

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**



**TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN LA EMPRESA GEN TROPIC SEEDS,
ANTIGUA GUATEMALA**

ANGEL ENRIQUE IBARRA LÓPEZ

Guatemala, Octubre de 2008

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

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

POR

ANGEL ENRIQUE IBARRA LÓPEZ

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, Octubre de 2008

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

RECTOR

LICENCIADO CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Msc .	Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr.	Waldemar Nufio Reyes
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr.	Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO	Ing. Agr.	Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL CUARTO	Br.	Rigoberto Morales Ventura
VOCAL QUINTO	Br.	Miguel Armando Salazar Donis
SECRETARIO	Msc.	Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, Octubre de 2008

**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 realizado en la empresa GenTropic Seeds, Antigua Guatemala, Guatemala, como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

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

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

ANGEL ENRIQUE IBARRA LÓPEZ

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS: Todo lo puedo en Cristo que me fortalece (Filipenses 4:13)

MIS PADRES: María Teresa López Lima., Doroteo Enrique Ibarra de la Cruz.

MIS ABUELOS: Julia Lima De Ortega, José Ángel López (+), Narcisa Revolorio (+), Doroteo Ibarra (+).

MIS HERMANOS: Manuel Antonio Ibarra López, Angelito y Martha Julia.

MIS TÍOS: Martha Olivia López Lima, Emiliano Ibarra.

MIS AMIGOS: Juancho (+), Marvin (+), Figueroa (+), RoDe, y a todos los que han estado siempre conmigo.

MI PAÍS: Guatemala. La Tierra más Bella del Mundo.

MIS CENTROS DE ESTUDIO: Colegio Mixto Santiago de los Caballeros.
Instituto Adolfo. V. Hall. Central.
Instituto Técnico Vocacional Privado Emiliani.
Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

DIOS.
MIS ABUELOS.
MIS PADRES.
MIS HERMANOS.
MI FAMILIA.
MIS AMIGOS.
MIS CENTROS DE ESTUDIOS.

AGRADECIMIENTOS

A:

DIOS: Sin Ti no soy nadie Gracias Infinitas por estar siempre a mi lado.

MIS ABUELOS: José Ángel López (+), Narcisa Revolorio (+), Doroteo Ibarra (+).Julia Lima De Ortega. Gracias por ensañarme el poder de la voluntad y el coraje.

MIS PADRES: María Teresa López Lima, Doroteo Enrique Ibarra de la Cruz, lo logramos mamá. A mi padre, aunque la distancia nos separe gracias por tu apoyo incondicional.

MIS HERMANOS: Manuel Antonio Ibarra López y Angelito, Gracias por sus consejos, apoyo y compañía en todo momento.

MIS TÍOS: Martha Olivia López Lima, Emiliano Ibarra. Gracias Son unas personas de un gran corazón.

MIS AMIGOS: Gracias por todo el tiempo que pasamos juntos, por los buenos y grandes momentos siempre los recordare.

MIS PADRINOS: Ing. Agr. Luis Eduardo Guzmán Irungaray, Ing. Agr. Luis Lorenzo Rodríguez, Ing. Agr. Alexander Rafael Asencio González, Ing. Agr. Ronald Joel Lima Mencos, Dr. Cristian Omar Le-cunff. Gracias por los consejos y compañía durante la vida.

MIS ASESORES: Ing. Luís Montes, Ing Amilcar Sánchez. Gracias por su apoyo y su tiempo.

MI SUPERVISOR: Ing. Agr. Fredy Hernández Ola. Gracias por el apoyo incondicional.

LA EMPRESA: Pilonos de Antigua S.A., GenTropic Seeds. Escuela donde continúo ampliando mis conocimientos, baluarte de apoyo al desarrollo sostenible y económico de familias deseosas de un mejor porvenir.

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE DE CUADROS	iv
	ÍNDICE DE FIGURAS	v
	RESUMEN GENERAL	vi
CAPÍTULO I.	DIAGNÓSTICO DE LA EMPRESA GEN TROPIC SEEDS, ANTIGUA GUATEMALA	1
1.1	PRESENTACIÓN	2
1.2	MARCO REFERENCIAL	3
1.2.1	Generalidades biofísicas del área	3
1.2.2	Marco principal de trabajo del presente estudio	3
1.2.3	Fincas experimentales	4
1.2.4	Programas e híbridos	4
1.3	OBJETIVOS	5
1.4	METODOLOGÍA	6
1.4.1	Fase de campo	6
1.4.2	Fase de gabinete	6
1.5	RESULTADOS	7
1.5.1	Priorización de problemas	7
1.6	CONCLUSIONES	9
1.7	BIBLIOGRAFÍA	10
CAPITULO II.	INVESTIGACIÓN: IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMO ISOENZIMÁTICO EN LÍNEAS DE TOMATE PARA SU UTILIZACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE PUREZA DE HÍBRIDOS COMERCIALES	11
2.1	PRESENTACIÓN	12
2.2	MARCO CONCEPTUAL	13
2.2.1	Definición de términos	13
2.2.2	Biotecnología	15
2.2.3	Marcadores moleculares	16
2.2.4	Electroforesis	16
A.	Electroforesis de isoenzimas	17
B.	Geles de poliacrilamida y almidón	18
2.2.5	Isoenzimas	19
2.2.6	Isoenzimas polimórficas para el tomate	21
A.	ADH (Alcohol Deshidrogenasa)	21
B.	EST (Esterasa)	22
C.	MDH (Malato deshidrogenasa)	22
D.	SKDH (Ácido shikimico deshidrogenasa)	22
E.	AcP (Fosfatasa ácida)	22
2.2.7	Generalidades e importancia económica del tomate	23
2.2.8	Descripción botánica del tomate	24
A.	Raíz	24

	B. Tallo.....	24
	C. Porte.....	25
	D. Hojas.....	25
	E. Inflorescencia.....	25
	F. Polinización.....	25
	G. Fruto.....	26
	H. Semilla.....	26
2.3	OBJETIVOS.....	27
2.3.1	Objetivo General.....	27
2.3.2	Objetivos Específicos.....	27
2.4	HIPÓTESIS.....	27
2.5	METODOLOGÍA.....	28
2.5.1	Antecedentes y ubicación del estudio.....	28
2.5.2	Transporte de las muestras.....	28
	A. Obtención del extracto vegetal.....	28
2.5.3	Preparación de los geles.....	30
	A. Gel de almidón.....	30
	B. Gel de poliacralamida.....	30
2.5.4	Cargado de la muestra (Poliacralamida).....	30
	A. Armado del equipo.....	31
	B. Funcionamiento del sistema.....	33
2.5.5	Cargado de la muestra para el gel de almidón.....	34
2.5.6	Sistemas enzimáticos evaluados.....	35
	A. Para el gel de Poliacralamida las enzimas polimórficas evaluadas fueron.....	36
	B. Para el gel de Almidón las enzimas polimórficas evaluadas fueron.....	36
2.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
2.6.1	Bandeo de isoenzimas en gel de almidón.....	37
2.6.2	Bandeo de isoenzimas en gel de Poliacralamida.....	37
2.6.3	Protocolo para determinación de pureza de híbridos de tomate.....	38
	A. Composición del gel de poliacralamida.....	38
	B. Composición del gel de Fosfata ácida.....	38
	C. Lectura de bandas en gel de Poliacralamida con la enzima polimórfica Fosfata Ácida en híbridos de tomate.....	39
2.6.4	Comparación de costos de determinación de pureza en campo y en laboratorio.....	40
2.7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
2.7.1	CONCLUSIONES.....	42
2.7.2	RECOMENDACIONES.....	42
2.8	BIBLIOGRAFÍA.....	43

