra otros patógenos que afectan al tomate tales como los nematodos, hongos y bacterias. Este último aspecto fue considerado como prioridad del programa de mejoramiento genético de tomate a corto plazo.

La posibilidad de poder desarrollar de manera inmediata una técnica de marcadores moleculares para estudiar la resistencia a nemátodos (*Meloidogyne* spp.) en las plantas del programa de mejoramiento fue lo que originó el interés por realizar este estudio. La resistencia a nemátodos en las variedades comerciales actuales es conferida por un solo gen dominante denominado *Mi* obtenido por introgresión a partir de la especie silvestre *Lycopersicon peruvianum* L. De acuerdo con la literatura, Williamson *et al* (1994), desarrollaron el marcador codominante REX-1 que por medio del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permite amplificar un fragmento de ADN de 750 pb estrechamente ligado al gen del tomate *Mi*. Este fragmento tiene un sitio de restricción en

las plantas resistentes que permite identificar por el número de bandas y su tamaño, cuáles de ellas son heterocigotos u homocigotos resistentes, mientras que las plantas susceptibles no tienen sitio de restricción. REX-1 es ventajoso en relación a otros marcadores desarrollados con anterioridad como el marcador isoenzima *Aps-1* con alto ligamiento al gen *Mi* o los casi 1000 marcadores RFLP desarrollados. *Aps-1* por ejemplo se puede identificar sólo en plantas de tomate portadoras de un segmento grande de *L. peruvianum* de esta isoenzima mientras que los marcadores RFLP requieren de varios días de trabajo para la obtención de resultados lo que hace prácticamente imposible hablar de pruebas rutinarias sencillas.

El laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUSAC cuenta con la infraestructura, equipo y reactivos necesarios para poder ejecutar un proyecto de este tipo. De implementarse de manera rutinaria la técnica de PCR con el marcador REX-1, la selección de plantas resistentes a nemátodos asistida por el uso de técnicas moleculares se realizaría en un par de días. Esto obviamente representa ventajas sobre los métodos de selección tradicionales. Esta última implica la evaluación directa de las plantas realizando la observación de los síntomas en las raíces de las plantas. Asimismo, tal como lo describen Messeguer (1991) y Williamson (1994) la inoculación y posterior selección de plantas resistentes en el campo requiere del mantenimiento de nemátodos vivos lo cual puede llegar a ser impráctico y no permite (por ser *Mi* un gen dominante) el identificar líneas homocigotas sin tener que evaluar a la progenie. Cabe mencionar que en Guatemala no se cuenta con líneas puras de las especies de nemátodos de interés, habría que generarlas, lo cual significaría un alto costo económico para el proyecto.

1.3.2 Objetivos del estudio

General

Proveer información sobre el genotipo REX-1 en las plantas de tomate del programa de mejoramiento de la FAUSAC como un indicador de la resistencia a nemátodos, que permita asistir la selección de plantas resistentes por medio de técnicas de marcadores moleculares.

Específicos

1. Estandarizar bajo las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUSAC el método de PCR desarrollado por Williamson *et al* (1994) para la identificación del marcador REX-1.
2. Identificar por medio de este método el genotipo REX-1 de plantas con características valiosas para selección pertenecientes a poblaciones de cultivares, híbridos, líneas y variedades de tomate dentro del programa de mejoramiento de la Unidad de Riego Sansirisay.
3. Evaluar la implementación de esta técnica para su uso rutinario en la selección de plantas de tomate resistentes a nemátodos formadores de nudos radiculares dentro del programa de mejoramiento de la Unidad de Riego Sansirisay

CAPÍTULO 1

LOS NEMATODOS FORMADORES DE NUDOS RADICULARES COMO PATÓGENOS DEL TOMATE CULTIVADO Y OTRAS ENFERMEDADES

1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL TOMATE

La importancia de *Lycopersicon esculentum* Mill. (Familia Solanaceae) como hortaliza a nivel mundial ha ido aumentando considerablemente en los últimos años. Los frutos se destinan, tanto al consumo fresco como a la transformación para la industria conservera que produce diversos productos tales como concentrados, jugos, ketchup, polvo, tomates pelados, triturados y otros (Depestre y Gómez 1999; www.orst.edu/dept/hort/233/tomto.htm-26k).

Por los años 20 el consumo per cápita de tomates en los Estados Unidos era solamente de 8.2 kilogramos por año; para 1978 era de 25.5 kilogramos y para 1998 se producían casi 11 millones de toneladas anuales. En el año 2000 el tomate generó un valor económico total a nivel mundial calculado en \$ 2 billones (\$ 1.2 billones de mercado fresco y \$ 633 millones de tomate procesado), siendo el segundo cultivo después de la papa. Constituye más del 30% de la producción hortícola del planeta con una superficie de siembra superior a los tres millones de hectáreas, una producción de 88 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27 toneladas por hectárea. (Rick 1978; Depestre y Gómez 1999; www.orst.edu/dept/hort/233/tomto.htm-26k).

En los países en desarrollo el rendimiento promedio por hectárea es sólo de 19 toneladas por hectárea, lo que representa menos del 40% del alcanzado en los países desarrollados. En estos países el rendimiento se ve afectado por devastadoras infecciones, como las causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca y más recientemente por la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Guatemala es el segundo productor de tomate de Centroamérica y El Caribe, después de la República Dominicana

con un área sembrada de 5,600 hectáreas de un total de 28,200. El rendimiento promedio en Guatemala es de aproximadamente 30 toneladas por hectárea, pero los rendimientos son inestables y se hace un uso excesivo de los pesticidas (Depestre y Gómez 1999; Martínez, 2001).

1.2 LOS NEMATODOS COMO AGENTES DE ENFERMEDAD EN EL TOMATE

1.2.1 Los nemátodos formadores de nudos radiculares, *Meloidogyne* spp.

Los nemátodos parásitos de vegetales de la familia Heteroderidae son los causantes principales de severos daños económicos en los cultivos y pueden dividirse en dos grupos: los nemátodos quísticos que incluyen el género *Heterodera* y *Globodera*, y los nemátodos formadores de nudos radiculares (root-knot) del género *Meloidogyne*. El último es un género distribuido a nivel mundial y es capaz de atacar más de 2000 especies vegetales. Las especies *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* son las principales con importancia económica a nivel mundial (Vos *et al.* 1998). Aun así, su importancia en la producción de los cultivos es pasada por alto o subestimada, porque el daño no es definido hasta que las raíces y/o el suelo son examinados. Son especialmente dañinos en los invernaderos donde se ven favorecidos por las temperaturas idóneas para su desarrollo. (Walters y Barker 1994)

En general son organismos pequeños de 300 a 1000 μm , de ancho y por lo tanto sólo observables en microscopio. Su distribución en los cultivos es irregular y mayor en torno a las raíces en donde pueden reproducirse más rápido debido a la abundancia de alimento y a su atracción por las sustancias liberadas por las raíces. La temperatura, humedad y aireación del suelo afectan su supervivencia y movimiento. (Agris 1985)

1.2.2 Sistemática de *Meloidogyne* spp.

En la actualidad se han descrito alrededor de 70-75 especies para este género aunque algunos autores reportan 68. El primer nematodo formador de nudos radiculares fue descrito y publicado por Cornu en 1879. Goeldi (1892) fue el primer investigador en reconocer a estos nemátodos como un género que denominó *Meloidogyne* por la especie

tipo de *M. exigua*. La historia de la taxonomía de este género puede dividirse en dos periodos, el anterior a la revisión de Chitwood en 1949 y el periodo de 1949 en adelante. Chitwood estudió la morfología de varias razas y encontró suficientes diferencias que le permitieron designar 5 especies, 1 variedad y finalmente separar los nemátodos formadores de nudos radiculares de los formadores de quistes. La extensa revisión de Chitwood se centra en la identificación específica por medio de patrones perineales. (Wouts 1979; Franklin 1979; <http://plpncmweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/>)

La citogenética también ha sido una herramienta que ha mejorado el entendimiento de la biología y las relaciones filogenéticas entre los nemátodos de este género. Estos métodos se desarrollaron para estudiar el proceso de la gametogénesis, modo de reproducción y el complemento cromosomal del grupo. Se reproducen por alguna de los siguientes medios: a) fertilización cruzada (anfimixis), b) partenogénesis meiótica facultativa (automíctica) y c) partenogénesis mitótica obligatoria (apomíctica). Las especies *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* se reproducen por apomixis. Las antes mencionadas además de *M. hapla* representan en relación al complemento cromosómico los pasos más avanzados en la evolución del género. La extensa distribución geográfica de estas especies puede ser explicada por este medio de reproducción y por su naturaleza poliploide que permite una alta heterocigosis (Triantaphyllou 1979).

Recientemente se han desarrollado otros métodos para la identificación de los nemátodos formadores de nudos radiculares. Entre estos se encuentra la prueba de intervalo de hospederos (host range test) desarrollado por J.N. Sasser, el conteo de cromosomas de Triantaphyllou, la estructura de la cabeza de los juveniles de Eisenback, los patrones de proteínas (patrones en electroforesis en gel) de Esbenshade y los patrones de ADN usados para separar especies. Varios de estos métodos se desarrollaron a partir del Proyecto Internacional Meloidogyne (IMP) auspiciado por la AID y dirigido por Sasser de 1975 a 1984, con el fin de determinar el impacto de este género en la agricultura a nivel mundial (http://www.cals.ncsu.edu:8050/pgg/dan_webpage/Nematodes/Endos/Meloidogyne.html Sasser 1980).

A través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es un método muy sensible, se ha logrado distinguir distintas especies de *Meloidogyne*. La PCR ha sido probada eficientemente para discriminar entre *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. chitwoodi*. Dada la sensibilidad de esta prueba, es posible amplificar el ADN a partir de un solo juvenil en segundo estado (J2). Las especies *M. incognita* y *M. javanica* producen un fragmento de 1.7 –kb que posteriormente se someten a la digestión con endonucleasas lo que permite la separación de las dos especies (<http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos/ubiespejo/ubiid=4639&-find.html>).

1.2.3 Morfología y anatomía en *Meloidogyne* spp.

Hembra: El cuerpo tiene forma de pera, la parte posterior es globosa y el cuello se proyecta anteriormente en línea con el final de la cola (figura 1.1). Tiene una longitud entre 510 y 690 μm y un ancho de 300 a 430 μm . Las hembras están embebidas completamente en el tejido radical, mientras que las masas de huevos se abren paso y sobresalen de la agalla. El patrón perineal presenta un arco dorsal alto con estrías que varían de lisas a onduladas. Algunos patrones perineales muestran un arco dorsal más bajo, mientras que otros presentan indicaciones de alas laterales. Algunas estrías también pueden estar curvadas hacia la vulva. El estilete mide de 15 a 17 μm de largo; el cono es afilado y claramente curvado dorsalmente, y la columna es ligeramente más ancha en su base. Los nódulos de estilete se encuentran claramente separados de la columna. La abertura de la glándula dorsal esofágica (AGDE) está a una distancia de 2 a 4 μm posterior a la base de los nódulos (Rodríguez 2001; <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos>).

Macho: Tiene una longitud entre 1.2 y 2.0 mm (figura 1.1). Presenta una cabeza muy característica. Muestra un disco labial grande, redondeado y cóncavo que sobresale de los labios medios. Carece de labios laterales, aunque en algunas poblaciones se presentan bien desarrollados. La región cefálica usualmente está subdividida por anulaciones incompletas cuyo número varía dentro y entre poblaciones. El estilete varía en longitud de 23 a 25 μm ; la punta es roma y aplanada lateralmente. La columna es cilíndrica, pero generalmente es más angosta cerca de los nódulos del estilete, los cuales se encuentran claramente separados

de la columna. Los nódulos varían en tamaño y forma entre las distintas poblaciones, y pueden ser desde pequeños y redondos hasta grandes y elongados. La abertura de la glándula dorsal esofágica (AGDE) se encuentra a una distancia de 2 a 4 μm posterior a la base de los nódulos (Rodríguez 2001; <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos...>).

Juveniles en segundo estado(J2): La longitud total promedio es de 405 μm , aunque puede variar de 346 a 463 μm (figura 1.1). El disco labial y los labios medios se encuentran fusionados y forman una estructura continua y elongada muy característica cuando es observada en posición frontal. La región anterior de la cabeza es aplanada y la estructura cefálica puede ser lisa o bien tener de 1 a 3 anulaciones completas o incompletas. La longitud del estilete es de 10 a 12 μm . Los nódulos del estilete son prominentes, redondeados posteriormente y claramente separados de la columna. En sentido posterior, tanto el ancho del cono como el de la columna aumenta gradualmente. La abertura de la glándula dorsal esofágica (AGDE) está situada a una distancia de 2 a 3 μm posterior a la base de los nódulos. Otras medidas diagnósticas útiles son la longitud promedio de la cola, de 52 μm , y la región hialina de la cola de 9 μm en promedio (Rodríguez 2001; <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos>).

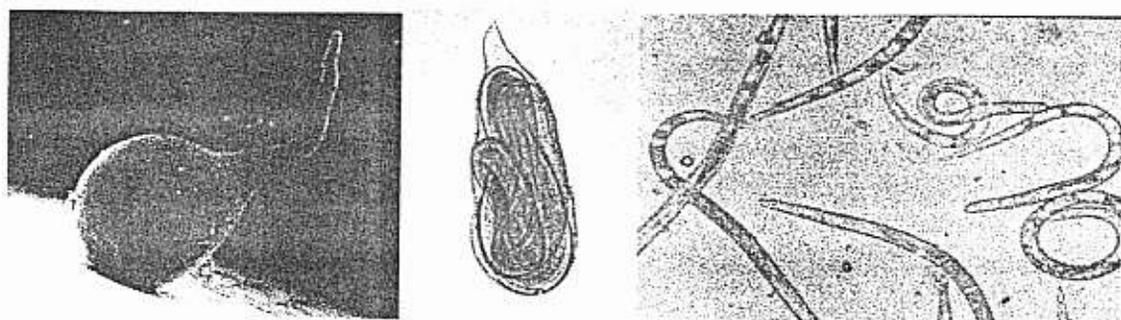


Figura 1.1 Hembra, macho y juvenil en 2^o estado de Meloidogyne spp. (Tomado de Google/Meloidogyne spp/images).

1.2.4 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Los huevecillos pueden estar libres en el suelo o embebidos en una matriz gelatinosa que puede adherirse al tejido radicular de la planta (Guiran y Ritter 1979.) A partir de un huevo liberado en el suelo se forma por evolución dentro del mismo los dos primeros estados

larvarios (J1 y J2). El 2º estado es el que sale del huevo y rápidamente busca raicillas donde penetrar y aunque en principio se alimenta de los tejidos corticales, seguidamente, penetra en su interior y se instala en una zona más o menos interna mientras que delante de su cabeza se forman células gigantes de las que se alimenta (Figura 1.1). Está claro que el normal desarrollo de estos nemátodos y de su abundante reproducción depende de la formación de células gigantes que son más abundantes a medida que es mayor el número de larvas que penetran por el mismo punto de la raíz. La evolución continúa dentro de la raíz y los nemátodos sufren las siguientes mudas pasando por los estados de 3ª y 4ª larvarios (J3 y J4) hasta convertirse en adultos. Mientras tanto sus cuerpos han ido cambiando de forma de hilo (filiforme) a forma de pera (piriforme). El macho es un parásito sedentario solamente durante su desarrollo larvario, por el contrario la hembra es sedentaria durante toda su vida, pues aquellos una vez llegados al 4º estado de su desarrollo se diferencia de las hembras y abandonan la cubierta larvaria y la raíz en forma de gusano delgado y sus hábitos de aquí en adelante no son bien conocidos. Por su parte las hembras continúan su desarrollo en el interior de las raíces adoptando una forma cada vez más globulosa y depositando huevos en una masa gelatinosa que los mantiene reunidos. Estas masas de huevos (de 500 a 1000) fluyen por el extremo posterior de las hembras que sobresale o está cerca de la superficie de la misma, para que broten al exterior y se diseminen por el suelo. Muchas masas de puestas quedan más internas, englobadas por un tejido membranoso formado por el mismo vegetal (Guiran y Ritter 1979; Rodríguez 2001; <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos>).

La duración del ciclo de vida de los nemátodos del género *Meloidogyne* está grandemente influenciado por la temperatura y el tipo de planta hospedera. Varía según las especies; por ejemplo, para *M. hapla* y especies afines de clima frío el intervalo óptimo de temperatura puede ir desde 15° a 25° C, mientras que para las especies de clima caliente como *M. javanica* el óptimo se sitúa de 25° a 30° C. En zonas tropicales el ciclo se completa entre 21 y 28 días. Para todas las especies la actividad es casi nula por encima de 40° C o por debajo de 5° C. De acuerdo con un estudio, en Sudáfrica *M. javanica* requiere 56 días para completar su ciclo a 14° C y sólo 21 días a 26° C. (Guiran y Ritter 1979; Rodríguez 2001; <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos>).

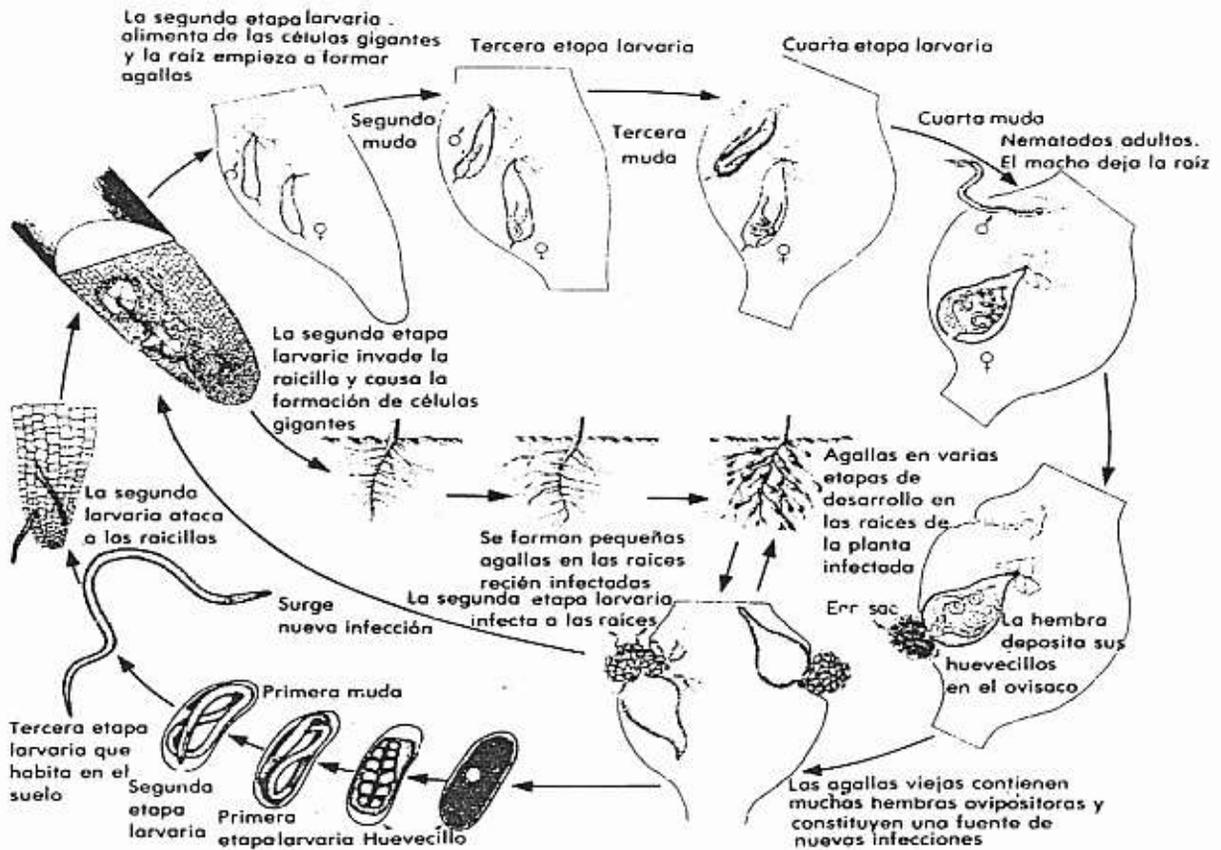


Figura 1.2 Ciclo patológico causado por los nematodos formadores de nudos radiculares *Meloidogyne* spp. (Tomado de Agrios G. 1985)

1.2.5 Ecología y distribución de *Meloidogyne* spp.

Los requerimientos para las especies de *Meloidogyne* para sobrevivir, infectar y causar enfermedad en climas tropicales como templados son, una planta hospedera disponible, humedad adecuada y una temperatura favorable para la planta así como para el desarrollo del nematodo. Sasser (1979) indica que para países como Guatemala (al cual clasifica como tropical) la supervivencia del nematodo depende de un hospedero disponible para mantener la densidad poblacional alta, mientras que en su ausencia decrecerá la densidad rápidamente, especialmente durante la estación seca. Las interacciones con otros microorganismos del suelo pueden favorecer la destrucción de las raíces. Bajo temperaturas muy altas, las larvas consumen rápidamente sus reservas alimenticias y mueren por hambre o siendo presas de otros organismos. Otro factor que puede favorecer

su supervivencia es el crecimiento de malezas durante los períodos donde no se tienen cultivos en el campo, pues permite la permanencia en las plantas hospederas. (Sasser 1979)

En los países templados, la distribución de *Meloidogyne spp.* está basada en la habilidad de establecerse y sobrevivir el invierno, es decir, la relación entre las temperaturas mínimas y máximas alcanzadas y la cantidad de tiempo que estas temperaturas permanecen en estos extremos. El principal factor que limita la capacidad de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* al invierno es la temperatura promedio durante el mes más frío del año (Walters y Barker 1994).

