

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a blue robe and hat, possibly a saint or scholar, holding a staff. Above him is a golden crown with a cross on top. To the left is a golden castle tower, and to the right is a golden lion rampant. The background is light blue with a white path leading to a green hill. The text 'UNIVERSITAS CONSPICUA CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS INTERCIVITATIS' is written around the perimeter of the seal.

**TRABAJO DE GRADUACIÓN: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCASIONADA POR *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith EN TRES FAMILIAS DE POBLACIONES SEGREGANTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REeALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S. A. Y FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA, CA.**

SANDY MAOLY CASTAÑEDA FRANCO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2016



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCASIONADA POR *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith EN TRES FAMILIAS DE POBLACIONES SEGREGANTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S. A. Y FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA, CA.**

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR  
SANDY MAOLY CASTAÑEDA FRANCO

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERA AGRÓNOMA

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2016



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

DOCTOR CARLOS GUILLERMO ALVARADO CEREZO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL PRIMERO	Dr. Tomás Antonio Padilla Cámara
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. M. A. César Linneo García Contreras
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. M. Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL CUARTO	B. Ind. Milton Juan José Caná Aguilar
VOCAL QUINTO	P. Agr. Cristian Alexander Méndez López
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2016



Guatemala, noviembre 2016

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el **TRABAJO DE GRADUACIÓN: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCACIONADA POR *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith EN TRES FAMILIAS DE POBLACIONES SEGREGANTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S. A. Y FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA, CA.**, como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Sandy Maoly Castañeda Franco



## ACTO QUE DEDICO

**A:**

- Dios:** Por darme valor, sabiduria y guiarme diariamente para alcanzar esta meta.
- Mi madre:** María Areli Castañeda Franco por sus enseñanzas, esfuerzo, apoyo, comprensión, y amor. La amo, Dios la bendiga.
- Mis hermanas:** Norma Isolina Cruz Castañeda, Ana Delmi Castañeda Franco. Por su apoyo incondicional, comprensión, cuidados, y guiarme siempre por el camino correcto. Las amo, Dios las bendiga.
- Mis hermanos:** José Ruben, Elfrid Omar, Erwin Roberto, Flavio César Castañeda Franco. Por su cariño, apoyo incondicional y creer siempre en mi. Los amo, Dios los bendiga.
- Mis sobrinos:** Dario Ottoniel Tello Cruz, Katerin Nayeli Buezo Caceres, Kevin Joseph Castañeda Ocampo, Jonathan Alexander Castañeda Ocampo, Maryorie Yisel Castañeda Lara (Q.E.P.D), José Eduardo Salquilmer Castañeda. Por alegrar mis días, los amo, Dios los bendiga.
- Mis cuñados (as):** Ottoniel Tello, Flor Ocampo, y en especial a Eduardo Saquilmer, por su apoyo a lo largo del camino hacia este logro.

## TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

**A:**

**Dios:** Por la oportunidad de terminar esta fase de mi vida.

**Universidad de San Carlos  
de Guatemala:** Por darme la oportunidad de obtener este triunfo.

**Facultad de Agronomía y  
Personal docente:** Por brindarme los conocimientos que me formaron para la obtención de este logro.

**Liceo Preuniversitario de  
Computación:** Por brindarme conocimientos base, en especial al Lic. Hugolino Menchú por su amistad, apoyo y por haber contribuido con sus conocimientos y experiencias en mi formación profesional.

**Colegio Mixto La Inmaculada:** Por brindarme conocimientos base que ayudaron en mi formación profesional.

**Escuela Oficial Urbana Mixta  
No. 810:** Por ser parte inicial en mi formación educativa.

**Escuela Oficial Rural Mixta  
Colonia Los Pinos:** Por ser parte inicial de mi formación escolar.

## AGRADECIMIENTOS

**A:**

- Dios:** Por la vida y la oportunidad de terminar esta fase.
- Mi familia:** Por el apoyo y amor, a lo largo del camino hacia este logro. Dios los bendiga.
- Ing. Agr. Victor David Estuardo García:** Por su amistad, apoyo, enseñanzas y por contribuir a mi desarrollo profesional.
- Dr. Luis Mejía de León:** Por su apoyo, valiosas recomendaciones y por haber compartido experiencias para contribuir a mi desarrollo profesional.
- Ing. Agr. Wendy Robles:** Por su amistad y apoyo incondicional.
- Dr. Douglas Maxwell:** Por su apoyo y valiosas recomendaciones.
- Dr. Caitilyn Allen:** Por su ayuda en el desarrollo del trabajo de investigación.
- Dr. Amilcar Sanchez:** Por su asesoría, apoyo brindado en esta investigación.
- Ing. Agr. César Linneo García:** Por haberme supervisado y orientado a lo largo del ejercicio profesional supervisado.
- Ing. Agr. Edgar Leonel Alvarez** Por su amistad y apoyo.
- East-West Seed (Guatemala), S.A.:** Por la colaboración de todo el personal que de forma directa o indirecta colaboró en el desarrollo de este trabajo de graduación.

**MBA. Herke van der Woude:**

Por darme la oportunidad de realizar mi ejercicio profesional supervisado en la empresa East-West Seed (Guatemala), S.A.

**Br. Electr. Eduardo Saquilmer:**

Por su apoyo, amistad y colaboración a lo largo de mi carrera.

**Familia Saquilmer Vasquez:**

Por su amistad, apoyo y cariño. Dios los bendiga.

**Familia García Medina:**

Por su apoyo incondicional, su cariño y haber sido más que una familia para mi, infinitas gracias y que Dios los siga bendiciendo, los quiero.

**Familia Samayoa:**

Ivania y Angelly por alegrar mis días con sus ocurrencias, Dios las bendiga.

**Familia Hernandez Marroquin:**

Por su cariño y apoyo, Dios los bendiga.

**Mis amigos (as) y compañeros (as):**

A todos con quienes compartí agradables experiencias a lo largo de mi vida, Dios los bendiga siempre.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
<b>CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM L.) DE LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S.A.</b> .....	<b>1</b>
1.1 PRESENTACIÓN .....	2
1.2 MARCO REFERENCIAL.....	3
1.2.1 Localización geográfica .....	3
1.3 OBJETIVOS .....	6
1.3.1 General .....	6
1.3.2 Específicos .....	6
1.4 METODOLOGÍA.....	7
1.4.1 Fase de gabinete inicial .....	7
1.4.2 Fase de campo .....	7
1.4.3 Segunda fase de gabinete.....	7
1.4.4 Análisis de información.....	7
1.4.5 Fase de gabinete final .....	8
1.5 RESULTADOS.....	8
1.5.1 Áreas del programa de mejoramiento genético de tomate .....	8
1.5.1.1 Desarrollo de líneas parentales .....	8
1.5.1.2 Desarrollo de híbridos.....	8
1.5.1.3 Evaluación de híbridos .....	9
1.5.1.4 Introgresión de genes de resistencia a materiales parentales .....	9
1.5.1.5 Evaluaciones de resistencia y/o tolerancia a enfermedades .....	10
1.5.2 Proceso productivo para la obtención de un híbrido comercial.....	10
1.6 CONCLUSIONES.....	13
1.7 RECOMENDACIONES .....	13
1.8 BIBLIOGRAFÍA .....	14
 <b>CAPÍTULO II: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCASIONADA POR RALSTONIA SOLANACEARUM E. F. SMITH EN TRES FAMILIAS DE POBLACIONES SEGREGANTES DE TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM L.) BAJO LAS CONDICIONES DE LA FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA, CA.</b> .....	 <b>15</b>
2.1 PRESENTACIÓN .....	16
2.2 MARCO TEORICO.....	18
2.2.1 Marco Conceptual.....	18
2.2.1.1 Importancia del cultivo de tomate (Solanum lycopersicum L.) .....	18
2.2.1.2 Taxonomía del cultivo de tomate .....	18
2.2.1.3 Descripción botánica del cultivo de tomate .....	19
2.2.1.4 Requerimientos edafoclimáticos .....	20
2.2.1.5 Materiales genéticos de tomate .....	21
2.2.1.6 Agente causal de la marchitez bacteriana.....	21
2.2.1.7 Marcadores moleculares .....	28
2.2.1.8 Polimorfismo de nucleótido único (SNPs) .....	29
2.2.1.9 Tarjetas FTA (Flinders Technology Associates).....	29
2.2.1.10 Método para la identificación de la cepa de Ralstonia solanacearum.....	30
2.2.2 Marco referencial .....	36

2.2.2.1	Ubicación .....	36
2.3	OBJETIVOS .....	37
2.3.1	Objetivo General .....	37
2.3.2	Objetivos Específicos.....	37
2.4	HIPÓTESIS .....	37
2.5	METODOLOGÍA .....	38
2.5.1	Tratamientos evaluados.....	38
2.5.1.1	Descripción de los tratamientos.....	38
2.5.2	Manejo del experimento.....	39
2.5.2.1	Fase de campo.....	39
2.5.2.2	Fase de laboratorio.....	43
2.5.3	Diseño Experimental.....	44
2.5.3.1	Unidad experimental.....	44
2.5.3.2	Croquis del experimento .....	44
2.5.3.3	Variable de respuesta .....	46
2.5.3.4	Análisis para la proporción de sobrevivencia de plantas para cada familia .....	46
2.5.3.5	Análisis para la proporción de sobrevivencia de las poblaciones segregantes de las familias .....	47
2.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
2.6.1	Identificación de la cepa de <i>Ralstonia solanacearum</i> E. F. Smith.....	47
2.6.2	Selección de plantas de tomate resistentes a la cepa de <i>R. solanacearum</i> E. F. Smith .....	48
2.6.3	Determinación de la familia con la mayor proporción de sobrevivencia a <i>R. solanacearum</i> E. F. Smith bajo las condiciones del experimento .....	53
2.6.4	Análisis de las poblaciones segregantes dentro de cada familia .....	53
2.6.5	Verificación la presencia del marcador molecular BW 12 en las plantas sobrevivientes.....	58
2.7	CONCLUSIONES.....	62
2.8	RECOMENDACIONES .....	63
2.9	BIBLIOGRAFÍA .....	64
2.10	ANEXOS.....	69

### **CAPÍTULO III: SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S. A..... 70**

3.1	EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCASIONADA POR <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> E. F. SMITH EN DOCE HÍBRIDOS DE TOMATE ( <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.) BAJO LAS CONDICIONES DE LA FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA. ....	71
3.1.1	Presentación .....	71
3.1.2	Marco Teórico .....	72
3.1.2.1	Marco Conceptual.....	72
3.1.2.2	Marco Referencial.....	72
3.1.3	Objetivos .....	73
3.1.3.1	General.....	73
3.1.3.2	Específico.....	73
3.1.4	Metodología .....	74
3.1.4.1	Tratamientos evaluados.....	74
3.1.4.2	Manejo del experimento.....	74
3.1.4.3	Diseño Experimental .....	75
3.1.5	Resultados y Discusión.....	76
3.1.6	Conclusiones.....	79
3.1.7	Recomendaciones .....	79
3.1.8	Bibliografía .....	79

3.2	VINCULACIÓN ENTRE LOS GENES “AH” (ANTHOCYANINLESS) Y “TM-2A” (TOBACCO MOSAIC VIRUS RESISTANCE-2) EN CONDICIÓN HOMOCIGOTA DOMINANTE, EN TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM L.).....	80
3.2.1	Presentación.....	80
3.2.2	Marco Teórico.....	81
3.2.2.1	Marco Conceptual.....	81
3.2.2.2	Marco Referencial.....	83
3.2.3	Objetivos.....	84
3.2.3.1	General.....	84
3.2.3.2	Específicos.....	84
3.2.4	Metodología.....	84
3.2.5	Resultados.....	85
3.2.6	Conclusiones.....	89
3.2.7	Recomendaciones.....	89
3.2.8	Bibliografía.....	89
3.3	EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO DE 13 HÍBRIDOS DE TOMATE (SOLANUM LYCOPERSICUM L.) EN LA FINCA SANTA TERESA EN ANTIGUA GUATEMALA, SACATEPÉQUEZ, GUATEMALA.....	91
3.3.1	Presentación.....	91
3.3.2	Marco Teórico.....	92
3.3.2.1	Marco Conceptual.....	92
3.3.2.2	Marco Referencial.....	93
3.3.3	Objetivos.....	93
3.3.3.1	General.....	93
3.3.3.2	Específicos.....	93
3.3.4	Metodología.....	94
3.3.5	Resultados.....	101
3.3.6	Conclusiones.....	105
3.3.7	Recomendaciones.....	105
3.3.8	Bibliografía.....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
FIGURA 1. FINCA SANTA TERESA, ANTIGUA GUATEMALA.....	3
FIGURA 2. FINCA EL COMÚN, SANARATE, EL PROGRESO. ....	5
FIGURA 3. FINCA EL COROZO .....	6
FIGURA 4. FLUJO BACTERIANO DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> A PARTIR DE UN TALLO DE TOMATE SUMERGIDO EN AGUA.....	23
FIGURA 5. PLANTAS SUSCEPTIBLES. A: SÍNTOMAS DE MARCHITAMIENTO, HOJAS DOBLADAS HACIA ABAJO. B: PLANTAS MUERTAS POR INFECCIÓN CON <i>R. SOLANACEARUM</i> .....	24
FIGURA 6. TARJETA FTA .....	30
FIGURA 7. PREPARACIÓN DEL TERRENO .....	40
FIGURA 8. ESTABLECIMIENTO DE PLANTAS EN CAMPO FINCA EL COROZO.....	41
FIGURA 9. PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS A PARTIR DE LA FAMILIA 1. ....	50
FIGURA 10. PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS A PARTIR DE LA FAMILIA 2. ....	51
FIGURA 11. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS DE LA FAMILIA 3....	52
FIGURA 12. GRÁFICA DE PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE TOMATE DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 1 A LA PRESENCIA DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> .....	55
FIGURA 13. GRÁFICA DE PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE TOMATE DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 2 A LA PRESENCIA DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> .....	56
FIGURA 14. GRÁFICO DE PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE TOMATE DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 2 A LA PRESENCIA DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> .....	58
FIGURA 15. GRÁFICO DE CONDICIONES CLIMÁTICAS DE LA PARCELA EN LA FINCA EL COROZO, RIO HONDO, ZACAPA REPORTADAS POR LA ESTACIÓN PASABIEN, RIO HONDO, ZACAPA INSIVUMEH 2010 .....	59
FIGURA 16. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA A <i>R. SOLANACEARUM</i> DE DOCE HÍBRIDOS DE TOMATE.....	78
FIGURA 17. LÍNEA PURA GT-6716.....	85
FIGURA 18. GRÁFICO DE RELACIÓN ENTRE EL COLOR DEL HIPOCOTÍLO Y LA PRESENCIA DEL MARCADOR MOLECULAR Tm-2A .....	87
FIGURA 19. HÍBRIDO GT-6332 .....	94
FIGURA 20. HÍBRIDO GT-5919 .....	94
FIGURA 21. HÍBRIDO GT-5644 .....	95
FIGURA 22. HÍBRIDO GT-6358 .....	95
FIGURA 23. HÍBRIDO GT-2395 .....	96
FIGURA 24. HÍBRIDO GT-7679 .....	96
FIGURA 25. HÍBRIDO GT-4832 .....	97
FIGURA 26. HÍBRIDO GT-7678 .....	97
FIGURA 27. HÍBRIDO GT-7680 .....	98
FIGURA 28. HÍBRIDO GT-7684 .....	98
FIGURA 29. HÍBRIDO GT-5199 .....	99
FIGURA 30. HÍBRIDO GT-4831 .....	99
FIGURA 31. RENDIMIENTO TOTAL EN KG POR PLANTA .....	102
FIGURA 32. GRÁFICO RENDIMIENTO DE FRUTOS PRIMERA CALIDAD EN KG POR PLANTA .....	104

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
CUADRO 1. CLASIFICACIÓN DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> DE ACUERDO AL RANGO DE HOSPEDEROS.....	26
CUADRO 2. CLASIFICACIÓN DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> , SEGÚN BIOVARES.....	27
CUADRO 3. CLASIFICACIÓN DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> SEGÚN FILOTIPOS .....	27
CUADRO 4. DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS EVALUADOS .....	38
CUADRO 5. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DESEADAS EN LAS PLANTAS DE TOMATE.....	39
CUADRO 6. DISTRIBUCIÓN ALEATORIZADA DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 1 .....	45
CUADRO 7. DISTRIBUCIÓN ALEATORIZADA DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 2 .....	45
CUADRO 8. DISTRIBUCIÓN ALEATORIZADA DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES DE LA FAMILIA 3 .....	45
CUADRO 9. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS DE LA FAMILIA 1....	49
CUADRO 10. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS DE LA FAMILIA 2...51	51
CUADRO 11. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE POBLACIONES SEGREGANTES SELECCIONADAS DE LA FAMILIA 3...52	52
CUADRO 12. CUADRO RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES.....	53
CUADRO 13. CUADRO RESUMEN DE LA PRUEBA DE TUKEY PARA EL FACTOR FAMILIA .....	53
CUADRO 14. CUADRO RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES PARA LA FAMILIA 1 .....	54
CUADRO 15. CUADRO RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES PARA LA FAMILIA 2 .....	56
CUADRO 16. CUADRO RESUMEN DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PROPORCIÓN DE PLANTAS SOBREVIVIENTES PARA LA FAMILIA 3.....	57
CUADRO 17. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL MARCADOR BW12 EN LAS POBLACIONES SELECCIONADAS. ....	60
CUADRO 18A. COMPONENTES DEL MEDIO CPG (CASAMINO ACID-PEPTONE-GLUCOSE).....	69
CUADRO 19A. COMPONENTES DEL MEDIO SMSA.....	69
CUADRO 20. DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS EVALUADOS .....	74
CUADRO 21. CUADRO RESUMEN DE ANÁLISIS DE VARIANZA A DOCE HÍBRIDOS DE TOMATE .....	76
CUADRO 22. PROPORCIÓN DE SOBREVIVENCIA DE HÍBRIDOS A <i>R. SOLANACEARUM</i> .....	77
CUADRO 23 COLOR DEL HIPOCOTÍLO Y PRESENCIA DEL MARCADOR MOLECULAR TM-2A. ....	86
CUADRO 24. CASOS DE RELACIÓN ENTRE EL COLOR DEL HIPOCOTÍLO Y EL ESTADO DEL MARCADOR MOLECULAR TM-2A .....	87
CUADRO 25 ESTIMACIÓN UTILIZANDO INTERVALO DE CONFIANZA PARA 100 PLANTAS .....	88
CUADRO 26. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE RENDIMIENTO TOTAL (KG POR PLANTA). ....	101
CUADRO 27. CUADRO RESUMEN PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS UTILIZANDO EL METODO DE TUKEY .....	102
CUADRO 28. RENDIMIENTO DE FRUTOS CATEGORÍA PRIMERA CALIDAD .....	103
CUADRO 29. CUADRO RESUMEN PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS RENDIMIENTO FRUTOS DE PRIMERA .....	104



**TRABAJO DE GRADUACIÓN: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA OCASIONADA POR *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith EN TRES FAMILIAS DE POBLACIONES SEGREGANTES DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.). DIAGNÓSTICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S. A.: FINCA EL COROZO EN ZACAPA, GUATEMALA, CA.**

**RESUMEN**

En Guatemala, el tomate es una de las hortalizas con mayor importancia económica, tanto por su producción como por su consumo, sin embargo existen varios factores que han sido determinantes en la rentabilidad del cultivo tales como la alta incidencia de plagas, que conlleva al incremento de los costos de producción, reducción de rendimientos, mala calidad de fruta (López, 2005). Es por ello que el mejoramiento genético surge como una alternativa para mejorar la producción del cultivo a través de incrementar la resistencia y/o tolerancia a ciertos patógenos, mejorar el rendimiento y la calidad de frutos.

En la empresa East-West Seed (Guatemala), S.A. se ha venido realizando mejoramiento del cultivo de tomate desde hace varios años, antes a través de la empresa Semillas Tropicales, S.A. En un programa de mejoramiento los cruzamientos iniciales son realizados para generar líneas parentales a través del tiempo en generaciones llamadas F2, F3, F4, etc. A cada estado, se aplica una selección para obtener nuevos parentales con caracteres deseables de sus dos parentales originales. Una vez que muchos parentales deseables han sido desarrollados, nuevos cruzamientos son necesarios para producir nuevos híbridos (Emmatty, 2005).

En el presente informe integrado se describen las actividades realizadas durante el diagnóstico, investigación y servicios prestados a la empresa East-West Seed (Guatemala), S.A. El diagnóstico descrito en el capítulo I permitió conocer los antecedentes y la situación actual del programa de mejoramiento, por medio de la revisión de fuentes primarias y secundarias, con la ayuda del personal de la empresa. Esto fue una herramienta donde se obtuvo el primer paso para la realización de la investigación dirigida a la evaluación de la

resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en el cultivo de tomate.

A través del diagnóstico también se obtuvo información de cuales proyectos ayudarían al programa de mejoramiento. Con la participación del grupo de personas del departamento de investigación de la empresa se priorizaron las problemáticas y se seleccionaron tres para llevar a cabo los servicios profesionales del EPS.

En el capítulo II, se presenta la investigación de la evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en tres familias de poblaciones segregantes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) todo esto bajo las condiciones de la finca El Corozo en Zacapa. Al llevar a cabo la investigación se logró identificar que la cepa de *R. solanacearum* presente dentro de la parcela es la conocida como Filotipo I, Secuevar 14 (también conocida como Raza 1, Biovar 3). También se determinó que de las tres familias evaluadas, la numero 1 fue la que presentó la mayor proporción de sobrevivencia a la bacteria, se obtuvieron plantas que presentaron buena resistencia y/o tolerancia a la bacteria y buena características de planta y de fruto siendo estas clasificadas por familia: familia 1: GT-6854, GT-6855, GT-6856, GT-6857, GT-6858, GT-6859, GT-6848, GT-6849, GT-6850, GT-6833, GT-6834; familia 2: GT-6860, GT-6861, GT-6862, GT-6863, GT-6865, GT-6852, GT-6839, GT-6864, GT-6851, GT-6863; y familia 3: GT-6866, GT-6840, GT-6841, GT-6842, GT-6843, GT-6844, GT-6845, GT-6846, GT-6847.

El informe de los servicios realizados dentro de la empresa se presentan en el capítulo III siendo estos: la evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *R. solanacearum* en doce híbridos de tomate, bajo las condiciones de la finca El Corozo en Zacapa; la vinculación entre los genes “ah” (anthocyaninless) y “Tm-2a” (tobacco mosaic virus resistance-2) en condición homocigota dominante, en tomate (*Solanum lycopersicum* L.); y la evaluación de rendimiento de trece híbridos de tomate en la finca Santa Teresa en Antigua Guatemala, Sacatepéquez.

CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROGRAMA DE  
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) DE LA EMPRESA  
EAST-WEST SEED (GUATEMALA), S.A.

## 1.1 Presentación

East-West Seed Internacional es una compañía especializada en el mejoramiento genético de hortalizas para zonas tropicales. Comenzó sus operaciones en Guatemala en el año 2008, y en el año 2014 fusionó a la empresa Semillas Tropicales, S. A., convirtiéndose en East-West Seed (Guatemala) S.A.

Dentro de las hortalizas que trabaja está el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el cual es uno de los de mayor importancia, producción y consumo a nivel mundial. Se cultiva en más de cien países tanto para consumo fresco como industrial. En Guatemala la producción de tomate se ha convertido en una actividad de alto costo debido a la presencia de enfermedades y plagas que atacan a las plantas, ocasionando pérdidas económicas para los agricultores (Duque 2008).

El programa de mejoramiento del cultivo de tomate tiene como objetivo principal proveer a los agricultores con híbridos de tomate de alto rendimiento, calidad y paquete de resistencias a enfermedades.

A través del diagnóstico se identificó que dentro del programa de mejoramiento se encuentran cinco áreas de investigación, siendo estas: el desarrollo de líneas parentales, este proceso dura aproximadamente cuatro años para que estabilizar las líneas; el desarrollo de híbridos, a partir de las líneas parentales estables este proceso dura seis meses; la evaluación de híbridos, esta puede ser híbridos desarrollados en otros países o bien híbridos desarrollados dentro del país, se identifican las características agronómicas y genéticas deseadas y la adaptación del material al ambiente; la introgresión de genes de resistencia a materiales parentales, el tiempo que tarda este proceso depende de la cantidad de genes que se pretendan retrocruzar; la evaluación de resistencia y/o tolerancia a enfermedades, la cual se realiza en diferentes parcelas experimentales dentro del país, en época seca y en época lluviosa.