CAPÍTULO III.	SERVICIOS PRESTADOS EN LA EMPRESA GEN TROPIC SEEDS	46
3.1	PRESENTACIÓN	47
3.2	ELABORACIÓN DE UN MANUAL QUE DETALLA LOS PROCESOS QUE SE UTILIZAN PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA HIBRIDA DE TOMATE	48
3.2.1	Objetivo	48
3.2.2	Metodología	48
3.2.3	Resultados	48
	A. Siembra de parentales.....	48
	B. Manejo fitosanitario.....	50
	C. Trasplante.....	50
	D. Emasculación y polinización.....	50
	E. Fecundación	52
	F. Recolección de la fruta	53
	G. Extracción de la semilla	53
	H. Fermentación de la semilla.....	54
	I. Lavado de la semilla.....	54
	J. Secado de la semilla.....	55
	K. Almacenado e identificación de la semilla	56
	L. Prueba de pureza	57
3.2.4	Evaluación.....	58
3.3	INVENTARIO DE REACTIVOS DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE PUREZA DE HÍBRIDOS DE TOMATE.....	59
3.3.1	Objetivo	59
3.3.2	Metodología	59
3.3.3	Resultados	59
3.3.4	Evaluación.....	67
3.4	BIBLIOGRAFÍA.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Matriz de priorización de problema de Gentropic Seeds, febrero 2007... 7
Cuadro 2.	Valor nutritivo medio del tomate por 100 g de producto comestible 24
Cuadro 3.	Componentes para la preparación del Buffer de extracción..... 29
Cuadro 4.	Bandeo de las isoenzimas en gel de almidón 37
Cuadro 5.	Bandeo de las isoenzimas en gel de poliacralamida 37
Cuadro 6.	Costos de prueba de pureza en campo..... 40
Cuadro 7.	Costos de laboratorio para determinar pureza en híbridos de tomate... 41
Cuadro 8.	Reactivos en el locker 3-A1 60
Cuadro 9.	Reactivos en el locker 3-A2 61
Cuadro 10.	Reactivos en el locker 3-A3 62
Cuadro 11.	Reactivos en el locker 2-A1 63
Cuadro 12.	Reactivos en el locker 2-A2 64
Cuadro 13.	Reactivos en la refrigeradora 1..... 65
Cuadro 14.	Reactivos en la refrigeradora 2..... 65
Cuadro 15.	Reactivos en la refrigeradora 3..... 66
Cuadro 16.	Detalle de los costos de insumos para la prueba de pureza en campo. 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vista de la finca Tierra de Fuego, en Alotenango.....	3
Figura 2.	Invernaderos de madera que se están sustituyendo por los de aluminio	8
Figura 3.	a) material vegetal de tomate listo para ser macerado; b) bandeja de extracción con 24 pozos dentro de la cámara de extracción de gases.....	29
Figura 4.	Pilares que sostienen las láminas de vidrio donde se vierte la poliacralamida	31
Figura 5.	Equipo cargado con la poliacralamida y peine receptor de muestras.....	32
Figura 6.	Aparato de electroforesis listo para retirar los peines.....	32
Figura 7.	a) cargado del extracto vegetal en la bandeja de extracción; b) aplicación del extracto vegetal a los pozos ó cavidades c) vista ampliada del llenado de los pozos con el extracto vegetal.....	33
Figura 8.	a) recirculador de agua fría y b) fuente de poder del sistema	33
Figura 9.	Corrida electroforética en ambiente frío	34
Figura 10.	Revelado de las bandas	34
Figura 11.	Preparación y montaje de los sistemas enzimáticos en el gel de almidón.....	35
Figura 12.	Bandeo de híbrido de tomate en fosfata ácida en gel de poliacralamida utilizando la isoenzima ACP	39
Figura 13.	Siembra de la semilla de tomate en contenedores.....	49
Figura 14.	Identificación de diferentes parentales de híbridos de tomate.....	49
Figura 15.	Emasculación de flores en tomate.....	51
Figura 16.	Polinización en tomate	51
Figura 17.	Recolección de la fruta de tomate	53
Figura 18.	Extracción de la semilla.....	54
Figura 19.	Secado tendido de la semilla de tomate.....	56
Figura 20.	Pesado y almacenaje de la semilla de tomate	57

TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN LA EMPRESA GEN TROPIC SEEDS, ANTIGUA GUATEMALA

RESUMEN GENERAL

El presente trabajo se realizó en la empresa Gentropic Seeds, la cual se ubica en Antigua Guatemala. Esta empresa desde hace nueve años se dedica a la investigación y mejoramiento genético de vegetales. Actualmente, resultado de estas investigaciones se encuentran en el mercado a nivel comercial cuatro híbridos de tomate de distintas variedades (industriales y redondos) y diferentes híbridos de chiles pimientos.

A través del diagnóstico se determinó que un aspecto relevante en el proceso productivo de la empresa es la evaluación de la pureza de los lotes de los híbridos que se producen, la cual actualmente se realiza en un tiempo largo (aproximadamente de 75 a 80 días), siendo necesario desarrollar un nuevo método que permita acortar el tiempo para obtener resultados, el cual podría ser a través del empleo de marcadores moleculares. En segundo término se evidenció la falta de un protocolo que permita mostrar a todo el personal relacionado todos los pasos que se utilizan para la producción de semilla híbrida.

Por medio de la investigación principal para conocer la pureza de los lotes de semilla híbrida se procedió a evaluar una técnica de laboratorio, para lo cual se emplearon dos geles y nueve enzimas. Las enzimas polimórficas evaluadas en gel de poliacrilamida fueron cinco: alcohol deshidrogenasa (ADH), Ácido Shikimico deshidrogenasa (SKDH), Esterasa (EST), Malato deshidrogenasa (MDH) y Fosfata Ácida (ACP). En gel de almidón se evaluaron cuatro enzimas polimórficas: Malato deshidrogenasa (MDH), Esterasa (EST), Alcohol deshidrogenasa (ADH) y Superóxido dismutasa (SOD).

De los 9 sistemas isoenzimáticos evaluados se identificó la isoenzima fosfata ácida (ACP) como polimórfica y útil para ser utilizada como referente en determinación de híbridos de tomate (*S. lycopersicum*). Así mismo se determinó que la gel con mejores resultados fue la gel de poliacrilamida, determinando que este proceso es 58.4% más

barato que el sistema tradicional utilizado en el campo para establecer la pureza de los híbridos.

Se realizaron dos servicios, el primero en la empresa Gentropic Seeds y el segundo en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía.

A través del primer servicio se describe la metodología que se utiliza en la empresa Gentropic Seeds para el proceso de siembra, chequeo de líneas parentales, polinización y extracción de semilla híbrida, así como los procesos de verificación de la pureza de los diferentes híbridos producidos, hasta llegar a obtener semilla lista para su comercialización. Básicamente es un manual de procedimientos que describe detalladamente cada uno de los pasos para producir semilla híbrida.

Un segundo servicio lo constituye la elaboración de un inventario de los reactivos que se tienen en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía que fueron utilizados para la realización de la investigación que se desarrolló en el laboratorio para la determinación de pureza de híbridos de tomate, por medio del cual se ha sistematizado la información referente a los reactivos y se sugiere que se continúe empleando, no solo para agilizar el proceso para obtener reactivos, sino que también para realizar a tiempo requerimientos de los mismos conforme se vayan agotando.

CAPITULO I

DIAGNÓSTICO DE LA EMPRESA GEN TROPIC SEEDS, ANTIGUA GUATEMALA

1.1 PRESENTACIÓN

Entre las actividades que se realizaron en el EPS de la Facultad de Agronomía se encuentra el diagnóstico de la empresa donde se desarrolló el mismo, el cual da a conocer la situación actual por la que atraviesa la misma.