1.2.6 Síntomas de la enfermedad, daños histopatológicos y fisiológicos en la planta.

Los síntomas de la infección se aprecian por el amarillamiento de la planta y el debilitamiento al mediodía. Los efectos de la infección de *Meloidogyne spp* sobre el desarrollo de las plantas incluyen una deformación y reducción del sistema radicular (figura 1.2). Las raíces de las plantas atacadas presentan los típicos nódulos, están poco o nada ramificadas y carentes de pelos radiculares. Por otra parte decrece notablemente la eficiencia en la traslocación normal de agua y nutrientes por la obstaculización mecánica y como consecuencia ocurren las típicas marchiteces de las plantas infectadas. (Rodríguez 2001)

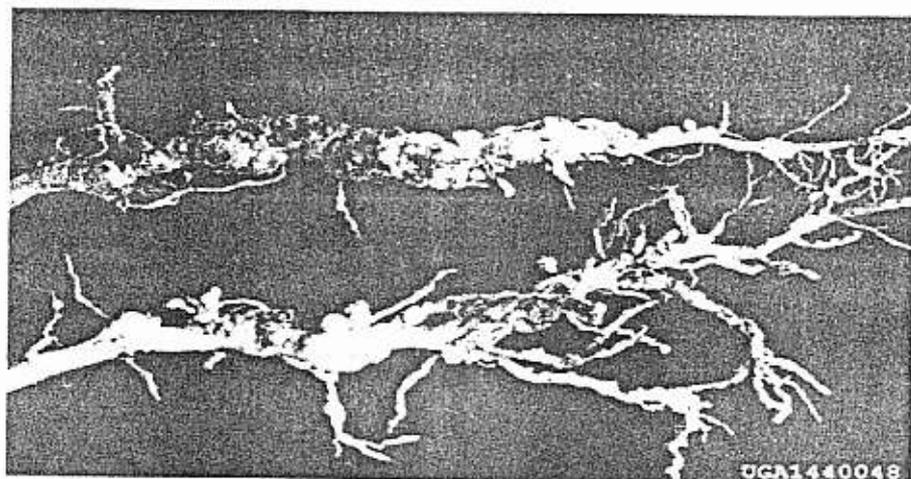


Figura 1.3 Deformación y reducción del sistema radicular en las plantas de tomate por infección de nematodos *Meloidogyne spp* (Tomado de Maxwell D. 2004).

Los procesos histopatológicos y fisiológicos que se dan en las plantas hospederas por la infección de estos nemátodos son la formación de células gigantes y agallas. En relación a las células gigantes, existe una confusión en el uso de este término y "sincitio". Un sincitio se define como una masa multinucleada o protoplasma formado por la fusión de células uninucleadas, mientras que una célula gigante puede ser simplemente una célula alargada, como las células corticales hipertrofiadas en las paredes de las agallas. La mayoría de los expertos están de acuerdo en que *Meloidogyne* spp. induce células gigantes al inducir la mitosis sincronizada sin deposición de la pared celular; ocurre una proliferación nuclear, donde 2 núcleos son observados dentro de las primeras veinticuatro horas de la penetración del estilete y más de 8 dentro de las siguientes 24 horas. La diferenciación se ve alterada y el crecimiento celular da como resultado la compresión de células aledañas (Bird 1979; <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/>).

Las agallas se definen como células desarrolladas patológicamente, o bien tejidos u órganos vegetales que han surgido principalmente por hipertrofia (sobre crecimiento) e hiperplasia (proliferación celular) bajo la influencia de organismos parasíticos como bacterias, hongos nemátodos, e insectos. Están constituidas por células corticales hipertrofiadas que rodean al nematodo. Esto ocurre generalmente en el tejido vascular y el incremento en el tamaño de la agalla varía con la planta y la especie. Por ejemplo, *M. hapla* y *M. incognita* causan diferentes tamaños de agalla en el tomate (Bird 1979; <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/>).

1.2.7 Interacción de la planta resistente-susceptible con el nematodo.

Tres son las interacciones posibles que pueden ocurrir entre los nemátodos y las plantas: La neutral (inmune), sin infección; la compatible (hospedero apropiado), con una reacción susceptible o tolerante; y la incompatible (hospedero inapropiado) con una reacción hipersensitiva (resistente) o intolerante. La resistencia total a los nemátodos puede definirse como cualquier característica(s) o propiedad (es) del hospedero que previene, reduce o retarda el desarrollo de un parásito y la enfermedad asociada. Mientras que la tolerancia total se define como la habilidad de la planta de superar los niveles de infección parasítica y de la enfermedad que causaría un empeoramiento del crecimiento y producción si ocurriera

en otras plantas de la misma especie o de una similar. Tanto la resistencia total como la tolerancia total, involucran la resistencia al parásito y la resistencia a la enfermedad y/o daño (Barker 1993).

Las plantas hospederas con resistencia preinfeccional (antes de entrar las larvas en las raíces), casi siempre por exudados radiculares repelentes o tóxicos para los nematodos, suele ser específica para una sola especie. La resistencia postinfeccional (tipo más común) viene expresada por diferentes motivos: incapacidad de las larvas para evolucionar al estado adulto; prolongación del ciclo de desarrollo; muerte de larvas en los tejidos de las raíces; alteración de relación de sexos hacia los machos; abandono de las raíces por las larvas, etc. La resistencia de un cultivar puede cambiar con las variaciones en la temperatura del suelo, por el tipo de interacción con la planta y por la variabilidad genética de los nemátodos (Rodríguez 2001).

Un cultivar resistente a una enfermedad u organismo debe ser aceptable tanto agronómicamente como horticulturalmente para justificar su liberación al mercado. Por ejemplo, cerca de 100 cultivares de tomate resistentes a la formación de nudos radiculares se han desarrollado, pero pocos de estos se cultivan ampliamente; esto debido a que los cultivares aceptables para una región pueden fallar en otros ambientes o no ser apropiados para las prácticas culturales locales. Esta situación se ha dado en la pera Nemaguard; cuando se usa como resistente a *M. incognita*, da buenos resultados en California pero está asociado con la lesión de invierno de los árboles en el sureste de los Estados Unidos. (Barker 1993).

1.2.8 La respuesta hipersensitiva

Una necrosis rápida localizada o respuesta hipersensitiva (HR) cerca de la parte anterior del nematodo invasor es la característica de la resistencia mediada por el gen *Mi* contra los nematodos formadores de nódulos radiculares (*Meloidogyne spp.*). Esta respuesta es llevada a cabo a las 12 horas de la infección y los nematodos que fallan en establecerse, mueren o dejan las raíces (Dropkin *et al.* 1969; Kaloshian *et al.* 1998; Milligan *et al.* 1998).

Las larvas de *Meloidogyne* entran en el hospedante en la cofia o cerca de ella y migran intercelularmente a la región de diferenciación del tejido vascular. Se vuelven sedentarias y dentro de una planta susceptible la larva comienza a crecer mientras los tejidos de la raíz que lo rodean se rediferencian. Las células de la raíz cerca de la cabeza del nematodo desarrollan hipertrofia con repetidas divisiones nucleares, junto con la incorporación de células vecinas, esto resulta en un sincitio multinucleado de pared gruesa (células gigantes). Las células del periciclo se dividen y alargan para formar agallas; la diferenciación xilar se rompe. Las raíces laterales frecuentemente crecen para formar agallas. En plantas resistentes, no obstante, estos patrones no se desarrollan. Las larvas pueden entrar a las raíces en bajos números o el sincitio puede desarrollarse anormalmente. La reacción más común en las plantas resistentes es que las células que están rodeando a la larva, mueran inmediatamente después de la entrada de la larva entre a las raíces (Dropkin *et al.* 1969).

Numerosos registros han descrito observaciones en microscopio de luz de la HR en las raíces vegetales contra nemátodos. En esta línea de investigación, Paulson y Webster (1972) realizaron un estudio sobre los cambios en la ultraestructura celular inmediatamente después del ataque a las raíces de Nematex (una variedad de tomate cultivado resistente a *M. incognita*). Se usó *M. incognita* y *M. hapla* con el fin de descifrar los cambios progresivos ocurridos en las células. Cuando se utilizó *M. hapla* a la cual las raíces de Nematex son susceptibles la formación de células gigantes fue evidente después de 48 horas y la HR no ocurrió. A nivel citológico observaron que las inclusiones vacuolares electrodensas desaparecieron y la electrodensidad del citoplasma incrementó antes de cualquier cambio visto en paredes celulares, membranas u organelos. Estos cambios ultraestructurales en el desarrollo de células hipersensitivas sugieren que la HR puede ser iniciada por la pérdida de varios materiales de la vacuola hacia el citoplasma lo que causa el deterioro de la organización citoplásmica y efectivamente previene la formación de células gigantes. Observaron también un incremento aparente en el número de ribosomas y un cambio en la forma del retículo endoplásmico que va de segmentos cortos aislados asociados con ribosomas a formas largas y delgadas sin ribosomas. Esos cambios sugieren el incremento de síntesis proteínica y no fueron observados en las células adyacentes aparentemente no afectadas. Estas características fueron seguidas por la pérdida de

distinción de la membrana y por el desaparecimiento de la mitocondria, que son características que indican la muerte celular (Paulson y Webster 1972).

Los resultados permitieron concluir que la especie *M. incognita* parece activar en la variedad Nematex los mecanismos de resistencia por medio de la HR dentro de 8 a 12 horas. Según el estudio, es probable que el estímulo que inicia la hipersensitividad sea un componente de secreciones glandulares del esófago del nematodo que actúan rápidamente para prevenir la formación de células gigantes, un proceso que normalmente toma de 24 a 36 horas. Las células adyacentes a las células hipersensitivas no mostraron anormalidades por lo que la carencia de una respuesta gradual sugiere que el estímulo que inicia la HR no pasa fácilmente de célula a célula y de hecho es inducida solo por la penetración y secreción a la célula por el estilete del nematodo.

Esto explicaría la presencia de la relativamente poca hipersensitividad celular a lo largo del patrón del nematodo a través de los tejidos radiculares. Las células hipersensitivas al no proveer suficientes nutrientes para el desarrollo del nematodo, desestiman la búsqueda de un mejor sitio para su desarrollo. Las larvas en segundo estado que fueron removidas de raíces hipersensitivas dos días después de la inoculación fueron capaces de infectar raíces susceptibles subsecuentemente lo cual indica la ausencia de un factor tóxico en las raíces hipersensitivas. (Paulson y Webster 1972).

1.2.9 Medidas de Control de nematodos en el tomate

El control químico se realiza mediante el uso de productos nematicidas fumigantes o no fumigantes en el suelo. Además, se desarrolla actualmente una nueva línea de investigación sobre el empleo de enmendantes húmicos o materias orgánicas, extractos de plantas que llevan microorganismos o sustancias antagonistas de los nemátodos. No obstante aunque alguno de estos productos parecen mostrar cierta acción nematicida, no existen indicios claros de control efectivo a corto plazo de los nematodos formadores de nudos radiculares. Sin embargo, el uso de variedades resistentes es sin duda el mejor control actual de los nemátodos del género *Meloidogyne* en el cultivo del tomate. Esta resistencia se debe al gen denominado *Mi*, que por introgresión a partir de la especie silvestre *L. peruvianum*, se

introdujo en el genoma del tomate (Rodríguez 2001). Las investigaciones sobre este gen constituyen el tópico del siguiente capítulo.

1.2.10 Importancia económica de *Meloidogyne* en Centro y Sudamérica

De acuerdo con los estudios de poblaciones del género *Meloidogyne* realizados en los países tropicales por el proyecto IMP¹, la dominancia de especies se presenta de la siguiente manera: *M. incognita* es la más dominante, con el 64% de las poblaciones presentes en estos países. Segunda en importancia es *M. javanica* con el 28%, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. exigua* representan el 8% restante (Sasser 1979, Sasser 1980). En Centro y Sudamérica las principales especies se presentan en la tabla 2.1, en orden arbitrario.

Tabla 1.1 Distribución de las especies de *Meloidogyne* en Centro y Sudamérica

Primer orden	Segundo orden	Tercer orden
<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. coffeicola</i>
<i>M. javanica</i>	<i>M. hapla</i>	<i>M. lordelloi</i>
	<i>M. exigua</i>	<i>M. inornata</i>
		<i>M. bauruensis</i>

Tomado de Sasser J. N. Economic Importance of *Meloidogyne* in tropical countries. 1979.

Los datos de estimados de pérdidas en cultivos a causa de *Meloidogyne spp.* se obtuvieron de estudios llevados a cabo en México, Centro América y el Caribe por el IMP. Incluyen 18 diferentes cultivos con un porcentaje medio de pérdida total del 15%. Sin embargo los cultivos más afectados en orden de importancia son el tomate y el güisquil con un 38% de pérdida, la guayaba con un 35% y la calabaza con un 22%; el resto de los cultivos tienen estimados de pérdida entre el 7 y el 16% (Sasser 1979).

En Guatemala, Del Cid (2002) estudió la determinación de géneros y la distribución horizontal de los nemátodos fitoparasíticos que afectan el cultivo de la Sábila en El Progreso, El Progreso. La población más alta en el suelo de la zona y en las raíces de las plantas pertenece al género *Meloidogyne*. Este género presentó mayor distribución en suelos franco arcillosos y franco arenosos.

¹ International Meloidogyne Project. Sasser J. (1980).

1.3 OTROS PATÓGENOS IMPORTANTES EN EL TOMATE

1.3.1 Bacterias y medidas de control

Ralstonia solanacearum causa la denominada marchitez bacteriana y es la enfermedad más grave del tomate en el trópico que daña el sistema vascular de la planta, impidiendo la producción y pérdidas adicionales debidas a la restricción del uso de áreas infectadas. El control químico es inoperante y el mejoramiento por resistencia parece ser la estrategia más adecuada (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999)

Xanthomonas campestris pv *vesicatoria* es una bacteriosis causante de pérdidas económicas por frutos no comerciables. Se reproduce óptimamente a 25° C y alta humedad relativa. Se transmite por semilla y se disemina por la lluvia y el riego por aspersión a través de los estomas de la planta (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999)

Otras enfermedades bacterianas importantes económicamente pero que no están presentes en Centro América son el cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganense*, la mancha bacteriana causada *Xanthomonas vesicatoria* y la peca bacteriana por *Pseudomonas tomato* (Rodríguez 2001). Las medidas de control se basan principalmente en su prevención con el uso de pesticidas y por mejora genética. La resistencia derivada de *L. pimpinellifolium* contra *Ralstonia solanacearum* se introdujo en 1953. Sin embargo esta resistencia sólo actúa para algunas razas de la especie y es variable según la densidad del inóculo. En 1966 se confirmó la resistencia para *C. michiganense* en *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum* y en una línea de este último, sin embargo la resistencia es compleja debido a su carácter multigénico (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

1.3.2 Hongos y medidas de control

Fusarium oxysporum f. sp *lycopersici* conocida como fusariosis causa una sintomatología caracterizada por marchitamiento de la planta que puede desaparecer a la caída de la tarde, haciéndose después perenne y causando la muerte de la planta. Su desarrollo es óptimo a 28° C. Existen tres razas (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

Verticillium dahliae tiene una sintomatología similar a la de la fusariosis pero su crecimiento óptimo se encuentra entre los 20° y 23° C (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

Stemphylium solani produce manchas pardas pequeñas en los folíolos y pedúnculos de los frutos, desarrollándose mejor entre los 26° y 28° C. Existen varias especies del mismo género que pueden causar la enfermedad (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999)

Alternaria solani causa el tizón temprano y se manifiesta generalmente al momento de la fructificación aunque puede atacar plantas jóvenes. Se desarrolla mejor cuando alternan períodos de alta y baja humedad ambiental así como a temperaturas entre los 18° y 25° C (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999)

Phytophthora infestans se conoce como el tizón tardío y es endémico en algunas zonas, convirtiéndose en epidemia bajo condiciones de temperaturas entre los 10° y 25° C (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

El control químico puede hacerse con fungicidas de acción preventiva y de acción curativa. El control por uso de variedades resistentes ha presentado hasta el momento serias dificultades. La variedad silvestre *Solanum demissum* es aparentemente inmune a *P. infestans* y se han desarrollado a partir de ella variedades de papas resistentes que han resultado susceptibles a nuevas razas del patógeno (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999). Contra las especies de *Fusarium* las primeras variedades resistentes fueron desarrolladas en Estados Unidos antes de 1939 pero sucumbían ante condiciones climáticas favorables a ellas. Las resistencias que existen a las razas 0 y 1 derivan de *L. pimpinellifolium* y son debidas a los genes I e I-2, que están situados en el mismo cromosoma y han sido introducidas en muchos cultivares comerciales. Después de la aparición de la raza 2 de *F. Lycopersici* las plantas con el gen I sucumbían. Se obtuvo entonces nuevas líneas de variedades inmunes a las razas 1 y 2 de las cuales se disponen hoy para cultivo al aire libre y en invernadero. La resistencia a *Verticillium* está condicionada por el gen dominante *Ve* proveniente de *L. pimpinellifolium*. Otra resistencia obtenida a partir de esta especie silvestre de tomate actúa contra *Stemphylium* y está determinada por el gen dominante *Sm* que se encuentra localizado cerca de los genes I e I-2 en el cromosoma II (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

1.3.3 Virus y medidas de control

Virus del mosaico del tabaco (TMV) producen mosaico amarillo en las hojas y afectan ocasionalmente a los frutos. Son transmisibles por vía mecánica y a través de las semillas. Existen diversos genes que confieren resistencia a diferentes patotipos del virus (Depestre y Gómez 1999)

Geminivirus Se han convertido en el patógeno que más obstaculiza la producción de tomate en Centroamérica y el Caribe. Transmitidos por moscas blancas (*Bemisia*), pueden provocar pérdidas en las plantaciones que oscilan desde el 30 al 100% dependiendo de la variedad, la fecha de siembra, manejo agronómico y el momento de arribo de la enfermedad. Se cree que la explosión de la enfermedad pudo haberse debido al abuso de productos químicos en el control del vector o en la introducción de una nueva forma o especie del vector. Los síntomas varían de acuerdo al virus en cuestión, pero en general, comprende el enrollamiento de las hojas, amarillamiento de sus bordes, inhibición del crecimiento de las plantas y pobre cuajado de los frutos (Depestre y Gómez 1999; Rodríguez 2001).

Se han identificado resistencias de diferentes tipo en las especies silvestres afines, que van desde poligénica recesiva hasta monogénica parcialmente dominante. En Guatemala, el programa de mejoramiento de la FAUSAC inició la investigación de resistencia a geminivirus con el uso de líneas derivadas del híbrido FAVI-9 (obtenido de la Universidad Hebrea de Jerusalem, Israel) con *L. hirsutum* como fuente de resistencia; también las líneas TY-197 y TY-198 (obtenidos del Centro Volcani de Israel) con resistencia derivada de *L. peruvianum* y las derivadas de la población Pimper J-13 (obtenidas de INRA, Francia) con resistencia originada de *L. pimpinellifolium* y *L. peruvianum*. A estas se han ido agregando líneas de universidades estadounidenses. (Mejía 2001; Depestre y Gómez 1999;).

1.3.4 Insectos y medidas de control

Los minadores *Liriomyza spp.* y *Keifferia lycopersici* son muy frecuentes en el trópico y responsables de graves daños. Se ha trabajado en la búsqueda de resistencia a partir de *L. hirsutum* y *L. cheesmanii* (Rodríguez 2001; Depestre y Gómez 1999).

CAPÍTULO 2

EL GEN *Mi* DESDE LA PERSPECTIVA DE LA GENÉTICA MOLECULAR

2.1 GENERALIDADES DE LA MEJORA GENÉTICA EN EL TOMATE

Lycopersicon esculentum Mill. es una especie diploide con $2n = 24$ cromosomas. Su genoma es de pequeño tamaño, 0.74 picogramos por genoma haploide. La flor es hermafrodita y su estructura asegura una estricta autogamia, lo cual favorece los estudios genéticos puesto que conduce a una pronta expresión de las mutaciones recesivas, la facilidad de hibridaciones controladas y la falta de duplicación génica. La riqueza de mutantes ha permitido la confección del mapa cromosómico de la especie, que cuenta con más de 235 genes localizados con precisión en cada uno de los 12 cromosomas existentes y más de 90 genes atribuidos a un cromosoma dado sin que su localización haya sido precisada aún (Rick 1978; Depestre y Gómez 1999). Debido a su autogamia, el tomate cultivado presenta una variabilidad reducida para determinados caracteres; este problema se ha superado exitosamente con el uso de especies silvestres que representan una importante fuente de variabilidad. De hecho es la especie cultivada en la cual han sido más utilizadas estas últimas. Por ejemplo *L. peruvianum*, la especie de la cual se obtuvo la resistencia a nematodos formadores de nudos radiculares, también es fuente, entre otras, de las resistencias a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (gen *Frl*); *Pyrenochaeta lycopersici* (gen *pyl*); virus del mosaico del tabaco (genes *Tm-2* y *Tm-2²*); virus del bronceado del tomate (gen *Sw-5*) y algunos geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia*). (Depestre y Gómez 1999).

El género *Lycopersicon* es originario de América del Sur. De una estrecha franja que incluye el sur de Ecuador (0° latitud) hasta el norte de Chile (30° latitud) y entre el Océano Pacífico y las estribaciones de los Andes. Se incluyen las Islas Galápagos (Figura 2.1). El género comprende 9 especies de las cuales 8 se han mantenido dentro de los límites de su lugar de origen. *L. esculentum* en su forma silvestre *cerasiforme* fue llevada como maleza hacia América Central por los mayas y en México fue domesticada en la zona

tropical de Puebla, Veracruz. Fue introducida a Europa en el siglo XVI donde por mucho tiempo se le consideró venenosa dado su parentesco con la hierbamora, el beleño y la belladona (Nevins *et al.* 1988; Rick 1978; Depestre y Gómez 1999; www.orst.edu/dept/hort/233/tomto.htm-26k).

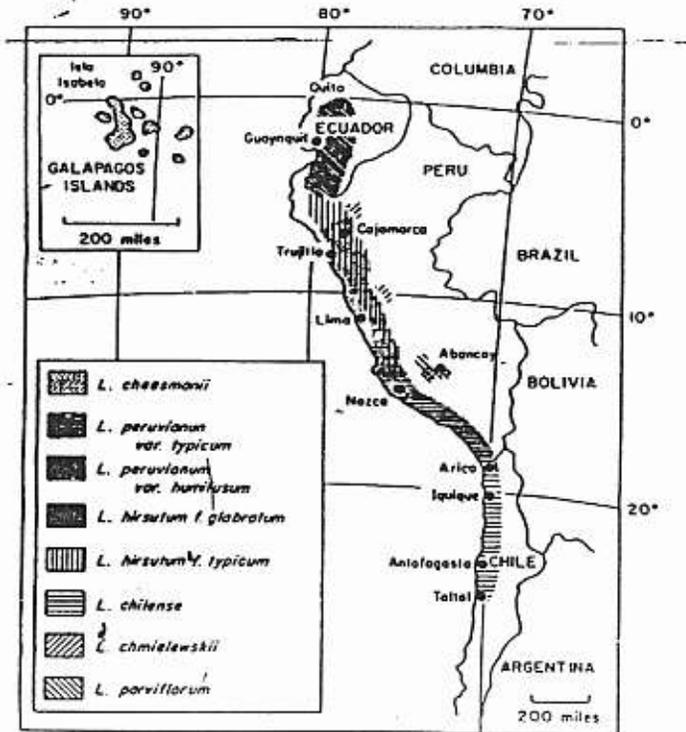


Figura 2.1 Distribución natural de 6 especies de *Lycopersicon* (Tomado de: Qualset C et al 1988)

Las especies silvestres al igual que el tomate cultivado son plantas herbáceas, anuales o perennes. Todas son diploides con el mismo número de cromosomas que la especie cultivada. Los cruzamientos interespecíficos tienen éxito cuando se utiliza *L. esculentum* como madre y para las que presentan problemas como *L. peruvianum* y *L. chilense* se utiliza el cultivo de embriones inmaduros (Depestre y Gómez 1999).