## 1.2 Marco Referencial

### 1.2.1 Localización geográfica

#### A. Oficinas centrales

Está ubicada en el municipio de Santa Lucía Milpas Altas el cual se encuentra localizado en la región central de Guatemala, y ubicado en el departamento de Sacatepéquez con coordenadas geográficas en latitud de 14°34'35" y longitud de 90°40'40", a una altura que oscila entre 1970 metros sobre el nivel del mar (SEGEPLAN 2010).

#### B. Finca Santa Teresa

Se ubica en la Aldea San Bartolomé Becerra en el Municipio de Antigua Guatemala del Departamento de Sacatepéquez. La aldea se ubica al sur poniente de la Antigua Guatemala a 2 kilómetros. Se localiza en el Valle de Panchoy, a una latitud de 14°33'20", y longitud 90°43'54" oeste meridiano Greenwich, a 1,530 metros sobre el nivel del mar, ocupa una extensión de 78 kilómetros cuadrados. Está limitado al norte por los municipios de Jocotenango y San Bartolomé Milpas Altas; al este por San Bartolomé, Santa Lucía Milpas Altas y Santa María de Jesús y al oeste por San Antonio Aguas Calientes, Ciudad Vieja y Santa Catarina Barahona; todos municipios de Sacatepéquez. Se localiza a 45 kilómetros de la ciudad capital (Avendaño 2006) (figura 1).



Figura 1. Finca Santa Teresa, Antigua Guatemala

Fuente: M. Castañeda, 2015

Las condiciones climáticas del lugar son:

- a. Temperatura: el clima en el departamento de Sacatepéquez es templado, con una temperatura promedio durante el año es de 17 a 18°C. La temperatura mínima en el año se da en el mes de enero siendo de 12°C, y la máxima en marzo y abril de 25°C.
- b. Precipitación pluvial: los meses de invierno en la ciudad son de mayo a octubre, las lluvias más fuertes se dan en agosto y septiembre. Enero, febrero, marzo, abril, noviembre y diciembre son por lo general secos. La precipitación promedio anual es de 1,100 a 1,400 mm, con un promedio de 83 días de lluvia al año.
- c. Humedad relativa: la humedad relativa es de 75%

### C. Finca El Común

Se ubica en el Municipio de Sanarate del Departamento de El Progreso. Según el Censo XI de Población realizado por el INE (2002) el Municipio de Sanarate es uno de los 8 municipios, que conforman El Progreso el cual pertenece a la Región III o Región Nor-Oriental, cuenta con 156 poblaciones entre caseríos, pueblos, parajes, aldeas y fincas, ocupa el segundo lugar en población y el tercero en extensión 8273 Km<sup>2</sup> y ocupa el 14 % del territorio de El Progreso, su localización geográfica es 14°47'12" de Latitud y 90°0'2" de Longitud y sus colindancias político administrativas son: al norte con el municipio de Morarán (El Progreso) y Salamá (Baja Verapaz), al sur con Jalapa, al oeste con el municipio de San Antonio La Paz ( El Progreso), los municipios de San José El Golfo y Chuarrancho (Guatemala), su altura sobre el nivel del mar según el banco de marca ubicado en la estación del ferrocarril es de 812.68 metros sobre nivel del mar que es la altura a la que se encuentra la mayoría de la cabecera municipal (figura 2).



Figura 2. Finca El Común, Sanarate, El Progreso.

Fuente: M. Castañeda, 2015

En lo que respecta al clima de Sanarate, según la clasificación climática de “Thornwaite”, la clasificación de la mayoría del municipio es: B'b'Di, esto quiere decir: temperatura: Semi-Cálido, con variaciones de la temperatura con invierno benigno y jerarquía de humedad con carácter de clima seco, con estepa como vegetación natural característica, con invierno seco como tipo de distribución de la lluvia.

#### D. Finca El Corozo y Finca Santa Cruz.

Se ubican entre las aldeas Santa Cruz y Pasabien en el Municipio de Rio Hondo del Departamento de Zacapa. Tiene una extensión Territorial: 422 kilómetros cuadrados, Altitud: 500 a 600 metros sobre el nivel del mar, Longitud: 89°, 35', 06" Longitud Oeste del meridiano de Greenwich, Latitud: 15°, 02', 36" Latitud Norte; Colindancias: Limita al Norte con el municipio de El Estor (Izabal), y el municipio de Panzós (Alta Verapaz), tiene de por medio la cadena montañosa de la Sierra de Las Minas; al Sur con el municipio de Zacapa (Zacapa) y Estanzuela (Zacapa), media entre los dos municipios el Río Motagua; al Oeste con el municipio de Teculután

(Zacapa), tiene como línea divisoria la Quebrada Barranca Seca; y al Este con el municipio de Gualán (Zacapa). Un diagnóstico realizado por la Municipalidad de Rio Hondo, la humedad relativa oscila entre 60 y 72%. La precipitación registrada al año es de 600 a 800 milímetros (Roldan 2006) (figura 3).



Figura 3. Finca El Corozo

Fuente: M. Castañeda, 2015

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 General

Diagnosticar la situación actual del programa de mejoramiento genético de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la empresa East-West Seed (Guatemala).

#### 1.3.2 Específicos

1. Identificar las áreas del programa de mejoramiento genético de tomate.
2. Describir el proceso productivo para la obtención de un híbrido de tomate comercial.

## 1.4 Metodología

### 1.4.1 Fase de gabinete inicial

En esta fase realizó a través de la consulta de fuentes bibliográficas y entrevistas a las personas del departamento de investigación de la empresa con el objetivo de adquirir conocimiento acerca de las actividades que se realiza la empresa y el lugar donde estas se llevan a cabo.

### 1.4.2 Fase de campo

Esta fase consistió en un recorrido por las instalaciones de la empresa iniciando por las oficinas centrales, realizando entrevistas a las personas encargadas del departamento de investigación, para recabar información sobre antecedentes de las actividades de mejoramiento genético en la empresa. Se realizó una visita guiada por las fincas de la empresa siendo estas:

- Finca Santa Teresa
- Finca El Común
- Finca El Corozo
- Finca Santa Cruz

### 1.4.3 Segunda fase de gabinete

Dentro de esta fase se indagó acerca de las áreas que están dentro del programa de mejoramiento genético de tomate en la empresa en los últimos años y se identificaron los siguientes:

- Desarrollo de líneas parentales de tomate
- Desarrollo de híbridos de tomate
- Evaluación de híbridos de tomate
- Introgresión de genes de resistencia a materiales parentales de tomate
- Evaluaciones de resistencia o tolerancia a enfermedades en plantas de tomate

### 1.4.4 Análisis de información

Se compiló la información obtenida en el campo para su análisis, se elaboró un listado de principales actividades realizadas dentro del programa de mejoramiento genético de

tomate para detectar posibles complicaciones y sugerir cambios útiles para mejorar el programa.

#### 1.4.5 Fase de gabinete final

En esta fase se elaboró el presente documento, con toda la información recopilada en las fases anteriores.

### 1.5 Resultados

#### 1.5.1 Áreas del programa de mejoramiento genético de tomate

Dentro del programa de mejoramiento genético del tomate, se tienen cinco áreas siendo estas:

1. Desarrollo de líneas parentales
2. Desarrollo de híbridos
3. Evaluación de híbridos
4. Introgresión de genes de resistencia a materiales parentales
5. Evaluación de resistencia o tolerancia de plantas de tomate a enfermedades.

##### 1.5.1.1 Desarrollo de líneas parentales

Esta es la primera parte del programa de mejoramiento, donde se hacen los cruzamientos iniciales para generar líneas parentales a través de tiempo en generaciones filiales ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ , ..., etc.). En cada generación se aplica una selección para obtener líneas parentales con caracteres deseables de parentales iniciales. Este proceso lleva 4 años, realizando dos ciclos anualmente.

##### 1.5.1.2 Desarrollo de híbridos

En el desarrollo de híbridos se cumplen dos pasos esenciales. Primero, se combinan los caracteres deseados de diversas plantas de tomate y para desarrollar líneas parentales. Segundo, se usan esas líneas parentales y se cruzan para la producción de híbridos experimentales. Las fases para esta parte del programa son las siguientes:

- a. Selección de parentales
- b. Preparación de semilleros
- c. Preparación del terreno

- d. Trasplante y manejo del cultivo
- e. Polinización
- f. Cosecha de frutos
- g. Extracción de semilla
- h. Tratamiento de semilla
- i. Secado de semilla

#### 1.5.1.3 Evaluación de híbridos

Después del desarrollo del híbridos  $F_1$ , se realizan ensayos en las diferentes fincas de la empresa observar su adaptabilidad en comparación con las variedades que están actualmente en el mercado. Esta parte del programa tiene una duración de tres a cuatro años. Las fases de la evaluación de híbridos son las siguientes:

- a. Semilla de híbridos
- b. Preparación de semilleros
- c. Preparación del terreno
- d. Trasplante y manejo del cultivo
- e. Observación de híbridos
- f. Evaluación de rendimientos
- g. Evaluación de comportamiento en campo

#### 1.5.1.4 Introgresión de genes de resistencia a materiales parentales

Esta parte del programa permite obtener a medio plazo genotipos con resistencias deseadas sin comprometer las características morfológicas de las plantas. Las fases de esta parte del programa de mejoramiento son las siguientes:

- a. Semilla de híbridos
- b. Preparación de semilleros
- c. Preparación del terreno
- d. Trasplante y manejo del cultivo
- e. Identificación de genes de resistencia (se realiza en Hortigenetics Research (S.E. Asia) Limited)

#### 1.5.1.5 Evaluaciones de resistencia y/o tolerancia a enfermedades

Dentro del programa de mejoramiento se pretende que los híbridos y/o líneas presenten resistencia o tolerancia a enfermedades siendo estas:

- Verticillium raza 1
- Fusarium razas 1, 2, y 3
- Peca bacteriana
- Virus del bronceado del tomate o TSWV
- Virus de mosaico del tabaco o TMV / Virus del mosaico del tomate o ToMV
- Nematodo del nudo de la raíz.
- Marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum*
- Virus del rizado amarillo del tomate o TYLCV

Las fases de la evaluación de resistencia o tolerancia a enfermedades son las siguientes:

- a. Selección de resistencia a evaluar
- b. Ubicación de terreno
- c. Semilla de híbridos y/o líneas puras
- d. Semilleros
- e. Preparación de terreno
- f. Trasplante y manejo del cultivo
- g. Identificación de la presencia de determinado marcador genético
- h. Evaluación de resistencia o tolerancia

#### 1.5.2 Proceso productivo para la obtención de un híbrido comercial

El proceso para obtener un híbrido de tomate comercial dentro del programa de mejoramiento genético de la empresa East-West Seed (Guatemala) es el siguiente:

- a. Interés por obtener un nuevo híbrido comercial

Se realiza un sondeo en el mercado para identificar cuáles son las características morfológicas y genéticas que están demandando los agricultores actualmente para hacer una proyección a futuro del híbrido a desarrollar en los siguientes cuatro años.

b. Desarrollo y/o uso de líneas que tengan las resistencias y características deseadas para evaluar su aptitud combinatoria

a) Línea (s) en existencia: se selecciona la (s) líneas del interés del investigador con características deseadas (buen rendimiento, color deseado de la fruta, tamaño de frutos, firmeza, plantas vigorosas, vida de anaquel) y con genes de resistencia (*Verticillium sp.* (Ve), Resistencia a Begomovirus (Ty1 y Ty3), Nematodo *Meloidogyne sp.* (Mi), Spotted wild (Sw5), Virus del mosaico del tabaco TMV (Tm2a), *Fusarium oxysporum* (I2 y I3)).

b) Línea (s) nueva (s): para obtener líneas nuevas se realizan numeras autofecundaciones, en el caso de las plantas autógamas esto ocurre naturalmente como lo es en su mayoría en tomate. Después se obtienen las semillas y se seleccionan las plantas que expresan los caracteres de interés y se siembran nuevamente, luego se repite el proceso anterior. Para obtener una línea pura (altamente homocigota para los caracteres de interés) pasan varias generaciones hasta llegar a un alto grado de consanguinidad (ASA 2015). Este proceso aproximadamente dura 4 años para alcanzar la F8, debido a que cada año se hacen dos ciclos.

c. Ensayos de campo

Después de seleccionar las líneas que presentan mayor aptitud combinatoria se eligen para la creación del híbrido los cuales son probados en ensayos de campo en diferentes localidades para determinar cuáles son los que pueden llegar a ser comerciales, siendo estos ensayos los siguientes:

a) HOT: Hybrid observation trial (ensayo de observación de híbrido)

El mejorador de tomate es el encargado de la evaluación de este primer ensayo en el cual se realizan cruces utilizando las líneas de interés del mejorador, el ensayo debe llevarse a cabo en al menos tres localidades representativas de las condiciones para las que se quiere el híbrido de tomate. Esta etapa se realiza las

fincas de la empresa y con el manejo que el mejorador proponga y se pueden llegar a evaluar aproximadamente 200-300 híbridos, de los cuales se descartan todos aquellos que no tengan buenas características para el mercado para el que están siendo desarrollados. Los híbridos seleccionados resultan entre un 10 a 20% y son los que pasan a la siguiente etapa. Este ensayo se divide en dos siendo estos:

- HOT-1: se realiza durante la época seca o lluviosa.
- HOT-2: se realiza durante época diferente al HOT-1.

b) RYT: Replicated yield trial (ensayo replicado de rendimiento)

El mejorador de tomate es el encargado de la evaluación de este segundo ensayo el cual se realiza en al menos tres localidades representativas. En esta etapa se evalúan los híbridos que han avanzado de la etapa HOT y como su nombre lo indica se toman datos de rendimiento y otras características deseadas más específicas, este ensayo se realiza dentro de las fincas de la empresa y con el manejo propuesto por el mejorador. Este ensayo se divide en dos siendo estos:

- RYT-1: se realiza durante la época seca o lluviosa.
- RYT-2. se realiza durante la época diferente al RYT-1

c) PDS: Product developed support (producto desarrollado de apoyo)

El mejorador de tomate junto con el equipo de ventas son los encargados de la evaluación de este ensayo. Se evalúa el comportamiento del híbrido en al menos 3 lugares representativos de zonas productoras, los ensayos se ubican en las fincas de agricultores de las zonas y son evaluados con los manejos utilizados por ellos. Este ensayo se divide en dos siendo estos:

- PDS 1: se realiza durante la época seca o lluviosa
- PDS 2: se realiza durante la época diferente al PDS-1

d) MI: Market introduction (Introducción al mercado)

El equipo de ventas es el encargado de la introducción del híbrido al mercado nacional e internacional. Se realiza el establecimiento de ensayos finales para ser mostrados en días de campo a agricultores nacionales e internacionales.

## 1.6 Conclusiones

1. El programa de mejoramiento genético de tomate está dividido en cinco áreas siendo estas: desarrollo de líneas parentales, desarrollo de híbridos, evaluación de híbridos, introgresión de genes de resistencia a materiales parentales, evaluación de resistencia o tolerancia a enfermedades.
2. El proceso productivo para obtener un híbrido comercial consta de cuatro fases: ensayo de observación de híbrido; ensayo replicado de rendimiento; producto desarrollado de apoyo; introducción a mercado. Las primeras tres fases se dividen a su vez en dos observaciones, una realizada en época seca o lluviosa y la otra realizada en el semestre siguiente. La fase final es la introducción del híbrido al mercado nacional e internacional, dependiendo las características del mismo.

## 1.7 Recomendaciones

Debido a que identificaron varias problemáticas dentro del problema de mejoramiento las cuales son: la caracterización de *Phytophthora infestans* en tomate (*Solanum lycopersicum*) en lugares productores de tomate en todo el país, Introgresión de genes de resistencia a líneas parentales de (*Solanum lycopersicum*) usando el método de retrocruza. Lo cual ayudarían al desarrollo de líneas e híbridos con otras características que permitirán una mejor competencia dentro del mercado del cultivo de tomate, por lo que se recomienda llevar a cabo dichas investigaciones.

## 1.8 Bibliografía

1. ASA (Asociación Semilleros Argentinos). 2015. Fito mejoramiento: mejoramiento de especies para aprovechar la heterosis (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 20 mayo 2015. Disponible en <http://asabiotecnologia.com.ar/fitomejoramiento>.
2. Avendaño, M. 2006. Lineamientos para un esquema de desarrollo y ordenamiento territorial del sistema de aldeas que conforman el municipio de La Antigua Guatemala. Tesis MSc. Barcelona, España, Universidad Politécnica de Cataluña. 59 p.
3. Duque, C. 2008. Manejo agronómico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en casa malla, bajo las condiciones de Monjas, Jalapa; caso empresa mosca blanca. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 77 p.
4. INE (Instituto Nacional de Estadística, GT). 2002. XI censo de población y VI de habitación. Guatemala. 1 CD.
5. Municipalidad de San Francisco, Petén, GT. 2001. Censo sociodemográfico de áreas urbanas y rurales del municipio de San Francisco. Guatemala. 12 p.
6. Roldan, E. 2006. Historia del municipio de Río Hondo departamento de Zacapa. Tesis MSc. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades. 143 p.
7. SEGEPLAN (Secretaria General de Planificación y Programación, GT). 2010. Plan de desarrollo de Santa Lucia Milpas Altas, Sacatepéquez, Guatemala. Guatemala. 87 p.
8. Simmons, C; Tárano, J.; Pinto, J. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trad. Pedro Tirado Sulsona. Guatemala, José de Pineda Ibarra. 987 p.

CAPÍTULO II: Evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en tres familias de poblaciones segregantes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo las condiciones de la finca El Corozo en Zacapa, Guatemala, CA.

Evaluation of the resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith in three families of segregating tomato (*Solanum lycopersicum* L.) population under the conditions of El Corozo farm in Zacapa, Guatemala, CA.

## 2.1 Presentación

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más cultivadas en todo el mundo. Sin embargo la producción de tomate está afectada por muchas limitaciones de producción, una de estas es la marchitez bacteriana la cual es una enfermedad causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, que ha estado afectando la producción del cultivo en todo el mundo. En Guatemala se han realizado estudios uno de ellos por Sánchez et al. 2008 constatando la presencia de la bacteria en zonas productoras de tomate por diferentes áreas del país.

Una de las zonas productoras de tomate donde ya pocos productores se atreven a sembrar es la región aledaña a la Finca El Corozo parte de la empresa East-West Seed (Guatemala), S. A. ubicada en Pasabién en el municipio de Río Hondo, Zacapa. Por este motivo, en abril del 2014 se estableció en esta finca una parcela comercial del híbrido 2117, resistente a marchitez bacteriana. Sin embargo, debido a la alta mortandad presente en la parcela, esta debió ser abandonada. Según análisis fitopatológicos se determinó la presencia del patógeno *Ralstonia solanacearum* E, F. Smith en la finca. El híbrido 2117 proviene del cruce de dos líneas parentales seleccionadas en la bajo la presencia de la bacteria *R. solanacearum*, la cual fue identificada como Filotipo I, Sequevar 14 (también conocida como Raza 1, Biovar 3), la cuál ha sido aislada en las principales áreas productoras de tomate del país (Sánchez et. al. 2008). Este resultado inesperado podría atribuirse a la que las condiciones climáticas del lugar pudieran haber conducido a un ataque más virulento por parte del patógeno, quebrando la resistencia.

La situación anterior condujo a plantear la presente investigación, donde se utilizaron para el efecto poblaciones segregantes provenientes de tres familias diferentes, resistentes a la marchitez bacteriana en una parcela experimental en la Finca El Corozo, en el mismo sitio en el que el híbridos 2117 había sido eliminado. La lógica detrás del experimento era que en una población segregante, al menos algunos de los individuos sobrevivirían bajo las condiciones el lugar, relacionando la sobrevivencia de las plantas con características morfológicas deseadas con la presencia de genes de resistencia al patógeno.

El ensayo se estableció en el mes de abril del año 2015, evaluándose las poblaciones segregantes de las tres familias. Las tres familias provenientes de tres híbridos, GT-5230,

GT-5188 y GT-5215, con resistencia a la marchitez bacteriana y en previos estudios se determinó mediante pruebas moleculares, realizadas a las líneas progenitoras, que estos tienen presente el marcador molecular BW12. De la primera familia se evaluaron 6 poblaciones segregantes, de la segunda familia 8 y de la tercera familia 10. Cada unidad experimental constó de 10 plantas con tres repeticiones para un total de 72 unidades experimentales, se utilizó un modelo experimental jerárquico o anidado desbalanceado. Se colocaron controles susceptibles y resistentes, el control susceptible fue el híbrido GT-4830 (nombre comercial Patrón), el cuál no presenta resistencia al patógeno de estudio y el control resistente fue la variedad GT-5076 (el cultivar Hawaii 7996), estos para constatar la presencia de la bacteria en la parcela.

En el Centro Asiático de Investigación y Desarrollo de Hortalizas (AVRDC) se han desarrollado marcadores los cuales permitieron identificar la presencia de estos dos grupos de genes (Wang et. al. 2013). La resistencia a la marchitez bacteriana en el tomate es considerada una característica cuantitativa compleja, controlada por varios genes. Se han identificado dos loci de rasgos cuantitativos por sus siglas en ingles QTL's (quantitative trait loci) con fuerte efecto sobre la resistencia, estos están localizados en los cromosomas 6 y 12.

Como resultado del estudio se determinó que la cepa bacteriana presente en la parcela experimental es la misma encontrada en el área oriental de país donde se cultiva tomate, siendo esta identificada como Filitipo I, Sequevar 14. En cuanto a las tres familias evaluadas según análisis estadístico la mejor fue la familia 1 teniendo sus poblaciones segregantes una mayor sobrevivencia en campo y por lo tanto mayor resistencia frente al patógeno, sin embargo no existe diferencia significativa entre todas las poblaciones segregantes de esta familia. La mayoría de las poblaciones que presentaron resistencia en campo a la bacteria tienen la presencia del marcador BW12, sin embargo cuatro poblaciones no presentan el marcador indicando esto que el marcador no parece estar involucrado en la expresión de la resistencia bajo las condiciones del experimento.

## 2.2 Marco Teórico

### 2.2.1 Marco Conceptual

#### 2.2.1.1 Importancia del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate es originario de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú y Ecuador (Esquinas 1981). Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. El nombre de tomate procede del náhuatl xictli, ombligo y tomatl, tomate, que significa tomate de ombligo (SFA 2010). En Guatemala y el mundo el cultivo de tomate es una de las hortalizas de importancia, mayor producción y consumo, debido a que forma parte de la dieta alimentaria de las personas por su sabor y alto valor nutricional, conteniendo cantidades considerables de vitaminas y minerales (Villela 1993).

Guatemala es el principal productor de tomate a nivel de América Central, con una producción de 706,130 toneladas en 8,944.64 hectáreas en el año 2013 (DIPLAN 2013). Siendo una de las principales hortalizas cultivada la cual genera mayor número de empleos especialmente en la región de oriente del país, pero debido al incremento de plagas y enfermedades que existe en la actualidad las áreas de siembra han disminuido obligando al agricultor a implementar medidas de control a un alto costo (Lemus 2012). Esto ha contribuido al deterioro del medio ambiente. Los problemas son mayores para enfermedades donde no existe un control químico efectivo y el combate cultural no es utilizado, esto es el caso de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*.

#### 2.2.1.2 Taxonomía del cultivo de tomate

El tomate es una especie dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas, la cual es una de las más grandes e importantes entre las angiospermas. Según Knapp, et al. (2005) el tomate se clasifica de la siguiente manera:

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanácea

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum lycopersicum* L.

### 2.2.1.3 Descripción botánica del cultivo de tomate

Es una planta de porte erecto o semi erecto, arbustivo, cultivo de tipo anual. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas) (SFA 2010).

#### A. Semilla

La semilla de tomate es de forma plana y lenticular con dimensiones aproximadas de 3 x 2 x 1 mm y está constituida por el embrión, endospermo y la cubierta seminal. El embrión está constituido por la yema apical, dos cotiledones, el hipocótilo y la radícula. El endospermo contiene los elementos nutritivos para el desarrollo del embrión. La testa o cubierta seminal está constituida por un tejido duro e impermeable, recubierto de vellosidad, que envuelve y protege el embrión y el endospermo (Nuez 1995).