La empresa Gentropic Seeds, se dedica a la investigación y mejoramiento genético de vegetales desde hace nueve años, posicionándose en el mercado a nivel comercial con cuatro híbridos de tomate de distintas variedades (industriales y redondos), y diferentes híbridos de chiles pimientos.

Este informe que se presenta a continuación consta de dos fases, una de campo y otra de gabinete, con el fin de realizar un diagnóstico de la producción comercial de híbridos en la empresa Gentropic Seeds. Para realizar el diagnóstico se realizó un recorrido por las instalaciones de la empresa, las cuales básicamente consisten en invernaderos y oficinas administrativas, la mayor información obtenida fue la consultada con los técnicos de la empresa, la cual se refiere básicamente a una matriz de priorización de problemas que incluye el nivel de escolaridad, el nivel de conocimiento del personal sobre los procesos de producción, el estado de la infraestructura (invernaderos) y las limitantes en la producción de semilla híbrida. A través de la matriz se pudo establecer que el principal problema encontrado fue que para evaluar los lotes de pureza de los híbridos que se producen, se realiza en un tiempo largo (aproximadamente de 75 a 80 días). Por lo que para fines comerciales se necesita encontrar un método que se pueda realizar en un menor tiempo para poder liberar los lotes y venderlos, para lo cual se propuso un trabajo de laboratorio utilizando Marcadores Moleculares con los cuales se ayudará a minimizar el tiempo a cinco días. Otra de las propuestas que se realizaron fue la de realizar un manual con los pasos que se utilizan para la producción de la semilla híbrida.

1.2 MARCO REFERENCIAL

1.2.1 Generalidades biofísicas del área

La finca Tierra de Fuego en la cual opera su producción la empresa Gentropic Seeds, se localiza en el municipio de San Juan Alotenango, Sacatepéquez, a 55 km de la ciudad Capital. Geográficamente se encuentra en las coordenadas 14°29'13" Latitud Norte, y 90°40'03" Longitud Oeste. La región fisiográfica a la que pertenece es Tierras Altas Volcánicas y los suelos pertenecen a la serie de suelos de Alotenango, son suelos con alta fertilidad, la geología es de origen volcánico cuaternario y según Holdridge se encuentra en la zona de vida de Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical (boca costa), en el cual el promedio de lluvias anual es de 1,344 mm de precipitación y la biotemperatura es de 15°C, habiendo una época seca (octubre-abril) y una lluviosa (abril-octubre), con canícula en julio y agosto (1, 2).



Figura 1. Vista de la finca Tierra de Fuego, en San Juan Alotenango.

1.2.2 Marco principal de trabajo del presente estudio

Actualmente en la empresa Gentropic Seeds, se lleva a cabo el proceso de producción de semilla híbrida de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill), por lo cual se necesita determinar la pureza de la misma, debido a que se están produciendo millones de pilones de distintos materiales y para su venta se tiene que tener plena seguridad de que

en el proceso de polinización no existieron semillas que procedan de frutos auto polinizados. La importancia de esto es que al momento de que el productor inicie la producción obtenga frutos con las características que debe expresar el híbrido. Actualmente la determinación de la pureza de un lote de semilla se realiza sembrando 300 semillas en un semillero, luego se trasplantan y se esperan de 75 a 80 días para observar las características de las plantas híbridas y con ello determinar la pureza del lote para ponerlo a la venta.

Sin embargo la prueba de pureza en campo descrita en el párrafo anterior, se puede reducir significativamente en tiempo y en costo con el empleo de Marcadores Isoenzimáticos (isoenzimas) que son proteínas ampliamente utilizadas para marcadores moleculares usadas en genética de plantas. Las isoenzimas son variantes de una misma enzima (son formas funcionalmente similares de enzimas) que comparten un sustrato en común pero difieren en su movilidad electroforética. Ya que es un método muy eficaz y que se pueden obtener resultados en un lapso corto de tiempo, se recomienda trabajar con ellas.

1.2.3 Fincas experimentales

La empresa Gen Tropic Seeds, cuenta con fincas experimentales las cuales se encuentran en los Departamentos de Sanarate y Mazatenango, así mismo cuenta con una finca experimental en El Salvador.

1.2.4 Programas e híbridos

Se dispone de un programa de líneas de avance de tomate manzano y un programa de líneas de avance de chile jalapeño, ambos programas se están ejecutando continuamente en cada una de las fincas experimentales. Como productos finales se han obtenido cuatro híbridos comerciales de tomate, dos de tipo alargado y dos de tipo redondo, siendo éstos Llanero, San Miguel, Río Blanco y Romelia.

1.3 OBJETIVO

Elaborar un diagnóstico del estado actual de la empresa Gentropic Seeds, que permita conocer el proceso que se lleva a cabo para la producción de semilla híbrida en la empresa Gentropic Seeds.

1.4 METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el diagnóstico de la empresa Gentropic Seeds, en primer lugar se elaboró el plan de diagnóstico, luego con base al plan se desarrolló la metodología que consta de dos fases: fase de campo y fase gabinete.

Las fases de campo y de gabinete se realizaron en las instalaciones de la empresa Gentropic Seeds durante el mes de febrero de 2007. Como resultado de estas dos fases a continuación se describe los métodos y resultados que se obtuvieron.

1.4.1 Fase de campo

En esta fase se llevaron a cabo diferentes actividades, descritas a continuación:

- Recorrido por las instalaciones de la empresa para observar sus procesos de producción.
- Entrevistas a las personas involucradas en el proceso.
- Detectar posibles fallas que afecten el proceso.
- Determinar la situación actual del proceso de producción de semillas híbridas de tomate

1.4.2 Fase de gabinete

En esta fase se ordenó, organizó y analizó, la información recopilada en la fase de campo, para finalmente integrar toda la información en el presente documento.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Priorización de problemas

En el Cuadro 1 se presenta la matriz de priorización de los problemas encontrados en la empresa Gentropic Seeds.

Cuadro 1. Matriz de priorización de problemas de Gentropic Seeds, febrero 2007.

	Bajo Nivel Escolaridad	Poca divulgación de la Información sobre los procesos de producción	Deterioro de la Infraestructura	Falta de manual para la producción	Determinación de Pureza
Bajo nivel de Escolaridad	XXXXX	Poca Divulgación de la Información sobre los procesos de Prod.	Deterioro de la Infraestructura	Falta de Manual para la Prod.	Determinación de Pureza
Poca divulgación de la Información sobre los procesos de producción	XXXXX	XXXXX	Poca Divulgación de la información	Falta de Manual para la Prod.	Determinación de Pureza
Deterioro de la Infraestructura	XXXXX	XXXXX	XXXXX	Falta de Manual para la Prod.	Determinación de Pureza
Falta de manual para la producción	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	Determinación de Pureza
Determinación de Pureza	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX

De acuerdo a la matriz de priorización de problemas, se pudo determinar que lo más representativo para el mes de febrero del año 2007 en la empresa Gentropic Seeds, es la necesidad de integrar un método de laboratorio para minimizar el tiempo para la determinación de pureza de los lotes de tomate y chile que se están produciendo, esto para agilizar la liberación de lotes para ponerlos a la venta. Actualmente se realiza la prueba de pureza en campo y esta requiere entre 75 a 80 días para obtener resultados, es decir que cuando un lote nuevo de semillas ingresa a la empresa, se requiere de al menos de tres meses para determinar su pureza y después de éste tiempo se podrá producir pilones para la venta al público.

Como segunda acción o necesidad prioritaria, se tiene la necesidad de elaborar un manual que tenga los procesos que están involucrados en la producción de la semilla híbrida.

La infraestructura deteriorada se ha ido mejorando debido a que se han realizado inversiones para nuevos invernaderos construidos de aluminio puesto que los anteriores eran de madera (Figura 2).