La mejora genética del tomate se inició en Estados Unidos a partir de los años 20 con la hibridación y selección. En los años 40 se desarrolló la búsqueda de resistencia genética, tanto en ese país como en Europa, tomando en los años 60 un gran auge. Hasta esa época el

objetivo era la obtención de variedades que se diferenciaron en precocidad, forma y grosor de los frutos. Casi todos los cultivares de tomate existentes hoy día han sido desarrollados por los métodos clásicos de mejora de plantas autógamas, aunque cada vez más se utilizan los híbridos F1. Los mejoradores de los programas en curso actuales tienden a acumular en los nuevos cultivares el máximo de resistencias ya conocidas y estudiadas, junto con caracteres agronómicos favorables y calidad de los frutos. También se busca la introducción de resistencia a enfermedades todavía no controladas genéticamente o nuevas razas de agentes patógenos. El uso de la selección asistida por marcadores moleculares, ofrece nuevas perspectivas pues permitirá reunir mecanismos complementarios de resistencia durable a diversas enfermedades de importancia económica de este cultivo. (Depestre y Gómez 1999).

2.2 ORIGEN DEL GEN *Mi*

Este gen fue introducido al tomate cultivado a partir de la especie silvestre *Lycopersicon peruvianum* L. por rescate de embriones en un cruce interespecífico realizado por Smith en 1944. La resistencia es derivada de una accesión de *L. peruvianum* PI128657 que fue colectada en 1938 en la región costera sur del Perú en el oeste de Tanca, que es el hábitat natural de distribución al sur de esta especie. De una sola planta F1 se obtuvo la resistencia a nematodos en los cultivares de tomate modernos y ha sido explotado extensivamente en las últimas dos décadas (Yaghoobi *et al.* 1995; Milligan *et al.* 1998; Veremis *et al.* 1999). El gen *Mi* cuya resistencia está expresada por un solo gen dominante denominado *Mi-1.2* ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (figura 2.2) (Messeguer 1991; Ho 1992; Williamsom 1994 y Kaloshian 1998, Veremis *et al.* 1999, Milligan *et al.* 1998).

El gen *Mi* confiere resistencia a tres de las especies más dañinas de nematodos formadores de nudos radiculares, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne incognita* (Ammiraju 2002), así como al áfido de la papa *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.* 1998). Este gen ha sido un clásico ejemplo del uso de la resistencia del hospedero para reducir la necesidad de aplicación de pesticidas. Con la asistencia de marcadores ligados comenzando con el marcador isoenzima *Aps-1* y más recientemente con marcadores

de ADN tales como Rex-1, *Mi* ha sido incorporado a varios cultivares modernos (Milligan *et al.* 1998).

2.3 **MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A *Mi* UTILIZADOS PARA IDENTIFICACIÓN RUTINARIA (*Aps-1* y *REX-1*)**

En las investigaciones realizadas en la búsqueda de la clonación del gen *Mi* se desarrollaron mapas genéticos y físicos del gen con el uso de marcadores moleculares como RFLP's (de los cuales hay más de 1000 para tomate), así como marcadores RAPD's e isoenzimas. Los últimos dos, son los tipos de marcador molecular más utilizados actualmente para la selección de plantas de manera rutinaria en laboratorios especializados (Williamson *et al.* 1994).

2.3.1 **Isoenzima marcador *Aps-1***

Esta isoenzima es codificadora de la ácido-fosfatasa-1 y está fuertemente ligada al gen *Mi* (Kaloshian, 1998). Como marcador ha sido ampliamente usada por compañías de semillas como una selección indirecta del gen *Mi* con el fin de evitar la evaluación directa de progenies. Existe un alto ligamiento entre *Mi* y *Aps-1* por lo cual es un indicador de alta fidelidad de la presencia del gen de resistencia. Además por ser codominante este marcador puede ser usado para identificar plantas resistentes homocigotas. Desafortunadamente, la selección con *Aps-1* trabaja sólo cuando se hace mejora con variedades del grupo A, que portan el alelo de *L. peruvianum* de esta isoenzima (Medina-Filho y Stevens (1980) citados por Messeguer *et al.* 1991 y Kaloshian *et al.* 1998). Las variedades dentro de los grupos B y C que contienen menos ADN de *L. peruvianum* ya no portan del alelo *Aps-1*, por lo cual esta enzima no puede usarse para selección indirecta de *Mi* (sección 2.4). El alelo *Aps-1* de *L. esculentum* denominado *Aps-1+* puede encontrarse en germoplasma que porta *Mi* presumiblemente debido a la recombinación entre estos dos genes. La región del cromosoma 6 obtenida por introgresión en estas líneas es mucho más pequeña que en plantas con el alelo *Aps-1* (Kaloshian *et al.* 1998).

Recientemente se ha obtenido información afirmando que *Mi-1* y *Aps-1* están al menos a 40Mb de distancia. Zhong *et al.* (1999) generaron estos resultados, por medio del uso de clones BAC-*Mi* y de clones YAC *Aps-1* con la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH), aplicada a cromosomas en paquitene. De tal manera proveyeron evidencia física que muestra a *Mi-1* localizado en el borde la región eucromática y heterocromática del brazo corto (6S) y a *Aps-1* en la heterocromatina pericentromérica del brazo largo (6L) cerca de la eucromatina (Zhong *et al.* 1999).

2.3.2 Desarrollo y usos del marcador PCR REX-1

El marcador codominante REX-1 basado en PCR y fuertemente ligado a *Mi* fue desarrollado por Williamson *et al.* (1994). Surgió de la necesidad de desarrollar marcadores de uso rutinario. Como se conoce los RFLP's han sido especialmente útiles para el mapeo de genes en regiones con introgresiones en el tomate, pero se necesita llevar a cabo hibridación por Southern blot lo cual los hace imprácticos para análisis de rutina.

La amplificación por PCR de ADN genómico con oligómeros arbitrarios genera marcadores RAPD para el mapeo. Estos marcadores se han identificado ligados a genes de resistencia contra enfermedades del tomate, al evaluar líneas casi isogénicas que difieren en la presencia de un solo gen de resistencia. Los marcadores RAPD tienen la ventaja de ser fáciles de generar y no requerir del uso de isótopos. Sin embargo, por las condiciones de hibridación no astringente usados para generarlos, los patrones de amplificación varían entre preparaciones de ADN y las condiciones del ensayo. El método es por tanto no rentable para análisis rutinarios (Klein-Lankhorst *et al.* 1991b; Martín *et al.* 1991 y Williamson *et al.* 1990 citados por Williamson *et al.* 1994).

Sin embargo estos marcadores RAPD pueden ser convertidos en marcadores estables y confiables al clonar las bandas amplificadas, secuenciando sus extremos y luego usando esta secuencia para generar cebadores oligómeros. Estos oligómeros cuando se alinean bajo condiciones de hibridación estringente llevan a cabo de manera reproducible la amplificación de bandas solas, que corresponden a loci genéticamente definidos, llamados SCARs (sequence-characterized, amplified regions) (Paran y Michelmore 1993 citados por

Williamson *et al.* 1994). Los SCARs asemejan los sitios de secuencia marcados (STSs) que han sido una de las principales herramientas en la alineación de clones en el proyecto del genoma humano (Olson *et al.* 1989; Chumakov *et al.* 1992 citados por Williamson *et al.* 1994).

Para desarrollar un marcador de este tipo en la identificación del gen *Mi*, Williamson *et al.* (1994) usaron una metodología que consistió en la amplificación por PCR (usando 160 diferentes primers decámeros) del ADN de seis líneas de tomate que diferían en los alelos de la isoenzima *Aps-I* y *Mi*. Cuando estos decámeros fueron usados en pares para amplificar el ADN de tomate, varias bandas (en promedio 7) fueron obtenidas, permitiendo generar marcadores adicionales a los decámeros disponibles. Usaron entonces 55 de esos pares para amplificar el ADN de las líneas de tomate. Entre los primers allí evaluados, un par, OPG01 y OPX17, produjeron bandas dominantes que estuvieron presentes en todas las líneas evaluadas que portaban *Mi* y ausentes en las líneas susceptibles. Este marcador fue designado REX-1 (Williamson *et al.* 1994).

La caracterización de REX-1 consistió en aislar el fragmento correspondiente al marcador dominante de RAPD REX-1 y clonarlo. Se determinaron las secuencias de ADN de los extremos de los insertos clonados. Se obtuvieron de un extremo del inserto 177 nucleótidos comenzando con la secuencia del decámero OPG01 y 169 nucleótidos comenzando con la secuencia OPX17. Se diseñó un par de primers de 20 mer, REX-F1 y REX-R, a partir de los datos de la secuencia. Las secuencias de oligonucleótidos de los primers fueron escogidos para que tuvieran un 50% GC y carecieran de estructura secundaria por examen visual. Los primers fueron localizados a 49 y 146 bases de los extremos del marcador RAPD clonado. Por medio de PCR se obtuvo la amplificación de una banda esperada de 750 pb en el ADN del tomate resistente como susceptible a una temperatura de alineación de 55°C. El ADN amplificado del tomate resistente y susceptible fue cortado con varias enzimas de restricción (Ahi I, DraI, Hind III, MspI, Sau 3^a, SspI y TaqI). Sólo la TaqI reveló polimorfismos. El ADN amplificado de las plantas resistentes fue cortado en 2 bandas de aproximadamente 570 y 160 pb, mientras que el ADN amplificado de las plantas susceptibles no contenía un sitio de corte para Taq I. Los heterocigotos desplegaron las 3

bandas, generando por tanto un marcador codominante del tipo CAPS (Cleaved amplified polymorphism) (Williamson *et al.* 1994).

El marcador fue luego evaluado en los extractos de ADN de 69 individuos en una población F2 segregando para la resistencia contra nemátodos. Los individuos en esta población habían sido previamente caracterizados para los alelos *Mi* y *Aps-1* y para marcadores RFLP ligados a *Mi* (Ho *et al.* 1992). En todos los casos el fragmento amplificado derivado de las plantas con el alelo resistente de *Mi* fue cortado con Taq I mientras que el fragmento de las plantas susceptibles no fue cortado. Además se hicieron otros ensayos adicionales con los mismos resultados. Hicieron un mapa detallado de RFLP de la región *Mi* del cromosoma 6 comparando los polimorfismos ligados a *Mi* en las líneas disponibles y en los recombinantes de la población F2 segregando para la resistencia a nemátodos (figura 2.2). El alelo REX-1 de *L. peruvianum* es inseparable de *Mi* en todas las líneas evaluadas y por lo tanto, a la par de LC379 representa el único marcador de diagnóstico descrito presente en Motelle, que parece retener la región introgresionada más pequeña de las líneas resistentes disponibles (Williamson *et al.* 1994).

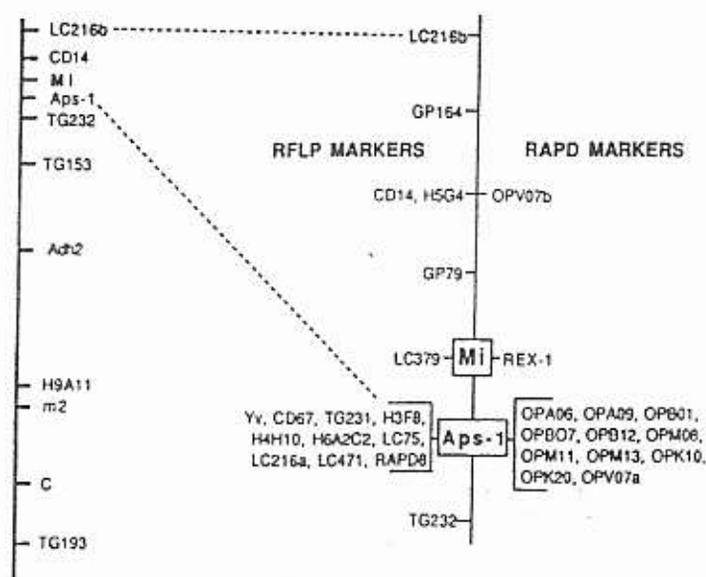


Figura 2.2 Mapa genético de la región del gen *Mi*. A la izquierda se observa un mapa del cromosoma 6 y se indica la posición relativa de los marcadores RFLP altamente ligados (Ho *et al.* 1992). A la derecha se indica la posición de los marcadores RAPD deducida de un análisis de caracterización de líneas de tomate (Tomado de Williamson *et al.* 1995).

Este marcador funciona con el ADN extraído por procedimientos sencillos que permiten cientos de extracciones en un día, por lo cual puede usarse rutinariamente en evaluaciones de programas de mejoramiento genético. Además, está más fuertemente ligado a *Mi* que *Aps.-1* y permite el tamizaje de germoplasma donde el ligamiento entre *Mi* y *Aps.-1* se ha perdido (Williamson *et al.* 1994). Investigaciones recientes como la de Debert *et al.* (1999) registran el uso de este marcador para estudiar la segregación de *Mi* y la resistencia *BW* para *Ralstonia solanacearum*. Ellos reportan evidencias de que ambos genes están altamente ligados y que la introgresión de *Mi* desde *L. peruvianum* al cromosoma 6 llevó a la pérdida en el mismo cromosoma de los alelos de resistencia de *BW*.

2.4 MAPEO DEL GEN *Mi*

Se han hecho mapas de este cromosoma con detalle considerable y se han identificado múltiples marcadores que están ligados a *Mi*. La abundancia de polimorfismos entre *L. esculentum* y *L. peruvianum* ha sido útil en el desarrollo de un mapa detallado de la región *Mi* (figura 2.3).

Entre los mapas que han generado importante información se encuentra el desarrollado por Messeguer *et al.* (1991). Su trabajo consistió en elaborar un mapa que cubre las nueve unidades de mapa más distales del cromosoma 6, contiene al gen *Mi*, nueve marcadores RFLP y el marcador isoenzima *Aps.-1*. Con 1000 plantas F₂, fueron capaces de marcar el gen *Mi* entre el intervalo entre dos de estos marcadores, *GP79* y *Aps.-1*. Usando los marcadores alrededor de *Mi* como sondas, clasificaron las variedades de tomate resistentes a nematodos en tres tipos basados en la cantidad de ADN de *L. peruvianum* ligado y aún presente. Los dos primeros tipos (representando la mayoría de las variedades evaluadas) aun contienen más de 5 cM del cromosoma de *L. peruvianum*. Este resultado podría explicar algo de los efectos negativos asociados con la resistencia a nematodos debido a que otros genes de *L. peruvianum* pueden estar contenidos dentro del segmento transferido. (Messeguer *et al.* 1991)

De acuerdo con sus resultados las variedades en la primera categoría (Grupo A) tipificadas por VNF8 han retenido ADN de *L. peruvianum* por el extremo entero del grupo de

ligamiento del cromosoma 6, incluyendo 9 marcadores RFLP y un locus de isoenzima (*Aps-1*). El tamaño del segmento transferido, más grande de lo esperado en el grupo A puede deberse al nivel reducido de recombinación en la región *Mi* del cromosoma 6. Messeguer apunta además que una situación similar se ha encontrado para el gen Tm2a (tobacco mosaic virus) que también fue transferido al tomate cultivado desde *L. peruvianum*. A pesar de varias generaciones de retrocruza, pedazos relativamente largos de ADN de *L. peruvianum* ligado persisten aun en las variedades de tomate portadoras de este gen (Young and Tanksley 1989 citados por Messeguer *et al.* 1991).

En el segundo grupo de variedades (grupo B) que tienen su origen en la línea Anahu, la longitud del segmento se ha reducido y se extiende solo desde *Mi* al extremo del grupo de ligamiento del cromosoma (aproximadamente 5 cM o 5% del cromosoma 6). Este grupo no contiene el alelo de *L. peruvianum* en *Aps-1* o cualquiera de los marcadores moleculares pasados de este punto (hacia el brazo largo). El tercer grupo representado por una sola variedad, Motelle, es aun resistente a nematodos, aunque ya no contiene alelos de *L. peruvianum* en ninguno de los marcadores evaluados. Por lo tanto, Motelle contiene menos de 2 cM del cromosoma de *L. peruvianum*. Kaloshian *et al.* (1998) reporta que el tamaño físico de esta región introducida en Motelle restringe *Mi* a una región de 650 kb del genoma y que los marcadores LC379 (Ho *et al.* 1992) y el marcador PCR REX-1 (Williamson *et al.* 1994) fueron identificados dentro de la región de 650 kb. (Ho *et al.* 1992, Kaloshian *et al.* 1998, Messeguer *et al.* 1991)

Messeguer *et al.*, observaron además bajos niveles de recombinación en la región del cromosoma 6 conteniendo a *Mi*. Indican que la causa de la recombinación reducida en los cruces conteniendo *Mi* puede deberse a la reducida homología entre el ADN de *L. esculentum* y el ADN de *L. peruvianum* conteniendo *Mi*, lo cual también es apoyado por Kaloshian *et al.* (1998). Esta baja recombinación no ocurre en cruces que no portan el gen en mención. La transferencia del gen *Mi* junto con ADN de *L. peruvianum* ligado puede de alguna manera estar impidiendo la recombinación y el apareamiento meiótico normal.

Otros resultados importantes se han obtenido del trabajo de Kaloshian *et al.* (1998). Este equipo identificó puntos de recombinación cercanos al gen *Mi* al evaluar grandes poblaciones de tomate para recombinantes. Evaluaron un total de 21,089 individuos de la F2 usando marcadores morfológicos y 1887 individuos F2 usando marcadores de flaqueo basados en PCR. Realizaron mapeo de estructura fina de los recombinantes con marcadores AFLP y RFLP derivados de subclones de cósmidos, localizando al gen *Mi* en una región genómica de 550 kb. Encontraron además una baja frecuencia de recombinantes, lo que indicaba que la recombinación fue en general suprimida en estos cruces y las recombinaciones estuvieron restringidas a regiones particulares. Para circunscribir este problema, hicieron crecer una población segregante de *L. peruvianum*. Con el tamizaje de esta población usando marcadores RFLP, AFLP y PCR identificaron varias plantas con recombinaciones cerca de *Mi*. La frecuencia de recombinación fue aproximadamente 8 veces mayor en la región *Mi* del cruce de *L. peruvianum*. No obstante, aun dentro del cruce de la especie silvestre, los sitios de recombinación no estaban uniformemente distribuidos en la región. Combinando los datos de los análisis de recombinantes de *L. esculentum* y *L. peruvianum* localizaron *Mi* en una región del genoma que se expande menos de 6.5 kb (Kaloshian 1998).

2.5 CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *Mi*

Recientemente, varios genes de resistencia a fitopatógenos han sido clonados usando estrategias basadas en mapas. El gen *Mi* era un objeto de clonación particularmente atractivo por la importancia de los nemátodos formadores de nudos radiculares como patógenos y su amplio rango de hospederos (Kaloshian *et al.* 1998).

Milligan *et al.* (1998) quienes llevaron a cabo la clonación y caracterización de *Mi* señalan que ha sido un alcance importante por dos razones generales. La primera es que el gen proveerá un punto de inicio para entender la biología básica de la resistencia a plantas a un animal parasítico y la relación de *Mi* con otros genes R de patógenos. La segunda es que *Mi* puede ser introducido a varias especies diferentes seriamente dañadas por nematodos formadores de nudos radiculares y para las cuales no se ha identificado aun una fuente de

resistencia genética. Los esfuerzos por localizar el gen *Mi* fueron impedidos por varios años debido a la represión severa de recombinación cerca de este gen en las líneas de *L. esculentum* portadoras por introgresión del ADN de *L. peruvianum* (Messeguer *et al.* 1991; Ho *et al.* 1992; Milligan *et al.* 1998). Basados en el trabajo de Kaloshian *et al.* (1998) sobre análisis de recombinantes de *L. esculentum* y *L. peruvianum* que permitió localizar al gen *Mi* en una región del genoma menor a las 65 kb (figura 2.3), el trabajo de Milligan *et al.* (1998) fue entonces dirigido a la pregunta de dónde está localizado *Mi* dentro de esta región por secuenciación de 52 kb de ADN contiguo. La metodología y resultados generales se presentan en los siguientes párrafos.

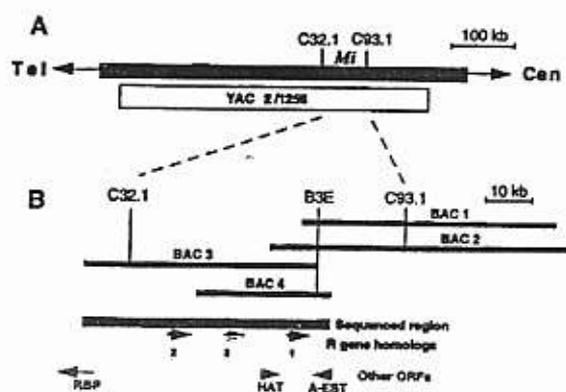


Figura 2.3 Región del cromosoma 6 donde se ubica el gen *Mi* (Tomado de Milligan *et al.* 1998)

(A) La barra negra indica la región de ~650 kb de introgresión de ADN de *L. peruvianum* en el cual *Mi* ha sido localizado. Cel y Tel indican las direcciones hacia el centrómero y telómero respectivamente. Por análisis de recombinantes (Kaloshian *et al.* 1998) se localizó *Mi* en una región de 65 kb entre los marcadores C32.1 y C93.1. La barra blanca representa la posición del YAC 2/1256. (B) El BAC contiguo identificado usando las sondas de ADN C32.1 y C93.1 y B3E. La región de 52 kb para la cual se determinó la secuencia de ADN está indicada por la barra negra ancha. Las flechas 1, 2 y 3 representan las posiciones de tres genes *R* homólogos. RBP, HAT y A-EST indican marcos abiertos de lectura con similitud a la proteína de unión retinoblastoma, una transposasa de la familia HATy una secuencia tag expresada de *Arabidopsis* respectivamente

2.5.1 Identificación de los homólogos de genes *R*, su transcripción y estructura génica

Primero desarrollaron una biblioteca de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) a partir de una cepa de levadura portando el YAC2/1256. Este incluye la región entera en la cual fue localizado *Mi* (Kaloshian *et al.* 1998). Se identificaron cuatro clones BAC1, BAC2, BAC3 y BAC4 por hibridación con sondas de ADN que flanquean a *Mi*. La secuenciación a

gran escala se llevó a cabo con BAC3 y BAC4. En todas las 52 kb, incluyendo el inserto entero de BAC3 de 50 kb y sumadas 2 kb de BAC4, así como 20 kb de secuencia común entre los dos BACS. Se encontraron seis marcos abiertos de lectura de al menos 400 nucleótidos en la región de los 52 kb. Tres de estos resultaron homólogos entre sí y homólogos con los genes R previamente identificados de la clase LRR. La mayor homología fue con el gen del tomate *Prf* (Salmeron *et al.* 1996 citado por Milligan *et al.* 1998). Dos de los tres marcos abiertos de lectura tenían más o menos 95% de residuos idénticos; estos genes candidatos fueron designados como *Mi-1.1* y *Mi-1.2* respectivamente. El tercero carece de las secuencias de los extremos N y C y contiene una deleción y varios codones sin sentido relacionados con los otros dos. Otros tres marcos abiertos de lectura en la región contenían secuencias con similitudes a *Arabidopsis*.