#### B. Sistema radicular

El sistema radicular del tomate consta de una raíz principal, numerosas raíces secundarias y terciarias. La raíz principal pivotante crece 0.03 m al día hasta que alcanza los 0.60 m (Rodríguez y Medina 2001), sin embargo cuando la planta se propaga mediante trasplante, la raíz principal se ve parcialmente detenida en su crecimiento, en consecuencia favorece el crecimiento de las raíces secundarias laterales las cuales se desenvuelven entre 0.5 y 0.7 m de la capa del suelo (Garza 1985).

#### C. Tallo

Los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de grosor mediano y con tricomas (pilosidades), simples y glandulares. Eje con un grosor que oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando las hojas, tallos secundarios e inflorescencias. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde se inician los nuevos primordios foliares y florales (Monardes 2009).

#### D. Hojas

Las hojas compuestas imparipinadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado en número de 7 a 11 recubiertos de tricomas. Las hojas se disponen

en forma alterna sobre el tallo, están cubiertas por glándulas secretoras de sustancias aromáticas (Rodríguez y Medina 2001).

#### E. Flor

Las flores aparecen en racimos, son pequeñas, pedunculadas de color amarillo de forma estrellada que forman un tubo corto en la base y se abre en un solo plano. El cáliz es verde y de forma de tubo corto terminado en cinco o diez sépalos, verdes pubescentes. Los estambres son de cinco a diez generalmente seis en variedades comerciales, están soldados en estilo único que a veces sobresale de los estambres (Castellanos 2009). La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal, se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión. Las inflorescencias se desarrollan a cada dos o tres hojas en las axilas (Iñiguez 1991).

#### F. Fruto

El fruto es una baya de color amarillo, rosado, anaranjado o rojo debido a la presencia de licopeno o caroteno, siendo el más común el rojo en la madurez. Tiene dos o más lóculos que se desarrollan a partir de un ovario, su forma puede ser redonda, ovalada o pera y con superficie lisa o con pequeños surcos, están compuestos por paredes de pericarpio carnoso desarrollado del ovario, está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene una capa de abscisión (Desai et al. 1997).

##### 2.2.1.4 Requerimientos edafoclimáticos

Temperatura: la temperatura óptima de desarrollo se sitúa en 23°C durante el día y entre 13-17°C durante la noche (SFA, 2010).

Humedad: la humedad relativa oscila entre un 60 y 80% (SFA, 2010).

Luminosidad: según Carpeño (2004) citado por Lemus, A. (2012) el tomate es un cultivo que no lo afecta el fotoperiodo o largo del día, sus necesidades de luz oscilan entre las 8 y 16 horas y valores de radiación diaria en torno a 0.85 MJ/m<sup>2</sup> son los

umbrales mínimos para la floración y cuajado siendo preferible mayor iluminación en menor periodo de tiempo que iluminaciones débiles en periodos más largos.

Suelos: la planta de tomate se puede cultivar en cualquier tipo de suelo, pero se prefieren suelos profundos, margosos (suelos compuestos de arcilla, limo y arena con abundante cantidad de materia vegetal descompuesta) y bien drenados. Lo ideal es un suelo ligeramente ácido, con un pH de 6.2 a 6.8 (SFA, 2010).

#### 2.2.1.5 Materiales genéticos de tomate

Las tres familias (conjunto de individuos provenientes de las mismas líneas parentales) de poblaciones segregantes (individuos genéticamente variables) que se utilizaron para la prueba de resistencia a *Ralstonia solanacearum*, son descendientes de tres híbridos siendo estos: GT-5230, GT-5188 y GT-5215. Los híbridos han sido evaluados en parcelas con presencia de *R. solanacearum* y han demostrado tener resistencia, además que también tienen presente el marcador BW12 en condición heterocigoto.

Las poblaciones segregantes que se utilizaron fueron generaciones filiales 2, 3, y 4. Para la familia 1 se usaron: una F2, dos F3, y cuatro F4; para la Familia 2 se usaron: una F2, tres F3, y cuatro F4; para la Familia 3 se usaron: una F2, cuatro F3, y cinco F4. Así mismo, se utilizaron dos controles para constatar la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en la parcela, uno susceptible GT-4830 (Patrón) el cual es un híbrido comercial que no tiene resistencia al patógeno y el GT-5076 (Hawaii 7996) el cual es un cultivar considerado como la mejor fuente de resistencia a marchitez bacteriana.

#### 2.2.1.6 Agente causal de la marchitez bacteriana

La marchitez bacteriana es una enfermedad que afecta a muchas especies de plantas, más notoriamente de miembros de la familia de las Solanáceas a la cual pertenecen cultivos importantes como el tomate, chile (*Capsicum annuum*), berenjena (*Solanum melongena*) y papa (*Solanum tuberosum*). La enfermedad es causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (antes *Pseudomonas solanacearum*). A diferencia de otros patógenos que atacan a las Solanáceas, para este no se conocen productos químicos que aplicados a las plantas antes o después de la infección por la bacteria, eviten el desarrollo de la enfermedad, esto incluye a los antibióticos, los cuales han mostrado ser inefectivos (FHIA, 2012).

*R. solanacearum* es una bacteria aeróbica, gram negativa, en forma de bacilos o bastones rectos o curvos, con dimensiones de 0.50 - 0.7  $\mu\text{m}$  x 1.5 - 2.5  $\mu\text{m}$  (Agris, 1997), se desplazan por medio de uno o más flagelos polares (Subedi 2015). Sin embargo señaló Buddenhagen (1986), que es heterogénea y es considerada como un complejo de especies que comparten suficientes características morfológicas, genéticas, bioquímicas y patogénicas para considerarlas una misma especie, no obstante, dichas cepas poseen algunas características distintivas que las diferencian entre sí, de las cuales en la práctica la más importante es la habilidad para infectar distintas especies de plantas.

El término complejo de especies fue aplicado por primera vez por Gillings y Fahy (1994) para reflejar la variación fenotípica y genotípica dentro de la especie. Siguiendo esta clasificación Poussier et al. (2000) menciona que los patógenos de la marchitez bacteriana conforman un grupo filogenético heterogéneo con miles de cepas distintas que varían con respecto al intervalo del hospedero, distribución geográfica y fisiología.

#### A. Clasificación taxonómica

A nivel de especie, *R. solanacearum* fue descrita por primera vez como *Bacillus solanacearum* por Smith en 1896. Desde entonces, ha sufrido modificaciones recibiendo denominaciones como *Pseudomonas solanaearum* prevaleciendo por muchos años (Rodríguez 2007). Su clasificación es la siguiente:

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Burkholderiaceae

Género: *Ralstonia*

Especie: *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith

#### B. Síntomas de la enfermedad

La marchitez bacteriana es una enfermedad de tipo vascular, se caracteriza por la invasión primaria de la bacteria *R. solanacearum* a los vasos del tejido del xilema. Se propaga invadiendo internamente el tejido vascular principalmente los vasos de las raíces y el tallo, sin embargo se presenta hasta la parte superior de las plantas infectadas (etapa final de la enfermedad) (Rodríguez, 2007).

Según Subedi, N. (2015) en tomate la enfermedad se puede identificar en campo por los síntomas y signos así como se puede observar en la figura 4 un exudado utilizando la prueba del flujo bacteriano.



Figura 4. Flujo bacteriano de *Ralstonia solanacearum* a partir de un tallo de tomate sumergido en agua

Fuente: M. Castañeda, 2015

Según Subedi, N. (2015) también se encuentran otros síntomas siendo estos:

- a. Flacidez de meristemas y hojas: las plantas afectadas se marchitan y mueren en pocos días bajo condiciones favorables para el patógeno (figura 5).
- b. Hojas dobladas hacia abajo y no hay desarrollo de raíces adventicias: cuando las condiciones no son favorables estos síntomas se desarrollan lentamente.
- c. Ocurre decoloración de haces vasculares: de color amarillo hasta café oscuro.
- d. Exudación bacteriana: esta se observa al realizar un corte transversal al tallo



Figura 5. Plantas susceptibles. A: síntomas de marchitamiento, hojas dobladas hacia abajo. B: Plantas muertas por infección con *R. solanacearum*

Fuente: M. Castañeda, 2015

Cuando *R. solanacearum*, infecta una planta, penetra por el sistema de absorción radicular y entra en el sistema vascular, distribuyéndose a los vasos del tejido del xilema (tubo conductor) de forma vertical u horizontal (Watanebe 2006 citado por Rodríguez, 2007). Produce taponamiento de los conductos, consecuentemente la planta sucumbe ante una falta de hidratación celular, ocasionando de esta forma un marchitamiento vascular y por ende sistémico. Los síntomas son característicos de las plantas jóvenes debido a su periodo de susceptibilidad dentro de los 20 a 25 días después del trasplante o emergencia (Sánchez et. al. 2006).

#### C. Supervivencia de *Ralstonia solanacearum*

La bacteria *R. solanacearum* puede sobrevivir en el suelo (principalmente en resto de cosechas de plantas infectadas), en las raíces y en el suelo (rizosfera) de muchas plantas hospedantes (García et. al. 1999).

El patógeno persiste en el suelo durante varios años e invade al hospedante a través de heridas ubicadas generalmente bajo el nivel del suelo. Las temperaturas favorables para que se desarrolle la enfermedad van desde los 28 °C a los 36 °C (Fernández 1975, Allen 2015). Interactúa específicamente con las raíces de las plantas y de hecho, las concentraciones a las que son encontradas alrededor de las mismas generalmente son numerosas comparado con el resto de suelo. Esto posiblemente refleje la presencia de altos niveles de nutrientes que son encontrados

alrededor de las raíces y que pueden ser utilizadas para el crecimiento y metabolismo bacteriano.

*R. solanacearum*, parece ser una bacteria adaptada a colonizar raíces de plantas como rizobacterias y con una patogenicidad con excepción a la regla que sucede en condiciones edafoclimáticas especiales. Siendo así, la mayoría de las plantas hospederas pueden ser asintomáticas no susceptibles. La difusión de la bacteria se hace por el agua de riego, por el movimiento de suelo contaminado y por el trasplante de plántulas infectadas, aunque no presenten síntomas. Cuando se hace poda de plantas de tomate con tijera o cuchillo, este puede ser vehículo de difusión (Melo, 1995).

Hayward (1991) describe que la temperatura es el factor más importante que afecta la interacción patógeno-hospedero y que el aumento de la temperatura ambiental de 30-35°C durante el día aumenta también la incidencia y la severidad de la marchitez bacteriana, pero no para todas las estirpes del patógeno. En este contexto, las plantas que eran resistentes o moderadamente resistentes pueden tornarse susceptibles a temperaturas más altas, siendo la resistencia, por lo tanto sensible a la temperatura y a la cepa específica. Describe que aún no está claro éste cambio en la resistencia y que se debe al factor virulencia del patógeno que es la expresión de genes de resistencia del hospedero en temperaturas elevadas.

La identificación de las características de comportamiento de las diferentes estirpes del patógeno en relación del hospedero y en función de las diferentes condiciones de temperatura es un aspecto extremadamente importante para los conocimientos epidemiológicos y para las estrategias de control de la marchitez bacteriana. Estas características envuelven no solo los fenómenos de manifestación y de recuperación de la enfermedad que ocurren en las variaciones de temperatura, como también a la sobrevivencia o fluctuación poblacional del patógeno en raíces de diferentes plantas asintomáticas o no susceptibles (Orozco, 1997).

#### D. Clasificación Infraespecifica

La marchitez bacteriana limita la producción de muchos cultivos de importancia económica como la papa, el tomate, el plátano y el tabaco (Kelman, 1953; Buddenhagen y Kelman, 1964; Janse, 1996, Elphistone, 2005). A nivel infra-subespecífico *Ralstonia solanacearum*, ha sido clasificada de acuerdo al hospedero, distribución geográfica, patogenicidad, relaciones epidemiológicas y propiedades fisiológicas (Hayward 1991) siendo esta la siguiente:

Razas: esta clasificación está basada en rango de hospederos, al inicio se suponía eran tres razas según Buddenhagen y Kelman (1964). Actualmente se han identificado cinco razas pero el problema con esta clasificación es que hay alta variación y tiene por lo tanto un uso limitado (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* de acuerdo al rango de hospederos.

Raza	Hospederos
1	Rango de hospedero amplio
2	Banano y otras especies del genero <i>Musa</i>
3	Papa, algunas Solanáceas, Geranio; además de otras especies
4	Jengibre
5	Morera

Fuente: Subedi, N. 2015

Biovar: esta clasificación es de acuerdo a la prueba fisiológica desarrollada por Hayward (1964; 1961), se basa en la capacidad de la cepa para oxidar tres disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa), tres alcoholes hexosa (manitol, dulcitol y sorbitol) y dextrosa como control positivo en todos los biovares (cuadro 2). Sin embargo esta clasificación no es adecuada porque los diferentes biotipos coinciden en el comportamiento y la gama de huéspedes (Allen, C. 2015).

Cuadro 2. Clasificación de *Ralstonia solanacearum*, según biovares

Maltosa	Lactosa	D (+) Celobiosa	Dextrosa	Dulcitol	Sorbitol	Manitol	Biovar
(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	<b>1</b>
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	<b>2</b>
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>3</b>
(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<b>4</b>
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	<b>5</b>

Fuente: Allen, C. 2015

Filotipo: esta clasificación se propuso en 2005 y permite evidenciar como se relaciona las distintas cepas dentro del complejo de especies (Fegan y Prior 2005). Este sistema permitió identificar cuatro grupos principales denominados “filotipos” con base en el análisis de la secuencia del espaciador interno transcrito (ITS) localizado entre los genes 165-235 del ARNr. Con base a estas secuencias, se diseñó una reacción de multiplex-PCR a través de la cual se puede asignar el filotipo a una cepa dada. Los filotipos están relacionados con el origen filogenético y geográfico de las cepas (cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* según filotipos

Filotipo	Descripción
I	Cepas de Asia y Australia
II	Cepas de América
III	Cepas de África
IV	Cepas de Indonesia

Fuente: Allen, C. 2015

Secuevar: esta clasificación está basada en el análisis de secuencia nucleotídica parcial del gel de la endoglucanasa, esta clasificación fue propuesta por Fegan, M., y P. Prior (2005).

Estos diversos sistemas de clasificación propuestos para las cepas de *Ralstonia solanacearum* reflejan la gran variación fenotípica y genotípica dentro de la especie, lo que ha llevado al término “Complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*”, definidos como “un grupo de aislamientos emparentados que presentan más de una especie” (Hayward, 1991). Los nuevos métodos moleculares de clasificación son más específicos porque analizan la secuencia en el ADN directamente y no se basan en características genotípicas más generales (como la utilización de compuestos en medios de cultivo) (Jyothi, H.K. et al., 2012) a nivel del experimento la identificación del patógeno se realizará hasta Secuevar.

#### 2.2.1.7 Marcadores moleculares

Un marcador se refiere a cualquier molécula de ADN de tamaño o peso molecular conocido que está relacionada con la presencia de una característica fenotípica, que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para alguna enfermedad) (Azofeifa, 2006).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en las secuencias nucleotídicas en el ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998 citado por Azofeifa, 2006).

La selección asistida por marcadores (MAS) es un proceso de selección indirecta, mediante el cual se selecciona un rasgo de interés, no en base al propio rasgo, sino que en un marcador ligado a ella. Por ejemplo, si se utiliza MAS para seleccionar individuos con resistencia a una enfermedad, el nivel de la enfermedad no se cuantifica, sino más bien se determina la presencia de un alelo del marcador que está vinculada con la enfermedad. La selección asistida por marcadores puede ser útil para los rasgos que son difíciles de medir, exhiben baja heredabilidad, y / o están expresados tarde en el desarrollo (Jyothi, H.K. et al., 2012).

Los rasgos cuantitativos se refieren a fenotipos que varían en grado y se pueden atribuir a efectos poligénica, es decir, producto de dos o más genes, y su entorno. Loci de rasgos cuantitativos (QTL) son tramos de ADN que contienen o están vinculados a los genes que subyacen a un rasgo cuantitativo. Mapeo de regiones del genoma que contiene genes

implicados en la especificación de un rasgo cuantitativo se realiza utilizando marcadores moleculares como AFLP o, más comúnmente SNPs. Este es un primer paso en la identificación y secuenciación de los genes reales subyacentes al rasgo de variación (Jyothi, H.K. et. al., 2012).

#### 2.2.1.8 Polimorfismo de nucleótido único (SNPs)

El hecho de que en muchos organismos la mayoría de los polimorfismos son el resultado de cambios en una sola posición de nucleótido (mutaciones puntuales), ha llevado al desarrollo de técnicas para estudiar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (Kumar et. al. 2009).

Los marcadores basados en los polimorfismos de nucleótido único (SNP) han ganado rápidamente en popularidad en la genética molecular (Melgar, Sf) durante los últimos años debido a su abundancia en los genomas y su adaptabilidad a los formatos y plataformas de detección de alto rendimiento (Mammadov et. al. 2012). Los procedimientos analíticos requieren información de la secuencia para el diseño de cebadores de PCR específicos de alelo o sondas de oligonucleótidos (Kumar et. al. 2009).

#### 2.2.1.9 Tarjetas FTA (Flinders Technology Associates)

FTA es una tecnología basada en papel, diseñado para recoger y archivar los ácidos nucleicos, ya sea en forma purificada o dentro de muestras prensadas de tejido fresco, después se hace la evaluación de la amplificación por PCR (polymerase chain reaction) en diferentes intervalos de tiempo (ver figura 3).

Según un estudio realizado por Chandrashekara et al. (2012) llamado: método rápido, sensible y fiable para la detección de *Ralstonia solanacearum* usando tarjetas FTA (Whatman), revela que este método es suficientemente sensible para detectar patógenos de plantas con baja población y la presencia de otros organismos no parece disminuir la sensibilidad del ensayo (Geoff et al., 2013 citado por Chandrashekara et. al., 2012), las

tarjetas producen ácidos nucleicos bacterianos de una calidad equivalente a la obtenida con los métodos de extracción química convencional.

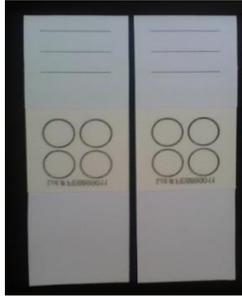


Figura 6. Tarjeta FTA

Fuente: M. Castañeda, 2015

#### 2.2.1.10 Método para la identificación de la cepa de *Ralstonia solanacearum*

El procedimiento usado para identificar la cepa de *Ralstonia solanacearum*, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison es el que se describe a continuación:

De cada muestra almacenada en las membranas de las tarjetas FTA, se corta una pequeña porción y se procede a suspenderlo en 5 ml de agua destilada y posteriormente se distribuye 1 ml de dicha solución sobre medio selectivo CPG o SMSA (ver cuadro 18A) el cual facilita el crecimiento de la bacteria *R. solanacearum* y la presencia de fungicidas y antibióticos inhiben el crecimiento de microorganismos saprofitos. Los medios de cultivo conteniendo las muestras se incuban a 28 °C, durante 72 horas.

##### A. Identificación de la bacteria basándose en su morfología sobre el medio SMSA o CPG

Las colonias que presentaban las características fenotípicas (mucoides, de borde irregular y coloración rojiza) de *R. solanacearum* sobre los medio de SMSA o CPG, se preservan en agua estéril a temperatura ambiente para su posterior caracterización bioquímica y molecular. En el medio las colonias normales virulentas, son lisas, fluidas, irregulares, blancas o levente rojas, en el centro de la colonia y las mutantes avirulentas son completamente opuestas. Las diferencias entre los tipos de

colonias y niveles de virulencia están relacionadas con la presencia y cantidad del mucopolisacárido extracelular que produce la bacteria (Kelman & Sequeira, 1965).

#### B. Aislamiento de ADN de las bacterias aisladas de *Ralstonia solanacearum*

El ADN genómico de la bacteria se aísla de cultivos frescos del patógeno cultivados en medio líquido de CPG, para ello se utiliza el kit de extracción de ADN de Epicentro, utilizando el protocolo propuesto por la empresa proveedora, el cual se resume a continuación:

- Cultivar la bacteria en medio CPG líquido durante 24 horas a temperatura de 28° C en una incubadora con agitación constante de 150 revoluciones por minuto (rpm)
- A un tubo eppendorf de 1.5 ml agregar 1.5 ml de cultivo bacteriano y centrifugar a 8,000 rpm durante 3 minutos.
- Seguidamente descartar el sobrenadante, suspender el precipitado en 600 µl de solución para el lisado de las células (Cell Lysis Solution, Tris (hydroxymethyl) Aminomethane ethylenediamintraacectic acid & sodium dodecyl sulfate).
- Incubar durante una hora a 65 °C.
- Agregar 3 µl de ARNsa, mezclar agitándolo durante 20 segundos.
- Los tubos conteniendo la muestra incubarlos a 37 °C durante 20 minutos.
- Después del periodo de incubación dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Agregar 200 µl de reactivo de precipitación de proteínas (acetato de amonio)
- Mezclar agitando los tubos durante 2 minutos.
- Colocar en el congelador durante 20 minutos.
- Seguidamente, centrifugar los tubos a 12,000 rpm por 6 minutos.
- Se traslada el sobrenadante otro tubo nuevo de 1.5 ml.
- Se agrega 600 µl de isopropanol (para precipitación del ADN)
- Se centrifugan los tubos con las muestras a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- Se elimina el sobrenadante (teniendo precaución para no eliminar el precipitado que se encontraba en el fondo del tubo).

- Agregar 600 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- Se elimina el sobrenadante (teniendo precaución para no eliminar el precipitado que se encuentra en el fondo del tubo).
- Los tubos se colocaran en forma invertida sobre papel mayordomo durante 20 minutos, para secar el ADN extraído y eliminar completamente el alcohol.
- Se agregan 50 µl de solución de hidratación de ADN, y se incuban a 65° C durante una hora con el objetivo de facilitar la re suspensión del ADN
- Las muestras de ADN extraído se almacenan a -20 °C., para su posterior uso durante el proceso de caracterización molecular.

#### C. Determinación molecular de la presencia de *Ralstonia solanacearum*

El ADN aislado de las cepas de *Ralstonia solanacearum* se evalúan mediante la técnica de PCR usando el par de cebadores generales (Opina, 1997) cuya secuencia es la siguiente: 759 (5-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3') y 760 (5'-GTCGCCGTGTCAGCAATGCGGAATCG-3').

Las reacciones son realizadas en tubos de 250 µl, la mezcla de reacción (25 µl volumen total) contiene 30 ng de ADN genómico como molde 1X PCR buffer sin magnesio, 2.5 mM Mg<sup>++</sup>, 0.25 mM de cada nucleotido (ATP, CTP, GTP y TTP, 20 picomol de cada cebador, 1µl de Taq ADN polimerasa. Esta fase se realiza en un termociclador Biorad (MJ research 2000), bajo las siguientes condiciones: un inicio en caliente 96°C durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C , 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C. y finalmente durante 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR son corridas en un gel de agarosa a 1.5% por electroforesis, posteriormente la gel es sumergido en bromuro de etidio para su tinción, las bandas serán visualizadas con luz UV, y fotografiadas para su posterior análisis.

#### D. Identificación molecular de raza de *Ralstonia solanacearum*

Las reacciones se realizan en tubos de 250 µl, usando un par de cebadores específicos para raza 3 (Danial, 2006), cuyas secuencias son las siguientes 630 (5'-ATACAGAATTCGACCGGCAC-3') y 631 (5'AATCACATCCAATTCGCCTACG-3'), la

mezcla de reacción (25 µl total volumen) contenido de 30 ng de ADN genómico como molde, 1X PCR buffer sin magnesio, 2.5 mM Mg<sup>++</sup>, 0.25 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 picomol de cada cebador, 2.5 U de Taq polimerasa. Las condiciones en el programa de PCR son las siguientes: un inicio a alta temperatura a 96 °C durante 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C. La reacción es completada con 5 minutos a 72 °C. Los productos de PCR son visualizados posterior a haber sido corridos en una gel de agarosa de 1.5% por electroforesis; las bandas son visualizadas con luz UV después de su tinción con bromuro de etidio.