Figura 2. Invernaderos de madera que se están sustituyendo por los de aluminio.

La falta de información de los procesos de producción, que es el tercer problema priorizado se corregirá cuando se presente el manual de estos.

El bajo nivel de escolaridad no es un factor que pueda intervenir negativamente en el proceso de producción puesto que el 80% del personal cuenta con un nivel de tercero básico, el 15 % con un nivel de sexto primaria y un 5% con diversificado. Para el tipo de trabajos que se realizan el personal cuenta con la capacidad necesaria para realizarlos.

1.6 CONCLUSIONES

Después de realizar las fases de campo y gabinete, y según la matriz de priorización de problemas, presentada en el Cuadro 1 se determinó lo siguiente:

- 1.6.1 El método de prueba de pureza de híbridos de tomate en campo necesita más de tres meses para poder obtener resultados en la determinación de pureza de los lotes de semilla híbrida producida, lo cual retarda la liberación de los materiales.
- 1.6.2 No existe un manual que contenga los procesos que se realizan en la producción de la semilla híbrida.

1.7 BIBLIOGRAFÍA

1. Cruz, JR De la. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, basada en el sistema de Holdridge. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
2. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, GT). 2000. Mapas temáticos digitales de la república de Guatemala, a escala 1:250,000. Guatemala. 1 CD.

00

CAPITULO II
INVESTIGACIÓN

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMO ISOENZIMÁTICO EN LÍNEAS DE TOMATE
PARA SU UTILIZACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE PUREZA DE HÍBRIDOS
COMERCIALES**

**ISOENZYMES POLYMORPHIC IDENTIFICATION IN TOMATOES LINES TO BE USED
TO DETERMINE PURITY INCOMERCIAL HYBRIDS.**

2.1 PRESENTACIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue desarrollar un protocolo para determinar por medio de polimorfismo isoenzimático la pureza de híbridos de tomate, previo a su comercialización en pilones.

Se emplearon dos geles y nueve enzimas. Las enzimas polimórficas evaluadas en gel de poliacrilamida fueron cinco: alcohol deshidrogenasa (ADH), Ácido Shikimico deshidrogenasa (SKDH), Esterasa (EST), Malato deshidrogenasa (MDH) y Fosfata Ácida (ACP). En gel de almidón se evaluaron cuatro enzimas polimórficas: Malato deshidrogenasa (MDH), Esterasa (EST), Alcohol deshidrogenasa (ADH) y Superóxido dismutasa (SOD).

De los 9 sistemas isoenzimáticos evaluados se identificó la isoenzima fosfata ácida (ACP) como polimórfica y útil para ser utilizada como referente en determinación de híbridos de tomate (*S. lycopersicum*). Así mismo se determinó que la gel con mejores resultados fue la gel de poliacrilamida.

Con este trabajo se estableció el protocolo para determinar la pureza de los híbridos de tomate.

En cuanto a los costos comparativos la utilización del protocolo propuesto en esta estudio es 58.4% más barato que el sistema tradicional utilizado en el campo para establecer la pureza de los híbridos.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Definición de términos

A. Aminoácido

Sustancia química orgánica en cuya composición molecular entran un grupo amino y otro carboxilo. Todos los organismos están constituidos por los mismos 20 aminoácidos como bloques de construcción para ensamblar las moléculas de proteína. A pesar del número limitado de tipos de aminoácidos, las variaciones en el orden en el cual se conectan y en el número de aminoácidos por proteína permiten una variedad prácticamente ilimitada de proteínas (15).

B. Bando

Las bandas de ácidos nucleicos o moléculas de proteínas tienen propiedades electroforéticas idénticas (tamaño, carga y conformación en geles no desnaturizantes), se separan en un gel y migran idénticamente formando una línea detectable. El conjunto de bandas en un gel se conoce como zimograma (26).

C. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Técnica para separar macromoléculas, por ejemplo, de ácidos nucleicos y proteínas en función de su tamaño y estructura mediante electroforesis a través de una matriz inerte que consiste de acrilamida ligada en forma cruzada. La separación de las proteínas, usualmente se lleva a cabo en presencia de sodio dodecil sulfato. La desnaturización completa de las proteínas antes de electroforesis en gel de poliacrilamida se lleva a cabo por calentamiento, especialmente en presencia de SDS. Los ácidos nucleicos o los productos de las reacciones de secuenciación del ADN pueden desnaturizarse mediante calentamiento libre de formamida, urea o hidróxido metil mercúrico antes de la electroforesis en geles fuertemente desnaturizantes, con la finalidad de separar fragmentos que difieren solamente en un nucleótido (26).

D. Enzima

Cualquiera de las numerosas sustancias orgánicas especializadas compuestas por polímeros de aminoácidos, que actúan como catalizadores en el metabolismo de los seres

vivos. Con su acción, regulan la velocidad de muchas reacciones químicas implicadas en este proceso (15).

E. Gel de poliacrilamida

Soporte (matriz) insoluble, tridimensional de monómeros de acrilamida ligados en forma cruzada con N,N'-bisacrilamida de metileno (por ejemplo, TEMED) y usada para electroforesis. El tamaño de los poros del gel puede cambiar por la relativa variación proporcional de los ingredientes y esto puede adaptarse a la separación electroforética de moléculas fragmentadas de diferentes tamaños como proteínas y ácidos nucleicos (11, 20, 22).

F. Isoenzimas

Son variantes de una misma enzima (son formas funcionalmente similares de enzimas) que comparten un sustrato en común pero difieren en su movilidad electroforética (15).

G. Marcadores moleculares

Cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía; el marcador molecular estándar es una escalera de fragmentos de diferente peso molecular. El marcador estándar de peso molecular, es una mezcla de diferentes péptidos, proteínas o fragmentos de ácidos nucleicos con masa molecular conocida, usados para la calibración (determinación) del peso molecular de las proteínas, o de las moléculas de los ácidos nucleicos después de su separación por electroforesis (26).

H. Proteína

Sustancia constitutiva de las células y de las materias vegetales y animales. Es un biopolímero formado por una o varias cadenas de aminoácidos, fundamental en la constitución y funcionamiento de la materia viva, como las enzimas, las hormonas, los anticuerpos (15).

I. Polimorfismo

Cambio localizado en una secuencia específica de ADN dentro de un genoma que ocurre generalmente por deleciones, inversiones, inserciones o rearrreglos en el material genético. Estas mutaciones permiten la existencia de diferentes alelos para un *locus* específico. En el caso del ADN repetido, las variaciones en el número de repeticiones pueden dar lugar a una longitud diferente en los fragmentos de restricción lo que los hace polimórficos. Los polimorfismos pueden detectarse por técnicas de huellas de ADN (26).

J. Peine

Estructura de plástico parecido a un peine que se usa para formar pozos (orificios) con geles de poliacrilamida o agarosa. Las muestras de AND, ARN o proteína se colocan dentro de los pozos antes de la electroforesis (26).

K. Revelado

El revelado es un proceso de reducción, en el cual el revelador (ACP) reacciona químicamente con los haluros de plata expuestos a la luz y crea plata metálica negra. La cantidad de luz que incide sobre la emulsión determina la cantidad de plata metálica obtenida durante el revelado. Mientras más luz haya incidido sobre la emulsión, más plata metálica se creará, asimismo mientras más tiempo de revelado se le da a la película, los haluros de plata alterados por la luz se transformarán cada vez en plata metálica negra y así hasta que se transformen en plata los haluros apenas expuestos, generando así la gama de grises que permiten distinguir las bandas.