Para estudiar la transcripción construyeron una biblioteca de cADN a partir de ARNm aislado a partir de tejido de raíces de una línea de tomate resistente a nemátodos. Fue evaluada y se identificaron 24 clones de hibridación. El análisis de secuenciación reveló que tres clones de hibridación correspondían al *Mi-1.1*, que dos correspondían al *Mi-1.2* y los tres restantes a otros dos genes adicionales con secuencia similar. El marco abierto de lectura deducido fue de 1255 aminoácidos para el *Mi-1.1* y de 1257 aminoácidos para *Mi1.2*.

En cuanto a la estructura génica la comparación de cADN y secuencias genómicas revelaron que *Mi-1.1* y *Mi1.2* contienen cada uno dos intrones en posiciones conservadas cerca de su extremo 5'. El intrón 1 es más largo en *Mi-1.2* que en *Mi-1.1* (1306 y 556 nucleótidos respectivamente). Las secuencias del intrón 1 de *Mi-1.1* y *Mi1.2* comparten regiones similares. Los 183 nucleótidos de 3' son 97% idénticos entre las dos copias y las regiones de 383 nucleótidos de 5' son 70% idénticos y comparten regiones de homología esparcidas entre pequeñas inserciones. Una inserción de 738 nucleótidos parece haber ocurrido en la mitad del intrón 1 de *Mi1.2*. El intrón 2 tiene 75 nucleótidos de longitud en ambos genes R homólogos, y sus secuencias son 97% idénticas. La posición del codón de iniciación ATG es conservada entre los dos genes y comienza a 42 pb 5' del intrón 2. De esta manera, si los cADNs tienen la longitud completa, cada transcrito maduro tiene una

región 5' no traducida de ~86 nucleótidos. Las longitudes de las regiones no traducidas 3' para *Mi-1.1* y *Mi-1.2* son de 132 y 108 nucleótidos respectivamente. Los dos genes tienen una secuencia TATA box idéntica a 30 pb a partir del comienzo del transcrito putativo. Además, *Mi-1.1* tiene una secuencia CAAT box a -76 pb. Los resultados de complementación indican que el fragmento de 14.7kb conteniendo al gen *Mi-1.2* y no otro marco abierto de lectura es suficiente para conferir resistencia a las líneas de tomate susceptibles; es decir, que no hay otros genes que sean específicos para la región de introgresión en líneas de tomate resistentes que sean requeridos para la resistencia contra *M. javanica* y *M. incognita* y que el fenotipo se transmite establemente a las plantas progeñe.

2.5.2 Estructura de las proteínas codificadas y similitud con otros genes de resistencia.

Las proteínas predichas codificadas por *Mi-1.1* y *Mi-1.2* tienen 91% de aminoácidos idénticos. La comparación con secuencias disponibles reveló que pertenecen a la familia de productos génicos LRR-de unión nucleotídica, asociados a la resistencia. La más alta similitud entre las proteínas LRR-de unión nucleotídica-cremallera de leucina es una región conservada central de 260 aminoácidos que sugiere una función conservada para esta parte de la proteína. La proteína putativa codificada por *Prf* es la que presenta mayor similitud con las proteínas de *Mi-1.1* y *Mi-1.2* (Milligan *et al.* 1998).

Las regiones del extremo terminal N de los miembros de esta familia pueden dividirse en dos subclases. En una, la región N-terminal contiene una secuencia que se asemeja a los dominios de señales intercelulares de la proteína de la *Drosophila toll* y de la proteína receptora interleucina-1 de mamíferos. *Mi-1.2* no contiene este motivo. La segunda clase, ejemplificada por las proteínas codificadas por los genes de *Arabidopsis* *RPM1* y *RPS2* y el gen del tomate *Prf*, contienen un potencial motivo de cremallera de leucina. *Mi-1.1* y *Mi-1.2* contienen este motivo por lo que caben dentro de esta subclase. Para Vos *et al.* (1998) el producto del gen *Mi* se asemeja cercanamente al producto del gen *Prf* de *L. esculentum*.

Para Ammiraju (2002), la mayoría de los genes de resistencia a enfermedades parecen estar agrupados en el genoma vegetal. La duplicación y divergencia subsecuente parece ser un

proceso común en la evolución de los genes vegetales. Tal es el caso del locus *Mi-1* donde sólo *Mi-1.2* confiere la resistencia, mientras que el caso del locus *Cf2* del tomate, contiene dos miembros de esta familia génica que reconocen el mismo factor de avirulencia del hongo *Cladosporium fulvum*.

2.5.3 *Cómo Mi-1.2 confiere resistencia?*

Basados en la carencia de una señal peptídica es muy probable que *Mi-1.2* y otros miembros de esta clase estén localizados en el citoplasma. Si *Mi-1.2* reconoce de hecho un producto del nematodo, es muy probable que este producto del nematodo esté presente dentro de la célula vegetal. Aunque los nematodos son patógenos extracelulares, se alimentan del citoplasma de células vivientes vegetales y se piensa que inyectan secreciones dentro del citoplasma para desarrollar células alimenticias (Williamson y Hussey 1996, citados por Milligan *et al.* 1998). La reacción hipersensitiva (HR) celular asociada con la presencia de *Mi* ocurre cerca del extremo anterior del nematodo más o menos 12 horas después de la inoculación. Esto corresponde al tiempo en el cual se espera que el nematodo inyecte saliva en el citoplasma de las células del tejido vascular en desarrollo para iniciar la formación de células gigantes. Este tiempo es consistente con la hipótesis de que *Mi-1.2* reconozca algo que el nematodo inyecta dentro de la planta. El encontrar tal molécula será difícil a pesar de la disponibilidad de cepas de nemátodos que pueden infectar plantas conteniendo *Mi* porque este grupo de nemátodos no se reproduce sexualmente haciendo imposible el uso de técnicas genéticas estándar para identificar los genes de parásitos asociados (Milligan *et al.* 1998).

Recientemente se han identificado otros genes con características estructurales similares a *Mi*; Brommonschenkel *et al.* (2000) usaron un método de clonación posicional para aislar el locus *Sw-5* del tomate que confiere resistencia de amplio espectro al tospovirus. Experimentos complementarios con cósmidos les permitieron demostrar que *Sw-5* es un gen de un solo locus capaz de reconocer varios aislados de tospovirus y especies. Además, basados en sus características estructurales, *Sw-5* pertenece a la clase de genes de resistencia NBS-LRR. La similitud general entre las proteínas *Mi* y *Sw-5* del tomate sugiere que una ruta de señal de transducción compartida o comparable conduce a la resistencia de

nematodos y virus; además también apoya la hipótesis de que *Sw-5* provee resistencia por la vía de la respuesta sensible.

2.6 ESTUDIOS SOBRE TERMOESTABILIDAD DEL GEN *Mi* EN *L. peruvianum*

La ruptura de la resistencia mediada por *Mi-1* debido a la alta temperatura ha sido reportada tanto en condiciones de campo como de invernadero. Por tanto, la incorporación de una resistencia termo estable contra nematodos formadores de nudos radiculares sería un avance genético valioso en el tomate. De hecho algunos investigadores han identificado accesiones de *L. peruvianum* poseedoras de resistencia termo estable (Ammati *et al.* 1986; Veremis y Roberts 1996b citados por Ammiraju *et al.* 2002).

Entre los estudios de resistencia termoestable contra nematodos el de Yaghoobi *et al.* (1995) consistió en evaluar accesiones del tomate silvestre con la población de nematodos formadores de nudos radiculares 557R que infecta plantas de tomate portadoras del gen *Mi*. Varias accesiones demostraron portar la resistencia contra 557R. De acuerdo con los resultados, la proporción de segregación de las plantas resistentes a las plantas susceptibles sugiere que un solo gen dominante fue el principal factor en la nueva resistencia y fue designado como *Mi-3*. Este gen u otro cercanamente ligado confiere además resistencia a 32°C, una temperatura a la cual *M-1* no es efectivo. Con el uso de marcadores RFLP se determinó el ligamiento del marcador NR14 con *Mi-3* y se sabe que pueden ubicarse de acuerdo con los mapas en el brazo corto del cromosoma 12; esto fue confirmado con análisis Southern en la población segregante para *Mi-3*. En este estudio pudieron además posicionar a *Mi-3* cerca del marcador RFLP TG180, que se mapea en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 12 del tomate.

El estudio de Veremis *et al.* (1999) se enfocó en la realización de un mapa en el cromosoma 6 del locus de resistencia termo estable de *L. peruvianum* LA2157 pertenece al grupo colectado en el norte de Perú, en una región que puede ser el centro ancestral del complejo *peruvianum*. Como se conoce, *L. peruvianum* es una especie autoincompatible excepto por

la accesión LA2157 que es autocompatible y altamente resistente a nemátodos a temperaturas del suelo entre 25 y 30°C. (De Nettancourt 1997; Ammati *et al.* 1986; Rick 1986 citados por Veremis *et al.* 1999). Varias especies de angiospermas emplean la autoincompatibilidad para mantener la diversidad genética en una población y se cree que la autocompatibilidad evolucionó de la autoincompatibilidad.

Los resultados obtenidos permitieron afirmar que todas las entradas del tomate silvestre LA2157 y de su progenie S1, evaluadas a 32°C, resultaron resistentes a aislados de *Meloidogyne spp* *Mi*-avirulentos, pero susceptibles a *Mi*-virulentos. Esto indica que la accesión autocompatible es homocigota para la resistencia termoestable. La posición de esta nueva resistencia termoestable de LA2157 fue localizada en el brazo corto del cromosoma 6, en el grupo de genes de resistencia cerca del gen *Mi-1*. Veremis *et al.* (1999) califican de interesante el hecho que la resistencia de LA2157 esté posicionada en la misma región del cromosoma 6 que el gen término inestable *Mi* (*Mi-1*). También indican que el resultado provee evidencia de que el gen de resistencia termoestable en LA2157 es diferente de los genes *Mi-3*, *Mi-7* y *Mi-8* que confieren resistencia a los aislados de *M. incognita* *Mi-1* virulentos en *L. peruvianum* PI126443-1MH, PI270435-3MH Y PI270435-2R2 respectivamente (Veremis 1995 citado por Veremis *et al.* 1999). No obstante LA2157 tiene el mismo fenotipo de los genes de resistencia termoestables *Mi-2*, *Mi-4*, *Mi-5* y *Mi-6* en *L. peruvianum* PI270435-2R2, LA1708, PI126443-1MH y PI270435-3MH respectivamente.

Las accesiones LA1708 y LA2172 son resistentes a *Mi-1*-avirulento y susceptibles al *Mi-1*-virulento lo que las hace similares a LA2157. De acuerdo con los autores, existe la posibilidad que hayan diferentes y múltiples orígenes de resistencia seleccionados independientemente a través de coevolución paralela en diferentes áreas. Esto debido a que los organismos están constantemente evolucionando; en cada interacción coevolutiva algunas variantes son generadas y pocas son seleccionadas y retenidas dentro de los genomas. La duplicación génica pudo haber sido el mecanismo de origen de casi todos los genes incluyendo los loci *Mi* (Veremis *et al.* 1999).

El estudio de Ammiraju *et al.* (2002) está muy relacionado con el presentado en los párrafos anteriores, siendo una caracterización avanzada de la resistencia termo estable contra tres biotipos avirulentos *Mi-1* de *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita*. En este trabajo (que incluyó a REX-1 como uno de los marcadores), la metodología consistió en la evaluación de progenies F2 y F3, derivadas de un cruce interespecífico entre el resistente a nematodos LA2157 y la susceptible LA392, a 25°C y 32° C. Los resultados revelaron una herencia monogénica simple dominante con todos los biotipos evaluados. El gen fue designado como *Mi-9*. Como un primer paso para clonar *Mi-9*, construyeron un mapa de ligamiento alrededor de este gen. El mapeo avanzado de recombinantes con marcadores basados en RFLP y PCR localizaron *Mi-9* en el brazo corto del cromosoma 6 y dentro del mismo intervalo genético que dispersa la región *Mi-1*. Con este trabajo concluyeron hasta ahora que *Mi-9* tiene la misma expresión fenotípica que *Mi-1* en términos de especificidad a especies de *Meloidogyne* y biotipos, y difiere fenotípicamente de *Mi-1* solo en la estabilidad de la resistencia a alta temperatura.

2.7 RESISTENCIA A ÁFIDOS-NEMÁTODOS

El áfido de la papa, *Macrosiphum euphorbiae*, es capaz de infestar varias especies vegetales. Aunque principalmente parasita a *Rosa* sp., es altamente polífago en Solanaceae especialmente en la papa y puede crecer en grandes números en el tomate causando daños severos en algunas variedades. Este áfido transmite más de 40 diferentes virus, de los cuales el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV) es llevado de manera persistente (Kaloshian *et al.* 1998, Vos *et al.* 1998). El daño causado a diferentes especies incluye las pérdidas de la producción causadas por la disminución del crecimiento, muerte gradual de la planta joven, malformación de las hojas, clorosis y necrosis de las hojas. Los pesticidas son el control que comúnmente se utiliza contra el insecto pero se ha reportado la resistencia al áfido de la papa en *Lycopersicon pennellii*, un pariente silvestre del tomate cultivado, por lo cual se busca un método para crear resistencia en la planta hospedante. (Kaloshian *et al.* 1995).

Kaloshian *et al.* (1995) denominaron como *Meu-1* al gen de resistencia contra el áfido de la papa. En ese estudio la resistencia de campo a *M. euphorbiae* se encontró presente en todas las líneas de tomate portadoras del gen *Mi* y los datos de campo indicaban que la líneas no portadoras de *Mi* diferían en la resistencia a áfidos. Con la clonación del gen *Mi* en 1998, se pudo determinar las relaciones entre *Mi* y *Meu-1*. Se ha concluido que *Mi* se expresa en las hojas y tiene una especificidad dual, confiere resistencia contra los áfidos y nematodos que son organismos de diferentes fila, lo cual demuestra que un miembro de la familia de los genes de resistencia de unión nucleotídica rica en leucina es capaz de conferir resistencia específica aislada contra un insecto (Rossi *et al.* 1998; Vos *et al.* 1998).

Rossi *et al.* (1998) apuntan que en este caso en el cual un solo gen mediatiza la resistencia a dos organismos tan diversos, surgen preguntas intrigantes acerca del posible mecanismo de reconocimiento. Parece improbable que la proteína codificada por *Mi* interactúe con ligandos idénticos que estén presentes en nemátodos y áfidos particularmente porque, para *M. euphorbiae* y los nemátodos formadores de nudos radiculares, hay variabilidad entre especies en cuanto a la efectividad de la resistencia conferida por *Mi*. Existen otras posibilidades. Primero, *Mi* puede ser capaz de mediar un respuesta a diferentes ligandos. Existe evidencia que otros genes R responden a más de un patógeno dado. El mejor ejemplo estudiado es el gen *RPMI* de *Arabidopsis*, que codifica una proteína que comparte las mismas secuencias de motivos y estructura general de *Mi*. Este gen confiere resistencia a cepas de *P. syringae* portadoras de los genes avirulentos no relacionados, *avrRpm1* y *avrB*. Se desconoce si *RPMI* interactúa físicamente con cada una de estas proteínas de avirulencia. Segundo, *Mi* puede no reconocer directamente un ligando de cada organismo, en vez de esto codificar un compuesto involucrado en la señal de la cascada de transducción entre receptores primarios y la respuesta de resistencia. En este caso, los receptores específicos desencadenarían el mismo patrón de señales de transducción vía *Mi*. Bajo esta hipótesis, todos los componentes además de *Mi* estarían presentes en el tomate susceptible (Rossi *et al.* 1998, Vos *et al.* 1998).

Ya sea que las respuestas de defensa mediadas por *Mi* sea la misma para los áfidos, existe algo interesante que señalar. Existen similitudes en la alimentación, por lo que un

mecanismo que bloquea la ingestión de nutrientes al inducir cambios físicos o químicos en las células penetradas o en los elementos cribosos es un ejemplo de una defensa que podría funcionar contra diferentes parásitos. No se ha descrito ninguna reacción hipersensitiva (HR) para la resistencia mediada por *Mi* contra áfidos pero podría ser porque ha habido una limitada investigación. La secuencia predicha de la proteína codificada por *Mi* sugiere una localización citoplásmica. Si este producto génico reconoce directamente los productos del patógeno, entonces estos productos deberían estar presentes dentro de la célula vegetal, posiblemente inyectados vía estiletes de nematodos y áfidos. Para el áfido, la molécula reconocida podría ser ya sea del áfido u originarse de un endosimbionte (Rossi *et al.* 1998).

CAPITULO 3

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS USADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR REX-1 EN EL ADN DE PLANTAS DE TOMATE USANDO LA TÉCNICA DE PCR Y LA SECUENCIACIÓN DE ADN

3.1. SITIO DE COLECTA. UNIDAD DE RIEGO SANSIRISAY –URS-

La URS fue seleccionada en 1998 inicialmente como un área piloto para el estudio del complejo mosca blanca/geminivirus, sin embargo hasta el presente se han desarrollado varios proyectos de investigación relacionados con los geminivirus y más recientemente estudios sobre otras enfermedades que afectan al tomate como el marchitamiento bacteriano causado por *Ralstonia solanacearum* y la infección en las raíces del tomate por los nematodos del género *Meloidogyne*. La URS está ubicada en el municipio de Sanarate, Departamento del Progreso a 800 msnm, en un área que se caracteriza por ser un sistema cerrado, aislado de otras áreas agrícolas y de producción intensiva de hortalizas durante todo el año. Es accesible por medio de una carretera de terracería, que es transitable todo el año. Sus características ecológicas corresponden a un bosque seco subtropical con una precipitación media anual de 667 mm y una temperatura promedio de 32°C. Existe una incidencia de la enfermedad del enrollamiento de la hoja del tomate del 100% con presencia de 5 geminivirus diferentes (Mejía 2002; Teni 1998).

3.2 CULTIVARES, HÍBRIDOS, LÍNEAS Y VARIEDADES ESTUDIADOS

Los materiales estudiados para el genotipo REX-1 están siendo evaluados actualmente en la URS para la resistencia a geminivirus y por sus características agronómicas favorables. Todas provienen de donaciones hechas por los programa de H. Laterrot del INRA, Francia; H. Czosnek y F. Vidavsky de la Universidad hebrea de Jerusalén, Israel (HUJI), del Centro Volcani de Israel, del Instituto de Investigaciones Horticolas Liliana Dimitrova de Cuba y de las Universidades de la Florida y Wisconsin en Madison de Estados Unidos (ver sección 1.3.3). Algunas líneas o híbridos han sido producidos en la URS con origen en los

materiales donados (Tabla 3.1). Para el presente estudio se utilizaron los materiales que se describen en los siguientes párrafos (Mejía 2002).

3.2.1 CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO USADOS CON EL MARCADOR PCR REX-1

Marina

El control positivo es un híbrido comercial de la empresa Sakata Seed America Inc., considerada por los productores locales como uno de los mejores cultivares disponibles actualmente en el mercado, pues es ampliamente adaptable y tiene una buena uniformidad. Las resistencias/tolerancias con las que cuenta incluyen T= Tomato mosaic virus, una a más cepas; F= marchitamiento por *Fusarium*, razas 1 (F1) y 2 (F2); V= marchitamiento por *Verticillium*, raza 1; N= nematodos formadores de nudos radiculares; C= *Cladosporium* leaf mold, algunas razas; A= *Alternaria* ítem canker; S= *Stemphylium* y Sk= Bacterial speck, raza 0 (<http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wehner/vegcult/tomatojr.html>).

Tomatillo

Conocido también como tomate-cereza silvestre, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* es el antecesor más directo del tomate cultivado. Crece espontáneo en toda América tropical y subtropical y se ha extendido a lo largo de los trópicos del Viejo Mundo (Rick 1978). Se utilizó como el control negativo en el presente estudio.

3.2.2 CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO PARA LA SECUENCIACIÓN DE ADN

Better Boy

Se utilizó este híbrido como control positivo de resistencia a nematodos en la secuenciación del fragmento de 750 pb correspondientes al marcador REX-1. Las plantas del híbrido de tomate Better Boy son de crecimiento indeterminado y producen frutos largos en todas las estaciones. Presenta tolerancia a la marchitez por *Fusarium*, *Verticillium* y nematodos (<http://www.yankeegardener.com/seeds/hartseed11.html>).

HC-7880

Cultivar cubano, de crecimiento determinado, fruto firme, tipo de procesamiento, con resistencia a *Verticillium*, *Fusarium* y *Stemphyllium*. Además es altamente tolerante a la temperatura, con un fruto firme y con altas cosechas. Se utilizó como control negativo para *Mi* en las muestras utilizadas en secuenciación de ADN (Mejía 2002 ; Maxwell 2003).

3.2.3 EL HÍBRIDO H44, SUS PARENTALES Y LÍNEAS RELACIONADAS**H44**

El híbrido H44 constituye la F₁ del cruce de los siguientes parentales: Línea comercial Marina de la compañía Sakata X el híbrido H5 (Mejía 2002).