#### E. Determinación de Biovares cepas de *Ralstonia solanacearum*

La determinación de los biovares se hace al determinar la habilidad de la bacteria de poder utilizar u oxidar determinados carbohidratos. Veinte ml de cada una de los siguientes soluciones (10 % p/v) como fuente de carbohidratos son utilizados, Dextrosa, Lactosa, Dulcitol y D-manitol; las soluciones se esterilizan a través de filtración y se agregan a 200 ml del medio de Hayward, seguidamente un volumen 2 ml del medio resultante se agrega en cada celda de una placa con múltiples celdas (Multiwell™ Tissue Culture Plate 24 well).

El medio de Hayward sin ningún carbohidrato se utiliza como control negativo. Una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml se prepara para cada una de las cepas. Como control positivo se utilizan las siguientes cepas de *Ralstonia solanacearum* que son obtenidas de la colección de bacterias de la Universidad de Wisconsin-Madison, para biovar 1 (K60), para biovar 2 (UW 551), para biovar 3 (GMI 1000), para biovar 4 (UW 151) y para biovar 5 (UW 373). Cada celda se inocula con 3 µl de la suspensión de bacterias preparadas y posteriormente se incuba a 28 °C durante 3 semanas. Se toman datos a cada 2 días

#### F. Determinación de secuevar de *Ralstonia solanacearum* mediante el análisis de la secuencia del gen de la *Endoglucanasa*

Se amplifica un fragmento de 750 pares de bases del gen de *Endoglucanasa*, para ello se utiliza el siguiente para de cebadores: Endo-F (5'-

ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') y Endo-R (5' GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3'), los demás componentes de la reacción son 1X buffer de *pfu* Polimerasa, 0.25 mM de cada dNTP; 6% DMSO, 20 pmol de cada cebador; 100 ng de ADN como molde y 5U de *Pfu High fidelity* ADN Polimerasa (Poussier, 2000).

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador MJ research 200, bajo las siguientes condiciones: 3 minutos de inicio a temperatura de 96 °C, luego 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 70 °C, 1.5 minutos a 72 °C, con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se examinan por electroforesis usando una gel de agarosa a una concentración de 1.5% y las bandas son visualizadas con luz ultravioleta después de haber sido teñida con bromuro de etidio.

#### G. Clonación de los fragmentos de los genes *Endoglucanasa*

Los productos de PCR obtenidos son clonados en el vector pCR® Blunt II-TOPO (invitrogen™) de acuerdo a las instrucciones de la compañía productora. Después células competentes de DHα5 de *E. coli*, son transformadas con el vector portando el fragmento del gen de la *Endoglucanasa*.

Las células de *E. coli* transformadas se plaquean sobre el medio sólido de Luria Bertani conteniendo el antibiótico Kanamicina a una concentración 25 µg/ml, posteriormente se incuban durante la noche a 37 °C. Al siguiente día se seleccionan las colonias de *E. coli* que potencialmente posean el gen *Endoglucanasa*. Las colonias que presentan una coloración blanca son las que fueron transformadas y las no transformadas presentaban una coloración azul. Se escogen 12 colonias de cada muestra transformada y se realiza un PCR. Las condiciones de PCR son las mismas que se describieron amplificar el fragmento del gen *endoglucanasa*. De las colonias que sean positivas se extrae el ADN de plásmido.

#### H. Procedimiento de secuenciación del gen *Endoglucanasa* de los aislados de *Ralstonia solanacearum*

Con el objetivo de poder determinar la secuencia de los nucleótidos que contiene el gen *Endoglucanasa* de los aislados de *Ralstonia solanacearum*, se secuencia el fragmento del gen de la *endoglucanasa*:

Cada reacción tiene un volumen de 10  $\mu$ l: 0.7  $\mu$ l de Big Dye, 1.5  $\mu$ l de Big Dye buffer, 1  $\mu$ l de los cebadores T7 y SP6 (5 pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de plásmido y agua pura hasta ajustar el volumen de 10  $\mu$ l. La reacción se realiza en un termociclador JM Reseach PCT200, con las siguientes condiciones: 35 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 3 minutos. Seguidamente las muestras se llevan al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison, para su secuenciación. El análisis se realiza usando el programa ARB (<http://www.arb-home.de>). Las secuencias obtenidas combinadas con otras secuencias almacenadas del banco de genes, permite determinar el secuevar de las cepas presentes.

I. Determinación de la presencia del marcador QTL BW12 asociada a la resistencia a la marchitez bacteriana

La metodología para determinar la presencia del marcador molecular BW12 es la siguiente: se toma una pequeña fracción de un milímetro cuadrado de papel filtro el cual contiene la muestra de tejido vegetal, para la determinación de la presencia del marcador BW12 se usa un grupo de 6 cebadores que permiten evaluar la presencia del marcador (Wang et. al., 2013).

Las reacciones de PCR son realizadas en tubos de 250  $\mu$ l, la mezcla de reacción es de un volumen total de 25  $\mu$ l, y contiene el fragmento de la membrana FTA el cual contiene el ADN genómico como molde, 1X PCR buffer sin magnesio, 2.5 mM Mg<sup>++</sup>, 0.25 mM de cada nucleótido (ATP, CTP, GTP y TTP, 20 picomol de cada cebador, 1 $\mu$ l de *Pfu* ADN polimerasa de alta fidelidad. Esta fase se realiza en un termociclador Biorad bajo las siguientes condiciones: un inicio en caliente 94° C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C , 45 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C. y finalmente durante 10 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR son corridas en un gel de agarosa a 1.5% por electroforesis, posteriormente la gel es sumergido en bromuro de etidio para su tinción, las bandas son visualizadas con luz UV, y fotografiadas para su posterior análisis. La presencia de 6 bandas generadas por los cebadores es un indicativo de que las plantas son portadores del marcador BW 12 asociado a la resistencia a la marchitez bacteriana.

## 2.2.2 Marco referencial

### 2.2.2.1 Ubicación

#### A. Localización geográfica

El Municipio de Río Hondo está ubicado en el Departamento de Zacapa, cuenta con una extensión territorial de 458.09 kilómetros cuadrados, se encuentra a una altitud de 184 metros sobre el nivel del mar, entre sus coordenadas geográficas: 89°35'06" longitud Oeste del meridiano de Greenwich y 15°02'36" de Latitud Norte (SEGEPLAN, 2010). Limita al Norte con el municipio de El Estor (Izabal), y el municipio de Panzós (Alta Verapaz), tiene de por medio la cadena montañosa de la Sierra de Las Minas; al Sur con el municipio de Zacapa (Zacapa) y Estanzuela (Zacapa), media entre los dos municipios el Río Motagua; al Oeste con el municipio de Teculután (Zacapa), tiene como línea divisoria la Quebrada Barranca Seca; y al Este con el municipio de Gualán (Zacapa) (Roldan, E. 2006). La finca El Corozo se encuentra ubicada entre las aldeas Santa Cruz y Pasabien en el municipio de Río Hondo, departamento de Zacapa.

#### B. Condiciones climáticas del lugar

Como es propio del departamento de Zacapa el clima del municipio de Río Hondo es cálido en las partes bajas (el valle), y templado en la parte montañosa, cuenta con dos épocas definidas: lluviosa y seca.

Según Roldan, E. (2006) un diagnóstico realizado por la Municipalidad de Río Hondo, la humedad relativa oscila entre 60 y 72%. La precipitación registrada al año es de 988.57 milímetros (INSIVUMEH, 2005). Para el municipio de Río Hondo la temperatura media anual es de 22.50 °C la temperatura máxima 30.75 °C y la temperatura mínima 17.50 °C (SEGEPLAN, 2001).

Independientemente de su altura sobre el nivel del mar, el municipio de Río Hondo tiene un clima menos caluroso que otros municipios (Zacapa, Estanzuela, Huité y Cabañas), lo que se debe a las características descritas. En esto influye su posición fronteriza con la Sierra de Las Minas, sus ríos y abundante vegetación, que permite sentir la presencia de las corrientes de aire fresco. La zona de vida a la que pertenece está clasificada como Monte Espinoso Subtropical (Roldan, E. 2006).

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo General

Evaluar la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en tres familias de poblaciones segregantes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de la Finca El Corozo en Zacapa.

### 2.3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar la cepa de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith presente en las plantas de tomate infectadas.
2. Seleccionar plantas de tomate resistentes a la cepa de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith presente en la parcela y con características morfológicas adecuadas para el mercado guatemalteco.
3. Determinar cuál de las tres familias evaluadas presenta la mayor proporción de sobrevivencia a *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith bajo las condiciones del experimento
4. Verificar la presencia del marcador molecular BW 12 en las plantas sobrevivientes seleccionadas, para establecer su relación con la resistencia bajo las condiciones del experimento.

## 2.4 Hipótesis

Existe diferencia estadística significativa entre las poblaciones segregantes de tomate de las familias evaluadas así como se espera un comportamiento diferenciado entre cada familia en cuanto a la proporción de sobrevivencia a la presencia de *Ralstonia solanacearum* bajo las condiciones de la finca El Corozo, Rio Hondo, Zacapa.

## 2.5 Metodología

### 2.5.1 Tratamientos evaluados

Se evaluaron tres familias de poblaciones segregantes de plantas de tomate las cuales se describen en el cuadro 4.

Cuadro 4. Descripción de tratamientos evaluados

	Tratamiento	Descripción	
		Código	Población
<b>Familia 1</b>	T1	GT-4250	F2
	T2	GT-4986	F3
	T3	GT-4986	F3
	T4	GT-5693	F4
	T5	GT-5693	F4
	T6	GT-5693	F4
<b>Familia 2</b>	T7	GT-4254	F2
	T8	GT-4992	F3
	T9	GT-4992	F3
	T10	GT-4992	F3
	T11	GT-5699	F4
	T12	GT-5699	F4
	T13	GT-5699	F4
	T14	GT-5700	F4
<b>Familia 3</b>	T15	GT-4296	F2
	T16	GT-4974	F3
	T17	GT-4974	F3
	T18	GT-4974	F3
	T19	GT-4975	F3
	T20	GT-5715	F4
	T21	GT-5715	F4
	T22	GT-5715	F4
	T23	GT-5716	F4
	T24	GT-5716	F4

#### 2.5.1.1 Descripción de los tratamientos

Se usaron plantas de tomate de tres familias diferentes, las poblaciones de plantas de las familias derivan de híbridos que presentan resistencia a *Ralstonia solanacearum* siendo estos: GT-5230, GT-5188 y GT-5215. Se determinó que estos parentales tienen el

marcador BW12 en condición heterocigota. Por lo tanto, el marcador BW12 se encuentra segregando en los individuos pertenecientes las familias. Dentro de cada familia se evaluarán diferente número de poblaciones siendo estas 6, 8 y 10 respectivamente. En cada familia hay una población F2, las poblaciones F3 son diferente número siendo estas: 2, 3, 4 respectivamente en cada familia. Las poblaciones F4 están distribuidas de la manera: 3, 4 y 5 respectivamente en cada familia. Todas estas poblaciones fueron seleccionadas en una parcela experimental ubicada en San Francisco, Petén, bajo presión de infección por *Ralstonia solanacearum*.

Se usaron dos controles (testigos) uno resistente y otro susceptible al patógeno, para constatar la presencia de la bacteria en la parcela. El control resistente GT-5076 es la variedad Hawaii 7996. El control susceptible GT-4830 (híbrido comercial Patrón), el cual no es resistente a marchitez bacteriana y no contiene el marcador BW12, según análisis realizados en el laboratorio de Hortigenetics Research, en Chiang Mai, Tailandia.

Las características de calidad de planta deseadas dentro del programa de mejoramiento se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Características morfológicas deseadas en las plantas de tomate

<b>Características</b>	<b>Medición</b>
Vigor de planta	Grosor del tallo
Peso de fruto	90-120 g
Color de fruto	Rojo intenso
Firmeza de fruto	Firme al tacto*

\*Un fruto con firmeza baja es el que al presionarlo, la cascara sufre un rasgado y quedan las marcas de los dedos sobre ella. Frutos con firmeza intermedia son los que al presionarlo sufre la cascara un leve hundimiento. Un fruto firme es el que al ser presionado no presenta hundimiento ni rasgado.

## 2.5.2 Manejo del experimento

### 2.5.2.1 Fase de campo

#### A. Delimitación del área de trabajo

Consistió en la ubicación del terreno donde se estableció el experimento

#### B. Preparación del terreno

- Limpia y desmalezado del terreno: consistió en la eliminación de plantas voluntarias que no eran de interés en la investigación con aplicación del herbicida Paraquat.
- Preparación de surcos: consistió en la elaboración de camellones, dejando una distancia entre cada uno de 0.90 m (figura 7).



Figura 7. Preparación del terreno

Fuente: M. Castañeda, 2015

#### C. Preparación de semillero

El semillero fue elaborado 35 días antes del trasplante por servicio de Pilonos de Antigua, S.A. Donde se utilizaron bandejas de duroport de 252 celdas debidamente desinfectadas con agua más cloro a razón de 18.5 cm<sup>3</sup> de cloro con una pureza del 5.20% por litro de agua. Se colocó una semilla de cada material de tomate en cada celda de la bandeja, luego se colocó dentro del germinador (habitación con condiciones de humedad y temperatura controlada), luego se trasladaron las bandejas al invernadero.

#### D. Trasplante de las plantas

Consistió en el establecimiento de la plántula al campo definitivo a los 35 días después de la siembra de almácigo a un distanciamiento de 0.40 m entre plantas y 0.9 m entre surcos.



Figura 8. Establecimiento de plantas en campo Finca El Corozo

Fuente: M. Castañeda, 2015

#### E. Fertilizaciones

Consistió en la aplicación de la fuente de nutrientes en forma granulada siendo estos por su nombre comercial: Blaukorn, 15-15-15, Nitrato de Potasio y Muriato de Potasio; y aplicaciones foliares con Zinc Boro y Calcio Boro.

#### F. Método de riego

Se usó el método de riego por goteo. Consistió en la aplicación de una lámina de agua de 9 mm a las plántulas por el sistema de riego por goteo con una frecuencia de 3 días. Debido a las condiciones de alta temperatura del lugar el riego se realizó por las noches.

#### G. Tutorado

Consistió en la práctica en la cual se colocó tutores (varas de bambú) y rafia la cual le dio sostén a las plantas.

#### H. Control de plagas y enfermedades

Se aplicaron insecticidas siendo estos por su nombre comercial: Eviset, Cinta Negra, Muralla, Potenza. Y se realizó aplicación del fungicida Prevalor el día del trasplante.

#### I. Muestreos

Se realizaron tres muestreos de plantas, el primero fue a los 20 días después del trasplante, el segundo a los 45 días y el último en la cosecha a los 75 días después del trasplante. Los muestreos se realizaron a cada una de las plantas dentro de la parcela.

#### J. Identificación de posibles plantas resistentes

A los 20 días del trasplante se realizó el primer muestreo identificando las plantas que no presentaron síntomas aparentes de marchitez bacteriana, a cada planta sin síntomas se le colocó una cinta color rosado para su identificación en campo.

#### K. Revisión de posibles plantas resistentes

A los 45 días después del trasplante se reevaluaron las plantas identificadas con anterioridad que no presentaron síntomas y a las que siguieron sin presentar síntomas se quedaron con la cinta de identificación.

#### L. Cosecha de frutos de tomate de plantas resistentes

En la cosecha (75 días después del trasplante) se colectaron en bolsas transparentes plásticas identificadas, los frutos de las plantas que presentaron resistencia a marchitez bacteriana durante todos los muestreos, y luego se procedió a la extracción de semilla.

#### M. Extracción de semilla

De los frutos de las plantas de tomate sobrevivientes (y con buenas características agronómicas) se extrajo la semilla. La extracción de semilla se realizó manualmente de acuerdo con el procedimiento utilizado por la empresa, este consiste en el cortando los tomates en dos partes, luego se extrajo la semilla que estaba adherida a la pulpa y se colocó dentro de un recipiente plástico en el que se llevó a cabo el proceso de fermentación por 12 horas para favorecer el desprendimiento de la pulpa y la separación de la semilla, se eliminó el sobrenadante y se agregó ácido clorhídrico (HCl) 2% (v/v) por quince minutos, después se lavó con agua potable, luego se agregó fosfato trisódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) al 10% por 15 minutos, después se llevó a cabo el tratamiento de calor seco a 32 °C durante 24 horas, después se guardaron las semillas en sobres identificados.

#### N. Colecta de material enfermo de plantas de tomate

A los 20 días después del trasplante se identificaron los primeros síntomas en las plantas, se identificaron y colectaron ramas marchitas en la planta.

Con la ayuda de una navaja limpia se cortó la rama marchita dejando una superficie plana la cual se presionó contra uno de los espacios de la tarjeta FTA (Flinders Technology Associates), girando y presionando la rama marchita durante unos segundos, se dejó una marca de color verdoso pálido. Se dejó secar la tarjeta FTA y se almacenó a temperatura ambiente.

Se realizó una desinfección con alcohol al 70% de la superficie de los tallos de las plantas infectadas. Con el objetivo de colectar células vivas del patógeno se utilizaron tubos plásticos de 1.5 ml, se agregó agua destilada a cada tubo hasta alcanzar  $\frac{3}{4}$  de su capacidad. Se mantuvo la rama en el tubo de plástico durante 2 minutos con la superficie justo por debajo de la superficie del agua. Se cerró el tubo y se selló con parafilm.

Se almacenaron las muestras de agua a temperatura ambiente (18-25 °C). Se colocaron las tarjetas FTA en una bolsa de plástica sellada y los tubos en otra y se enviaron al laboratorio de patología vegetal de la Universidad de Wisconsin–Madison donde se determinó la presencia del patógeno en las plantas de tomate enfermas.

#### 2.5.2.2 Fase de laboratorio

##### A. Determinación de la presencia de la bacteria *Ralstonia solanacearum*

La determinación de la presencia de la bacteria en la parcela experimental, se confirmó por medio de análisis fitopatológicos de suelo y plantas, realizados en el laboratorio de Soluciones Analíticas S, A. previo a este experimento.

##### B. Identificación de la cepa de *Ralstonia solanacearum* presente en la parcela

El aislamiento e identificación de la cepa de *Ralstonia solanacearum* presente en las plantas que murieron en campo se realizó en el laboratorio de patología vegetal de la Universidad de Wisconsin-Madison.

De las plantas de tomate sobrevivientes de las tres familias con características agronómicas deseadas, a los 75 días después del trasplante se colectó tejido joven y el cual se aplastó en papel filtro y fue enviado para análisis molecular en el laboratorio Hortigenetics Research (S.E.Asia) Limited, ubicado en Chiang Mai, Tailandia. Determinándose cuáles de las plantas sobrevivientes contenían el marcador molecular BW12.

#### C. Determinación de respuesta diferencial entre familias de plantas de tomate

La respuesta diferencial entre familias de tomate se determinó mediante la proporción de sobrevivencia de las plantas en el área experimental, las diferencias significativas entre las tres familias indicando un efecto genotípico mientras que una respuesta aleatoria indicaría un efecto puramente ambiental .

### 2.5.3 Diseño Experimental

#### 2.5.3.1 Unidad experimental

Cada unidad experimental fue constituida por 10 plantas de tomate, colocadas en los surcos a un distanciamiento de 0.4 m entre plantas y 0.9 m entre surcos.

#### 2.5.3.2 Croquis del experimento

La distribución espacial de los tratamientos y repeticiones después de la aleatorización se presenta los cuadros 6, 7 y 8 respectivamente.

Cuadro 6. Distribución aleatorizada de las poblaciones segregantes de la familia 1

<b>Bloque I</b>	<b>Bloque II</b>	<b>Bloque III</b>
GT-5694	GT-4986	GT-4988
GT-4250	GT-5694	GT-4986
GT-4986	GT-4831	GT-5076
GT-4988	GT-4988	GT-5693
GT-5693	GT-5076	GT-5695
GT-5695	GT-5693	GT-4831
GT-4831	GT-4250	GT-5694
GT-5076	GT-5695	GT-4250

Cuadro 7. Distribución aleatorizada de las poblaciones segregantes de la familia 2

<b>Bloque I</b>	<b>Bloque II</b>	<b>Bloque III</b>
GT-4992	GT-4861	GT-5699
GT-4967	GT-5699	GT-4992
GT-5702	GT-4831	GT-4967
GT-4831	GT-4254	GT-4861
GT-5076	GT-5700	GT-5701
GT-5701	GT-4992	GT-5700
GT-5700	GT-5076	GT-5702
GT-4254	GT-5701	GT-4831
GT-4861	GT-5702	GT-5076
GT-5699	GT-4967	GT-4254

Cuadro 8. Distribución aleatorizada de las poblaciones segregantes de la familia 3

<b>Bloque I</b>	<b>Bloque II</b>	<b>Bloque III</b>
GT-4977	GT-4831	GT-5715
GT-5715	GT-5717	GT-4296
GT-4974	GT-5718	GT-4974
GT-5718	GT-4977	GT-5718
GT-4975	GT-5715	GT-5719
GT-4976	GT-5716	GT-5076
GT-4296	GT-5719	GT-4831
GT-5076	GT-4975	GT-5717
GT-5716	GT-4296	GT-4977
GT-5717	GT-4974	GT-4975
GT-4831	GT-4976	GT-5716
GT-5719	GT-5076	GT-4976

### 2.5.3.3 Variable de respuesta

La variable que se midió fue la proporción de plantas sobrevivientes a *Ralstonia solanacearum*. Para determinar la proporción de plantas sobrevivientes se empleó la ecuación siguiente:

$$\text{Proporción de sobrevivencia} = \text{No. plantas sobrevivientes} / \text{total de plantas}$$

### 2.5.3.4 Análisis para la proporción de sobrevivencia de plantas para cada familia

Se realizó un análisis de varianza para determinar si al menos una población segregante era diferente estadísticamente dentro de cada familia en cuanto a la proporción de sobrevivencia a la marchitez bacteriana causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, para lo cual en el estudio se establecieron tres bloques por familia. La familia 1, 2 y 3 con seis, ocho y diez tratamientos respectivamente. En cada unidad experimental se sembraron 10 plantas. El número total de plantas de las poblaciones segregantes fue de 720.

El modelo estadístico-matemático asociado al diseño de bloques al azar es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo:

$Y_{ij}$  = Proporción de sobrevivencia en la ij-ésima unidad experimental

$\mu$  = media general de la proporción de sobrevivencia

$\tau_i$  = efecto del i – ésima población segregante

$\beta_j$  = efecto del j – ésimo bloque

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

### 2.5.3.5 Análisis para la proporción de sobrevivencia de las poblaciones segregantes de las familias evaluadas

Para analizar cuál de las poblaciones segregantes de las tres familias evaluadas presentaba la mayor proporción de sobrevivencia, considerando que se tienen evaluaron dos factores (factor A: familia; factor B: poblaciones segregantes) estando el factor B anidado en el factor A y que en cada familia se evaluó un número variable de poblaciones segregantes (6, 8 y 10 respectivamente), debido a que no se tiene disponible todas las combinaciones de niveles fue necesario utilizar el diseño experimental factorial jerárquico o anidado no balanceado.

El modelo estadístico-matemático asociado al diseño se describe a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_{j(i)} + u_{(ij)k}$$

Siendo:

$Y_{ijk}$ : proporción de sobrevivencia medida en la  $ijk$ -ésima unidad experimental

$\mu$ : la media general de la proporción de sobrevivencia

$\tau_i$ : el efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor familias

$\beta_{j(i)}$ : el efecto producido por el nivel  $j$ -ésimo del factor poblaciones segregantes dentro del nivel  $i$ -ésimo del factor familias

$u_{(ij)k}$  : el error experimental.

## 2.6 Resultados y Discusión

### 2.6.1 Identificación de la cepa de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith.

De las plantas que presentaron síntomas de marchitez, a los 45 días después del trasplante fueron colectadas cuatro elegidas aleatoriamente, a las cuales se les realizó un corte a la base del tallo donde se observó oscurecimiento del sistema vascular. Una porción del tallo de cada planta elegida se colocó dentro de cuatro recipientes con agua, a los 2 minutos se observó la aparición de los exudados bacterianos en forma de hilos lechosos los cuales son indicativo de que el patógeno se ha estado multiplicando en los haces vasculares

de la planta (prueba de flujo bacteriano) (Champoiseau *et al.* 2010). Confirmándose así la presencia de la bacteria.

Los resultados del experimento indican que la causa de la muerte del híbrido 2117 sembrado con anterioridad a la parcela, cuya muerte dio origen a esta investigación, no sobrevivió debido a las condiciones climáticas del lugar, altas temperaturas.