2.2.2 Biotecnología

La biotecnología puede ser definida como un conjunto de técnicas que permiten la utilización de seres vivos (microorganismos, células vegetales y animales, etc.) con propósitos industriales, comerciales, conservación entre otros. Algunas de estas técnicas se conocen desde hace mucho tiempo (la fermentación y la enzimología por ejemplo), y son principalmente el resultado de la experiencia práctica acumulada a lo largo de mucho tiempo y constituyen la llamada biotecnología tradicional (1).

La biotecnología también abarca un gran campo de actividades en las cuales se incluyen diferentes metodologías entre las que se mencionan las técnicas biotecnológicas que constituyen la utilización de tejidos que sería un complemento para aumentar la eficiencia de programas de mejoramiento genético, las cuales incluyen la fusión y regeneración de protoplastos (1).

2.2.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son indicadores de la conformación de las moléculas de ADN, por medio de la identificación de diferentes segmentos de esta. Para ello se basa en métodos de interpretación indirecta los cuales utilizan proteínas de almacenamiento o isoenzimas, y en los métodos directos los cuales trabajan en contacto con la molécula de ADN, ayudándose de técnicas como los RAPD's, RFLP's, AFLP's y microsatélites. Los marcadores moleculares indirectos, pueden revelar la información contenida en un gen, mediante: a) localización subcelular, b) la estructura y c) la base genética de las enzimas, que son características conocidas y altamente conservadas en la evolución, lo que permite la interpretación de los patrones de bandeo en las geles de electroforesis. Los marcadores moleculares son útiles para determinar la estructura genética de una población, así como la herencia mendeliana y codominancia, pudiéndose detectar en cualquier fase de desarrollo y cualquier tejido de un organismo (3).

2.2.4 Electroforesis

La electroforesis consiste en la separación de las proteínas con base en su migración en un campo eléctrico a través de un aparato que aplica un fuerte potencial eléctrico a una placa de gel. En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), las muestras de proteína se colocan sobre una matriz de gel muy intrincada, y se aplica un campo eléctrico. Entonces se amortigua la matriz a un pH ligeramente alcalino de modo que las proteínas sean aniónicas y migren hacia el ánodo. Por lo común, se corren a la vez varias muestras, junto con una muestra de referencia. La matriz de gel retarda la migración de las moléculas grandes a medida que se mueven en el campo eléctrico. Por esto, las proteínas son fraccionadas sobre la base, tanto de carga, como de masa (21).

A. Electroforesis de isoenzimas

En la actualidad la realización de la mayoría de los estudios a nivel de genoma es necesario realizar electroforesis de gel, ya que es una técnica relativamente sencilla y económica en comparación con otras.

Una forma de electroforesis de proteínas (análisis de isoenzima) es una metodología ampliamente utilizada en diferentes estudios de diversidad genética, biología evolutiva y mejoramiento agrícola y forestal entre otros. Existen diferentes técnicas de electroforesis, que dependen del medio de soporte que se utilice (agar, almidón, acrilamida) (20).

Se pueden observar las isoenzimas cuando los extractos de los tejidos se someten a electroforesis en uno de los varios tipos de geles y posteriormente se sumergen en soluciones conteniendo colorantes específicos para cada enzima. El análisis genético puede indicar que algunas de las variantes electroforeticas son codificadas por alelos alternos en un locus, en cuyo caso los productores alélicos se denominan "aloenzimas". Los datos que se obtienen de los geles consisten de un número de productos enzimáticos con relativa movilidad (bandas), los que con análisis genéticos apropiados se transforman en genotipos con un locus o multilocus para cada individuo analizado (23).

Debido a que las isoenzimas son usualmente heredadas en forma codominante, cruces entre individuos portadores de diferentes electromorfos producirán una progenie F1 que mostrará los electromorfos parentales. Adicionalmente, la F1 puede mostrar bandas híbridas no observadas en ninguno de los padres, la presencia y número de ellas depende del número de subunidades de polipéptidos en la enzima activa. Así para una enzima dimerica, tres bandas son observadas, las dos homodiméricas parentales y un producto adicional de movilidad intermedia o heterodimero, compuesto de un polipéptido codificado para cada uno de los dos alelos parentales. En el caso de que la enzima sea tetrámera, cinco bandas son visibles en individuos heterocigotos, dos homotetrameras (AAAA y BBBB) y tres heterotetrameras (AAAB, AABB y ABBB). Cabe mencionar que estos son los casos más fáciles de interpretar, sin embargo, cuando dos o más genes están presentes,

la interpretación de las bandas electroforéticas se hace más complicada. Todos los tipos de electroforesis están gobernados por el principio general de la fórmula siguiente (16, 23).

$$\text{Movilidad de la molécula} = \frac{\text{Voltaje aplicado} \times \text{Carga neta de la molécula}}{\text{Fricción de la molécula.}}$$

B. Geles de poliacrilamida y almidón

Los geles de poliacrilamida poseen mayor poder de resolución que el gel de almidón (15) ya que poseen poros finos que permiten la penetración de moléculas hasta un cierto límite de tamaño e impiden el paso de las moléculas mayores. La acrilamida, $\text{H}_2\text{-CH-CO-NH}_2$, es un solvente sólido en agua e insoluble en solventes orgánicos no polares. Se le puede polimerizar en 3 formas distintas; por polímeros vinílicos de la acrilamida, de los que se obtienen un polímero lineal soluble en agua y con copolimerización con metileno-bisacrilamida, $\text{H}_2\text{C} = \text{CH-CO-NH-CH}_2\text{-NH-CO-CH=CH}_2$, en donde se obtiene un material en el que las cadenas de poliacrilamida tienen enlaces cruzados. Los monómeros que se usan en la síntesis de poliacrilamida son tóxicos y se deben manejar con cuidado. Los puntos débiles del material son los grupos amino que pueden ser hidrolizados a pH extremos; al hidrolizarse producen grupos carboxilo que le imparten al gel propiedad más o menos de intercambiador de iones (12).

La separación electroforética de mezclas complejas de proteínas se puede llevar a cabo en ciertos tipos de medios de soporte incluyendo geles de almidón, poliacrilamida, agarosa y membranas de celulosa. Estos dos últimos generalmente no se emplean para polimorfismo enzimático. Cuando se requiere del poder máximo de resolución con frecuencia se prefiere geles de poliacrilamida. Una propiedad valuable de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la alternancia de la concentración de acrilamida, entonces se incrementa el rango de los pesos moleculares que son separables. Otras ventajas de las geles de poliacrilamida es la uniformidad y la transparencia, facilitando la cuantificación densitométrica del producto, permitiendo una amplia compatibilidad de ensayos. Usualmente se requiere de poco tiempo para las corridas (20).

La electroforesis en geles de almidón, continua siendo preferido para muchos estudios que involucran el análisis de un gran número de individuos de diferentes enzimas. Entre las razones están: Simplicidad en la preparación de la gel de almidón, no toxicidad en el material utilizado (la acrialamida monómera utilizada por el método PAGE es un neurotóxico), relativo bajo costo de equipo y facilidad del manejo de cargar las muestra dentro de la gel. Las muestras de gel de almidón son homogenizadas en crudo sin centrifugar, pero el método PAGE requiere de la clarificación de las muestras (21).

2.2.5 Isoenzimas

La habilidad de observar variaciones alélicas en las isoenzimas (polimorfismo alozimico) en estudios de la genética bioquímica, ha sido usada en plantas para examinar los procesos genéticos en todos los estudios de su ciclo de vida (20).

El potencial para utilizar aloenzimas como marcadores genéticos, no fue inmediatamente comprendido cuando la variabilidad de isoenzimas fue inicialmente descrito. Los estudios de algunas poblaciones prestaron relativamente altos niveles de polimorfismo en isoenzimas, lo cual ha conducido a una consideración de la teoría de la evolución (20).