H5

El híbrido **H5** es un cruce entre las líneas GP10 (P2-1132) y GF1 (F6522) desarrolladas en la URS. (Mejía 2002).

GP10

Esta línea fue obtenida a partir de la población segregante Pimper J13-1A obtenida del INRA. Su resistencia a geminivirus deriva de las especies silvestres de *L. pimpinellifolium* y *L. peruvianum* (Mejía 2002; Maxwell 2003^{*}).

FAVI 9

Es un híbrido obtenido de la Universidad Hebrea de Jerusalén, producido por el cruzamiento de la línea 902, que presenta resistencia a geminivirus deriva de la especie silvestre *L. hirsutum*, con una línea susceptible (Vidavski y Czosnek, 1998).

GF1, GF3 y GF13

Son líneas seleccionadas dentro del programa de mejoramiento de tomate que tienen su origen en el híbrido FAVI 9. La línea GF1 proviene de la línea F9-3, mientras que GF3 y GF13 de la línea F9-1 (Mejía 2002).

* Comunicación personal con el PhD. Douglas Maxwell del departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin en Madison (10/2003). Se discutió la importancia agronómica de algunos materiales incluidos en el presente estudio.

3.2.4 CULTIVARES, HÍBRIDOS, LÍNEAS Y VARIEDADES COMERCIALES DE DIFERENTES PROCEDENCIAS

3.2.4.1 Materiales de la Universidad Hebrea de Jerusalén (HUJI) y el Centro Volcani de Israel

2305-1

Es una selección de una población F2 obtenida de HUJI, que se incorporó al programa de mejoramiento de tomate desde el año 2002 (Mejía 2002).

Sun Coast

Es un cultivar originario de Carolina del Norte, enviado desde HUJI, de fruto grande y resistente a *Verticillium*, *Fusarium* razas 1 y 2, pero susceptible a geminivirus. Además se considera importante dentro del programa de mejoramiento debido a que su fruto es redondo para ensalada (Mejía 2002; Maxwell 2003).

Rodade

Es un cultivar originario de Africa del Sur enviado desde HUJI, es de tipo determinado y resistente a la marchitez bacteriana, *Verticillium*, *Fusarium* razas 1 y 2, pero susceptible a geminivirus. (Mejía 2002).

Very Firm

Este cultivar de Israel enviado por HUJI, tiene larga vida en anaquel con un fruto muy firme, es de tipo determinado, resistencias a *Verticillium*, *Fusarium* raza 1 y susceptible a geminivirus. (Mejía 2002).

M-82

Es un cultivar desarrollado también en Israel, con un tipo para procesamiento, muy firme y de alta producción. Tiene resistencias a *Verticillium* y *Fusarium* raza 1 pero es susceptible a geminivirus. (Mejía 2002; Maxwell 2003).

TY-197 y TY-198

Estos genotipos son líneas de mejoramiento con resistencia a geminivirus derivada de la especie silvestre *L. peruvianum*. Se utilizaron las semillas originales de 1998 enviadas desde el Centro Volcani de Israel. (Mejía 2001).

3.2.4.2 Materiales de la Universidad de Florida y Universidad de Wisconsin en Madison, EUA

Líneas Fla

Cuatro líneas de la Universidad de Florida que derivan su resistencia a geminivirus de la especie silvestre *L. chilense* (Fla 024623-y3, Fla 024524-5, Fla 024652-Y1 y Fla 024525-9) (Mejía 2002).

GS9 y GS16

Líneas seleccionadas dentro del programa de mejoramiento de tomate por su resistencia a geminivirus. La línea GS16 es la de más alto rendimiento y proviene de la línea Fla 658. La línea GS9 se originó de la línea Fla 595. Presentan resistencia a geminivirus derivada de *L. chilense*. (Mejía 2002).

Money Maker

Líneas con y sin resistencia a nemátodos obtenidas del Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin en Madison. Es el origen de todas las variedades de frutos pequeños. De crecimiento indeterminado y tardío. Los frutos son de tamaño pequeño con peso medio de 70 g. La forma es redonda, de color uniforme rojo vivo y sin dorso verde. Es bilocular de tipo liso y con cuello verde. Es resistente a *Cladosporium* (Rodríguez 2001, Mejía 2002).

3.2.4.6 Materiales del Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, Cuba

Lignon

Es un cultivar de origen cubano con resistencia a altas temperaturas así como a *Verticillium*, *Fusarium* y *Stemphyllium*. De acuerdo con Maxwell (2003) presenta una resistencia leve a geminivirus.

Tabla 3.1 Resumen de los materiales utilizados en el estudio y su procedencia

Cultivar, híbrido, línea y variedad	Procedencia
Híbrido Marina	Comercial
Tomatillo, <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Crecimiento silvestre
Híbrido Better Boy	Comercial
Cultivar HC-7880	Inst. de Invest. Hortícolas Liliana Dimitrova, Cuba
Híbrido H44	URS*
Híbrido H5	URS
Línea GP10	Pimper J13 de INRA desarrollada en la URS
Híbrido FAVI 9	HUJI línea 902
Líneas GF1, GF3 y GF13	FAVI 9 desarrolladas en la URS
Híbrido 2305-1	HUJI
Cultivar Sun Coast	Carolina del Norte/HUJI
Cultivar Rodade	Sudáfrica/HUJI
Cultivar Very Firm	HUJI
Cultivar M-82	HUJI
Líneas Ty-197 y Ty-198	Centro Volcani
Línea Fla 024623-y3	Universidad de Florida
Línea Fla 024524-5	Universidad de Florida
Fla 024652-Y1	Universidad de Florida
Fla 024525-9	Universidad de Florida
Línea GS9	Línea Fla 595 desarrollada en la URS
Línea GS16	Línea Fla 658 desarrollada en la URS
Variedad Money Maker	Universidad de Wisconsin en Madison
Cultivar Lignon	Inst. de Invest. Hortícolas Liliana Dimitrova, Cuba

*URS: Unidad de Riego Sansirisay

3.3 TOMA DE MUESTRAS

La primera toma de muestras se realizó en la URS en la segunda semana de marzo de 2003.

Se colectó material foliar de las plantas del híbrido H44 de la siguiente manera:

1. Se identificaron las plantas sanas, con brotes jóvenes y se marcaron con tiras de plástico numeradas con tinta indeleble atadas a la base del tallo principal, dando un total de 60 plantas.
2. De cada planta se tomaron de 10 a 15 hojas jóvenes con la ayuda de una tijera. Se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético previamente identificadas y se conservaron sobre hielo hasta su traslado a Guatemala donde se colocaron en una refrigeradora a 4° C (Figura 3.1).
3. Se almacenó el tejido fresco por 2 días a 4° C previo a realizar la extracción del ADN. El tejido no utilizado para extracción fue congelado colocándolo en tubos Eppendorf debidamente etiquetados a una temperatura de -20° C.



Figura 3.1 Colecta de muestras del híbrido H44 en la URS (Fotografía de L. Mejía)

4. En la época de fructificación se colectaron de 3 a 5 frutos maduros de cada una de las 60 plantas y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía en donde se extrajeron las semillas a cada fruto. Se lavaron y secaron a temperatura ambiente en platos plásticos previamente identificados.
5. Las semillas secas de cada planta fueron colocadas en sobres de papel manila etiquetados.

Para la segunda toma de muestras se utilizaron en promedio 10 semillas de cada una de las restantes variedades, líneas, híbridos y cultivares. Asimismo, se usaron alrededor de 30 semillas (F2) colectadas de los frutos de la planta identificada como la No. 29 del híbrido H44. La germinación se realizó dentro del laboratorio de Biotecnología, utilizando el siguiente procedimiento:

1. Se colocó sustrato de turba (peat moss) en 2 bolsas plásticas que fueron luego sometidas a esterilización en autoclave.
2. El sustrato fue esparcido en 2 bandejas de duroport especiales para semilleros que habían sido también sometidas a desinfección con cloro al 10%.
3. Se procedió a colocar una semilla por orificio a medio centímetro de la superficie aproximadamente. Se realizó riego constante a las plantas.
4. Cuando las plantas presentaron el tercer par de hojas se procedió a la toma de muestras. Ya que germinaron en promedio 7 plantas por material, la muestra consistió en cortar aproximadamente una hoja joven de cada planta del mismo material para obtener una muestra representativa de la población (análisis por conglomerados), mientras que para los híbridos las muestras se tomaron por individuo. En las líneas F9, Ty-197 y Ty-198 solo germinaron 1, 2 y 2 semillas respectivamente.
5. Se almacenó el tejido fresco por 1 día en una refrigeradora a 4° C en bolsas de plástico con cierre hermético previamente identificadas, previo a realizar la extracción del ADN.

3.4 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN DE TEJIDO VEGETAL

El procedimiento utilizado fue el indicado para el kit Puregene™ de Gentra, catálogo números D-5500a, D-5000a, D-50KA, D40KA.

3.4.1 Purificación de ADN

3.4.1.1 Manipulación y Lisis Celular

1. Para cada planta se tomaron aproximadamente 20 mg de tejido fresco que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Cada tubo fue sumergido dentro de nitrógeno

líquido con la ayuda de una pinza e inmediatamente se maceró el tejido congelado con ayuda de un pistilo de plástico previamente esterilizado en autoclave.

2. Se agregaron 300 μ l de solución de lisis celular al tejido. Para homogenizar se maceró suavemente con un pistilo.
3. Se incubó el lisado celular a 65° C por 60 minutos. Después de 30 y 60 minutos se mezcló la solución por inversión (20 veces).

3.4.2 Tratamiento con ARNasa

4. Se agregaron 1.5 μ l de solución de ARNasa al lisado celular.
5. Se mezcló la muestra invirtiendo el tubo 25 veces e incubando a 37° C por 30 minutos.

3.4.3 Precipitación de proteína

6. Se enfrió la muestra a temperatura ambiente.
7. Se agregaron 100 μ l de solución para precipitación de proteínas al lisado celular.
8. Se mezcló uniformemente la solución al invertir la gradilla conteniendo los tubos con las muestras 150 veces (2 minutos aproximadamente).
9. Se centrifugó a 14,000 rpm por 4 minutos.

3.4.4 Precipitación de ADN

10. Se vertió el sobrenadante conteniendo el ADN en un tubo limpio de 1.5 ml al que se agregaron previamente 300 μ l de isopropanol al 100%. El precipitado fue descartado.
11. Se mezcló la muestra al invertir el tubo 50 veces.
12. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto.
13. Se descartó el sobrenadante y se colocó brevemente el tubo abierto sobre papel absorbente. Se agregaron 300 μ l de etanol al 70% y se mezcló con la pastilla de ADN varias veces por inversión.
14. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Cuidadosamente se eliminó el etanol.
15. El tubo abierto fue colocado sobre papel absorbente para eliminar los restos de etanol por un periodo de 15 minutos.

3.4.5 Hidratación del ADN

16. Se agregaron 50 μ l de solución de hidratación de ADN al tubo conteniendo la pastilla.

17. El ADN se rehidrató utilizando 50 μ l al tubo y dejándolo reposar por 24 horas a temperatura ambiente.
18. El ADN se almacenó a 4° C para su posterior uso en PCR.

3.4.6 Limpieza del ADN

La limpieza de las muestras que presentaron alta concentración de proteínas se hizo con un protocolo proporcionado por Furusawa (2003) de la siguiente manera:

19. Con una micropipeta se tomó una muestra de 40 μ l de ADN y se vertió en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
20. Se agregó luego 160 μ l de agua estéril y 200 μ l de una solución comercial de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Merck) y se mezcló por inversión.
21. Se centrifugó por 5 minutos a 12,000 RPM.
22. Con una micropipeta se tomó la fase superior (acuosa) de la solución y se colocó en un tubo limpio de las mismas características, descartando la otra fase.
23. A este tubo se agregaron 600 μ l de etanol absoluto y se centrifugó por 10 minutos a 12,000 RPM.
24. Se descartó el alcohol usando una micropipeta y se agregaron 1000 μ l de etanol al 70% para luego centrifugar por 5 minutos a 12,000 RPM.
25. Se eliminó el etanol y se secó la pastilla a temperatura ambiente.
26. Se rehidrató el ADN agregando 50 μ l de solución de hidratación de ADN del kit Pure Gene.

3.5 PROCEDIMIENTO PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR PCR REX-1 CON LOS KITS PROMEGA Y PCR BEADS AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

La amplificación por PCR (anexo 1 p.83) del marcador REX-1 se realizó en un termociclador marca Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research utilizando los primers o cebadores REX-F1 (5'- TCG GAG CCT TGG TCT GAA TT – 3') y REX-R3 (5'- ATG CCA GAG ATG ATT CGT GA-3') producidos por la empresa Integrated DNA Technologies, Inc.

Se evaluó el mejor método de amplificación del fragmento REX-1 comparando la efectividad de los dos kits, el manufacturado por Promega y los PCR Beads de Amersham Pharmacia Biotech. El de Promega fue ajustado a las condiciones del procedimiento de Williamson *et al.* (1994).

3.5.1 Procedimiento de amplificación con el kit Promega

Para el kit Promega se ajustaron la concentraciones de los reactivos de acuerdo con las condiciones de amplificación sugeridas por Williamson et al (1994) (tabla 3.2). Cada reacción se realizó en un tubo para PCR con capacidad de 0.5 ml colocando la muestra de ADN primero, seguida de los demás reactivos. La Taq polimerasa siempre se agregó de último. Las reacciones se hicieron sobre hielo e inmediatamente fueron colocados los tubos en el termociclador previamente ajustado a la temperatura de inicio.

Tabla 3.2 Condiciones de reacción para PCR para el marcador REX-1 utilizando el kit Promega

Reactivos	1 individuo
1. Agua estéril	9.4 μ l
2. Buffer 10X	2.5 μ l
3. MgCl 50mM-	1.5 μ l
4. dNTP 2.5 mM-	1.5 μ l
5. REX F1 2.0 μ M-	2.5 μ l
6. REX R3 2.0 μ M-	2.5 μ l
7. Taq polimerasa 5 u/ μ l	0.1 μ l
ADN (20 ng. μ l)	5.0 μ l
Volumen de reacción final:	25 μ l

Dada la dificultad para amplificar el ADN con este kit se hizo una prueba de estandarización evaluando 8 diferentes condiciones de amplificación del fragmento REX-1 (tabla 3.3).

Tabla 3.3 Condiciones de amplificación evaluadas con el kit Promega

<i>No.</i>	<i>Condición de amplificación</i>
1	Misma del procedimiento de Williamson et al.
2	Primers 2X
3	Magnesio 2X
4	Magnesio 2x Primers 2x
5	ADN 1/10 conc.
6	ADN 1/10 conc. Primers 2x
7	Enzima Taq Polimerasa 2x
8	ADN ½ conc.

La prueba de estandarización se realizó bajo el siguiente procedimiento:

1. Se escogió el ADN de la planta 29 del híbrido H44 para realizar la amplificación del fragmento REX-1 puesto que en amplificaciones preliminares con PCR Beads presentó bandas bien definidas en el gel de agarosa.
2. Se tomó una alícuota de 5 μ l de la muestra de ADN y se trasladó a un tubo eppendorf que fue colocado en una bandeja con hielo.
3. Se midió la concentración de la muestra (1.069 μ g/ml) en un espectrómetro Spectronic Genesys 2 y se ajustó la concentración a 20 ng/ μ l
4. Ajustada la concentración se tomó otro tubo eppendorf y se hizo una dilución a ½ y a 1/10.
5. Se prepararon 8 tubos de PCR (0.5ml), se rotularon y se colocaron sobre hielo.
6. En 5 tubos se colocó la muestra de ADN (5 μ l) a una concentración de 20 ng/ μ l, en dos se puso la muestra a 1/10 de la concentración y en la última a ½ de la concentración.
7. Después se agregó el resto de reactivos de acuerdo con las condiciones de la tabla 3.2, finalizando con la Taq polimerasa.
8. Se usó la programación del termociclador del procedimiento de Williamson *et al.* (1994)(tabla 3.4)
9. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% para verificar la amplificación de las muestras.

Una segunda prueba de amplificación con este kit se llevó a cabo con el ADN de 39 plantas del segundo grupo de muestras correspondiente a cultivares, híbridos, líneas y variedades de diferentes procedencias. Se usó la condición original del procedimiento de Williamson *et al.* (1994) para la prueba. Debido a que hubo problemas en la amplificación se midió la concentración de ADN e impurezas en las muestras que fueron limpiadas con el método del fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (sección 3.4.6).

Finalmente se hizo una tercera prueba de amplificación se llevó a cabo con las mismas 39 muestras después de la limpieza, evaluando las siguientes condiciones de amplificación:

1. Condiciones del procedimiento de Williamson *et al.* (1994)
2. Condición original del procedimiento de Williamson *et al.* (1994) variando la temperatura de alineamiento de 55° C a 52° C.
3. Aumento del cloruro de magnesio al doble y temperatura de alineamiento normal
4. Aumento de la Taq polimerasa a doble concentración
5. Aumento de la Taq polimerasa a doble concentración y la temperatura de alineamiento a 50° C
6. Las muestras amplificadas en cualquiera de las condiciones anteriores se usaron para realizar un PCR anidado[†]

3.5.2 Procedimiento de amplificación con PCR Beads

Para el kit de los PCR Beads de la empresa Amersham Pharmacia Biotech las condiciones se manejaron de acuerdo a las sugerencias del fabricante (tabla 3.4). Un PCR bead consiste en un tubo de reacción para PCR con capacidad para 0.5 ml que contiene en su interior una esfera seca y compacta de unos 3 mm de diámetro constituida por los reactivos necesarios para realizar una reacción. La muestra de ADN se agregó primero, seguida del agua estéril y finalmente los primers o cebadores. Las reacciones se realizaron sobre hielo y al finalizar la preparación fueron colocados los tubos en el termociclador previamente precalentado. Se evaluó su efectividad en la amplificación de las 60 muestras del primer grupo

[†] Para el PCR anidado se tomó 5 µl del producto de PCR y se realizó nuevamente la amplificación utilizando la condición original del protocolo.

correspondiente al híbrido H44 y luego con las 39 muestras del segundo grupo que necesitaron de limpieza con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para amplificar.

Tabla 3.4 Condiciones para la reacción de PCR usando Amersham PCR Beads

<i>Reactivos</i>	<i>1 individuo</i>
Agua estéril	15 μ l
Primer REX F1	2.5 μ l
Primer REX R3	2.5 μ l
ADN	5.0 μ l
Volumen de reacción final	25 μ l

3.5.3 Programación del termociclador

La programación del termociclador utilizada fue la del procedimiento de Williamson *et al.* (1994) (tabla 3.5). Se diseñó un programa en el termociclador con la información de las temperaturas y ciclos requeridos para la amplificación de las muestras y en algunos casos específicos se hicieron variaciones temporales en la temperatura de alineamiento.

Tabla 3.5 Programación del termociclador

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Duración</i>
1	93° C	3 min
30	94° C	1 min
	55° C	2 min
	72° C	2 min
1	72° C	10 min
1	10° C	24 h

3.6 PROCEDIMIENTO PARA EL CORTE DEL FRAGMENTO REX-1 CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN TAQ I.

La enzima Taq I utilizada en el estudio fue manufacturada por la empresa Promega y esta reconoce una secuencia particular de 4 bases nitrogenadas (tetranucleótido) siendo esta T↓CGA. Se utilizó el mismo volumen del producto de PCR y de concentración de la enzima sugeridos por el procedimiento de Williamson *et al.* (1994), mientras que los demás reactivos se utilizaron en las concentraciones sugeridas por Promega (tabla 3.6). La digestión se llevó a cabo por incubación en el termociclador por 3 horas a 65° C.

Tabla 3.6 Condiciones para la digestión por la enzima Taq I (endonucleasa) del marcador REX-1.

<i>Reactivos</i>	<i>1 individuo</i>
1. Agua estéril	7 µl
2. buffer de la enzima Multicore 10X	2.5 µl
3. BSA (Bovine serum albuminum)	0.25 µl
3. Enzima 5 u: Taq I	0.25 µl
4. Producto de PCR	15 µl
Volumen de reacción final:	25 µl

3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8 %, mientras que los productos del corte con la enzima de restricción en un gel de agarosa al 1.5%. La lectura y análisis de las bandas se realizó con el uso de una cámara de luz ultravioleta marca UVP ultraviolet product y para cada gel obtenido después del corte con la enzima de restricción se tomaron fotografías con una cámara Kodak.

La detección de bandas correspondientes al gen REX-1 sobre el gel de agarosa se realizó como lo describen Williamson *et al.* (1994):

Homocigotos susceptibles: 1 banda de 750 pb

Homocigotos resistentes: 2 bandas de 570 + 160 pb

Heterocigotos: 3 bandas de 740 + 570 + 160 pb.

3.8 SECUENCIACIÓN DE REX-1 EN LA PROGENIE DE UNA PLANTA HÍBRIDA H44.

3.8.1 Extracción de ADN y su amplificación.

Se extrajo el ADN de 22 de estas plantas progenie de la planta híbrida H44 No. 29, heterocigota para el marcador, tal como se describe en la sección 4.2 y se enviaron en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad en 50 μ l de la solución de rehidratación del kit Puregene al Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin en Madison. El estudio de la segregación del gen REX-1 fue realizado por el PhD Luis Mejía y el Ingeniero Agrónomo Amílcar Sánchez. En ese lugar se llevó a cabo la extracción de ADN del control positivo (híbrido Better Boy) y del control negativo (cultivar HC 7880) así como también la amplificación por PCR del fragmento de ADN de 750 pb correspondiente al marcador REX-1 utilizando las mismas condiciones del procedimiento de Williamson *et al.* (1994).

3.8.2 Secuenciación de ADN e interpretación de secuencias en el programa Chromas.

Después de la amplificación, los productos de PCR fueron sometidos al proceso de Cut & Kill que consistió en:

1. Preparar un tubo para PCR con 1 μ l de la enzima de restricción Exonucleasa I más 5 μ l del producto de PCR y 1 μ l de una fosfatasa alcalina de camarón para dar un volumen total de 7 μ l.

2. El tubo se colocó en el termociclador por 15 minutos a una temperatura de 37 ° C y a 85° C por otros 15 minutos.
3. Se adicionaron 6 µl de agua, 4 µl del buffer Big dye.
En cada reacción de secuenciación se usa 1 µl de primer y 2 µl de colorante para un total de 20 µl de solución de reacción.
4. Se limpiaron las muestras con beads magnéticos y luego fueron enviados al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin en Madison para su secuenciación por el método Dideoxi (anexo 2 p.86).