De tres de los cuatro tubos plásticos donde se realizó la prueba de flujo bacteriano se logró aislar el patógeno. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de patología de la Universidad de Wisconsin-Madison, donde se identificó que la cepa presente en las plantas de tomate infectadas por la bacteria *Ralstonia solanacearum* clasificada como Filotipo I, Secuevar 14 (también conocida como Raza 1, Biovar 3) (Weibel *et al.* 2016).

Según este resultado se determinó que la cepa bacteriana fue la misma a la encontrada en otras regiones productoras de tomate del oriente del país clasificándola como filotipo I, secuevar 14, cuyo origen es asiático. Los resultados de esta investigación concuerdan con una investigación sobre el estudio filogenético y distribución de la bacteria en Guatemala realizada por Sánchez *et al.* (2006).

#### 2.6.2 Selección de plantas de tomate resistentes a la cepa de *R. solanacearum* E. F.

Smith

La sintomatología ocasionada por *Ralstonia solanacearum* en las plantas de tomate se observó a los 20 días después del trasplante y se mantuvo presente hasta el momento de la cosecha. Se manifestó una marchitez en las hojas la cuales presentaban una apariencia flácida, se enrollaban hacia la cara superior y los márgenes carecían de turgencia y brillo. Esto ocurre debido a que la bacteria se multiplica en el sistema vascular de la planta, por donde fluye el agua que es absorbida por las raíces, provocando la obstrucción a dicho flujo y causando la muerte de la planta por falta de agua (Fernández, M. 1975).

Debido a que se encontró respuesta de sobrevivencia en campo, en algunas de las poblaciones segregantes se realizó selección de plantas basándose en las características deseadas (resistencia a otros patógenos, características morfológicas: vigor de la planta,

color de frutos, firmeza, peso de frutos; adaptabilidad a las condiciones del lugar) siendo estas: Familia 1: GT-6854, GT-6855, GT-6856, GT-6857, GT-6858, GT-6859, GT-6848, GT-6849, GT-6850, GT-6833, GT-6834; Familia 2: GT-6860, GT-6861, GT-6862, GT-6863, GT-6865, GT-6852, GT-6839, GT-6864, GT-6851, GT-6863; Familia 3: GT-6866, GT-6840, GT-6841, GT-6842, GT-6843, GT-6844, GT-6845, GT-6846, GT-6847. La selección de plantas resistentes, adaptadas a las condiciones climáticas de la región, a partir de las poblaciones segregantes seleccionadas fue altamente eficaz, debido a que la siguiente generación presentó altos niveles de resistencia.

De los frutos colectados de las plantas seleccionadas se realizó el proceso de extracción de semilla, y se establecieron las poblaciones segregantes en los meses de junio-noviembre para constatar la resistencia de las plantas a *Ralstonia solanacearum*, donde se realizaron evaluaciones (20, 45, 75 días después del trasplante) confirmándose la resistencia de las poblaciones segregantes seleccionadas con anterioridad.

Para la familia 1 que tiene como progenitor el híbrido GT-5230, se seleccionaron 9 poblaciones segregantes (cuadro 9).

Cuadro 9. Proporción de sobrevivencia de poblaciones segregantes seleccionadas de la familia 1

<b>Población segregante</b>	<b>Proporción de sobrevivencia</b>
GT-5076	1.00
GT-6856	1.00
GT-6858	1.00
GT-6859	1.00
GT-6848	1.00
GT-6850	1.00
GT-6834	1.00
GT-6833	0.95
GT-6849	0.85
GT-6854	0.80
GT-6855	0.80
GT-6857	0.73
GT-4830	0.44

Las poblaciones segregantes se establecieron en campo y se constató la resistencia de las mismas a la marchitez bacteriana las poblaciones con la mayor proporción de sobrevivencia fueron GT-6856, GT-6858, GT-6859, GT-6848, GT-6850 y GT-6834 con una proporción de sobrevivencia de 1.00 (figura 9).

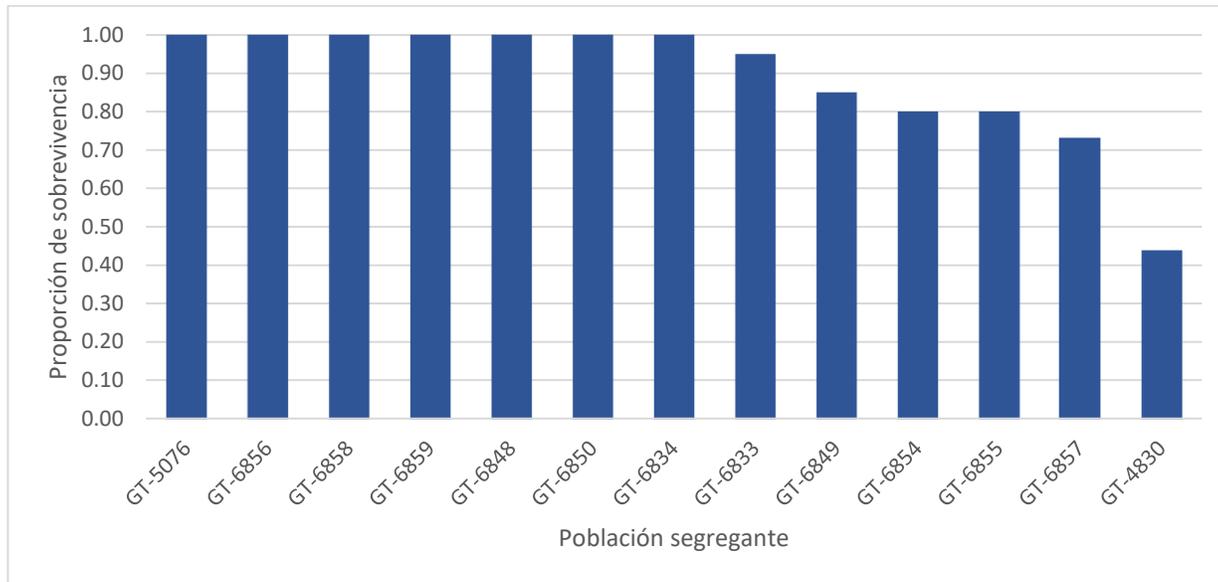


Figura 9. Proporción de plantas sobrevivientes de las poblaciones segregantes seleccionadas a partir de la familia 1.

Para la familia 2 que tiene como progenitor el híbrido GT-5188, se seleccionaron 12 poblaciones segregantes (cuadro 10 y figura 10).

Cuadro 10. Proporción de sobrevivencia de poblaciones segregantes seleccionadas de la familia 2

Población segregante	Proporción de sobrevivencia
GT-5076	1.00
GT-6860	1.00
GT-6862	1.00
GT-6839	1.00
GT-6837	1.00
GT-6852	0.94
GT-6861	0.93
GT-6864	0.93
GT-6853	0.90
GT-6851	0.80
GT-6838	0.80
GT-6835	0.80
GT-6863	0.69
GT-6865	0.67
GT-4830	0.44

Las poblaciones segregantes con la proporción más alta de sobrevivencia fueron GT-6860, GT-6862, GT-6839, GT-6837 con 1.00.

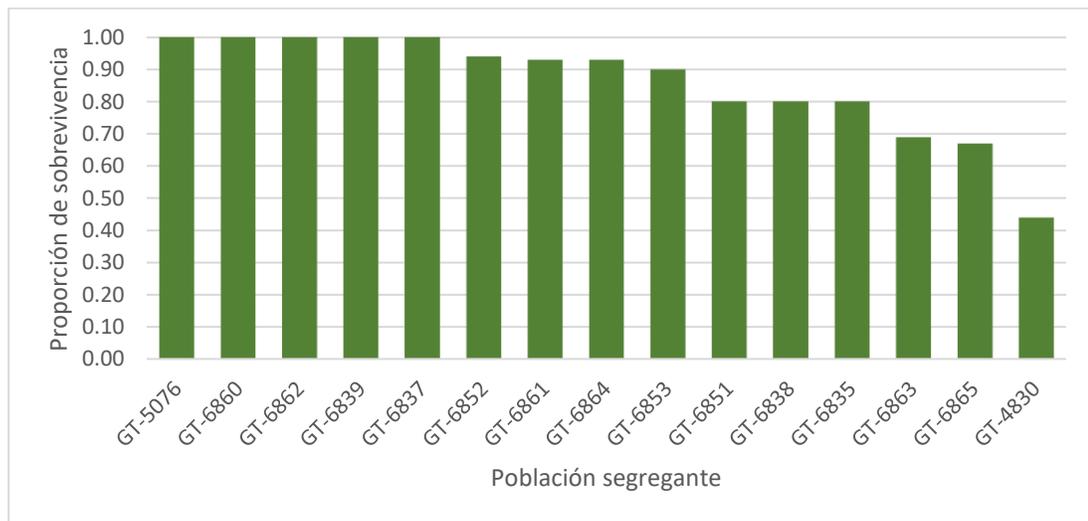


Figura 10. Proporción de plantas sobrevivientes de las poblaciones segregantes seleccionadas a partir de la familia 2.

De la familia 3, se seleccionaron 8 poblaciones segregantes, se establecieron en campo y se evaluó la resistencia de estas al patógeno *Ralstonia solanacearum* (cuadro 11).

Cuadro 11. Proporción de sobrevivencia de poblaciones segregantes seleccionadas de la familia 3

Población segregante	Proporción de sobrevivencia
GT-5076	1.00
GT-6841	1.00
GT-6842	1.00
GT-6844	1.00
GT-6845	1.00
GT-6846	1.00
GT-6847	1.00
GT-6843	0.85
GT-6866	0.53
GT-4830	0.44

Las poblaciones con la mayor proporción de sobrevivencia fueron GT-6861, GT-6842, GT-6844, GT-6845, GT-6846, y GT-6847 con 1.00 proporción de sobrevivencia al patógeno (figura 11).

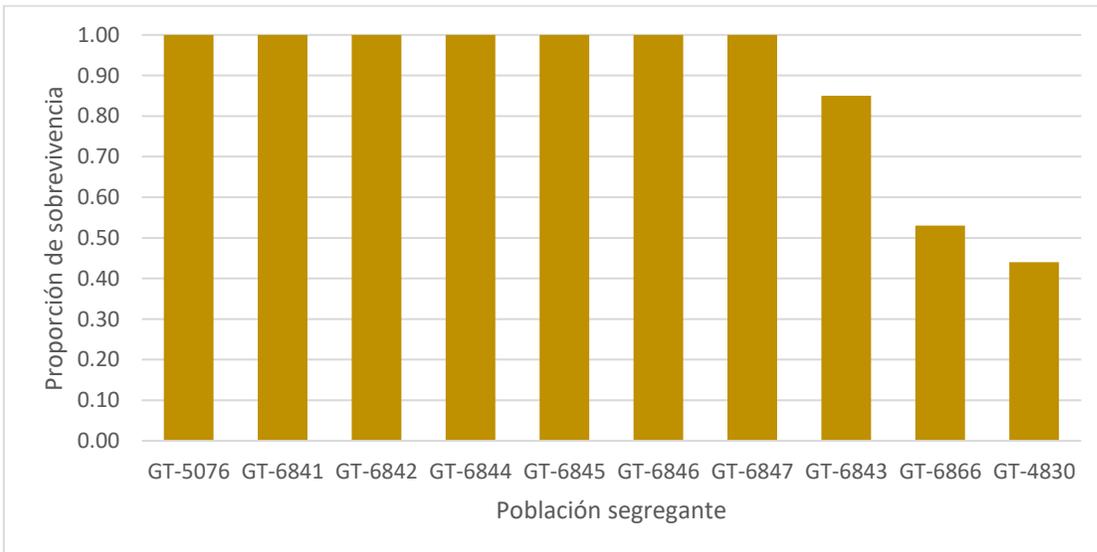


Figura 11. Proporción de sobrevivencia de poblaciones segregantes seleccionadas de la familia 3

2.6.3 Determinación de la familia con la mayor proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* E. F. Smith bajo las condiciones del experimento

Para si de las tres familias evaluadas, por lo menos una tenía una mayor proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum*, se realizó un análisis de varianza utilizando el diseño jerárquico o anidado no balanceado, donde se determinó con un nivel de significancia de 0.10 que al menos una de las familias evaluadas presenta un incremento significativo en la proporción de plantas sobrevivientes, no encontrando diferencia significativa entre las poblaciones segregantes dentro de las familias (cuadro 12).

Cuadro 12. Cuadro resumen del análisis de varianza para la variable proporción de plantas sobrevivientes

<b>F. V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	1.98	25	0.08	1.44	0.1413
Familia	0.31	2	0.16	2.58	0.0992
Familia > p segregante	1.26	21	0.06	1.09	0.3871
Bloque	0.40	2	0.20	3.65	0.0339
Error	2.53	46	0.05		
Total	4.51	71			

Por lo cual se realizó una prueba múltiple de medias utilizando el criterio de Tukey donde se definió que de las tres familias evaluadas, la familia 1 presentó la mayor media estando al mismo nivel que la familia 2 (cuadro 13).

Cuadro 13. Cuadro resumen de la prueba de Tukey para el factor familia

<b>Familia</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<b>Grupo</b>
Familia 1	0.82	18	A
Familia 2	0.68	24	A B
Familia 3	0.66	30	B

2.6.4 Análisis de las poblaciones segregantes dentro de cada familia

A. Familia 1

Dentro de la familia 1 la cual deriva del híbrido GT-5230 las poblaciones segregantes que la conforman presentaron buena adaptación a las condiciones

ambientales en la parcela. Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencia estadística significativa dentro de las poblaciones segregantes evaluadas (cuadro 14).

Cuadro 14. Cuadro resumen del análisis de varianza para la variable proporción de plantas sobrevivientes para la familia 1

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0.19	7	0.03	0.74	0.6451
Población	0.0038	2	0.0019	0.05	0.9506
Bloque	0.19	5	0.04	1.02	0.4570
Error	0.37	10	0.04		
Total	0.56	17			

Debido a que se obtuvo una probabilidad mayor al nivel de significancia ( $0.9506 > 0.10$ ), se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre los niveles de proporción de sobrevivencia de cada población segregante en la familia 1.

El coeficiente de variación para la familia 1 fue de 23.54 el cual nos indica una variabilidad debido a que el material vegetativo usado en la plantación es heterogéneo, debido a las características genotípicas de cada población segregante son diferentes.

En la figura 9, se presenta un gráfico de las proporciones de sobrevivencia de las poblaciones segregantes de la familia 1, donde se aprecia que la población segregante con mayor sobrevivencia es la GT-5694 (1.00) y la de menor proporción de sobrevivencia es GT-5695 (0.667). A pesar de la diferencia entre estas dos poblaciones segregantes el análisis de varianza no detectó diferencia estadística significativa.

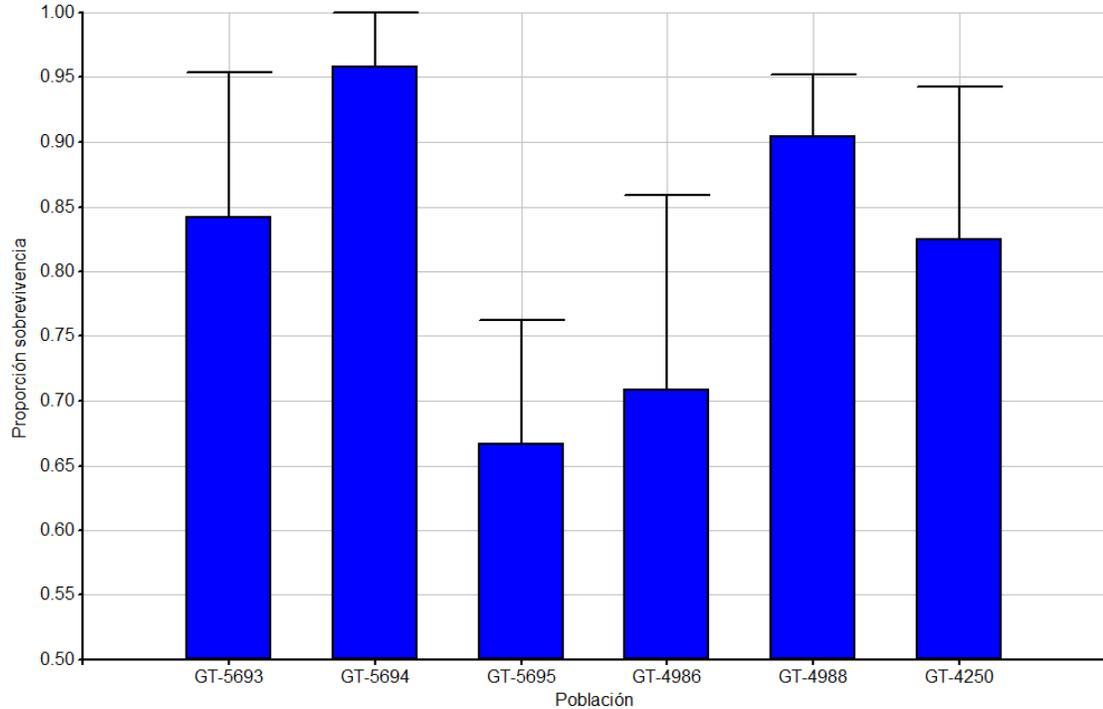


Figura 12. Gráfica de proporción de sobrevivencia de plantas de tomate de las poblaciones segregantes de la familia 1 a la presencia de *Ralstonia solanacearum*

## B. Familia 2

Se realizó selección de plantas en las poblaciones segregantes de la familia 2 basándose en las características deseadas (resistencia a otros patógenos, características morfológicas: vigor de la planta; tamaño, color, firmeza, peso de frutos; adaptabilidad a las condiciones del lugar). Se realizó un análisis de varianza a las poblaciones segregantes de la familia 2 la cual deriva del híbrido GT-5188 (cuadro 15).

Cuadro 15. Cuadro resumen del análisis de varianza para la variable proporción de plantas sobrevivientes para la familia 2

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.95	9	0.11	1.53	0.2294
Población	0.27	2	0.14	1.98	0.1750
Bloque	0.68	7	0.10	1.40	0.2793
Error	0.97	14	0.07		
Total	1.92	23			

Debido a que se obtuvo una probabilidad mayor al nivel de significancia ( $0.1750 > 0.10$ ), se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre los niveles de proporción de sobrevivencia de cada población segregante en la familia 2.

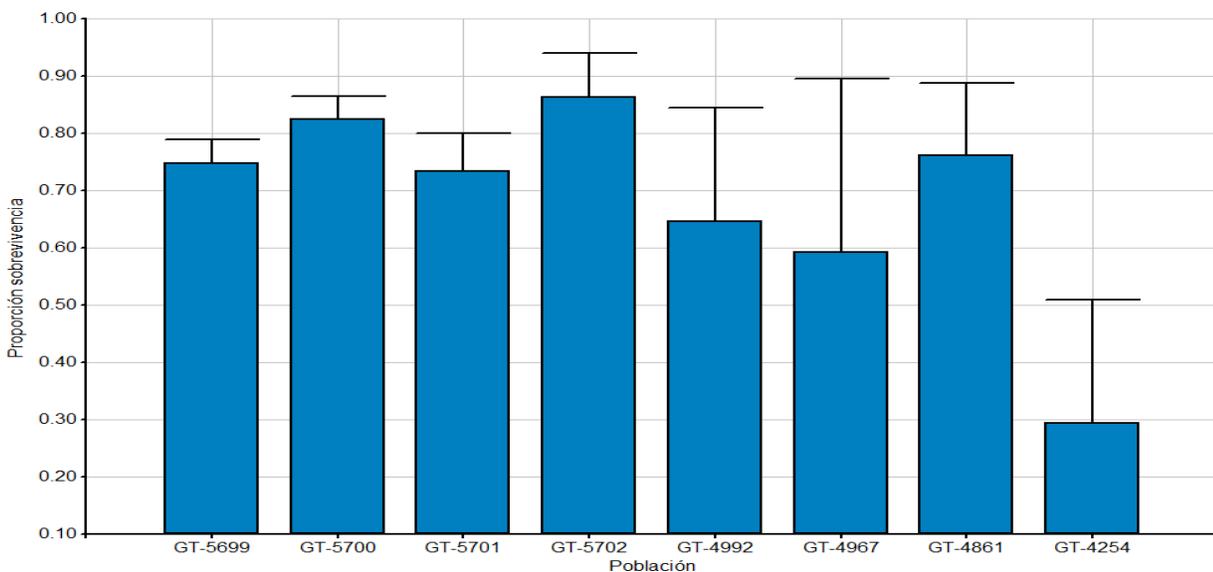


Figura 13. Gráfica de proporción de sobrevivencia de plantas de tomate de las poblaciones segregantes de la familia 2 a la presencia de *Ralstonia solanacearum*

En la figura 13 se presenta un gráfico de las proporciones de sobrevivencia de las poblaciones segregantes de la familia 2, donde la población segregante con mayor

proporción de sobrevivencia fue la GT-5702 con 0.734 y la con menor proporción de sobrevivencia fue la GT-4254 con 0.167. Sin embargo con el análisis de varianza se concluyó que no existe diferencia estadística significativa dentro de las poblaciones de la familia 2.

### C. Familia 3

Se realizó un análisis de varianza para la familia 3 la cual deriva del híbrido GT-5215, cuyos resultados se presentan en el cuadro 16.

Cuadro 16. Cuadro resumen del análisis de varianza para la variable proporción de plantas sobrevivientes para la familia 3

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0.65	11	0.06	1.00	0.4848
Población	0.25	2	0.13	2.13	0.1479
Bloque	0.40	9	0.04	0.75	0.6650
Error	1.06	18	0.06		
Total	1.71	29			

Según el análisis de varianza con un nivel de significancia del 10% y un coeficiente de 37.01, se determinó que no existe diferencia significativa dentro de las proporciones de sobrevivencia de las poblaciones segregantes en la familia 3. Debido que p-valor es mayor al nivel de significancia utilizado para la prueba ( $0.1479 > 0.10$ ). En la figura 14 se presenta las proporciones de sobrevivencia promedio de las poblaciones segregantes de la familia 3, donde la mejor población segregante es GT-4976 (0.83) y la menor GT-5717 (0.45).

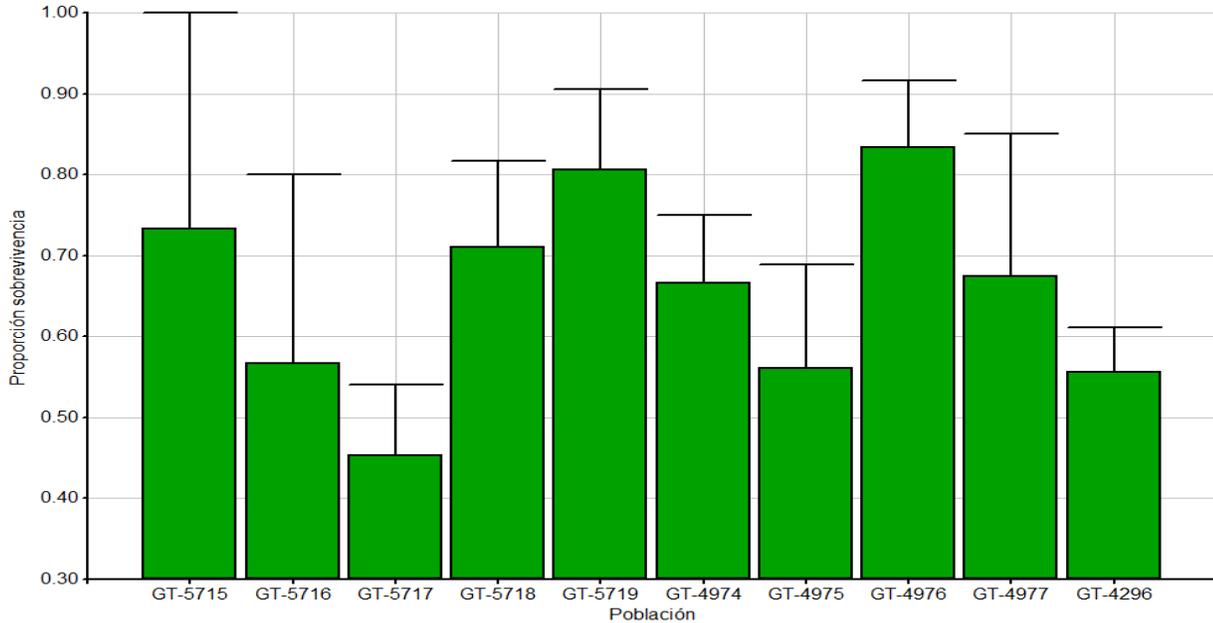


Figura 14. Gráfico de proporción de sobrevivencia de plantas de tomate de las poblaciones segregantes de la familia 2 a la presencia de *Ralstonia solanacearum*

#### 2.6.5 Verificación la presencia del marcador molecular BW 12 en las plantas sobrevivientes.

Según Jones et al. (2001) debido a que el marchitamiento de las plantas de tomate ocurre durante 2-5 días después de la infección dependiendo de la susceptibilidad del huésped, la temperatura y la virulencia del patógeno tanto la infección como el desarrollo de la enfermedad son favorecidos por temperaturas altas (óptimo 28 a 35 °C) y humedad y precipitación elevada, condiciones que según datos climáticos reportados durante el periodo de evaluación (ver figura 15) según datos climáticos reportados durante el periodo de evaluación final se alcanzaron las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno.