Las isoenzimas pueden ser utilizadas para identificar distintos números de genes los cuales pueden ser usados en el estudio de diversos problemas en genética, evolución, ecología, así como en aplicaciones en agricultura. Las isoenzimas son proteínas enzimáticas generalmente localizadas en el núcleo de la célula vegetal y que funcionan en diferentes compartimientos subcelulares, por ejemplo, cloroplastos, mitocondrias, microsomas o en el citosol. Las isoenzimas catalizan la misma reacción enzimática. En el estudio de las isoenzimas es necesario conocer su herencia o genética, así como su estructura o el conjunto de polipéptidos que componen a la enzima. En las células existe un numero conservado de isoenzimas, el número de genes que determinan estas isoenzimas es el mismo en todas las plantas, este número se ha conservado debido a que el metabolismo se ha conservado (23).

Las isoenzimas pueden usarse para identificar a los progenitores de una especie, lo cual es crítico para entender la evolución de nuevos atributos en la especie y para determinar el grado de identidad entre diferentes poblaciones. Además usando isoenzimas para distinguir diferentes cultivares, es posible estimar proporciones de alogamia, identificar plantas híbridas inmediatamente después de la germinación y sin tener que esperar hasta la floración en programas de mejoramiento. Es posible supervisar los cambios en variabilidad genética en programas de mejoramiento para evitar las consecuencias de la depresión endogámica (2).

El uso de isoenzimas ofrece una mejor alternativa para clasificar y caracterizar colecciones de germoplasma ya que estas son más estables ante los efectos ambientales, así mismo presentan polimorfismo fácilmente medibles e interpretables desde el punto de vista genético (3).

Algunas características de las isoenzimas:

- ✓ Expresión genética codominante.
- ✓ Identificación rápida de alelos individuales.
- ✓ Los efectos epistáticos o pleiotropicos generalmente ausentes.
- ✓ Son posibles muestras poblacionales con altos números.
- ✓ Pueden evaluarse varios loci isoenzimáticos en un solo cruce.

Cuando las geles que han sido sometidas a electroforesis son sumergidas en una solución que tiñe determinada isoenzima, una o más regiones de actividad enzimática son reveladas. El patrón de bandas que se obtiene es el correspondiente fenotipo electroforético, el cual generalmente consiste de una o más bandas coloreadas por cada individuo analizado. Este fenotipo varía grandemente en su complejidad, dependiendo de numerosos factores, tales como organismos, tejido y enzima analizada. En algunos casos, este puede ser simple, consistiendo de una banda invariable en todas las muestras (3).

Varios factores son considerados como determinantes principales del número de bandas observadas en un gel:

- ✓ El número de genes que codifican la isoenzima.

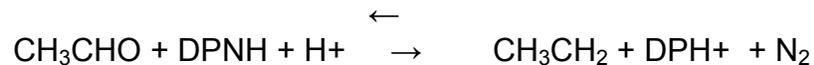
- ✓ Estado alélico (homocigoto o heterocigoto).
- ✓ Estructura de los productos de la proteína.

Su localización subcelular (en plastidios o en el núcleo) (15).

2.2.6 Isoenzimas polimórficas para el tomate

A. ADH (Alcohol Deshidrogenasa)

Esta enzima llamada deshidrogenada alcohólica cataliza la reacción que reduce el acetaldehído por el DPNH (22). La reacción es la siguiente:



Así en la levadura, el acetadehido sustituye el ácido pirúvico como oxidante del DPNH que surge en la oxidación del 3 - fosfogliceraldehido. Esta enzima es elemento importante, componente del metabolismo del etanol (13).

La primera y principal vía usa alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa que convierten el alcohol en acetaldehído y de hi a acetato, que luego pasa a acetil-CoA. En las dos reacciones se produce NADH- y H+ (15).

En la primera vía, el etanol es convertido en acetaldehído, el cual puede seguir dos caminos:

- a) Fijación a proteínas y ácidos nucleicos.
- b) Conversión a acetato, acetil-CoA y luego intervenir en el incremento de síntesis de ácidos grasos.

En la segunda vía, la enzima interviene en la relación NADH/NAD produciendo:

- I. Incremento en la proporción lactato/piruvato.
- II. Inhibición de gluconeogenesis.

Bloqueo de oxidación de ácidos grasos (15).

B. EST (Esterasa)

Esta enzima pertenece al grupo de las hidrolasas y forma intermediarios covalentes enzima-sustrato. La esterasa posee un grupo reactante serina cuya fórmula molecular es $\text{OH-CH}_2\text{-CH}$ y su tipo de intermediario covalente es el Acil Ester (23).

Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de las grasas neutras, originando tres moléculas de ácido graso y una glicerol, en plantas o animales, también denominadas lipasas (23).

C. MDH (Malato deshidrogenasa)

Esta isoenzima cataliza la reacción:



Debe unirse, en primer lugar el malato al NAD^+ y rinde el complejo E-NAD, el malato se combina con este último, con lo que se forma el complejo ternario E-NAD-malato (23).

D. SKDH (Ácido shikimico deshidrogenasa)

La mayoría de los compuestos fenolitos se derivan de los intermediarios del metabolismo respiratorio a través del ácido shikimico. Ciertos aminoácidos del grupo prostético de ciertas enzimas y la sustancia estructural lignina son compuestos fenolitos. El primer intermediario estable de importancia que tiene un anillo bencénico es el ácido shikimico, que da su nombre a esta vía de transformaciones (4).

E. AcP (Fosfatasa ácida)

Fosfatasa ácida (AcP) es el nombre dado a todas las fosfatasas que tienen actividad óptima por debajo de un pH de 7.0. La presencia de fosfatasa ácida en suero proviene de varias fuentes que incluyen: los riñones, el hígado, el bazo, los eritrocitos, las plaquetas y la glándula prostática. Cada uno de éstos contribuye con isoenzimas de fosfatasa ácida que son específicas del órgano o células de origen. La fosfatasa ácida prostática es la de mayor interés clínico ya que pueden encontrarse concentraciones séricas elevadas de esta enzima en pacientes que padecen carcinoma prostático con

metástasis. La fosfatasa ácida prostática puede diferenciarse de las otras fosfatasas ácidas mediante la adición de L-tartrato (7, 30).

De los muchos métodos propuestos para determinar la fosfatasa ácida, el más aceptado es el método de Hillman (14), en el cual hay una reacción de acoplamiento del α -naftilfosfato con el rojo de TR de adherencia rápida. El procedimiento de DCL para la determinación de la fosfatasa ácida se basa en este método, utilizando L-tartrato como inhibidor específico de la fracción prostática.

La fosfatasa ácida hidroliza al α -naftilfosfato, formando α -naftol, el cual reacciona inmediatamente con el rojo de TR de adherencia rápida, produciendo un colorante que se absorbe a 405 nm. El índice de incremento en absorbancia a 405 nm es proporcional a la actividad de la fosfatasa ácida. Si se agrega L-tartrato al reactivo, la fosfatasa ácida prostática se inhibe, pero todas las demás fosfatasas ácidas en el suero reaccionan. Por tanto, la prueba se realiza tanto en presencia como en ausencia del L-tartrato. La diferencia en la actividad entre los dos análisis es igual a la actividad de la fosfatasa ácida prostática en el suero (7, 14, 30).

2.2.7 Generalidades e importancia económica del tomate

En Guatemala el cultivo ha tomado importancia, el área cosechada para el año agrícola 2002-2003 fue de 3,410 hectáreas (17). En todos los departamentos de Guatemala se cultiva el tomate, siendo los departamentos de Jutiapa, Baja Verapaz, Chiquimula, Guatemala y Zacapa, los que generan más del 55 por ciento de la producción obtenida (27). El valor nutritivo del fruto de tomate se presenta en el Cuadro 1, ocupando el lugar 16 en cuanto a concentración relativa de un grupo de 10 vitaminas y minerales (24).