Los resultados de las 22 secuencias fueron enviados desde el Centro de Biotecnología en el programa Chromas 1.5. que puede obtenerse por internet y despliega los archivos de cromatogramas a partir de secuenciadores automatizados de “Applied Biosystems” y archivos en el formato Staden SCF. La interpretación de los cromatogramas se hizo con la secuencia del cebador forward de la siguiente manera:

1. Se abre el archivo del cromatograma de una secuencia dada.
2. Se activa el icono Find y se escribe en la pantalla la secuencia de corte de la enzima Taq I modificando el primer nucleótido, NCGA en lugar de TCGA.
3. Se presiona el botón de Find first y luego Find next para ubicar la secuencia de corte de Taq I que presenta el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del marcador PCR REX-1 en el marcaje del gen *Mi*. Una T corresponde al marcador del gen *Mi* y una G al marcador susceptible del gen. Debajo de la identidad del nucleótido aparece un pico que representa la concentración relativa del mismo. En la parte superior puede observarse además el número de nucleótidos de la secuencia.

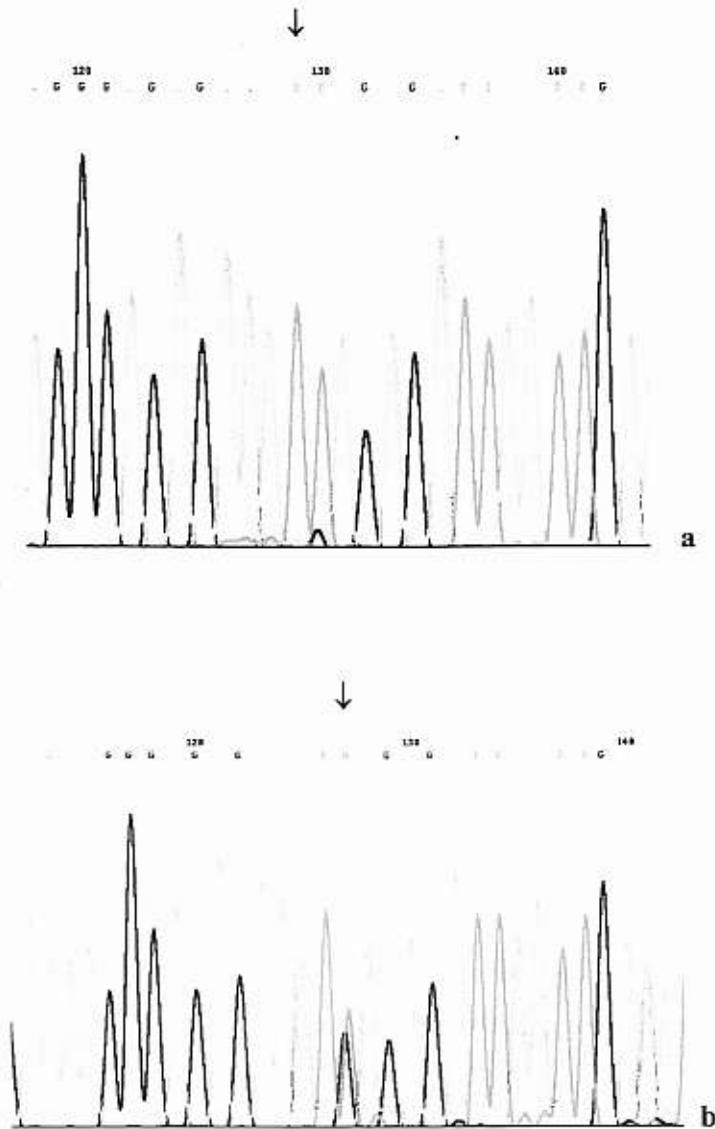


Figura 3.2 Ejemplo de un cromatograma de secuencias de ADN. Cada nucleótido está representado por un color; A se observa en color verde, T en color rojo, C en azul y G en negro. En a. un individuo homocigoto resistente; la flecha indica el sitio del polimorfismo para la enzima Taq-I. En b. un heterocigoto, el cual presenta una N y se observa una mezcla en los picos de los nucleótidos T/G; la flecha indica el sitio del polimorfismo para la enzima Taq-I.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN SOBRE LA IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR REX-1 EN EL ADN DE PLANTAS DE TOMATE POR PCR Y SECUENCIACIÓN DE ADN.

En este capítulo se presentan los resultados y discusión sobre los genotipos REX-1 de 99 materiales de tomate obtenidos por la técnica de PCR y los genotipos REX-1 obtenidos mediante la secuenciación de ADN de 22 plantas de tomate. Se incluye además la comparación de la efectividad de los procedimientos de PCR evaluados en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía y la factibilidad de implementación de esta técnica para asistir regularmente la selección de plantas resistentes a nematodos en el programa de mejoramiento genético de tomate en la Unidad de Riego Sansirisay.

4.1 COMPARACIÓN DE LOS KIT PROMEGA Y PCR BEADS DE AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH EN LA AMPLIFICACIÓN DE REX-1

Se comparó la efectividad de los kit Promega y PCR Beads en la amplificación del fragmento de 750 pb del marcador REX-1 en las muestras de ADN de dos grupos. El primero constituido por el ADN de 60 plantas del híbrido H44 y el segundo constituido por el ADN de 39 plantas entre cultivares, híbridos, líneas y variedades comerciales usados en el programa de mejoramiento de tomate de la URS (figura 4.1; figura 4.2)

Se llevaron a cabo amplificaciones preliminares con el ADN de 3 plantas del híbrido H44, además de los controles positivo (Marina) y negativo (Tomatillo) para comparar las dos técnicas. Las 5 muestras amplificaron con los PCR Beads mientras que con el uso del kit Promega amplificaron 2 muestras. Debido al éxito obtenido, se utilizó el kit de PCR Beads en la amplificación de las 57 muestras restantes del híbrido H44, de las cuales amplificaron 56. La muestra restante amplificó después de someterse a una limpieza con fenol-cloroformo-alcohol. No se utilizó el kit Promega en la amplificación de estas muestras.

Para determinar si cambiando las condiciones de amplificación se podría tener éxito con el kit Promega, se hizo una prueba de estandarización bajo 8 diferentes condiciones (tabla 3.5) utilizando el ADN de una planta del híbrido H44 que amplificó exitosamente con el kit de PCR beads. El aumento de los primers REX al doble fue la única condición que no permitió la amplificación, mientras que las demás presentaron la misma calidad de bandas en los geles de agarosa. Debido a que los resultados fueron semejantes en la mayoría de las condiciones probadas, se utilizó la condición del procedimiento original cubano para la amplificación de las 39 muestras del segundo grupo bajo estudio, pero solamente amplificaron 3 de ellas. La medición de la concentración de ADN en el espectrofotómetro permitió determinar que todas presentaban la concentración requerida (20 ng/μl) y que aproximadamente el 70% de las muestras presentaba una alta concentración de proteínas. Luego de realizar su limpieza con fenol-cloroformo-álcohol y después de evaluar varias condiciones de amplificación no se logró la amplificación masiva con el kit Promega, pues de cada 10 muestras amplificaban 2, que presentaron siempre bandas muy tenues en los geles de agarosa. Paralelamente se realizaron pruebas de amplificación con los PCR Beads en varias de estas muestras del segundo grupo antes de ser sometidas a limpieza y también presentaron problemas de amplificación.

La concentración de proteínas en las muestras se redujo después de la limpieza del ADN, lo cual fue suficiente para que se amplificara con el kit de PCR Beads pero no con el de kit de Promega. Es probable que el kit de Promega necesite ADN de más alta pureza para amplificar o que otras impurezas presentes afecten el procedimiento. Se descarta el hecho de que algún reactivo se encontrara en mal estado pues recientemente el kit Promega se ha utilizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal en un estudio relacionado con *Ralstonia solanacearum* y se han obtenido buenos resultados. Además, el procedimiento de extracción de ADN utilizado en esas 39 muestras fue el mismo que para la población del híbrido H44, por lo que no se considera posible que la alta concentración de impurezas se deba al procedimiento. Los factores que diferencian este segundo grupo del anterior son la edad de las plantas en el momento de la toma de muestras y el ambiente de crecimiento.

Estas últimas crecieron dentro del laboratorio con poca luz solar y tenían aproximadamente 25 días después de la germinación cuando se hizo la toma de muestras a diferencia de las del primer grupo de extracción que eran plantas adultas a finales de la floración y crecían en el suelo en campo abierto.

4.2 EFECTIVIDAD DEL CORTE CON LA ENZIMA TAQ-I DE PROMEGA

La efectividad de la condición de corte se evaluó en duplicado con 56 productos de ADN del híbrido H44 amplificados previamente con el kit de PCR Beads, obteniéndose los mismos resultados en ambos. Se observaron con claridad las bandas de 750, 570 y 160 pb en los geles de agarosa y por tanto se pudo analizar la identidad de los alelos para REX-1 en cada planta. El resto de productos de PCR amplificados con este mismo kit presentaron resultados fácilmente analizables después del corte con la enzima, mientras que las muestras amplificadas con el kit Promega presentaron bandas poco observables en todos los casos.

4.3 GENOTIPO REX-1 DE LOS CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

Las plantas híbridas Marina y Better Boy están registradas comercialmente como portadoras del gen *Mi*. Las primeras se usaron como control positivo con el método de PCR mientras que las segundas fueron el control positivo para la secuenciación de ADN. Para Marina se evaluó el ADN de 5 diferentes plantas, resultando todos los individuos heterocigotos para REX-1 (tabla 4.1; figura 4.1; figura 4.2). El híbrido Better Boy también es heterocigoto para este marcador de acuerdo con los resultados de la secuenciación (tabla 4.1; anexo 3 p 87) El tomatillo (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) fue el control negativo para las muestras evaluadas por el método de PCR mientras que el cultivar cubano HC 7880 fue el control negativo usado en la secuenciación de ADN. Ambos resultaron susceptibles para el marcador como se esperaba (tabla 4.1; figura 4.1; figura 4.2, anexo 3 p87).

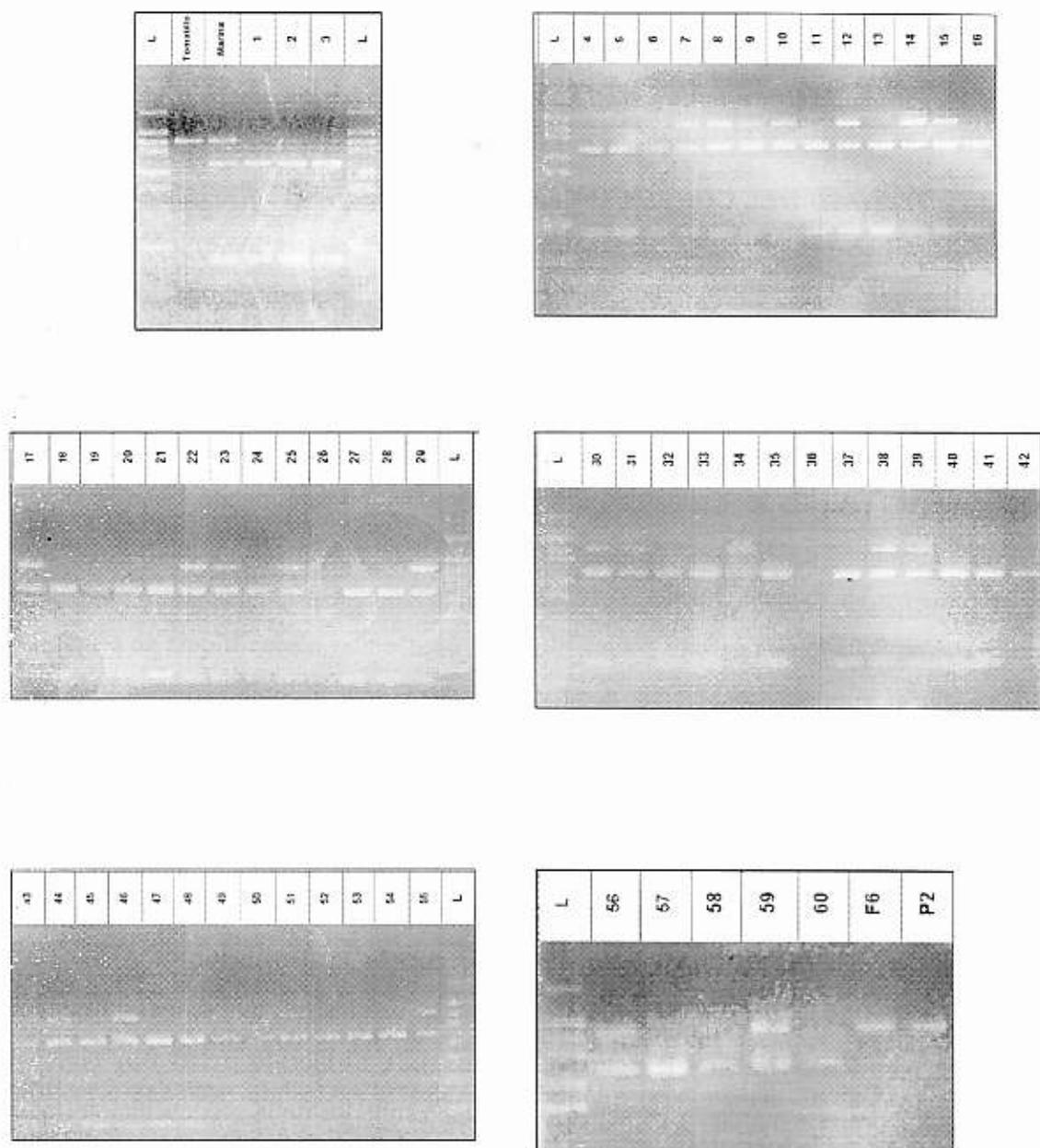


Figura 4.1 Fotografías de los geles de agarosa después de la amplificación del marcador PCR REX-1 y su corte con la enzima de restricción *Taq I* en 59 plantas híbridas H44. Los individuos heterocigotos despliegan tres bandas de 750, 570 y 160 pb mientras que los homocigotos resistentes despliegan las bandas de 570 y 160 pb. No se encontraron individuos susceptibles en esta población. El control positivo es el híbrido comercial Marina y el control negativo la especie silvestre *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* (Tomatillo). El marcador molecular está representado por una L.

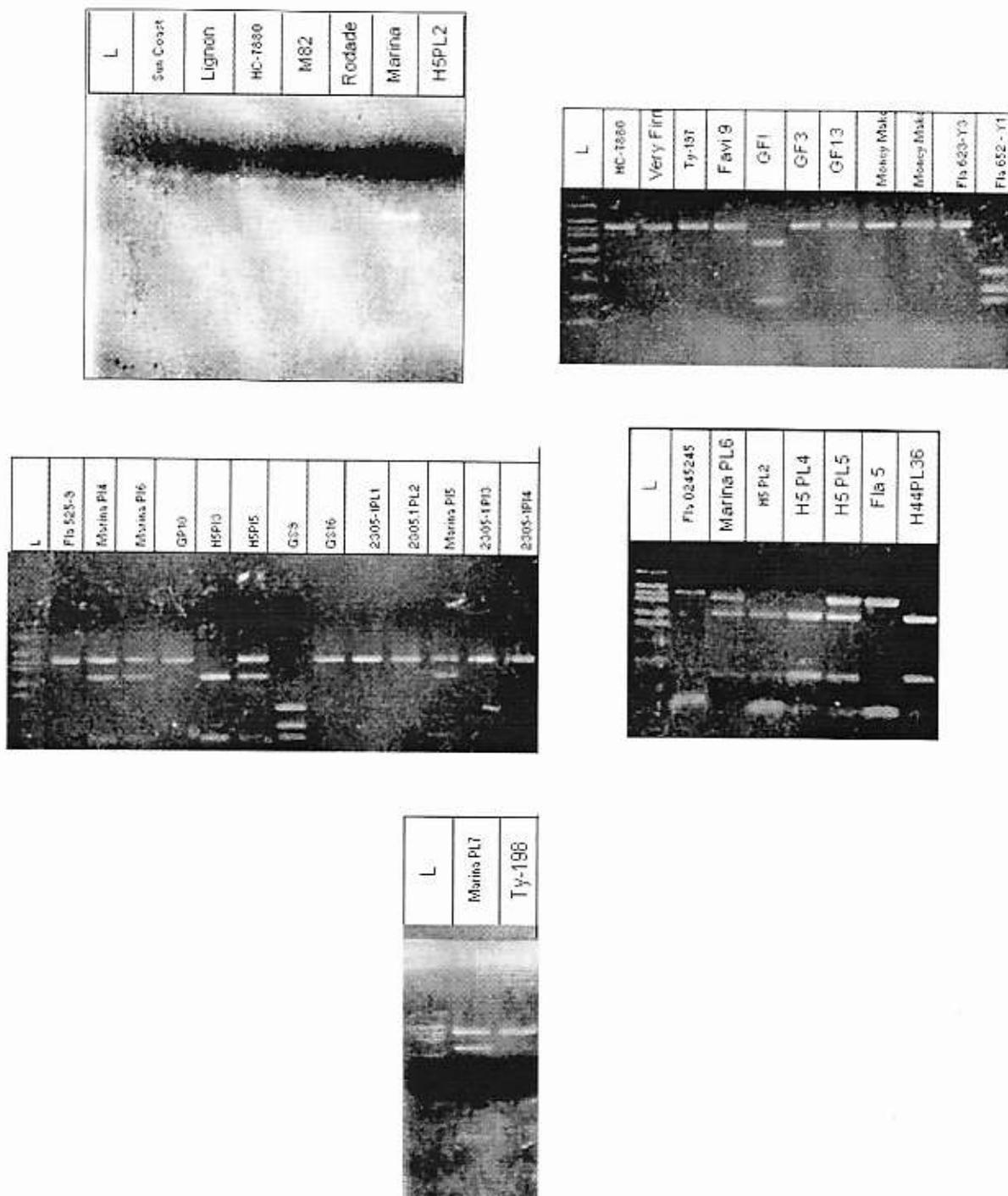


Figura 4.2 Fotografías de los geles de agarosa después de la amplificación del marcador PCR REX-1 y su corte con la enzima de restricción Taq I en 39 plantas de cultivares, híbridos, líneas y variedades de diferente procedencia. Los individuos heterocigotos despliegan tres bandas de 750, 570 y 160 pb, los homocigotos resistentes despliegan las bandas de 570 y 160 pb y los susceptibles no tienen sitio de corte. El control positivo es el híbrido comercial Marina y el control negativo la especie silvestre *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* (Tomatillo). El marcador molecular está representado por una L.

Tabla 4.1 Genotipo para el marcador *REX-1* de los controles positivos y negativos

<i>Híbrido, Cultivar, especie</i>	<i>Genotipo para REX-1</i>
Marina	Heterocigoto (<i>REX-1/REX-1+</i>)
Better Boy*	Heterocigoto (<i>REX-1/REX-1+</i>)
Tomatillo	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)
HC 7880**	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)

*Datos de secuenciación de ADN

**Datos de secuenciación de ADN y PCR

4.4 GENOTIPO *REX-1* DE LA POBLACIÓN HÍBRIDA H44 Y SUS PARENTALES, USANDO LA TÉCNICA DE PCR Y SECUENCIACIÓN DE ADN

En la figura 4.3 se observa el árbol genealógico del híbrido H44. La población H44 proviene del cruce entre el híbrido H5 (GF1 X GP10) y el híbrido comercial Marina (resistente a nematodos). Marina presentó un genotipo heterocigoto (*REX-1/REX-1+*) para *REX-1* (sección 4.3), mientras que para el híbrido H5 se evaluaron 5 individuos, 4 de ellos con genotipo heterocigoto (*REX-1/REX-1+*) y 1 con genotipo homocigoto resistente (*REX-1/REX-1*). Esto quiere decir que el híbrido H5 no es una línea genética uniforme (tabla 4.2; figura 4.2). De acuerdo con los genotipos *REX-1* observados para H5 y Marina, los posibles genotipos a presentarse en la población H44 serían homocigotos resistentes, heterocigotos y homocigotos susceptibles en una proporción de 1:2:1 respectivamente o bien, individuos homocigotos resistentes y heterocigotos en una proporción de 1:1.

En relación al genotipo *REX-1* de los parentales del híbrido H5, la línea GP10 (P2-1132) fue susceptible, mientras que GF1 (F6 522) resultó homocigoto resistente para el marcador (figura 4.2; figura 4.3; tabla 4.2). Recientemente D. Maxwell* y V Williamson han encontrado, por análisis de secuencias de ADN (tabla 4.4), que los polimorfismos de un solo nucleótido SNPs para la línea GF1 concuerdan con los polimorfismos encontrados para la línea Motelle que es portadora de la introgresión de *L. peruvianum* conteniendo al gen *Mi*. Motelle presenta un genotipo *Mi* homocigoto resistente (Williamson *et al.* 1994). De acuerdo con esta información, el genotipo *REX-1* para GF1 (*REX-1/R-1*) concordaría

* Comunicación personal con el Dr. Douglas Maxwell (08 /03/2004) en relación a los SNPs encontrados en varias líneas incluidas en el proyecto de investigación a su cargo.

su genotipo para *Mi* (*Mi/Mi*). No obstante, la línea GF1 proviene del híbrido FAVI 9 que presenta resistencia a geminivirus proveniente de *L. hirsutum*, pero no se reporta resistente a nematodos formadores de nudos radiculares*. De hecho el híbrido FAVI 9 y las líneas derivadas de él, GF3 y GF13 no presentaron el marcador REX-1 asociado a la resistencia (figura 4.2; figura 4.3; tabla 4.2).

D. Maxwell y V. Williamson^{††} (quien desarrolló el marcador REX-1) cuestionan la utilidad del marcador REX-1 como indicador de resistencia a nematodos en las líneas asociadas a FAVI. Ellos encontraron que el marcador de resistencia REX-1 estaba presente en la línea 902 que es susceptible a nematodos de acuerdo con los bioensayos realizados por F. Vidavsky. Esta línea fue usada como uno de los parentales en cruces como FAVI 9 y es resistente a geminivirus a partir de *L. hirsutum* (figura 4.3). Por esto, concluyen que el marcador REX-1 da falsos positivos en las líneas asociadas a FAVI 9 que incluyen las líneas GF de Guatemala, opinión que es apoyada por F. Vidavsky*.