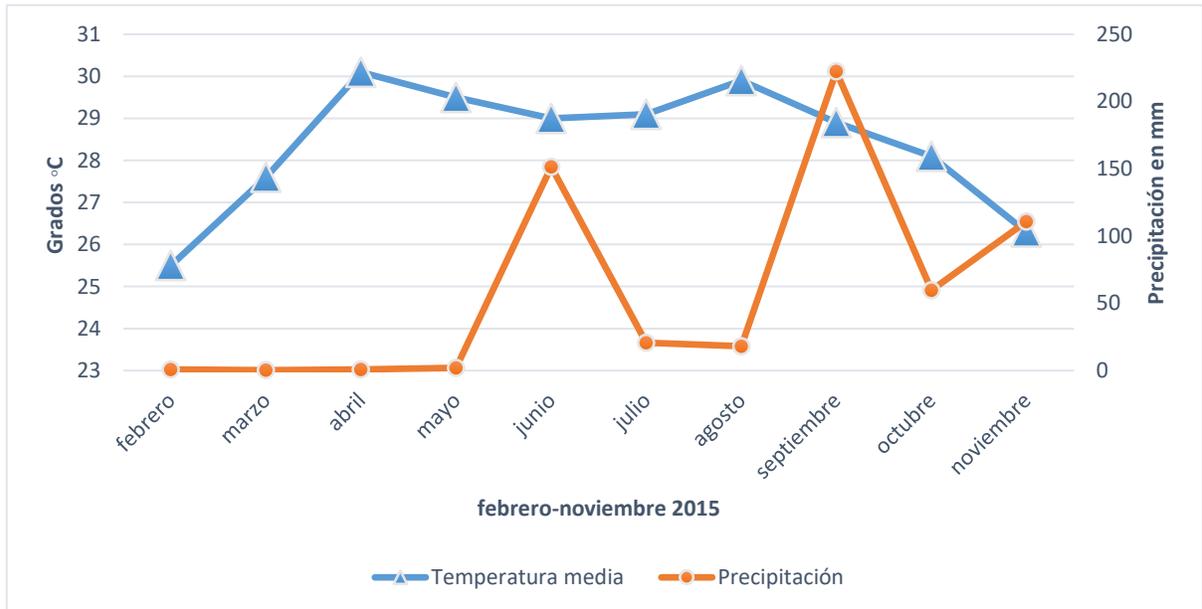


Figura 15. Gráfico de condiciones climáticas de la parcela en la finca El Corozo, Rio Hondo, Zacapa reportadas por la estación Pasabien, Rio Hondo, Zacapa INSIVUMEH 2010

De las plantas sobrevivientes a los 75 días después del trasplante se colectó tejido joven de las plantas de tomate y se plasmó en cuadros de 4\*4 cm y posteriormente fueron enviados para determinar la presencia del marcador molecular BW12 mediante análisis molecular en el laboratorio Hortigenetics Research (S.E.Asia) Limited, ubicado en Chiang Mai, Tailandia. En el cuadro 17 se pueden observar la presencia del marcador molecular BW12 en las plantas seleccionadas.

Cuadro 17. Verificación de la presencia del marcador BW12 en las poblaciones seleccionadas.

Familia	Población evaluada	Selección	Presencia del marcador BW 12
1	GT-5693	GT-6854	11
		GT-6855	11
	GT-5694	GT-6856	11
	GT-5695	GT-6857	11
		GT-6858	11
		GT-6859	11
	GT-4986	GT-6848	00
		GT-6849	00
	GT-4988	GT-6850	00
	GT-4250	GT-6833	10
GT-6834		00	
2	GT-5699	GT-6860	11
	GT-5700	GT-6861	11
		GT-6862	11
	GT-5701	GT-6863	11
		GT-6864	10
		GT-6865	11
	GT-4992	GT-6851	10
		GT-6852	11
		GT-6853	10
	GT-4967	GT-6839	11
3	GT-5719	GT-6866	11
	GT-4974	GT-6840	11
		GT-6841	11
		GT-6842	11
	GT-4975	GT-6843	11
		GT-6844	11
		GT-6845	11
		GT-6846	11
GT-4977	GT-6847	11	

11: Condición dominante (resistente); 10: Condición heterocigota; 00: Condición recesiva (susceptible)

Las poblaciones que presentan el marcador BW12 y tienen características morfológicas deseadas así mismo presencia de marcadores moleculares de interés para el programa de mejoramiento se seguirán sembrando los siguientes ciclos hasta llegar a tener una línea estable con el marcador BW12 en condición homocigota dominante y con buena adaptación a las condiciones climáticas del lugar.

Debido a la importancia que ha tomado la enfermedad para zonas de producción de tomate, papa y chile pimiento en los últimos años surgió la importancia de realizar la selección de plantas a partir de poblaciones segregantes (ver cuadro 13) con el fin de desarrollar líneas con resistencia a *Ralstonia solanacearum* y características morfológicas deseables para el investigador, debido a que la resistencia en el hospedero (plantas de tomate) constituye la estrategia más efectiva para alcanzar el control de la enfermedad a largo plazo.

Sumado a la aplicación de buenas prácticas agronómicas, medidas de prevención y grado de resistencia a campo contribuye a disminuir las pérdidas económicas. Las poblaciones que presentaron el marcador molecular BW12 en condición homocigota dominante (11), se seguirán evaluando hasta que sus características morfológicas deseadas por el investigador estén estables para tomarse como fuente de resistencia. En las poblaciones con el marcador molecular en condición heterocigota se avanzarán en el próximo ciclo y se realizará selección individual, siempre verificando la resistencia en campo y la presencia del marcador BW12 hasta que esté en condición homocigota dominante.

La presencia del marcador BW12 parecería estar relacionada con la resistencia, aunque esta relación no fue perfecta debido a que las poblaciones GT-6848, GT-6849, GT-6850 y GT-6834 presentaron resistencia en campo al patógeno pero no la presencia del marcador molecular BW12, sin embargo la resistencia se mantuvo en la siguiente generación, esto puede ser debido a que la resistencia a marchitez bacteriana es carácter cuantitativa y la confieren varios genes que están asociados a diferentes cromosomas (6 y 12) ((Wang et al., 2000). Esta relación es algo que se necesita estudiar más a fondo, ya que las poblaciones podrían tener otra región del genoma relacionadas con la resistencia bajo estas condiciones. Se verificó la presencia en las poblaciones segregantes del marcador BW6 sin embargo este parecería no estar involucrado en la expresión de la resistencia bajo las condiciones del experimento, debido a que ninguna de las líneas resistentes contenía este marcador.

Se recomienda llevar los individuos seleccionadas hasta nivel de líneas puras, cuando ya no se observe segregación fenotípica dentro de la población lo cual regularmente sucede arriba de la generación F6, luego realizar cruces entre líneas pertenecientes a diferentes familias para optimizar los niveles de heterosis o vigor híbrido, para así obtener híbridos con altos niveles de resistencia y adaptación a las condiciones climáticas de la región o bien seleccionar las líneas como fuentes de resistencia y cruzarlas con genotipos (híbridos o líneas) adaptados al calor, para generar ambas características.

## 2.7 Conclusiones

1. Se identificó la cepa de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith presente en las plantas de tomate infectadas en la parcela de la finca El Corozo, ubicada en Zacapa siendo esta la Filotipo I, Secuevar 14 (también conocida como Raza 1, Biovar 3).
2. Se seleccionaron plantas que presentaron resistencia a la bacteria *Ralstonia solanacearum* Filotipo I, Secuevar 14 y con características morfológicas deseadas (vigor de la planta; tamaño, color, firmeza, peso de frutos; adaptabilidad a las condiciones del lugar) siendo estas: Familia 1: GT-6854, GT-6855, GT-6856, GT-6857, GT-6858, GT-6859, GT-6848, GT-6849, GT-6850, GT-6833, GT-6834; Familia 2: GT-6860, GT-6861, GT-6862, GT-6863, GT-6865, GT-6852, GT-6839, GT-6864, GT-6851, GT-6863; Familia 3: GT-6866, GT-6840, GT-6841, GT-6842, GT-6843, GT-6844, GT-6845, GT-6846, GT-6847.
3. Se determinó que la familia 1, contiene las poblaciones segregantes con la mayor proporción de supervivencia, seguida de la familia 2, y ambas son estadísticamente iguales según la prueba múltiple de medias utilizando el criterio de Tukey.
4. Se verificó la presencia del marcador molecular BW12 en condición homocigota recesiva en las poblaciones segregantes que presentaron sobrevivencia a *Ralstonia*

*solanacearum* E. F. Smith, encontrando dicho marcador en las poblaciones de cada familia siendo estas: Familia 1: GT-6854, GT-6855, GT-6856, GT-6857, GT-6858, GT-6859; Familia 2: GT-6860, GT-6861, GT-6862, GT-6863, GT-6865, GT-6852, GT-6839; Familia 3: GT-6866, GT-6840, GT-6841, GT-6842, GT-6843, GT-6844, GT-6845, GT-6846, GT-6847.

## 2.8 Recomendaciones

1. Continuar con el programa de selección de individuos dentro de la parcela con presencia de la cepa de *R. solanacearum* clasificada como Filitipo I, Secuevar 14, para obtener líneas parentales estables con resistencia a la bacteria y con adaptación a condiciones de altas temperaturas.
2. Realizar cruces con líneas seleccionadas de la familia 1 la cual presento mayor sobrevivencia y líneas avanzadas dentro del programa de mejoramiento con características deseadas por el investigador y evaluar la resistencia del híbrido a la presencia de la bacteria y a las condiciones ambientales.
3. Investigar la presencia de otros marcadores moleculares relacionados con la resistencia a *R. solanacearum* a las poblaciones: GT-6848, GT-6849, GT-6850, GT-6834 las cuales presentaron resistencia a la presencia de la bacteria pero que sin embargo no tienen el marcador BW12.

## 2.9 Bibliografía

1. Agrios, G. 1997. Plant pathology. 4 ed. San Diego, California, US, Academic Press. 635 p.
2. Allen, C. 2015. Bacterial wilt disease (PDF file). Madison, US, University of Wisconsin. 61 p.
3. Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2):221-242.
4. Buddenhagen, I. 1986. Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. *In* International workshop held at PCARRD (1986, PH). Proceedings. Los Banos, Phylippines, Canberra, ACIAR. p. 123-143.
5. Buddenhagen, I; Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 2:203–292.
6. Castellanos, J. 2009. Manual de producción de tomate en invernadero. México, INTAGRI. p. 45-51.
7. Champoiseau, P; Jones, J; Momol, T; Pingsheng, J; Allen, C; Norman, D. 2010. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato and southern wilt of geranium (en línea). Consultado 20 nov 2015. Disponible en [http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/NRI\\_Project/Projectsummary.html](http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/NRI_Project/Projectsummary.html)
8. Chandrashekara, K; Prasannakumar, M; Deepa, M; Vani, A. 2012. A rapid, sensitive and reliable method for detecting *Ralstonia solanacearum* using FTA (Whatman) card. *Journal of Plant Pathology* 94(1):219-221.
9. Danial, J; McHugh, R; Saddler, G. 2006. Molecular characterization of the potato brown rot pathogen *Ralstonia solanacearum*, race 3 biovar 2A. *In* International Bacterial Wilt Symposium (4, 2006, US). CSL York, UK. 28 p.
10. Desai, B; Kotecho, M; Salunkhe, D. 1997. Seeds handbook: biology, production processing and storage. Ed. Marcel Dekker. New York, USA. *Acta Hort.* Vol 97 (2):627-760.
11. DIPLAN (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Dirección de Planeamiento, GT). 2013. El agro en cifras 2013. Guatemala, MAGA. 48 p.
12. East West Seed. 2015. Semillas de hortalizas y cultivos orientales (en línea). Consultado 10 set 2015. Disponible en <http://www.eastwestseed.com/latin-america/la/about/>

13. Elphinstone, J. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. In Allen, C; Prior, P; Hayward, AC (eds.). Bacterial wilt the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, Minnesota, US, APS Press. p. 9–28.
14. Esquinas, J. 1981. Genetic resources of tomatoes and wild relatives. Rome, Italy, IBPGR / FAO. 73 p.
15. Fegan, M; Prior, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex,”. In Allen, C; Prior, P; Hayward, AC (eds.). Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Madison, Wisconsin, US, APS Press. p. 449-462.
16. Fernández, M. 1975. Introducción a la fitopatología: vol. II: bacterias, fisiogénicas, fungicidas, nematodos. 3 ed. Buenos Aires, Argentina, INTA. 821 p. (Colección Científica INTA).
17. FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, HN). 2012. Marchitez bacteriana en solanáceas: su reconocimiento y manejo integrado. Honduras. 19 p.
18. French, E; Gutarra, L; Aley, P; Elphinstone, J. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Phytopathology* 30:126-130.
19. García, R; Delgado, L; García, A. 1999. Distribución, incidencia y variabilidad de *Ralstonia solanacearum* agente causal de la marchitez bacteriana de la papa en el estado de Mérida (en línea). Venezuela. Consultado 20 abr 2015. Disponible en <http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev11%281%29/2.%20Distribuci%C3%B3n,%20incidencia%20y%20variabilidad.pdf>
20. Garza, L. 1985. Las hortalizas cultivadas en México: características botánicas. Chapingo, Mexico, UACH, Departamento de Fitotecnia. 4 p.
21. Gillings, M; Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting; towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In Hayward, AC; Hartman, GL (eds.). Bacterial wilt disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK, CAB International. p. 95-112.
22. Hayward, A. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal Applied Bacteriology* 27:265-277.
23. Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29:65–87.
24. Iñiguez, G. 1991. Aspectos relevantes para el cultivo de jitomate en México. Tesis Ing. Fitotec. Chapingo, México, UACH, Departamento de Fitotecnia. 75 p.

25. INSIVUMEH (Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología, GT). 2005. Datos meteorológicos de los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Jalapa, Jutiapa y Zacapa de los años 1991 al 2004. Guatemala. 1 hoja electrónica.
26. \_\_\_\_\_. 2015. Datos meteorológicos de la estación Pasabien, Rio Hondo, Zacapa del año 2015. Guatemala. 1 hoja electrónica (Excel).
27. Izaguirre, L. 2008. Epidemiología de la marchitez bacteriana *Ralstonia solanacearum* en el cultivo de tomate *Lycopersicon sculentum* Mill en el oriente de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 82 p.
28. Janse, JD. 1996. Potato brown rot in western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. EPPO Bulletin 26:679–985.
29. Jones, JP; Stall, RE; Zitter, TA. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Madrid, España, Mundi-Prensa. 100 p.
30. Jyothi, H; Santhosha, H; Basamma, B. 2012. Recent advances in breeding for bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato – review. Current Biotica 6(3):370-398.
31. Kelman, A; Sequeira, L. 1965. Root-to-root spread *Pseudomonas solanacearum* to colonies appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 55:304-309.
32. Knapp, S; Peralta, L; Spooner, D. 2005. Comparison of AFLPs with other for phylogenetic inference in wild tomatoes (*Solanum* L. section *lycopersicon* (Mill.). Wettst). Taxon 54(1):43-61.
33. Kumar, P; Gupta, V; Misra, A; Modi, D; Pandey, B. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics Journal 2(4):141-162.
34. Lemus, A. 2012. Evaluación del potencial de rendimiento y calidad de fruto de seis híbridos de tomate tolerantes a marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) en aldea Tempisque, Agua Blanca, Jutiapa. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 78 p.
35. Mammadov, J; Aggarwal, R; Buyyarapu, R; Kumpatla, S. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. International Journal of Plant Genomics, vol. 2012. 11 p.
36. Melgar, S. 2014. Diplomado en biotecnología y seguridad: marcadores moleculares. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 73 p.

37. Melo, M. 1995. Avaliação de plantas cultivadas como hospederas de *Pseudomonas solanacearum* em condições de casa-de-vegetação. Tese MSc. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília. 51 p.
38. MINEDUC (Ministerio de Educación, Dirección Departamental de Educación de Zacapa, GT). 2006. Informe de la Unidad de Desarrollo Educativo. Guatemala. 277 p.
39. Monardes, H. 2009. Manual del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Características botánicas. Facultad de Ciencias Agronomicas, Universidad de Chile.
40. Municipalidad de Río Hondo, GT. 2006. Diagnóstico del municipio de Río Hondo. Río Hondo, Zacapa, Municipalidad de Río Hondo, Oficina Municipal de Planificación. 160 p.
41. Nuez, F. 1995. El cultivo de tomate. Bilbao, España, Mundi-Prensa. 793 p.
42. Opina, N; Tavner, F; Hollway, G; Wang, J; Li, T; Maghirang, R; Fegan, M; Hayward, A; Krishnapillai, V; Hong, W; Holloway, B; Timmis, J. 1997. A novel method for development of species and strains-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech. 5:19-30.
43. Orozco, E. 1997. Colonização de raízes de plantas daninhas por *Ralstonia solanacearum* *in vitro* e em casa-de-vegetacao. Tesis MSc. Brasilia, Brasil, Universidad de Brasilia. 114 p.
44. Orozco, E; Takatsu, A; Uesugi, CH. 2004. Colonização de raízes de plantas daninhas cultivadas *in vitro* e em vasos por *Ralstonia solanacearum*, biovars 1, 2 e 3. Fitopatología Brasileira vol. 29 (2):121-127.
45. Poussier, S; Prior, P; Luisetti, J; Hayward, A; Fegan, M. 2000. Partial sequencing of the *hrp* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Syst. and Appl. Microbiol. 23:479-486.
46. Rodríguez, D. 2007. Determinación de biovars y razas de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith, asociados a la marchitez bacteriana, en los cultivos de tomate *Solanum lycopersicum* L. y chile pimiento *Capsicum annuum* L. en el oriente de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 72 p.
47. Rodríguez, R; Medina, R. 2001. Cultivo moderno del tomate. 2 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 206 p.

48. Roldan, E. 2006. Historia del municipio de Río Hondo departamento de Zacapa. Tesis MA. Guatemala, USAC, Facultad de Humanidades, Escuela de Postgrado. 143 p.
49. Sánchez P, A; Mejía, L; Fegan, M; Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathology* 2008 (57):320-331.
50. Sánchez, A; Mejía, L; Allen, C. 2006. Estudio filogenético y de distribución de la bacteria *Ralstonia solanacearum* en Guatemala. *Tikalía* 24(1):17-23.
51. SEGEPLAN (Secretaría General de Planificación y Programación de la Presidencia, GT). 2001. Proyecto MAGA-ESPRED-CATIE base de datos digital de la república de Guatemala a escala 1:250,000. Guatemala. 1 DVD.
52. SEGEPLAN (Secretaría General de Planificación y Programación de la Presidencia, GT); COMUDE (Consejo Municipal de Desarrollo del Municipio de Río Hondo, Zacapa, GT). 2010. Plan de desarrollo Río Hondo, Zacapa. Río Hondo, Zacapa, Guatemala, SEGEPLAN / Municipalidad de Río Hondo. 106 p.
53. SFA (Subsecretaria de Fomento a los Agronegocios, MX). 2010. Manual del jitomate. México, SAGARPA. 10 p.
54. Smith, EF. 1896. A bacteria disease of tomato, pepper, eggplant and irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp). USDA, Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin no. 12:1-28.
55. Subedi, N; Miller, SA; Allen, C. 2015. *Ralstonia solanacearum*: introducción general. In Taller Diagnóstico de la bacteria *Ralstonia solanacearum*. Ohio, US, The Ohio State University, College of Food, Agricultural and Environmental Sciences. 26 p.
56. Valdés, A. 1996. Producción de hortalizas. México, Limusa. 298 p.
57. Villela, J. 1993. El cultivo de tomate. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Proyecto de Desarrollo Agrícola –PDA-. 144 p.
58. Wang, J; Ho, F; Hong, H; Huang, S; Balatero, C; Dittapongpitch, V; Hidayati, N. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar ‘Hawaii 7996’ to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
59. Weibel, J; Tuan, M; Bocsaczy, A; Daughtrey, M; Norman, D; Mejía, L; Allen, C. 2016. A *Ralstonia solanacearum* strain from Guatemala infects diverse flower crops, including new hosts *Vinca* and *Sutera*, and causes symptoms in geranium (*Pelargonium hortorum*), african daisy (*Osteospermum ecklonis*), and mandevilla (*Mandevilla*). Presentado para publicación en *Plant Health Progress*. 29 p.

## 2.10 Anexos

Cuadro 18A. Componentes del medio CPG (Casamino acid-Peptide-Glucose)

	Por litro
Ácido Casamino (hidrolizado de caseína)	1 g
Glucosa	5 g
Peptona	10 g
Agar	17 g

Cuadro 19A.. Componentes del medio SMSA

	Por litro
Ácido Casamino (hidrolizado de caseína)	1 g
Peptona	10 g
Agar	17 g
Glicerol	5 ml
Cristal violeta*	5 mg
$\beta$ sulfato de polimixina*	100 mg
Bacitracina*	25 mg
Cloromicetin*	5 mg
Penicilina*	0.5 mg

\* Disolver en 5 ml de etanol al 70% 30 minutos antes de su uso.

CAPÍTULO III: SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA EAST-WEST SEED  
(GUATEMALA), S. A.

### 3.1 Evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en doce híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo las condiciones de la finca El Corozo en Zacapa, Guatemala.

#### 3.1.1 Presentación

La marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* Smith es una devastadora enfermedad que afecta a varios cultivos de importancia mundial a nivel económico siendo tal el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*). En esta investigación se evaluó la capacidad de sobrevivencia en doce híbridos de tomate desarrollados dentro del programa de mejoramiento en ciclos anteriores, evaluando la proporción de sobrevivencia en un campo con presencia de la bacteria *R. solanacearum*, cabe mencionar que para constatar la presencia de la enfermedad dentro de la parcela se establecieron plantas que sin resistencia a la bacteria, para evitar escapes y posibles datos erróneos.

Se realizó la evaluación con el objetivo de encontrar alternativas para la producción por medio de la validación de materiales que presenten sobrevivencia en parcelas infectadas con la bacteria. La investigación se llevó a cabo en la finca El Corozo, en el municipio de Rio Hondo, Zacapa, en el transcurso del mes de abril a julio. Se estableció la parcela de tomate con los materiales de estudio, bajo el diseño experimental de bloques al azar. Los híbridos con la mayor proporción de sobrevivencia fueron: fueron GT-6331, GT-6334, GT-6365, GT-5188 y GT-6345.

### 3.1.2 Marco Teórico

#### 3.1.2.1 Marco Conceptual

##### A. Epifitiología de la enfermedad

Al instalarse *R. solanacearum* en una región, las posibilidades de diseminación son múltiples (a través de suelo infectado, aguas, labores culturales, restos vegetales, plantas de reservorio, etc.) (Caruso 2005). La bacteria en el suelo tiene la capacidad de producir marchitez en hospedantes susceptibles y sobrevivir el mismo tiempo bajo condiciones de oligotrofia (escasez de nutrientes) y en presencia de bajas temperaturas (Álvarez 2009).

Jones, Stall y Zitter 2001, indican que el periodo de sobrevivencia varía dependiendo de la raza del patógeno y las características físicas, químicas y biológicas del suelo. Además características que promuevan la supervivencia en suelos con buena capacidad de retención de agua, temperaturas y pH.