Cuadro 2. Valor nutritivo medio del tomate por 100 g de producto comestible

DESCRIPCIÓN	VALOR
Materia seca	6.2 por ciento
Energía	20.0 kilocalorías
Proteínas	1.20 gramos
Fibra	0.70 gramos
Calcio	7.00 miligramos
Hierro	0.60 miligramos
Caroteno	0.50 miligramos
Tiamina	0.06 miligramos
Riboflavina	0.04 miligramos
Niacina	0.60 miligramos
Vitamina C	23.00 miligramos

Fuente Tello, J. 2001 (23).

2.2.8 Descripción botánica del tomate

A. Raíz

El sistema radicular consiste en una raíz principal de la que salen raíces laterales y fibrosas, formando un conjunto que puede tener un radio hasta de 1.5 metros. En el cultivo, sin embargo, las labores de trasplante destruyen la raíz principal y los más común es que presente una masa irregular de raíces fibrosas. Es muy frecuente la formación de raíces adventicias en los nudos inferiores de las ramas principales (18, 29).

B. Tallo

El tallo es herbáceo, aunque tiende a lignificarse en las plantas viejas. Visto en sección transversal parece más o menos circular, con ángulos o esquinas; en las ramas jóvenes es triangular. La epidermis se forma en una capa de células, las que a menudo tienen pelos largos. Debajo hay una zona de colénquima de dos a cinco células de espesor, que es más gruesa en las esquinas y que constituye el mayor sostén del tallo. Sigue luego la región cortical, con cinco a diez capas de parénquima, de células grandes con muchos espacios intercelulares. Finalmente, el cilindro vascular se compone, de afuera hacia adentro, de floema, en bandas aisladas o unidas por conexiones delgadas y xilema que forma un tejido contínuo. La médula, que ocupa gran parte del tallo, tiene hacia la parte externa cordones de fibra del periciclo interior (18, 28).

C. Porte

Entre los diversos tipos de plantas de tomate hay cultivares de porte erecto o rastrero, a menudo reducido a un solo tallo. El eje central de la planta y sus ramas son de crecimiento monopodial y llevan en el ápice una yema vegetativa, de modo que crecen indeterminadamente. En el tallo y ramas, de las yemas axiales brotan hojas e inflorescencias; lo normal es que entre dos inflorescencias haya generalmente tres hojas. En algunos casos una rama florífera se continúa en el ápice y forma hojas. Una forma de crecimiento distinta a la anterior se debe a un gene recesivo que afecta el crecimiento del tallo y las ramas al emitir una inflorescencia terminal, dando por resultado el crecimiento determinado (18, 27).

D. Hojas

La forma de las hojas es muy variable y depende en gran parte de las condiciones ambientales. La lámina está dividida en pares de segmentos o folíolos, de diferente tamaño. Con frecuencia entre dos pares de folíolos grandes hay de uno a tres pares más pequeños, en todos ellos los bordes son muy recortados. En las hojas como en los tallos jóvenes, hay abundante pubescencia. Los pelos pueden ser largos y agudos o terminados en forma acotada (9, 18).

E. Inflorescencia

La inflorescencia más corriente es una cima racimosa, generalmente simple en la parte inferior de la planta y más ramificada en la superior. Las flores tienen un pedúnculo corto y curvo hacia abajo, por lo que asumen una posición pendular, el pedúnculo presenta un engrosamiento en el centro, que corresponde a la superficie de abscisión y es muy corriente en esta especie que un gran número de flores caiga prematuramente (9, 18).

F. Polinización

Las flores se desarrollan en racimo y se abren simultáneamente. En una misma rama hay siempre botones, flores y frutos. La antésis ocurre por lo común en las mañanas y 24 horas después se inicia la salida del polen. Este aparece en el lado interno de las

anteras y, por la posición pendiente de la flor, cae directamente sobre la superficie de los estigmas. La autopolinización es lo más frecuente en los tomates cultivados. La polinización cruzada debido a insectos ocurre en un cinco por ciento (8, 18).

G. Fruto

El fruto es una baya de forma muy variada. En los principales cultivos comerciales es de forma ovalada (aplanada) con rebordes longitudinales o lisa; hay también elipsoidales y piriformes. En los cultivares comerciales, seleccionados por el mayor número de tabiques y su grosor, es corriente encontrar de 5 a 10 celdas. La epidermis es una capa de células de paredes externas engrosadas por la cutícula (18).

H. Semilla

Las semillas, planas y ovaladas, miden de 2 a 5 milímetros de largo y están cubiertas de pelos finos, el embrión que ocupa la mayor parte se encuentra arrollado cerca de la superficie. Las capas de células que rodean las semillas se disuelven en la madurez, formando una masa gelatinosa rica en granos de almidón (8, 9, 18).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

- A. Desarrollar un protocolo para determinar por medio de Polimorfismo Isoenzimático la pureza de híbridos de tomate.

2.3.2 Objetivos Específicos

- A. Determinar la isoenzima polimórfica para los híbridos de tomate.

- B. Realizar un análisis de costos con la utilización de los métodos convencionales y los isoenzimáticos.

2.4 HIPÓTESIS

- 2.4.1 Al menos una de las isoenzimas evaluadas dará polimorfismo para determinar la pureza de los híbridos de tomate.

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 Antecedentes y ubicación del estudio

El presente trabajo es una parte del proyecto de investigación y mejoramiento genético que se llevó a cabo en la empresa Gentropic Seeds y Pilonos de Antigua S.A.

El propósito de este trabajo fue determinar la pureza de los híbridos de tomate que se están produciendo en la empresa por medio de marcadores moleculares (isoenzimas); utilizando a las líneas parentales como comparadores del bandeo que va a producir el híbrido.

En empresas semilleristas de otros países como Heinz, Seminis, se tiene una cantidad de semillas estipuladas para ser evaluada su pureza por cada lote producido que es de 300 semillas (25).

Las semillas que se utilizaron para ser evaluadas se sembraron en la empresa Pilonos de Antigua S.A; al momento de germinar la semilla se llevó a laboratorio para su análisis de isoenzimas.

2.5.2 Transporte de las muestras

Se utilizaron plantas de tomate previamente seleccionadas, tanto la planta híbrida como la de las líneas parentales. Estas plantas se cosecharon y se tuvo en cuenta que la humedad que estas llevan fuera la suficiente para que no se deshidrataran los tejidos vegetales para luego ser analizadas en el laboratorio.

A. Obtención del extracto vegetal

Se tomaron de 1.0 a 1.5 mg de hoja tierna recién cortada y se agregaron a la bandeja de extracción en hielo, posteriormente fueron homogenizadas con 850 microlitros de buffer de extracción, el cual debe estar a 4 °C. Todo este proceso se realizó en una campana de extracción de gases, por los reactivos que se utilizaron (Figura 3).

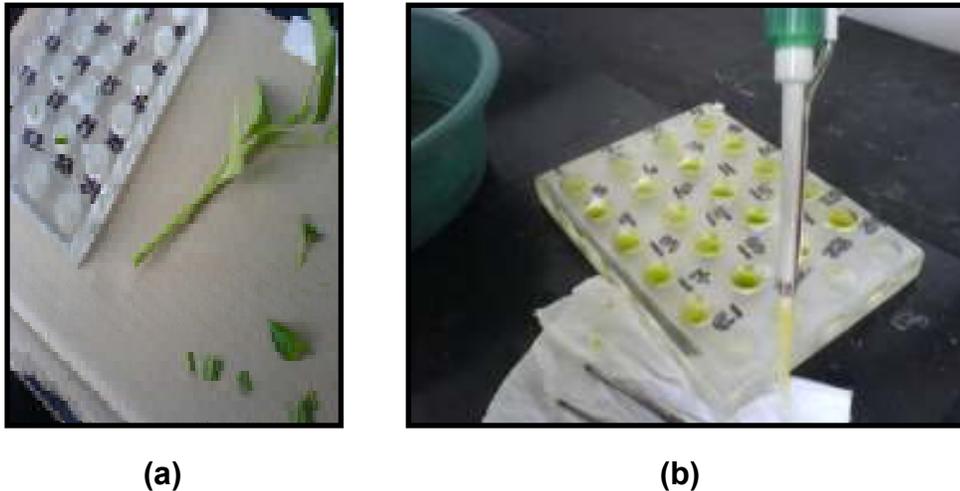


Figura 3. a) material vegetal de tomate listo para ser macerado; b) bandeja de extracción con 24 pozos dentro de la cámara de extracción de gases.