Aparentemente el marcador resistente REX-1 está asociado al gen *Mi* susceptible en la línea GF1. Los posibles eventos genéticos que pudieron dar como resultado esta asociación incluyen la recombinación, que pudo ocurrir en las líneas de *L. esculentum* utilizadas en el cruce para obtener la línea 902 (figura 4.3). En este caso *L. esculentum* pudo haber tenido el fragmento REX-1 de algún ancestro *L. peruvianum*. También una mutación en el exón del gen *Mi* o una mutación en el promotor del gen *Mi* pudo generar la susceptibilidad a nematodos. Una tercera posibilidad es que los SNP's de *L. peruvianum* en la introgresión que incluye a REX-1 coincidan con los SNP's de *L. hirsutum* presentes en la línea 902.

* Comunicación personal con el Dr. Favi Vidavsky (27/02/2004) en relación a la resistencia a nematodos de las líneas derivadas de la línea 902.

††Comunicación personal (26/02/2004) con el PhD. Douglas Maxwell sobre la investigación que realiza con el marcador REX-1 en las líneas de FAVI.

* Comunicación personal (27/02/2004) con el PhD. Favi Vidavski sobre los bioensayos de resistencia a nematodos realizados por él en la línea 902 y los genotipos esperados para líneas derivadas de ésta.

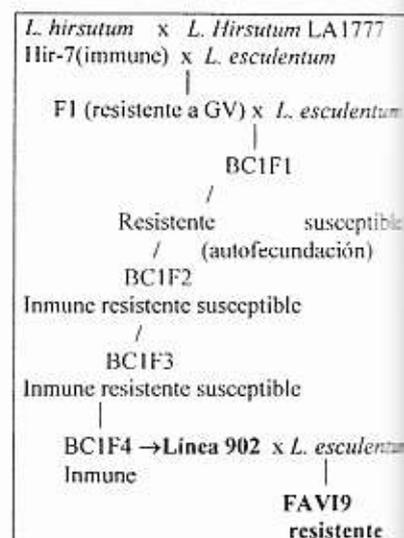
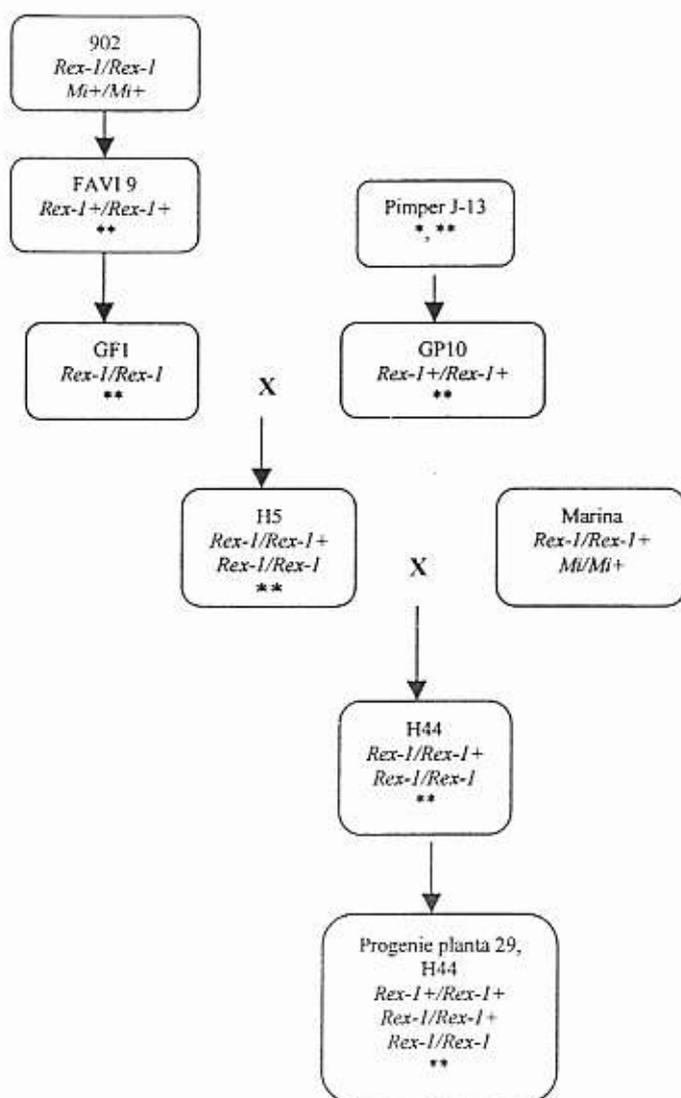


Figura 4.3 Árbol genealógico del híbrido H44 y de la línea 902. Todos los materiales han sido evaluados en la Unidad de Riego Sansirisay a excepción de la línea 902 (Recuadro tomado de Vidavsky y Czosnek, 2004).

* genotipo REX-1 desconocido

** genotipo Mi desconocido.

Tabla 4.2 Genotipo para el marcador REX-1 de los parentales del híbrido H44 y líneas relacionadas

<i>Parentales y líneas relacionadas</i>	<i>Genotipo para REX-1</i>
Marina	Heterocigoto (<i>REX-1/REX-1+</i>)
FAVI9	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)
GF1	Homocigoto (<i>REX-1/REX-1</i>)
GF3	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)
GF13	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)
GP10	Susceptible (<i>REX-1+/REX-1+</i>)
H5 (5 individuos)	4 homocigotos (<i>REX-1/REX-1</i>) 1 heterocigoto (<i>REX-1/REX-1+</i>)

En relación a las 60 plantas híbridas H44 estudiadas todas resultaron ser resistentes para el marcador REX-1. De ellas, 28 plantas son heterocigotos (*REX-1/REX-1+*) y 32 homocigotos resistentes (*REX-1/REX-1*) como se predeciría de acuerdo con el genotipo de los parentales si uno es heterocigoto y el otro homocigoto resistente para el marcador REX-1. El método estadístico de Ji-cuadrada no permitió determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:1 ($\chi^2 = 3.84$, $p=0.46$). Los individuos heterocigotos desplegaron como se esperaba las tres bandas mientras que los homocigotos desplegaron las bandas de 570 y 160 pares de bases (figura 4.1). La asociación observada entre los genotipos REX-1 y los genotipos *Mi* en las líneas que tiene como origen a FAVI9 permite inferir que en la población del híbrido H44 los individuos homocigotos para REX-1, en realidad son heterocigotos para el gen de resistencia *Mi*, y los heterocigotos para REX-1 son homocigotos para el gen susceptible *Mi+*.

En el estudio se incluyó la progenie de la planta No. 29 del híbrido H44, que presentó un genotipo heterocigoto para REX-1 por la técnica de PCR. Se utilizó la secuenciación del fragmento REX-1 para determinar el genotipo de 22 de estos individuos. En los cromatogramas de las secuencias correspondientes se encontraron SNPs que permitieron identificar 9 individuos heterocigotos para REX-1, 8 homocigotos resistentes y 5 susceptibles (anexo 4 p 88). El método estadístico de Ji-cuadrada no permitió determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:2:1 ($\chi^2 = 1.541$, $p=0.46$).

4.5 GENOTIPO REX-1 DE CULTIVARES, HÍBRIDOS, LÍNEAS Y VARIEDADES DE DIFERENTES PROCEDENCIAS.

Los materiales en esta sección fueron incluidos en el estudio debido a que presentan características agronómicas favorables como el rendimiento, resistencia a altas temperaturas o la forma del fruto que requiere el mercado local, mientras que otros presentan resistencia contra geminivirus de diferentes fuentes de especies silvestres. Todas fueron evaluadas con el marcador PCR REX-1. El híbrido 2305-1, los cultivares Sun Coast, Rodade, Very Firm, Lignon y M-82 así como las líneas Ty- 197 y Ty- 198 resultaron susceptibles para el marcador (tabla 4.3; figura 4.2). Para las dos últimas se ha encontrado que presentan resistencia a geminivirus a partir de *L. peruvianum*, pero son susceptibles a la infección por nematodos^{§§} confirmando los resultados del marcador. Se evaluaron además dos variedades, una registrada como resistente a nemátodos (Money Maker 5) y una registrada como susceptible (Money Maker 1). Ambas presentaron genotipo susceptible por lo que es probable que los datos de almacenamiento para Money Maker 5 estén equivocados (tabla 4.3; figura 4.2).

Las líneas obtenidas de la Universidad de Florida derivan su resistencia a geminivirus de la especie silvestre *L. chilense*. De ellas, Fla 024623-y3, Fla 024524-5, y Fla 024525-9 presentan un genotipo REX-1 susceptible al igual que la línea GS16 que fue seleccionada dentro del programa de mejoramiento de la URS por su resistencia promedio. En relación a las líneas Fla 024652-y1 y GS9 amplificaron ambas, 3 bandas de 320, 230 y 160 pb que no corresponden a los tamaños esperados para el fragmento REX-1 (*REX-1_A*), por lo cual no pudo determinarse su genotipo para el marcador (tabla 4.3; figura 4.2). El mismo patrón de bandas fue observado por D. Maxwell para las líneas GS9 y Ty-52 por lo que es posible que este patrón de bandas sea específico para introgresiones de la especie silvestre *L. chilense* en el tomate cultivado (Maxwell D, 2004).

^{§§} Comunicación personal con el Dr. Moshe Lapidot (Centro Volcani, Israel) hecha por el Dr. Douglas Maxwell sobre la susceptibilidad a nematodos de las líneas desarrolladas por ese centro.

Tabla 4.3 Genotipo para el marcador REX-1 de otros cultivares, híbridos, líneas y variedades

Híbridos, cultivares, Líneas y variedades	Genotipo Para REX-1	Institución donante
2305-1	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	HUJI, Israel
Sun Coast	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	HUJI, Israel
Rodade	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	HUJI, Israel
Very Firm	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	HUJI, Israel
M82	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	HUJI, Israel
Ty-197	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Volcani, Israel
Ty-198	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Volcani, Israel
Money Maker 1	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Wisconsin
Money Maker 5	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Wisconsin
Fla 024525-9	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Florida
Fla 024623 y3	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Florida
Fla 024652-y1	REX-1 _A *	Universidad de Florida
Fla 024524-5	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Florida
GS9	REX-1 _A *	Universidad de Florida
GS16	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Universidad de Florida
Lignon	Susceptible (REX-1+/REX-1+)	Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliانا Dimitrova, Cuba

*Alelo para el marcador REX-1 que despliega tres bandas de 320, 230 y 160 pb.

4.6 ANÁLISIS DEL ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL MARCADOR REX-1 EN CUATRO LÍNEAS DE TOMATE

Se usó el programa de Clustalw para alinear cuatro secuencias del marcador REX-1 correspondientes a las líneas de tomate cultivado Motelle, GF1, M-82 y TY52-R2 (Tabla 4.4). Dichas secuencias fueron proporcionadas por el Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin en Madison (Maxwell D, 2004). Al compararlas y analizarlas se encontró que efectivamente las secuencias para Motelle y GF1 son idénticas aún cuando se sabe que la primera es resistente a nematodos y la segunda es susceptible tal y como se discute en la sección 4.4. La línea Motelle porta una introgresión de *L. peruvianum* que incluye a REX-1, mientras que la línea GF1 porta una introgresión de *L. hirsutum* que le confiere resistencia a geminivirus y no existen registros en cuanto posibles introgresiones de *L. peruvianum* en ella.

La línea de *L. esculentum* M-82 no es resistente a geminivirus o nematodos y en el presente estudio esta línea resultó portadora del alelo susceptible del marcador REX-1 usando la técnica de PCR (figura 4.2, tabla 4.3). La secuencia alineada de M-82 difiere de Motelle y

GF1 en 10 nucleótidos y se considera posible que M-82 sea portadora de la región REX-1 de *L. esculentum*. Finalmente, la línea Ty52-R2 es resistente a geminivirus a partir de *L. chilense* y su secuencia difiere en 7 nucleótidos de Motelle y en 9 nucleótidos respecto de M-82. Esta línea fue evaluada para REX-1 por Maxwell (2003) utilizando la técnica de PCR y obtuvo los mismos tamaños de bandas (320, 230 y 160 pb) que en nuestro estudio se obtuvieron para la línea GS9 (sección 4.5) con la cual comparte el mismo origen y resistencia geminivirus a partir de *L. chilense*.

Las evidencias indican que la secuencia de nucleótidos de REX-1 en estas cuatro líneas de tomate cultivado difieren de acuerdo con el origen silvestre de su introgresión. Es decir que las plantas que portan introgresiones de *L. chilense* presentan secuencias idénticas entre ellas para REX-1, pero son diferentes (en pocos nucleótidos) de las que portan introgresiones de otra especie silvestre. En cuanto a Motelle y GF1 es posible que las secuencias de REX-1 para introgresiones de *L. hirsutum* y *L. peruvianum* sean idénticas o bien que GF1, aunque no existan registros sea portadora de introgresiones de *L. peruvianum* a partir de alguno de sus ancestros (sección 4.4).

4.7 UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR Y FACTIBILIDAD DE IMPLEMENTARLA COMO UNA PRUEBA RUTINARIA

Los resultados obtenidos con el marcador PCR REX-1 permitieron determinar el genotipo REX-1 en los materiales de tomate estudiados y utilizar al marcador como un indicador de la presencia del gen de resistencia a nematodos *Mi*, lo que comprueba la utilidad de la técnica en la asistencia de la mejora genética. Las excepciones incluyen las líneas emparentadas con el híbrido FAVI 9 que presentaron falsos positivos (resultados obtenidos por D. Maxwell y V. Williamson, sección 4.4) y dos líneas provenientes de la Universidad de Florida que amplificaron bandas diferentes de las esperadas para REX-1 y que se presume corresponden a una introgresión de *L. chilense* relacionada con la resistencia a geminivirus.

En relación a la factibilidad de implementar esta técnica de manera rutinaria, se puede indicar que el proceso de extracción de ADN para 60 muestras (con tres personas

realizándolo), tomó un promedio de 4 horas, al igual que el proceso de amplificación por PCR con el kit PCR Bead de Amersham Pharmacia Biotech. La puesta de muestras en un gel, la electroforesis y el análisis de resultados tomó un aproximado de dos horas, por lo que se necesitarían 10 horas para completar estos procedimientos. La preparación de la reacción de corte con la enzima Taq I, el proceso de incubación, la puesta de muestras en un gel, la electroforesis y el análisis de resultados tomó alrededor de 2 horas con 30 minutos. Por tanto, el proceso completo toma 12 horas con 30 minutos, siempre y cuando las muestras de ADN no presenten problemas de contaminantes. En el futuro inmediato sería importante lograr la estandarización con los reactivos del kit Promega con el fin de reducir los costos de cada reacción, puesto que cada reacción de PCR Beads tiene un costo aproximado de \$90.00 para 90 reacciones.

La opción alternativa al uso de los marcadores moleculares serían los bioensayos de resistencia a nematodos. Para poder realizar estos experimentos en Guatemala, sería necesario importar cepas puras de nematodos del género *Meloidogyne* de Estados Unidos o bien generarlas. Para la producción de una cepa pura, el Ingeniero Agrónomo Gustavo Alvarez^{***} indica que debe realizarse una expedición al interior del país en búsqueda de plantas de tomate infectadas de las cuales puedan aislarse los nematodos y realizar posteriormente la identificación taxonómica (para lo cual la compra de claves dicotómicas fuera del país sería necesaria). El desarrollo del pie de cría de los nematodos en plantas de tomate sería el próximo paso, para luego poder inocular las plantas de interés. De preferencia en un terreno donde se pueda controlar perfectamente los parámetros ambientales para evitar la contaminación de los suelos con el parásito. Todo el proceso tomaría aproximadamente de 60 a 80 días. El implementar estos experimentos implicaría la contratación de personal de campo en un periodo de tres meses aproximadamente, el arrendamiento de terreno, viáticos para viajes, así como la compra de material bibliográfico o bien de cepas de nematodos.

^{***} Comunicación personal con Gustavo Alvarez (03/2003) sobre la factibilidad de realizar bioensayos de resistencia a nematodos en la Facultad de Agronomía.

Si comparamos la inversión económica y de tiempo que requieren ambas técnicas, vemos que con los marcadores moleculares los resultados se obtienen en 12 ½ horas mientras que con los bioensayos deben invertirse de dos a tres meses de trabajo. En cuanto a los costos, los bioensayos requieren de una inversión mucho más alta, por lo que bien vale la pena apostar a los marcadores moleculares que han probado ser efectivos en la mayoría de los materiales evaluados en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Tabla 4.4. Alineamiento de las secuencias del marcador REX-1 obtenidas por el método dideoxi para las líneas Motelle, GF1, TY52-R2 y M82. Los sitios de corte aparecen en letras oscuras.

Motelle_	---TGGTCTGAATTTCCCGTCTTGCAAGCAAATTGACTAGCTTGACGTAAGGGATCTGCA
GF1REX_	-----CTGAATTTCCCGTCTTGCAAGCAAATTGACTAGCTTGACGTAAGGGATCTGCA
TY52-R2_	---TGGTCTGAATTTCCAGTCTTGCAAGCAAATTGACTAGCTTGACGTAAGGGATCTGCA
M82	CCTTGGTCTGAATTTCCAGTCTTGCAAGCAAAGTGACTAGCTTGACGTAAGGGATCTGCA
	*****.*****
Motelle_	CTTGATCGGTATCCTGTTGAGTTGCATAACCAGAAACCGTGGACTTTGCTTTGACTTTT
GF1REX_	CTTGATCGGTATCCTGTTGAGTTGCATAACCAGAAACCGTGGACTTTGCTTTGACTTTT
TY52-R2_	CTTACATCGGTATCCTGTTGAGTTGCATAACCAGAAACCGTGGACTTTGCTTTGACTTTT
M82	CTTACATCGGTATCCTGTTGAGTTGCATAACCAGAAACCATGGACTTTGCTTTGACTTTT
	.**.*****
Motelle_	TTACCTGATTCACGATGGACATCTTCTCCTCTAATTCAGCTTCAGATAATAGATCATAA
GF1REX_	TTACCTGATTCACGATGGACATCTTCTCCTCTAATTCAGCTTCAGATAATAGATCATAA
TY52-R2_	TTACCTGATTCACGATGGACATCTCTCCTCTAATTCAGCTTCAGATAATAGATCATAA
M82	TTACCTGATTCACGATGAACATCTTCTCCTCTAATTCAGCTTCAGATAATAGATCATAA
	*****.*****
Motelle_	CTCTTGCCATTGCAGGCATTATCCTTCTTAACCATACTGGATTTATTGGAGAACCCATCA
GF1REX_	CTCTTGCCATTGCAGGCATTATCCTTCTTAACCATACTGGATTTATTGGAGAACCCATCA
TY52-R2_	CTCTTGCCATTGCAGGCATTATCCTTCTTAACCATACTGGATTTATTGGAGAACCCATCA
M82	CTCTTGCCATTGCAGGCATTATCCTTCTTAACCATACTGGATTTATTGGAGAACACATCA
	*****.*****
Motelle_	TTTTACCATCAGAAGACCTCTTGGGACTAGAAGTGGGAAAGGCTGAAGAGGGAGCAACA
GF1REX_	TTTTACCATCAGAAGACCTCTTGGGACTAGAAGTGGGAAAGGCTGAAGAGGGAGCAACA
TY52-R2_	TTTTACCATCAGAAGACCTCTTGGGACTAGAAGTGGGTAAGGCTGAAGAGGGAGCAACA
M82	TTTTACCATCAGAAGACCTCTTGGGACTAGAAGTGGGTAAGGCTGAAGAGGGAGCAACA
	*****.*****
Motelle_	GAAGGTCGCGAATTGCATAGATCCTTTTGTGAAGAATCTGCAGCTTTAACACTCAACAAA
GF1REX_	GAAGGTCGCGAATTGCATAGATCCTTTTGTGAAGAATCTGCAGCTTTAACACTCAACAAA
TY52-R2_	GAAGGTCGCGAATTGCATCGATCCTTTTGTGAAGAATCTGCAGCTTTAACACTCAACAAA
M82	GAAGGTCGCGAATTGCATAGATCCTTTTGTGAAGAATCTGCAGCTTTAACACTCAACAAA
	*****.*****
Motelle_	GATAGAGTACTATCCAGATCTTGCCCAGCCTGCTGTTTCCTTTTTAACTTGACCTGTTCCA
GF1REX_	GATAGAGTACTATCCAGATCTTGCCCAGCCTGCTGTTTCCTTTTTAACTTGACCTGTTCCA
TY52-R2_	GATAGAGTACTATCCAGATCTTGCCCAGCCTGCTGTTTCCTTTTTAACTTGACCTGTTCCA
M82	GATAGAGTACTATCCAGATCTTGCCCAGCCTGCTGTTTCCTTTTTAACTTGACCTGTTCCA

Motelle_	GCACTACCTTTGCTTGCACTAGTGTCCCTCCGGTCAGACAAGGAGACCCCTTGCTACCTTT
GF1REX_	GCACTACCTTTGCTTGCACTAGTGTCCCTCCGGTCAGACAAGGAGACCCCTTGCTACCTTT
TY52-R2_	GCACTACCTTTGCTTGCACTAGTGTCCCTCCGGTCAGACAAGGAGACCCCTTGCTACCTTT
M82	GCACTACCTTTGCTTGCACTAGTGTCCCTCCGGTCAGACAAGGAGACCCCTTGCTACCTTT

Motelle_ TCCTTCCTGGAGATGTCATCACATATTTTTTCCATAGAATCTTGGGGATTACATGTCAAG
GF1REX_ TCCTTCCTGGAGATGTCATCACATATTTTTTCCATAGAATCTTGGGGATTACATGTCAAG
TY52-R2_ TCCTTCCTGGAGATGTCATCACATATTTTTTCCATAGAATCTTGGGGATTACATGTCAAG
M82 TCCTTCCTAGAGATGTCATCACATATTTTTTCCATAGAATCTTGGGGATTACATGTCAAG

Motelle_ GAATCTCGAAAGTTCTCTCCCTTTTCTCTTAATCGGAGAATCATTATTGTCACACTTCCCC
GF1REX_ GAATCTCGAAAGTTCTCTCCCTTTTCTCTTAATCGGAGAATCATTATTGTCACACTTCCCC
TY52-R2_ GAATCTCGAAAGTTCTCTCGCTTTTCTCTTAATCGGAGAATCATTATTGTCACACTTCCCC
M82 GAATCTCGCAGTTCTCTCCCTTTTCTCTTAATCGGAGAATCATTATTGTCACACTTCCCC

Motelle_ TTATGCGTTGACACATCGGAAATATAAGCTTCTGGGTTCTTTGCTGAAACCAAGTCTTTC
GF1REX_ TTATGCGTTGACACATCGGAAATATAAGCTTCTGGGTTCTTTGCTGAAACCAAGTCTTTC
TY52-R2_ TTATGCGTTGACACATCGGAAATATAAGCTTCTGGGTTCTTTGCTGAAACCAAGTCTTTC
M82 TTATGCGTTGACACATCGGAAATATAAGCTTCTGGGTTCTTTGCTGAAACCAAGTCTTTC

Motelle_ TTTGAATCATCCTCTG-AGTCCCTGTTCTTACATTTCTCACGAATCATCTCTGGC
GF1REX_ TTTGAATCATC-----
TY52-R2_ -----
M82 TTTGAATCATCCCTCTGAGTCCCTGTTCTTACATTTCTCACGAATCATC-----

CONCLUSIONES

1. De los dos kits utilizados para la amplificación del ADN, el kit de PCR Beads fue el único que permitió la amplificación masiva y de calidad del fragmento REX-1. Para el kit de Promega no se pudo establecer la condición óptima de amplificación.
2. La alta concentración de contaminantes, posiblemente proteínas, fueron los factores limitantes en la amplificación del ADN de las plantas de tomate que crecieron dentro del laboratorio de Biotecnología Vegetal. No obstante, la limpieza de las muestras con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico permitió la exitosa amplificación con los PCR Beads.
3. La enzima Taq-I de Promega fue efectiva en el corte de las bandas de 750, 570 y 160 pb que identifican a los alelos del marcador codominante REX-1, cuando se usó el kit de PCR Beads en la amplificación de dicho fragmento.
4. Los materiales experimentales utilizados como controles positivos (Marina y Better Boy) presentan un genotipo heterocigoto para el marcador REX-1 mientras que los controles negativos (Tomatillo y cultivar HC 7880) tienen el alelo susceptible del marcador.
5. El genotipo REX-1 de la línea GF1 de tomate cultivado es homocigoto resistente (*REX-1/REX-1*) aun cuando proviene del híbrido FAVI 9 y la línea 902 que presentan un genotipo REX-1 susceptible (*REX-1+/REX-1+*) y un genotipo *Mi* susceptible (*Mi+/Mi+*) respectivamente. Aparentemente el marcador resistente REX-1 está asociado al gen *Mi* susceptible en esta línea y en otras asociadas al híbrido FAVI9, presentándose falsos positivos.