##### B. Escape de la enfermedad

El escape de la enfermedad ocurre cuando las plantas genéticamente susceptibles no son infectadas, debido a que para que esta se desarrolle se necesitan tres factores siendo estos: el hospedante susceptible, el patógeno virulento y el ambiente favorable. Cuando estos no coinciden e interactúan en el momento oportuno o bien en un tiempo reducido se provoca el escape (Agrios, 1995)

#### 3.1.2.2 Marco Referencial

##### A. Ubicación geográfica

El Municipio de Río Hondo está ubicado en el Departamento de Zacapa, cuenta con una extensión territorial de 458.09 kilómetros cuadrados, se encuentra a una altitud de 184 metros sobre el nivel del mar, entre sus coordenadas geográficas: 89°35'06" longitud Oeste del meridiano de Greenwich y 15°02'36" de Latitud Norte (SEGEPLAN, 2010). La finca El Corozo se encuentra ubicada entre las aldeas Santa Cruz y Pasabien en el municipio de Río Hondo, departamento de Zacapa.

## B. Materiales de investigación

Los doce híbridos a evaluar son: GT-6328, GT-6330, GT-6331, GT-5642, GT-6334, GT-6365, GT-6370, GT-5188, GT-6383, GT-6346, GT-6381, GT-6345. Los cuales provienen de cruces con líneas parentales con características deseadas en el programa de mejoramiento (Color rojo intenso, frutos firmes al tacto, alto vigor de la planta, buen rendimiento, entre otros).

### 3.1.3 Objetivos

#### 3.1.3.1 General

Evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith en doce híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo las condiciones de la finca El Corozo en Zacapa.

#### 3.1.3.2 Específico

1. Identificar los híbrido de tomate con la mayor proporción de sobrevivencia a la presencia de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith.
2. Identificar los híbridos de tomate con la menor proporción de sobrevivencia a la presencia de *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith.

### 3.1.4 Metodología

#### 3.1.4.1 Tratamientos evaluados

Se evaluaron 12 híbridos de tomate que se describen en el cuadro 20.

Cuadro 20. Descripción de tratamientos evaluados

Tratamiento	Híbrido
1	GT-6328
2	GT-6330
3	GT-6331
4	GT-5642
5	GT-6334
6	GT-6365
7	GT-6370
8	GT-5188
9	GT-6383
10	GT-6346
11	GT-6381
12	GT-6345

#### 3.1.4.2 Manejo del experimento

##### A. Delimitación del área de trabajo

Consistió en la ubicación del terreno donde se estableció el experimento de los doce híbridos.

##### B. Preparación del terreno

- Limpia y desmalezado del terreno: se eliminaron las plantas voluntarias que no eran de interés en la investigación.
- Preparación de surcos: se elaboraron los camellones, dejando una distancia entre cada uno de 0.90 m

##### C. Preparación de semillero

Para la elaboración del semillero se utilizaron bandejas de duroport de 252 celdas debidamente desinfectadas con agua más cloro a razón de 18.5 cm<sup>3</sup> de cloro con una pureza del 5.20% por litro de agua. Se colocó una semilla de cada material de tomate en cada celda de la bandeja, luego se colocó dentro del germinador

(habitación con condiciones de humedad y temperatura controlada), luego se trasladaron las bandejas al invernadero para su posterior desarrollo.

#### D. Trasplante de las plántulas

Se establecimiento la plántula al campo definitivo a los 35 días después de la siembra de almácigo.

#### E. Tutorado

Se colocó tutores y rafia para brindar sostén a las plantas.

### 3.1.4.3 Diseño Experimental

#### A. Unidad experimental

Cada unidad experimental se constituyó de 10 plantas de tomate, colocadas en los surcos a un distanciamiento de 0.4 m entre plantas y 0.9 m entre surcos.

#### B. Variable de respuesta

##### a. Proporción de sobrevivencia

Para determinar la proporción de plantas sobrevivientes se empleó el siguiente modelo matemático:

$$\text{Proporción de sobrevivencia} = \frac{\text{Número de plantas sobrevivientes}}{\text{Total de plantas}}$$

#### C. Análisis para la proporción de sobrevivencia de plantas

Se realizó un análisis de varianza para determinar si al menos un híbrido de los evaluados es diferente estadísticamente en cuanto a la proporción de sobrevivencia a la marchitez bacteriana causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, para lo cual en el estudio se establecieron tres repeticiones.

El modelo estadístico-matemático asociado al diseño de bloques al azar es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo:

$Y_{ij}$  = Proporción de sobrevivencia en la  $ij$ -ésima unidad experimental

$\mu$  = media general de la proporción de sobrevivencia

$\tau_i$  = efecto del  $i$  – ésimo híbrido

$\beta_j$  = efecto del  $j$  – ésimo bloque

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental

### 3.1.5 Resultados y Discusión

Los síntomas externos más característicos en los híbridos que presentaron baja proporción de sobrevivencia a *Ralstonia solanacearum* fueron marchitamiento y enanismo. Estos aparecieron en toda la etapa de crecimiento del cultivo, aunque el marchitamiento total y colapso fue más frecuente en las plantas jóvenes como indica Kelman, 1953 citado por Naranjo et al 2013.

Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencia estadística significativa dentro de los doce híbridos evaluados en relación a la proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* (cuadro 21).

Cuadro 21. Cuadro resumen de análisis de varianza a doce híbridos de tomate

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0.66	13	0.05	1.27	0.2999
Híbrido	0.43	11	0.04	0.97	0.4993
Bloques	0.24	2	0.12	2.92	0.0748
Error	0.89	22	2.92		
Total	1.55	35			

Debido a que se obtuvo una probabilidad mayor al nivel de significancia ( $0.4993 > 0.10$ ) se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre los niveles de proporción de sobrevivencia de cada híbrido.

En el cuadro 21 se presentan los datos obtenidos en campo en cuando a la proporción de sobrevivencia de los doce híbridos evaluados.

Cuadro 22. Proporción de sobrevivencia de híbridos a *R. solanacearum*

Híbrido	Proporción de sobrevivencia
GT-6331	1.00
GT-6334	1.00
GT-6365	1.00
GT-5188	1.00
GT-6345	1.00
GT-6370	0.80
GT-6346	0.80
GT-6328	0.75
GT-6381	0.75
GT-6330	0.60
GT-6383	0.50
GT-5642	0.33

En la figura 16, se presenta un gráfico de las proporciones de sobrevivencia de los híbridos evaluados, donde se aprecia que los híbridos GT-6331, GT-6334, GT-6365, GT-5188 y GT-6345 obtuvieron la mayor proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* y el que presentó menor proporción de sobrevivencia fue el híbrido GT-5642 (0.33). A pesar de la diferencia entre estas dos poblaciones segregantes el análisis de varianza no detecto diferencia estadística significativa.

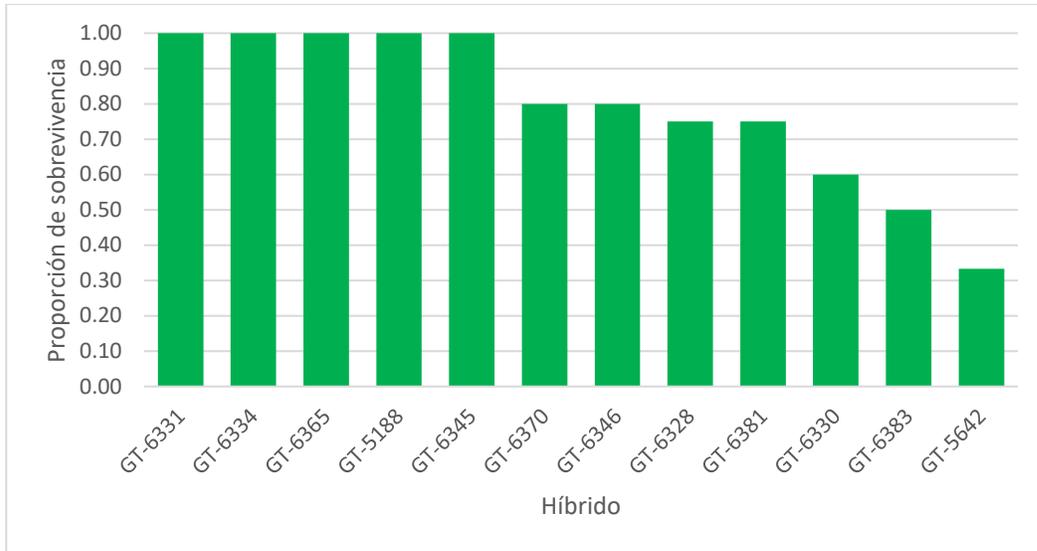


Figura 16. Proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* de doce híbridos de tomate

Debido a que se identificaron cinco híbridos con una proporción de sobrevivencia de 1.00 se recomienda desarrollar otra prueba de sobrevivencia el siguiente ciclo para descartar posibles factores que hayan podido afectar la infección del patógeno. Debido a que algunas plantas pueden escapar de la enfermedad debido a que son susceptibles al patógeno en una determinada etapa de crecimiento y por lo tanto si el patógeno no está presente o bien es inactivo en ese periodo, estas plantas difícilmente se infectarán (Agrios, 1995).

### 3.1.6 Conclusiones

1. De los híbridos evaluados los que presentan la mayor proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* (1.00) son: fueron GT-6331, GT-6334, GT-6365, GT-5188 y GT-6345.
2. El híbrido con la proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* más baja (0.33) fue el GT-5642.

### 3.1.7 Recomendaciones

1. Debido a que no se determinó diferencia estadística significativa de la proporción de sobrevivencia a *R. solanacearum* se recomienda realizar la prueba en otra época evitar que haya ocurrido un posible escape de la enfermedad.
2. Se recomienda seguir con el programa de mejoramiento y avance de los híbridos GT-6331, GT-6334, GT-6365, GT-5188 y GT-6345 que presentaron buena sobrevivencia a la presencia de *R. solanacearum* dentro de la parcela.

### 3.1.8 Bibliografía

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, Limusa. 821 p.
2. Álvarez, M. 2009. Biology of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II in host and non-host environments. Tesis PhD. Valencia, España, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. 120 p.
3. Caruso, P. 2005. Detección y caracterización serológica y molecular de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, causante de la marchitez y podredumbre parda en patata. Tesis PhD. Valencia, España, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. 38 p.
4. Jones, J; Stall R; Zitter T. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Madrid, España, Mundi-Prensa / The American Phytopathological Society. p. 2-3.
5. Naranjo, E; Martínez, Y. 2013. Avances en el diagnóstico de la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*): situación actual y perspectivas en Cuba. Rev. Protección Veg. 28(3):160-170.

### 3.2 Vinculación entre los genes “ah” (anthocyaninless) y “Tm-2a” (tobacco mosaic virus resistance-2) en condición homocigota dominante, en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

#### 3.2.1 Presentación

Se ha observado coloración purpura y verde en el tejido de hipocotílo del tomate. Este tipo de pigmentación del hipocotílo no está relacionado con la pigmentación de otros órganos, como la flor, el tallo, la hoja o el fruto. Basado en observaciones por mejoradores de Nong Bio Co., se cree que el rasgo del color verde del hipocotílo está vinculado con otras características importantes como la esterilidad genética masculina, la resistencia a marchitez bacteriana, virus del mosaico del tabaco, fusarium de la corona y la podredumbre de la raíz (Vakalounakis et al, 1997).

De esto surge la investigación con la línea pura GT-6716 de tomate, de la cual se utilizaron plántulas con el propósito de evaluar la relación que existe entre la pigmentación verde en el hipocotílo (anthocyaninless) de las plantas y la presencia del marcador molecular Tm-2a (Tobacco mosaic virus resistance-2a), los resultados se obtuvieron después de análisis moleculares para identificar la presencia del marcador molecular en el laboratorio Hortigenetics Research (S.E.Asia) Limited, ubicado en Chiang Mai, Tailandia, presentando que el 93.5% de las plantas con hipocotílo verde tienen la presencia del marcador molecular Tm-2a en estado homocigoto dominante y el 6.45% de las plantas tienen hipocotíleo purpura presentando el marcador molecular Tm-2a en estado homocigoto dominante.

### 3.2.2 Marco Teórico

#### 3.2.2.1 Marco Conceptual

##### A. Pigmentos

###### a. Antocianinas

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua visibles al ojo humano. Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo "B" de la molécula determina el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina. Aunque se han descrito doce diferentes antocianidinas, las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Las tres primeras son más frecuentes en frutos, en tanto que el resto lo son en flores. En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada; esto es, unidas a algún azúcar y en cuyo caso se denominan antocianinas (Aguilera et al, 2011). Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (Brouillard, 1982).

Estos pigmentos son normalmente encontrados disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Pecket y Small, 1980).

La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, principalmente bayas y uvas rojas, cereales, principalmente maíz morado, vegetales y vino rojo entre las bebidas (Harbone, 1993; Escribano et al., 2004).

##### B. Resistencia en plantas

La resistencia es la capacidad que tiene la planta huésped para reducir la infestación por otros patógenos, el daño causado por estos u ambas cosas. Los niveles de

resistencia varían desde una ligera defensa por parte de la planta, hasta la total inmunidad contra patógenos, en la resistencia se da el resultado de uno o más mecanismo de defensa (Maxwell & Jennings, 1991).

a. Resistencia verdadera

La resistencia verdadera en plantas es la que es controlada genéticamente por la presencia de uno o varios genes contra el ataque de un patógeno. El hospedante y el patógeno son incompatibles entre sí debido a la falta de reconocimiento químico entre ellos o bien porque la planta hospedante activa sus mecanismos de defensa o son activados en respuesta a la infección del patógeno (Agrios, 1995).

b. Resistencia aparente

Esta resistencia ocurre bajo ciertas condiciones o circunstancias, donde algunas plantas muy susceptibles pueden permanecer libres de síntomas e infección de una manera de parecer resistentes. En general esto es el resultado de procesos de escape de la enfermedad (Agrios, 1995).

C. Virus

Los virus son agentes patógenos tan diminutos que no pueden ser vistos a simple vista ni con microscopios ordinarios. Se desarrollan en el interior de las células vivas y son capaces de atravesar los filtros más finos donde quedan retenidos los microorganismos más pequeños tal es el caso de las bacterias (Llanos e Izquierdo, 1984).

a. Virus del mosaico del tabaco (TMV)

El virus del mosaico del tabaco penetra en las plantas y una vez instalado en el interior de sus células se multiplican y extienden por toda la planta causando daños diversos en los tejidos y órganos. La destrucción de los tejidos parenquimáticos y de los cloroplastos, ocasiona deformaciones, defectos de crecimiento, necrosis, decoloraciones entre otros, en las plantas infectadas (Llanos e Izquierdo, 1984).

#### D. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador (Azofeifa, 2006). Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos (Karp & Edwards, 1998).

##### 1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los polimorfismos de un solo nucleótido representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma. Debido a su amplia distribución estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma (Ramírez, et al 2013).

#### 3.2.2.2 Marco Referencial

##### A. Ubicación

La finca La Azoteita donde opera “Pilones de Antigua S.A”. Se localiza, Carretera a Jocotenango, en el copante de la Antigua Guatemala, municipio del departamento de Sacatepéquez, tiene una extensión aproximada de 78 kilómetros cuadrados, limita al Norte y al Este con San Bartolomé Milpas Altas, al Sur con Santa María de Jesús, al Oeste con San Antonio Aguas Calientes, Ciudad Vieja y Santa Catarina Barahona, todos del mismo departamento. Las coordenadas geográficas: Latitud Norte: 14°36'57”, Longitud Oeste 90°38'37”, elevación 1530.17 msnm (Ovalle, 2010).

### 3.2.3 Objetivos

#### 3.2.3.1 General

Comparar los resultados de la presencia de color verde del hipocotilo de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la presencia del marcador molecular Tm-2a.

#### 3.2.3.2 Específicos

1. Determinar el % de plantas con hipocotilo verde y el marcador Tm-2<sup>a</sup> en condición homocigota dominante
2. Determinar el % de plantas con hipocotilo purpura y el marcador Tm-2<sup>a</sup> en condición homocigota dominante

### 3.2.4 Metodología

#### A. Siembra en almacigo

El semillero de la línea GT-6716 fue elaborado por servicio de Pilonas de Antigua, S.A. en donde se utilizaron bandejas de duroport de 252 celdas debidamente desinfectadas con agua más cloro a razón de 18.5 cm<sup>3</sup> de cloro con una pureza del 5.20% por litro de agua. Se colocó una semilla de cada material de tomate en cada celda de la bandeja, luego se colocó dentro del germinador (habitación con condiciones de humedad y temperatura controlada), luego se trasladaron las bandejas al invernadero.

#### B. Muestreo

A los 25 días después de haber realizado el semillero se numeraron las plántulas y se tomaron datos de color de hipocotilo de las 250 plantas a evaluar, identificando cual planta presento color purpura y cual color verde.

#### C. Toma de muestras tejido vegetal

Después de que se colecto información de color de hipocotilo se tomó una muestra de tejido vegetal (hoja) de cada plántula se identificó y se guardó en bolsas plásticas transparentes.

#### D. Extracción de ADN

De las muestras de hoja que se colectaron se extrajo el ADN. Se colocó la hoja de la plántula sobre un trozo de papel filtro y se cubrió con un trozo de bolsa plástica transparente, luego con la ayuda de un pistilo se procedió a presionar la muestra vegetal para extraer clorofila y plasmarla en el papel filtro.

#### E. Identificación de presencia del marcador molecular Tm-2a de muestras

Las muestras plasmadas en el papel filtro se enviaron al laboratorio Hortigenetics Research (S.E.Asia) Limited para el análisis de la presencia del marcador molecular Tm-2a.

#### 3.2.5 Resultados

La pigmentación del hipocotílo de plantas de tomate está asociado con otras características que pueden ser del interés del investigador, ahorrar tiempo y dinero en procedimientos. Los tomates con hipocotílo purpura se han utilizado para la construcción de líneas elite a través de autofecundación y retrocruzamiento en el mejoramiento de tomate.

En la línea pura GT-6716 presentó color de hipocotílo verde así como también color purpura (figura 17), en el cuadro 23 se presentan los datos tomados de 250 plantas para determinar la presencia del marcador molecular Tm-2a y su condición (homocigota y heterocigota).



Figura 17. Línea Pura GT-6716.

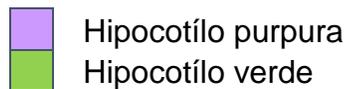
A- Plántula hipocotílo verde. B- Plántula hipocotílo purpura

E. Fuente: M. Castañeda, 2015

Cuadro 23 Color del hipocotilo y presencia del marcador molecular Tm-2a.

1	00	26	10	51	11	76	00	101	10	126	00	151	11	176	11	201	10	226	11
2	11	27	11	52	11	77	10	102	00	127	10	152	00	177	00	202	00	227	00
3	00	28	00	53	B	78	10	103	10	128	11	153	10	178	11	203	00	228	11
4	10	29	11	54	10	79	10	104	10	129	10	154	00	179	11	204	11	229	00
5	10	30	B	55	11	80	11	105	10	130	10	155	10	180	11	205	00	230	11
6	11	31	00	56	10	81	10	106	10	131	10	156	10	181	00	206	11	231	00
7	00	32	10	57	00	82	00	107	00	132	10	157	10	182	00	207	11	232	11
8	10	33	10	58	11	83	10	108	10	133	10	158	11	183	11	208	11	233	11
9	11	34	10	59	10	84	11	109	10	134	10	159	00	184	00	209	11	234	10
10	10	35	11	60	00	85	00	110	10	135	00	160	00	185	11	210	B	235	00
11	00	36	11	61	00	86	10	111	10	136	00	161	11	186	11	211	11	236	10
12	11	37	10	62	00	87	00	112	10	137	11	162	00	187	11	212	11	237	10
13	10	38	10	63	10	88	11	113	00	138	00	163	10	188	10	213	11	238	00
14	00	39	10	64	00	89	11	114	00	139	10	164	00	189	10	214	11	239	00
15	00	40	10	65	10	90	10	115	10	140	10	165	10	190	10	215	10	240	10
16	00	41	10	66	11	91	11	116	11	141	00	166	00	191	10	216	10	241	10
17	00	42	10	67	11	92	10	117	10	142	11	167	00	192	10	217	10	242	11
18	10	43	10	68	10	93	B	118	10	143	00	168	00	193	11	218	00	243	10
19	11	44	10	69	10	94	10	119	11	144	10	169	10	194	10	219	11	244	10
20	11	45	10	70	10	95	00	120	10	145	B	170	10	195	10	220	00	245	11
21	10	46	10	71	11	96	11	121	00	146	00	171	00	196	B	221	10	246	10
22	10	47	00	72	00	97	00	122	00	147	00	172	10	197	10	222	10	247	00
23	11	48	10	73	10	98	11	123	10	148	10	173	10	198	10	223	10	248	00
24	10	49	00	74	11	99	B	124	00	149	10	174	00	199	00	224	11	249	10
25	00	50	10	75	11	100	00	125	B	150	00	175	11	200	00	225	10	250	10

Nota: 11 (Homocigoto dominante, resistentes), 00 (homocigoto recesivo, susceptible), 10 (heterocigoto).



El color del hipocotilo se ha utilizado como marcador visual para trazar características de resistencia a través de la introgresión de tomates con hipocotilo verde en líneas con hipocotilos purpura.

Cuando se realizó la toma de datos fue en 250 plántulas obteniendo los resultados resumidos que se presentan en el cuadro 24 y figura 18.

Cuadro 24. Casos de relación entre el color del hipocotilo y el estado del marcador molecular Tm-2a

Casos	Porcentaje de relación
Hipocotilo verde y Tm-2a homocigoto dominante	23.97%
Hipocotilo verde y Tm-2a homocigoto recesivo	0.83%
Hipocotilo verde y Tm-2a heterocigoto	0.83%
Hipocotilo purpura y Tm-2a homocigoto dominante	1.65%
Hipocotilo purpura y Tm-2a homocigoto recesivo	28.51%
Hipocotilo purpura y Tm-2a heterocigoto	44.21%

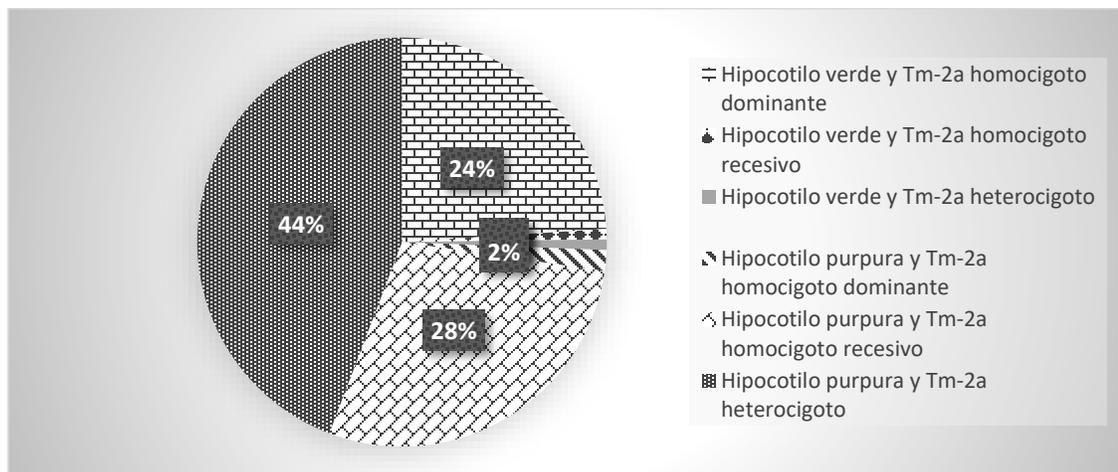


Figura 18. Gráfico de relación entre el color del hipocotilo y la presencia del marcador molecular Tm-2a

Se identificó que en la relación de presencia del marcador Tm-2a y el color del hipocotilo un 23.97% de plantas con hipocotilo verde tienen el marcador en condición homocigoto dominante, mientras que un 1.65% de plantas con hipocotilo purpura presentan el marcador en la misma condición.

Es necesario auxiliarse del uso de marcadores moleculares debido a que un marcador visual como lo es el color del hipocotilo en las plantas de tomate está limitado su uso para poder distinguir entre genotipos homocigotos y heterocigotos. Además si el dato de color de hipocotilo se toma cuando las plantas ya han sido trasplantadas a campo o bien han sido sembradas directamente al suelo esto podría incursionar en un error al no identificarse correctamente el color del hipocotilo.

Se realizó una estimación utilizando un intervalo de confianza para 100 plantas, los datos se muestran en el cuadro 25.