6. La asociación del marcador resistente REX-1 con el gen *Mi* susceptible en las líneas asociadas al genotipo FAVI9 pueden deberse a eventos de recombinación o bien de mutación en el exón o el promotor del gen *Mi*, lo cual generó la susceptibilidad a los nematodos. Una tercera posibilidad es que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) observados en la secuenciación del marcador REX-1 de la introgresión de *L. peruvianum* coincidan con los SNPs de *L. hirsutum* que es la especie silvestre de la cual provino la línea 902.
7. El híbrido H5 proveniente de la línea GF1 no es genéticamente puro. Presentó genotipos REX-1 heterocigotos (4 individuos) y homocigoto resistente (1 individuo).
8. La población de 60 plantas híbridas H44 presentan un genotipo heterocigoto y homocigoto resistente. El método estadístico de Ji-cuadrada no permitió determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:1 ($\chi^2 = 3.84$, $p=0.46$). Esta proporción coincide con lo esperado después de determinar los genotipos de sus parentales (H5 y Marina), en cuyo caso, H5 debió tener el gen REX-1 en forma homocigoto resistente y Marina en forma heterocigota.
9. Por ser la población híbrida H44 descendiente de FAVI9 puede inferirse que los individuos homocigotos para REX-1, en realidad son heterocigotos para el gen de resistencia *Mi*, y los heterocigotos para REX-1 son homocigotos para el gen susceptible *Mi+*.
10. El análisis de las secuencias del fragmento REX-1 de 22 individuos que constituyen la progenie de una planta híbrida H44 heterocigota para el marcador REX-1, permitió determinar por medio de SNPs su genotipo REX-1 y demostrar la segregación del gen. El método estadístico de Ji-cuadrada no permitió determinar diferencias significativas con la proporción esperada de 1:2:1 ($\chi^2 = 1.541$, $p=0.46$)

para los individuos homocigotos resistentes, heterocigotos y homocigotos susceptibles respectivamente, por lo que corresponde a una herencia mendeliana.

11. El híbrido 2305-1, los cultivares Sun Coast, Rodade, Very Firm, Lignon y M-82 así como las líneas Ty- 197 y Ty- 198 y las variedades Money Maker 1 y 5 presentaron un genotipo susceptible para el marcador REX-1.
12. Las líneas Fla 024623-y3, Fla 024524-5, y Fla 024525-9 presentan un genotipo REX-1 susceptible al igual que la línea GS16. Para las líneas Fla 024652-y1 y GS9 no se pudo determinar el genotipo REX-1 por haber amplificado ambas, 3 bandas de 320, 230 y 160 pb. Es posible que este patrón de bandas sea específico para introgresiones de la especie silvestre *L. chilense* en el tomate cultivado puesto que D. Maxwell (2004) también ha observado este patrón en la línea GS9.
13. El marcador REX-1 funcionó efectivamente como un indicador de la resistencia a nematodos en la mayoría de los materiales evaluados, a excepción de los materiales provenientes del híbrido FAVI9 que pueden presentar falsos positivos debido a eventos genéticos aun no determinados y dos líneas obtenidas de la Universidad de Florida que presentaron un patrón de bandas diferente del esperado para el marcador.
14. La técnica de PCR utilizada en este estudio puede implementarse en el laboratorio de Biotecnología Vegetal como una prueba rutinaria para determinar la resistencia a nematodos en la plantas de tomate del programa de mejoramiento de la Unidad de Riego Sansirisay. Requiere de 12 ½ horas de trabajo para poder determinar el genotipo REX-1 de 60 plantas con un equipo de tres personas y los costos son bajos en comparación con los bioensayos de resistencia a nematodos.

RECOMENDACIONES

No se recomienda en el caso particular del programa de mejora genética de tomate de la Facultad de Agronomía la implementación de la técnica de PCR usada en este estudio, ya que este programa está basado en el uso de las líneas derivadas de FAVI 9 y de la Universidad de Florida que pueden presentar respectivamente falsos positivos y patrones de bandeo diferentes a los esperados. Por tanto, debe investigarse la posibilidad de encontrar o diseñar otros marcadores moleculares de uso rutinario para estos patógenos que no presenten el mismo problema con las líneas ya mencionadas e iniciar el estudio de implementación de técnicas similares para otros patógenos del tomate como los hongos y las bacterias principalmente.

Se recomienda seguir fomentando las relaciones de colaboración con la Universidad de Wisconsin en Madison, puesto que su apoyo fue indispensable para obtener resultados valiosos en este estudio, especialmente en cuanto la información obtenida de la secuenciación de ADN. Además, sería importante poder contar en el futuro próximo con el apoyo del Dr. Favi Vidavsky de la Universidad Hebrea de Jerusalén, para que se puedan incluir algunos materiales de interés en los bioensayos de resistencia a nematodos que realiza actualmente.

REFERENCIAS

1. Agrios GN. 1985. Fitopatología. México, Editorial Limusa. pp 661-710.
2. Ammiraju JSS, Veremis JC, Huang X, Roberts PA, Kaloshian I. 2002. The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. Theor. Appl. Genet. 106: 478-484.
3. Barker KR. 1993. Resistance/Tolerance and related concepts/terminology in Plant Nematology. Plant Dis. 77:111-113.
4. Bird AF. 1979. Histopathology and physiology on syncytia, pp 155-171 in Root-Knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.).London, Academic Press.
5. Brommonschenkel SH, Frary A, Frary A, Tanksley D. 2000. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. MPMI 10: 1130-1138.
6. Debert P, Olivier J, Thoquet P, Queneherve P, Prior P. 1999. Quasi-isogenic tomato lines carrying *Mi* are useful tools for the genetic analysis of bacterial wilt resistance on chromosome 6. Abstract in www.inra.fr/Internet/Departements/PATHOV/2nd_IBWS/C20.html-7k
7. De Guiran G and Ritter M. 1979. Life Cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development, pp 173-191 in Root-Knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.).London, Academic Press.

8. Del Cid J. 2002. Determinación del género y estudio de la distribución horizontal de los nematodos fitoparasíticos que afectan al cultivo de sábila (*Aloe vera* L) en El Progreso, El Progreso. Facultad de Agronomía. Tesis de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción
9. Depestre T y Gómez O. 1999. Mejoramiento de plantas, Tomate y Chile Pimiento. Cuba, Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova.
10. Dropkin VH, Helgeson JP, Upper CD. 1969. The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: Reversal by Cytokinins. *Journal of Nematology*. 1: 55-61.
11. Franklin M. 1979. Taxonomy of the genus *Meloidogyne*, pp 37-58 in *Root-Knot nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and Control*. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.). London, Academic Press.
12. Genra Systems. Genomic DNA purification kit instructions. pp 45-48.
13. Ho JY, Weide R, Ma HM, van Wordragen MF, Lambert KN; Koornneef M; Zabel P, Williamson VM. 1992. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal* 2(6): 971-982.
14. Kaloshian I, Lange WH, Williamson VM. 1995. An aphid-resistance locus is tightly linked to the nematode-resistance gene, *Mi* in tomato. *Proc. Natl. Sci.* 92: 622.625.
15. Kaloshian I, Yaghoobi J, Liharska T, Hontelez J, Hanson D, Hogan P, Jesse T, Wijbrandi J, Simons G, Vos P, Zabel P, Williamson VM. 1998. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus *Mi* in tomato. *Mol. Gen. Genet.* 257: 376-385.

16. Klug W & Cummings M. 2000. Concepts of Genetics. New Jersey, Prentice Hall Inc. pp 515-517.
17. Martínez J. 2001. Tomato Market, Central America and Caribbean in Tomato Breeders Round Table Resumes. Guatemala.
18. Maxwell D. 2004. Gen de resistencia a nematodos, selección asistida por marcadores, el tomate y sus ancestros, sección 4 en Métodos moleculares para diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Mejía L (ed.). Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala
19. Mejía L. 2001. Mejoramiento genético del tomate para resistencia a geminivirus. Informe final proyecto FODECYT 83-99. Guatemala.
20. Mejía L. 2002. Híbridos de tomate resistentes a geminivirus. Anteproyecto. Guatemala, Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
21. Messeguer R, Ganai M; de Vicente MC, Young ND, Bolkan H, Tanksley SD. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. Theor. Appl. Genet. 82: 529-536.
22. Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM. 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* from Tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. The Plant Cell. 10: 1307-1319.
23. Nevins D, De Verna JW, Garvey TC, Jones RA, McGuire PE, Rick CM, St. Clair D, Stevens MA, Watterson JC, Yoder J, Qualset CO. 1988. Evaluation of the University of California Tomato Genetics Stock Center: recommendations for its long-term management, funding and facilities. California, University of California.

24. Nicholl D. 1994. An Introduction to Genetic Engineering. New York, Cambridge University Press.
25. Paulson RE and Webster JM. 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 2: 227-234.
26. Rick C. 1978. El tomate. *Investigación y Ciencia*. 25: 45-55.
27. Rodríguez R, Tabares JM, Medina JA. 2001. Cultivo moderno del tomate. 2 ed. España, Ediciones Mundi Prensa.
28. Rossi M, Goggin F, Milligan S, Kaloshian I, Ullman De, Williamson VM. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc, Natl. Acad. Sci.* 95: 9750-9754.
29. Sasser JN. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries, pp 359-374 in *Root-Knot nematodes (Meloidogyne species)*. Systematics, Biology and Control. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.). London, Academic Press.
30. Sasser JN. 1980. Root-knot nematodes: A global menace to crop production. *Plant Disease*. 64: 36- 41.
31. Teni R. 1998. Detección e identificación de geminivirus transmitidos por mosca blanca en plantas de la Unidad de Riego Sansirisay. Guatemala, Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
32. Triantaphyllou AC. 1979. Cytogenetics of root-knot nematodes, pp 85-109 in *Root-Knot nematodes (Meloidogyne species)*. Systematics, Biology and Control. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.). London, Academic Press.

33. Veremis JC, van Heusden AW, Roberts PA. 1999. Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*.
34. Vidavsky F & Czosnek H. 2004. Mejoramiento del tomate para resistencia a enfermedades producidas por begomovirus en Guatemala, sección 4 en Métodos moleculares para diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Mejía L (ed.). Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala
35. Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M, Flerens-Onstenk J, de Both M, Peleman J, Liharska T, Hontelez J, Zabeau M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology*. 16: 1365-1369.
36. Walters SA, Barker KR. 1994. Current distribution of five major *Meloidogyne* species in the United States. *Plant. Dis.* 78:772-774.
37. Williamson VM, Ho JY, Wu FF, Miller N, Kaloshian I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 87:757-763.
38. Wouts WM. 1979. Characterization of the family Meloidogynidae with a discussion on its relationship to other families of the suborder Thylenchina based on gonad morphology, pp 21-34 in Root-Knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. Lamberti, F and Taylor C.E. (eds.). London, Academic Press.
39. Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen Y, Williamson VM. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 457-464.
40. Zhong XB, Bodeau, J, Fransz PF, Williamson VM, van Kammen A van, de Jong JH, Zabel P. 1999. FISH to meiotic pachytene chromosome of tomato locates the

root-knot nematode resistance gene *Mi-1* and the acid phosphatase gene *Aps-1* near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. Theor. Appl. Genet. 98: 365-370, Abstract in <http://webdbs.library.wisc.edu:8585/webspirs/previewBriefRecordsHidden.ws?sel>

41. <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/G076.HTM#Classification>
42. <http://cuke.hort.ncsu.edu/cucurbit/wehner/vegcult/tomatojr.html>
43. http://www.cals.ncsu.edu:8050/pgg/dan_webpage/Nematodes/Endos/Meloidogyne.html
44. <http://www.inbio.ac.cr/bims/ubi/nematodos/ubiespejo/ubiid=4639&-find.html>
45. www.orst.edu/dept/hort/233/tomto.htm-26k
46. <http://www.yankeegardener.com/seeds/hartseed11.html>

ANEXO 1. *Reacción en cadena de la polimerasa*

En 1986 se desarrolló la técnica conocida como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La significancia de este avance ha sido enfatizado con la adjudicación en 1993 del premio nobel de química a su inventor Kary Mullis. La PCR es un método rápido de clonación de ADN fuera de la célula que ha encontrado aplicaciones en un amplio rango de disciplinas, incluyendo la biología molecular, la genética humana, la evolución, y la medicina forense.

La PCR permite la amplificación directa de secuencias específicas de ADN dentro de una población de moléculas de ADN y puede usarse con fragmentos de ADN que están inicialmente presentes en infinitísimamente pequeñas cantidades. Para amplificar una secuencia de ADN por PCR, se requiere alguna información acerca de la secuencia de nucleótidos del ADN objetivo. Esta información es usada para sintetizar dos primers o cebadores oligonucleótidos que son agregados a la reacción que contiene la muestra de ADN desnaturalizada (una sola cadena). Los primers o cebadores se hibridizan con las secuencias complementarias que flanquean la secuencia de una sola cadena a ser amplificada. Se utilizan una forma termo-estable de la ADN polimerasa (llamada *Taq* polimerasa) para sintetizar una segunda cadena del ADN objetivo.

Existen tres pasos básicos en una reacción de PCR y la cantidad de ADN producida está solamente limitada en teoría por el número de veces que estos pasos son repetidos.

1. En el primer paso, el ADN a ser amplificado es desnaturalizado en cadenas simples. Este ADN no tiene que estar purificado y puede proceder de varias fuentes, incluyendo ADN genómico, muestras forenses tales como sangre y semen secos, pelos, restos momificados y fósiles. La doble cadena de ADN se desnaturaliza por calentamiento (a 90-95° C) hasta que se disocia en cadenas simples (aproximadamente a los 5 minutos).
2. La temperatura de reacción se baja entre los 50 y 70° C, y esto permite que los primers se unan al ADN desnaturalizado. Los primers son oligonucleótidos

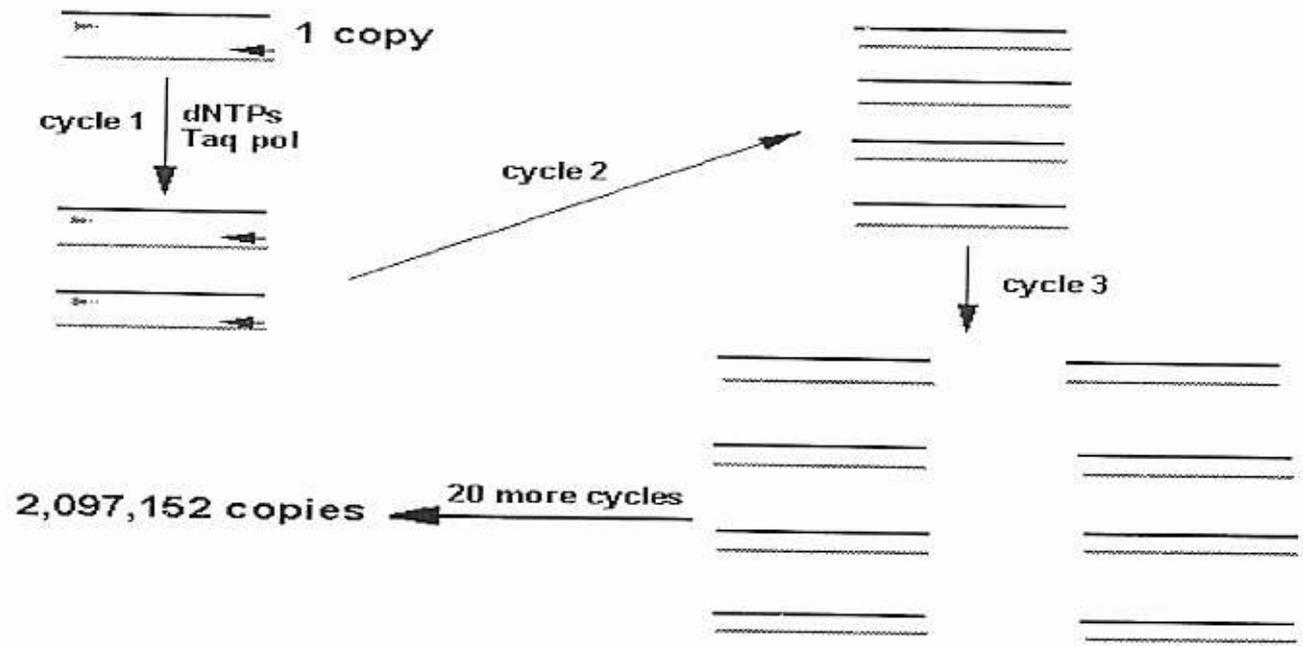
sintéticos (de 15 a 30 nucleótidos de longitud que se unen específicamente a las secuencias que flanquean el segmento a ser amplificado. Estos primers se diseñan para servir como puntos de inicio para la síntesis de nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN objetivo.

3. Una forma estable de la ADN polimerasa (*Taq*Polimerasa, una enzima bacteriana que vive en ambientes calientes) se agrega a la mezcla de reacción y la síntesis del ADN se lleva a cabo a temperaturas entre los 70 y 75° C. La polimerasa extiende los primera al agregar nucleótidos en la dirección 5' → 3', haciendo una copia de doble cadena del ADN objetivo.

Cada conjunto de tres pasos, es decir la **desnaturalización** del producto de la doble cadena, el **alineamiento** de los primers y la **extensión** hecha por la polimerasa, se denomina un **ciclo**. La PCR es una reacción en cadena porque el número de nuevas cadenas de ADN se duplica en cada ciclo, y las nuevas cadenas sirven como moldes en el siguiente ciclo (figura 1). Cada ciclo, que toma entre 4-5 minutos, puede repetirse al llevar a cabo cada paso otra vez. De 25 a 30 ciclos dan como resultado más de 1,000,000 de múltiplos del ADN. El proceso ha sido automatizado con el desarrollo de máquinas llamadas **termocicladores** que pueden programarse para realizar un predeterminado número de ciclos, produciendo grandes cantidades de ADN objetivo, que puede ser usado en otros procedimientos tales como clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tamizaje genético.

La clonación de ADN por PCR tiene ventajas sobre la clonación basada en un hospedero celular. La PCR es rápida y puede llevarse a cabo en pocas horas a diferencia de la otra que lleva semanas. Otra ventaja es que el diseño de los primers para PCR se puede hacer con software y la síntesis comercializada es rápida y económica. Sus limitaciones incluyen la necesidad de saber acerca de la secuencia nucleotídica del ADN objetivo, el pequeño tamaño de los productos amplificados y la posibilidad de contaminación aun con restos de la piel del laboratorista (Klug W & Cummings M, 2000).

Figura 1. Ciclos de la PCR



copyright M.W.King 1996

ANEXO 2. Método de secuenciación dideoxi

El método dideoxi hace una copia del ADN a ser secuenciado por medio del fragmento de Klenow de la Polimerasa de ADN¹. El molde para esta reacción es ADN de cadena simple y un primer o cebador debe agregarse para proveer al extremo 3' de la polimerasa de ADN un sitio de inicio de síntesis de la copia. La producción de un fragmento anidado se logra por la incorporación de dNTPs modificados que carecen de un grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxiribosa, que es necesaria para que ocurra la elongación de la cadena. Estos dNTPs modificados se conocen como dideoxi-nucleosido-trifosfatos (ddNTPs) y las cuatro formas (A, G, T y C) están incluidos en una serie de cuatro reacciones, cada una de las cuales contiene los dNTPs normales. La concentración de los nucleótidos dideoxi es tal que se incorporan a la cadena creciente de manera infrecuente. Cada reacción por lo tanto produce una serie de fragmentos que terminan en un nucleótido específico y las cuatro reacciones juntas proveen un juego de fragmentos anidados. La cadena de ADN es marcada al incluir un dNTP radioactivo en la mezcla de reacción. Este es generalmente un (α - ³⁵S)dATP, que permite leer una mayor secuencia a partir de un solo gel que con el uso de dNTPs marcados con ³²P que solía usarse previamente (Nicholl 1994).

¹ Para obtener el fragmento de Klenow se elimina la función de exonucleasa 5'-3' de la enzima por medio de un corte en esta lo que permite retener las actividades como polimerasa y exonucleasa en dirección 3'-5' (Nicholl, D 1994).

ANEXO 3. *Cromatogramas del genotipo REX-1 para el control positivo Better Boy (heterocigoto) y para el control negativo HC-7880 (susceptible). La flecha muestra el polimorfismo de un solo nucleótido.*