Cuadro 25 Estimación utilizando intervalo de confianza para 100 plantas

GT-6716	Hipocotilo	Tm-2a (Marcador)			Total
		11	10	00	
	Verde	93.55%	3.23%	3.23%	100
	Purpura	2.22%	59.44%	38.33%	100

Tomando en cuenta que de 100 plantas se pueden obtener los resultados anteriores utilizando intervalo de confianza.

Donde:

$p_s$  = proporción de plantas con hipocotilo verde con el marcador de resistencia en condición homocigota

$x$  = número de plantas con hipocotilo verde y presencia del marcador en condición homocigota

$n$  = número total de plantas con hipocotilo verde

$\sigma_s$  = error estándar para la proporción

$Z$  = valor según nivel de significancia

$\frac{\alpha}{2}$  = prueba bilateral

$$\hat{p} = \frac{x}{n}$$

$$\sigma_s = \sqrt{\frac{p_s(1-p_s)}{n}}$$

$$p_s = \frac{58}{62} = 0.9355$$

$$\sigma_s = \sqrt{\frac{0.9355(1-0.9355)}{62}} = 0.03119$$

$$p_s - Z_{(\alpha/2)}x \sqrt{\frac{p_s(1-p_s)}{n}} \leq p \leq p_s + Z_{(\alpha/2)}x \sqrt{\frac{p_s(1-p_s)}{n}}$$

$$0.9355 \pm 1.96x \sqrt{\frac{0.9355(1-0.9355)}{62}}$$

$$0.8743 \leq p \leq 0.996632$$

Esto indica que con un nivel de confianza de 95% (1- $\alpha$ ), la proporción de plantas que tienen el hipocotilo color verde y el gen de resistencia en condición homocigota están en el rango

de 87.43% y 99.66%, esto ayuda a disminuir la cantidad de plantas para identificar el marcador molecular Tm-2 a. Pudiendo así disminuir gastos de tiempo, e inversión económica.

### 3.2.6 Conclusiones

1. El 23.97% de las plantas evaluadas tienen el color de hipocotílo verde y la presencia del marcador molecular Tm-2 a en condición homocigota dominante.
2. El 1.65 % de las plantas tienen el hipocotílo color purpura y el marcador molecular Tm-2 a en condición homocigota dominante.

### 3.2.7 Recomendaciones

Debido a que el marcador visual del color del hipocotílo de las plantas resulta inefectivo cuando las plantas ya están sembradas dentro de las parcelas, se recomienda utilizar un marcador de ADN asociado con el color del hipocotílo para utilizar con eficacia y seleccionar los genes de resistencia a ciertas enfermedades con el consiguiente se podrá ahorrar tiempo, trabajo y costo de siembra de plantas.

Se recomienda evaluar la resistencia que tengan las plantas con hipocotílo verde y purpura y el marcador Tm-2 a en condición homocigota dominante para identificar su resistencia a TMV (tobacco mosaic virus) / ToMV (tomato mosaic virus) en parcelas experimentales.

### 3.2.8 Bibliografía

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, Limusa. 821 p.
2. Aguilera, M; Reza, M; Chew, R; Meza, J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista Ciencias Biológicas y de la Salud. 14(2):16-22.
3. Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2):221-242.

4. Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins: *In Anthocyanins as food colors*. Markakis, P. (ed). US, Academic Press. p. 1-38.
5. Escribano, M; Beulga, C; Rivas, J. 2004. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography* 1054(1-2):129-141.
6. Harbone, JB. 1993. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK, Chapman and Hall. 676 p.
7. Karp, A; Edwards, K. 1998. DNA markers: a global overview. *In Caetano, G. y Anollés, P (eds). DNA markers: protocols, applications and overviews*. New York, US, Gress-Hoff. p. 1-13.
8. Llanos, M; Izquierdo, A. 1984. *Las virosis del tabaco*. Madrid, España, Publicaciones de Extensión Agraria Bravo Murillo. 20 p.
9. Maxwell, F; Jennings, P. 1991. *Mejoramiento plantas resistentes a insectos*. México, Limusa. 696 p.
10. Ovalle, J. 2010. Trabajo de graduación realizado en la empresa "Pilonos de Antigua S. A.", Antigua Guatemala con énfasis a: evaluación de concentraciones de auxinas para la propagación vegetativa comercial de 4 especies forestales: melina (*Gmelina arborea*), eucalipto (*Eucalyptus urograndis*), pino (*Pinus patula*) Y pinabete (*Abies guatemalensis*). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 69 p.
11. Pecket, R; Small, C. 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry* 19:2571- 2576.
12. Ramírez, J; Vargas, G; Tovilla, C; Fragoso, J. 2013. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México* 149:220-228.
13. Vakalounakis, D; Laterrot, A; Moretti, E; Ligoixakis, E.; Smardas, K. 1997. Linkage between Frl (*Fusarium oxysporum* f.sp radicislycopersici resistance) and Tm-2 (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ann. Appl. Biol.* 130:319-323.

### **3.3 Evaluación de rendimiento de 13 híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la finca Santa Teresa en Antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala.**

#### **3.3.1 Presentación**

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial de rendimiento y calidad de fruto de trece híbridos de tomate desarrollados en ciclos anteriores en el programa de mejoramiento de tomate, tratando de obtener el máximo potencial genético de los materiales, es necesario tener en cuenta todos los aspectos que van desde una semilla de alta calidad (poder germinativo, vigor, pureza, etc.) hasta la selección del terreno, manejo del cultivo, transporte y destino industrial.

La productividad de los híbridos de tomate depende en gran parte de las técnicas de manejo que se apliquen y de la variedad a evaluar. La variedad debe escogerse la cual pueda adaptarse a las condiciones del lugar, también que sea el tipo de tomate del mercado, de buena calidad de fruto, resistente a desordenes fisiológicos y buen comportamiento poscosecha (Berenguer, 2003).

En la evaluación de rendimiento se obtuvo información de sus características físicas tanto del fruto como de la planta intentando mantener relacionadas la calidad del fruto, el manejo del cultivo, la productividad y rentabilidad. El ensayo se realizó a campo abierto bajo las condiciones de la finca Santa Teresa ubicada en Antigua Guatemala, Sacatepéquez. Los híbridos con los rendimientos más altos fueron: GT-6332, GT-5919, GT-5644 y GT-6358.

### 3.3.2 Marco Teórico

#### 3.3.2.1 Marco Conceptual

##### A. Clasificación

Para clasificar los frutos de acuerdo a su calidad, es necesario tomar en cuenta una serie de características: firmeza de los frutos, puede ser consistente, esponjosa o flácida, uniformidad en madurez y tamaño, forma de los frutos, las hendiduras y deformaciones influyen en la calidad, sanidad. De acuerdo a esta clasificación, el grado de madurez del fruto se va a determinar el grado y calidad a la que pertenezca. (Van, 1982)

##### a. Categoría Extra

Los tomates de esta categoría deben ser de calidad superior, tener pulpa firme, ser uniformes en cuanto a tamaño, su coloración según el estado de madurez, deberá ser la que permita satisfacer los requisitos establecidos, no deberán tener dorso verde u otros defectos (FAO, 2007).

##### b. Categoría I

Los tomates de esta categoría deberán ser de buena calidad con pulpa lo suficientemente firme, deberán ser uniformes en cuanto al tamaño y estar exentos de dorso verde visible y grietas. Podrá permitirse sin embargo, defectos leves siempre y cuando no afecten el aspecto general del producto, su calidad o estado de conservación: ligero defecto de forma, y coloración, defectos leves de piel, magulladuras muy leves, protuberancias no excesivas, cicatriz lineal cuya longitud no exceda de dos tercios del diámetro del fruto (FAO, 2007).

##### c. Categoría II

Los tomates deberán ser lo suficientemente firmes (pero podrán ser ligeramente menos firmes que los de las categorías anteriores), no deberán presentar grietas sin cicatrizar. Podrán permitirse defectos de forma, desarrollo y coloración, magulladuras, protuberancias, un ombligo, cicatriz pistilar fina de forma alargada (similar al de una costura) (FAO, 2007).

## B. Híbrido

Producto de un cruzamiento entre líneas genéticas no emparentadas. Las semillas de la generación filial 1 (F1) de tomate solo pueden sembrarse una vez, debido a que la segunda vez presentarían variación en cuanto a sus características y habrá una reducción en el rendimiento y uniformidad (Villa Real, 1982).

### 3.3.2.2 Marco Referencial

La finca Santa Teresa se ubica en la Aldea San Bartolomé Becerra en el Municipio de Antigua Guatemala del Departamento de Sacatepéquez. La aldea se ubica al sur poniente de la Antigua Guatemala a 2 kilómetros. Se localiza en el Valle de Panchoy, a una latitud de 14°33'20", y longitud 90°43'54" oeste meridiano Greenwich, a 1,530 metros sobre el nivel del mar, ocupa una extensión de 78 kilómetros cuadrados (Avendaño 2006).

### 3.3.3 Objetivos

#### 3.3.3.1 General

Evaluar la respuesta en rendimiento y calidad de frutos de trece híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo las condiciones de la finca Santa Teresa, en Antigua Guatemala, Sacatepéquez, Guatemala.

#### 3.3.3.2 Específicos

1. Determinar el híbrido de tomate con el mayor rendimiento total por planta.
2. Determinar el híbrido de tomate con el mayor rendimiento por planta en frutos de primera calidad.

### 3.3.4 Metodología

#### A. Material experimental

Se evaluaron 13 híbridos de tomate de tipo de crecimiento determinado, forma de frutos alargada, siendo estos:

##### a. Híbrido GT-6332

Híbrido de crecimiento determinado, buen vigor de planta. Frutos de forma alargada, de buen color y firmeza. Resistencias: Ve; Fol 0-1; Mi; TMV / ToMV, IR: TYLCV / ToLCV; tolerante a marchitez bacteriana BW



Figura 19. Híbrido GT-6332

Fuente: M. Castañeda, 2015

##### b. Híbrido GT-5919

Tipo de crecimiento determinado. Fruto con buena firmeza y color, forma alargada. Buen rendimiento. Resistencias: Ve; Fol 0-1; Mi; IR: TYLCV, TMV / ToMV; tolerante a marchitez bacteriana BW



Figura 20. Híbrido GT-5919

Fuente: M. Castañeda, 2015

c. Híbrido GT-5644

Híbrido determinado, buen vigor de planta y sanidad, frutos firmes.

Resistencias: Ve; Fol 0,1; Mi; IR: TYLCV, TMV/ToMV; tolerante a BW



Figura 21. Híbrido GT-5644

Fuente: M. Castañeda, 2015

d. Híbrido GT-6358

Tipo de crecimiento semi-determinado, buena cobertura foliar, y sanidad de la planta. Frutos de buen color y firmeza. Alta resistencia a enfermedades foliares. Resistencias: Ve; Fol 0,1; Mi; TYLCV, TMV/ToMV.



Figura 22. Híbrido GT-6358

Fuente: M. Castañeda, 2015

e. Híbrido GT-2395

Híbrido de crecimiento determinado, buena vigor de planta. Buen cuaje de frutos, buena sanidad de planta y buen rendimiento. Resistencias: Ve; Fol 0,1;Mi; TMV, TYLCV, TSWV.



Figura 23. Híbrido GT-2395

Fuente: M. Castañeda, 2015

f. Híbrido GT-7679

Buen vigor de planta, y cuaje de frutos. Tipo de crecimiento determinado, buena firmeza, y buen rendimiento. Resistencias: Ve; Fol 0,1; TYLCV, TMV; tolerante a BW.



Figura 24. Híbrido GT-7679

Fuente: M. Castañeda, 2015

g. Híbrido GT-4832

Tipo de crecimiento determinado, firmeza intermedia, color rojo intenso, buen rendimiento.



Figura 25. Híbrido GT-4832

Fuente: M. Castañeda, 2015

h. Híbrido GT-7678

Híbrido de crecimiento determinado, buen vigor y buen rendimiento. Frutos firmes. Resistencias: Ve; Fol 0,1; TYLCV, TMV; tolerante a BW.



Figura 26. Híbrido GT-7678

Fuente: M. Castañeda, 2015

i. Híbrido GT-7680

Tipo de crecimiento determinado, buena cobertura foliar y alto rendimiento. Resistencias: Ve; Fol 0-1;Mi; TMV; IR: TYLCV, TSWV



Figura 27. Híbrido GT-7680

Fuente: M. Castañeda, 2015

j. Híbrido GT-7684

Híbrido de crecimiento semi-determinado de buen vigor. Buena firmeza y color rojo intenso de frutos. Resistencias: Ve; Fol 0,1; TYLCV, TMV/ToMV; Tolerante a BW.



Figura 28. Híbrido GT-7684

Fuente: M. Castañeda, 2015

k. Híbrido GT-5199

Híbrido determinado con frutos de buena calidad y firmeza, buen rendimiento. Resistencias: Ve; Fol 0,1;Mi; TMV; IR: TYLCV, TSWV



Figura 29. Híbrido GT-5199

Fuente: M. Castañeda, 2015

I. Híbrido GT-4831

Híbrido de crecimiento semi-determinado, frutos muy firmes y de buen color. Con excelente cuaje de frutos, buena resistencia a virosis transmitida por mosca blanca. Resistencias: Ve; Fol 0-1; Mi; ToLCV, ToMV



Figura 30. Híbrido GT-4831

Fuente: M. Castañeda, 2015

B. Manejo agronómico

a. Marco de plantación

El distanciamiento de siembra fue de 0.5 m entre plantas y 1 m entre surcos.

b. Trasplante

El trasplante se realizó a los 30 días después de que realizado el almacigo

c. Tutoreo

Es una práctica para mantener la planta erguida y evitar que las hojas y frutos toquen el suelo, mejorando la aireación y el control de enfermedades.

## d. Control de maleza

Se realizó desmalezado para mantener libre de plantas hospedantes de plagas que afectan al cultivo.

## e. Control de plagas

Se realizaron monitoreos para determinar la necesidad de aplicación de plaguicidas. Siendo algunos ingredientes activos de productos utilizados como insecticidas: Muralla: Imidacloprid y Cyflutrin; Monarca: Thiacloprid + Beta-cyflutrina; Karate: Lambda-cihalotrina; Match: lufenuron

## f. Cosecha

La cosecha se realizó recolectando manualmente los frutos en su punto de corte es decir cuando adquiere la tonalidad rojiza (90 días después del trasplante). Se realizaron 3 cortes uno cada 7 días.

## C. Diseño experimental

## a. Unidad experimental

Fueron establecidas 39 unidades experimentales, cada una constituyó de diez plantas, en tres bloques.

## b. Análisis de rendimiento de híbridos de tomate

El diseño experimental que se utilizó fue el de bloques al azar, en donde se evaluaron los trece tratamientos, con tres repeticiones cada uno.

El modelo estadístico para el diseño de bloques completos al azar es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo:

$Y_{ij}$  = Proporción de sobrevivencia en la ij-ésima unidad experimental

$\mu$  = media general de rendimiento

$\tau_i$  = efecto del i – ésimo tratamiento

$\beta_j$  = efecto del j – ésimo bloque

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental

c. Variables de respuesta

1. Rendimiento total

La variable de rendimiento fue medida en kilogramos por planta

2. Rendimiento por categoría

Los frutos se clasificaron con forme las categorías: primera y segunda. Con las características de calidad de fruto (Color rojizo intenso, pulpa firme, sin deformaciones) y de peso.

3.3.5 Resultados

A. Rendimiento total

En el cuadro 26 se presentan los resultados del análisis de varianza obtenido de los trece híbridos de tomate evaluados durante el experimento.

Cuadro 26. Análisis de varianza para la variable rendimiento total (kg por planta).

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	38.3	14	2.74	3.55	0.0031
Bloque	8.82	2	4.41	5.72	0.0093
Híbrido	29.48	12	2.46	3.19	0.0075
Error	18.48	24	0.77		
Total	56.78	38			

Debido a que se obtuvo una probabilidad menor al nivel de significancia ( $0.0075 < 0.10$ ) se concluye que existe diferencia estadística significativa entre la variable rendimiento total de cada híbrido. Debido a esto se procedio a realizar un analisis multiple de medias utilizando el criterio de Tukey (cuadro 27).

Cuadro 27. Cuadro resumen prueba multiple de medias utilizando el metodo deTukey

Híbrido	Medias	Grupo
GT-6332	8.45	A
GT-5919	8.43	A
GT-5644	8.32	A
GT-6358	8.13	A
GT-2395	8.03	A B
GT-7679	7.39	A B
GT-4832	7.21	A B
GT-7678	7.14	A B
GT-7680	7.08	A B
GT-7684	7.01	A B
GT-5199	6.73	A B
GT-4831	6.18	A B
GT-6340	5.5	B

Según la prueba multiple de medias utilizando el criterio de Tukey se determino que los híbridos: GT-6332 (8.45), GT-5919 (8.43), GT-5644 (8.32), GT-6358 (8.13) presentan los mejores resultados en cuando a mayor rendimiento total por planta (figura 31).

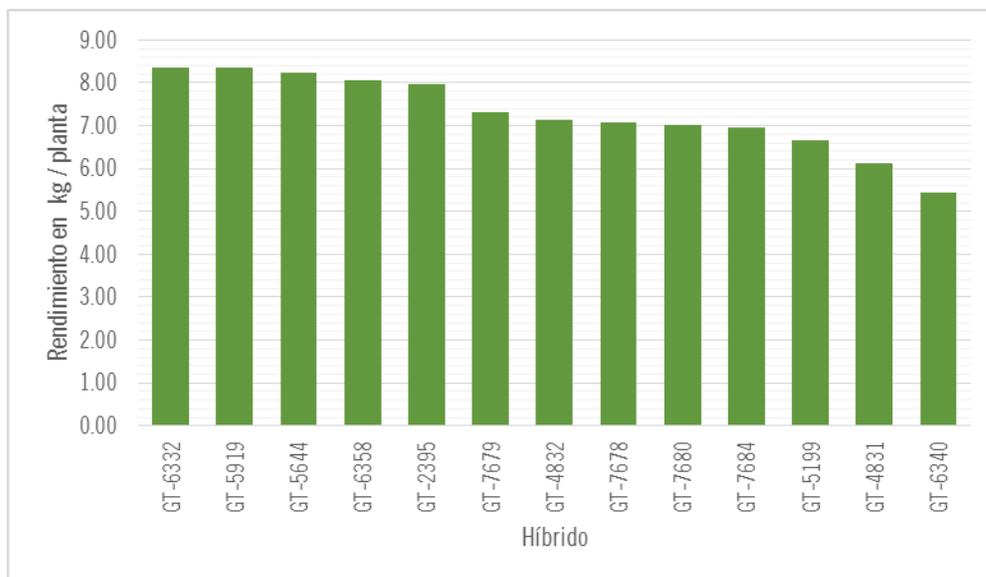


Figura 31. Rendimiento total en kg por planta

Hedge, 1997, menciona que la capacidad de consumo de nutrientes en solanáceas esta influenciado por una serie de variables climáticas y genéticas, por lo que no podemos afirmar que los híbridos que presentaron el mayor rendimiento en las condiciones de la finca Santa Teresa en Antigua Guatemala, no se sabe el comportamiento que tendrán en condiciones ambientales y de suelo de otro lugar.

#### B. Rendimiento frutos categoría primera calidad

Se realizó un análisis de varianza para determinar diferencia estadística significativa en la variable rendimiento de frutos de primera calidad en trece híbridos evaluados (cuadro 28).

Cuadro 28. Rendimiento de frutos categoría primera calidad

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	16.68	14	1.19	4.11	0.0012
Bloques	2.24	2	1.12	3.87	0.035
Híbrido	14.44	12	1.2	4.15	0.0015
Error	6.96	24	0.29		
Total	23.64	38			

Debido a que se obtuvo una probabilidad menor al nivel de significancia ( $0.0015 < 0.10$ ) se concluye que existe diferencia estadística significativa entre la variable rendimiento de frutos de primera calidad de cada híbrido. Debido a esto se procedio a realizar un analisis multiple de medias utilizando el criterio de Tukey (cuadro 29).

Cuadro 29. Cuadro resumen prueba multiple de medias rendimiento frutos de primera

Híbrido	Medias	Grupo
GT-7678	3.65	A
GT-2395	2.49	A B
GT-7680	2.44	A B
GT-5199	2.43	A B
GT-5644	2.34	A B
GT-5919	2.29	A B
GT-7679	1.88	B
GT-6332	1.75	B
GT-6358	1.73	B
GT-6340	1.63	B
GT-7684	1.53	B
GT-4831	1.38	B
GT-4832	1.34	B

Según la prueba multiple de medias utilizando el criterio de Tukey se determino que el híbrido GT-7678 (3.65) es el que presente los mejores resultados en cuando a mayor rendimiento de frutos de primera calidad por planta (figura 32).

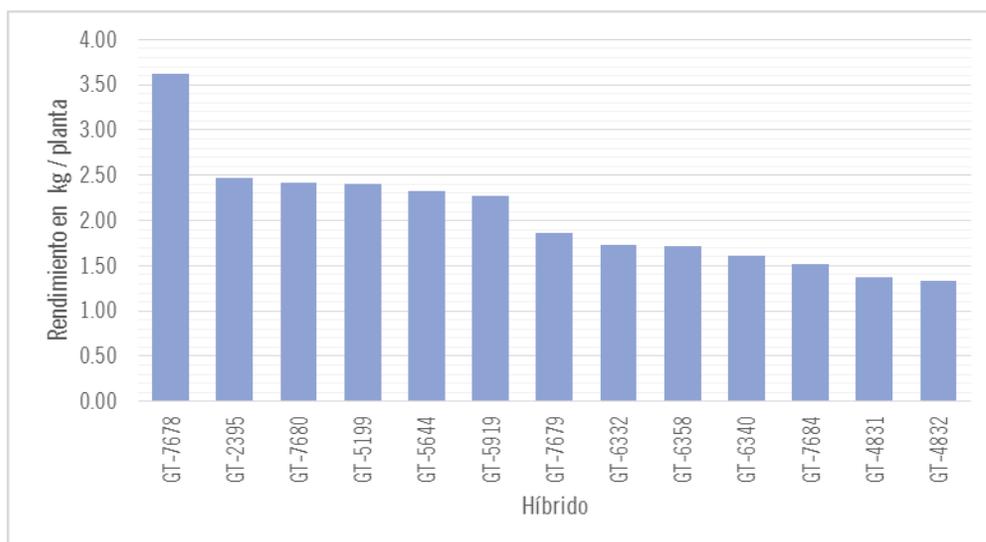


Figura 32. Grafico rendimiento de frutos primera calidad en kg por planta

### 3.3.6 Conclusiones

1. Los híbridos GT-6332, GT-5919, GT-5644 y GT-6358 presentan los mayores rendimientos en kg por planta de los trece híbridos evaluados.
2. El híbrido GT-7678 es el que presenta mayor rendimiento en frutos de primera calidad en kg por planta de los trece híbridos evaluados.

### 3.3.7 Recomendaciones

De acuerdo a la información obtenida de la evaluación de rendimiento de híbridos en la finca Santa Teresa, Antigua Guatemala, se recomienda realizar una comparación de rendimiento solo con los 5 materiales que tuvieron el mejor rendimiento total por planta.

A los cinco híbridos que fueron los mejores se recomienda analizar variables como vida de anaquel de frutos, resistencias y / o tolerancias a patógenos y otras condiciones ambientales.

### 3.3.8 Bibliografía

1. Avendaño, M. 2006. Lineamientos para un esquema de desarrollo y ordenamiento territorial del sistema de aldeas que conforman el municipio de La Antigua Guatemala. Tesis MSc. Barcelona, España, Universidad Politécnica de Cataluña. 59 p.
2. Berenguer, J. 2003. Manejo del cultivo de tomate en invernadero. *In* Castellanos, J; Muñoz, R. (eds). Curso internacional de producción de hortalizas en invernadero. Guanajuato, México, Celaya. p. 147-174.
3. FAO, IT. 2007. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre frutas y hortalizas frescas: proyecto de norma del Codex para el tomate. Roma, Italia. 5 p.
4. Hedge, D. 1997. Nutrient requirements of solanaceous vegetable crops. Maharashtra, India, All Coordinated Safflower Improvement. Project Solapus. 8 p.
5. Van, H. 1982. Manual de tomate para la educación agropecuaria. México, Trillas. 11 p.
6. Villa Real, R. 1982. Tomates. San José, Costa Rica, IICA. 184 p.