B. Preparación del Buffer de extracción 0.1M tris-HCL, pH 7.5

En el Cuadro 3 se presentan los componentes del buffer de extracción utilizado.

Cuadro 3. Componentes para la preparación del Buffer de extracción

Componente	Cantidad
Agua	12.00 ml
TritónX-100	0.30 ml
Polyvinylpolypyrrolidone	0.75 gr
Sucrose Ultra pura	0.30 gr
2-Mercaptoetanol	0.30 ml
Volumen final	15.0 ml

Con los reactivos indicados en el Cuadro 3, se alcanza un volumen de 13.5 ml, luego para alcanzar el volumen final de los 15 ml, se asesta con HCl hasta alcanzar el volumen final indicado.

El pvpp y el mercaptoetanol se agregaron al momento de ser usado el buffer. Es importante agregar el mercaptoetanol dentro de la campana de extracción ya que es altamente volátil y tóxico. Todo este proceso se debe realizar en frío, para esto se utilizaron bandejas que contenían suficiente hielo para que las enzimas no sufrieran

cambio alguno porque estas al cambio de temperatura cambian sus estructuras y se dificulta su observación.

Después que el material vegetal fue homogenizado con el buffer, se trasladó a un tubo de reacción de 1.5 ml de volumen previamente enfriado, el cual se centrifugó durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C, se tomaron 350 microlitros del sobrenadante de la muestra, el cual se trasladó a otro tubo de reacción frío, al cual anteriormente se le añadió 50 microlitros de glicerina con la finalidad de darle mayor densidad a la muestra para que el material homogenizado precipitara con más facilidad en los pozos del gel de poliacralamida al 12%. Al llegar a esta fase las muestras se encuentran listas para dar inicio a la electroforesis. Las muestras pueden permanecer en refrigeración hasta tres días máximo (11, 21, 23).

2.5.3 Preparación de los geles

A. Gel de almidón

Este gel se utilizó para las isoenzimas MDH, ADH Y EST. Para el Gel de almidón se aplica en un recipiente con capacidad de un litro, 35 gramos por litro de Starch, 0.5785 gramos por litro de ácido cítrico $C_6H_8O_7$ a una concentración de 0.003M y finalmente 1.0953 gramos por litro de tris $C_4H_{11}NO_3$ a una concentración de 0.009M. Para realizar la corrida electroforética se necesita un litro de buffer de electrodo.

B. Gel de poliacralamida

El sistema que se utilizó, fue el sistema discontinuo que consiste en un gel de resolución (running gel) al 12 % de concentración de acrialamida, un gel de peine (comb gel) al 2 % de concentración de acrialamida. Este gel se utilizó para las isoenzimas MDH, EST, ADH, SKDH Y ACP.

2.5.4 Cargado de la muestra (Poliacralamida)

Para realizar el cargado de la muestra previamente se armaron los geles de poliacralamida con las diferentes concentraciones mencionadas para posteriormente colocar en la parte superior del equipo los peines que sirven para formar las cavidades o

pozos donde se aplicaron 200 microlitros del extracto vegetal, macerado y homogenizado con el buffer de extracción. El tamaño de las geles es de 20 X 16 cm. Para la aplicación del extracto se emplea una micro pipeta de 1000 microlitros (11, 23). A continuación se describe el armado del equipo, el cargado y el proceso de electroforesis, además de la evaluación de las isoenzimas que se probaron en esta investigación.

A. Armado del equipo

En la Figura 4, se muestran los pilares que sostienen las láminas de vidrio, que es donde se aplica la poliacralamida a distintas concentraciones; dichos pilares ayudan a darle presión a las láminas para que no existan fugas de poliacralamida cuando se vierten en el equipo.

Además también se puede utilizar prensadores, los cuales tendrán la misma función que estos pilares que es la de mantener las laminas de vidrio niveladas y con suficiente presión para que estén listas para recibir la poliacralamida.



Figura 4. Pilares que sostienen las láminas de vidrio donde se vierte la poliacralamida.

En la Figura 5, se muestra el equipo ya cargado con la poliacralamida polimerizada y además se puede observar en la parte superior el peine de color blanco que es el

encargado de formar los pozos o cavidades donde se aplica el extracto del material vegetal.



Figura 5. Equipo cargado con la poliacralamida y peine receptor de muestras.

Las cámaras verticales de electroforesis para proteínas, se observan en la Figura 6, ya listos para quitarle los peines y proceder a la cargada de las muestras.



Figura 6. Aparato de electroforesis listo para retirar los peines.

En la Figura 6, se aprecia la bandeja donde se homogenizó el extracto vegetal con el buffer de extracción, luego con la micropipeta de 20 microlitros se procedió a succionar la solución para aplicarla en los pozos que se formaron con el peine que lleva cada lámina en la parte superior. Toda esta operación se realizó en un ambiente frío.

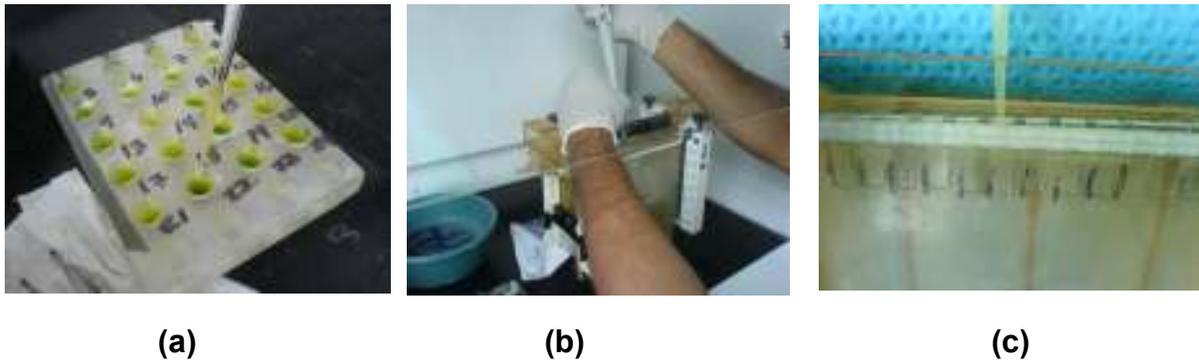


Figura 7. a) cargado del extracto vegetal en la bandeja de extracción; b) aplicación del extracto vegetal a los pozos ó cavidades c) vista ampliada del llenado de los pozos con el extracto vegetal.

B. Funcionamiento del sistema

El aparato recirculador de agua fría (Figura 8a), tiene como función estar circulando al agua en la cámara vertical de electroforesis para que el sistema se mantenga a una temperatura adecuada. También se necesita de una fuente de poder (Figura 8b) (Fisher, Biotech electrophoresis systems FB 105) la cual es la encargada de suministrar la energía a un campo eléctrico a las proteínas y a los ácidos nucleicos para que las partículas migren. La fuente poder se debe calibrar a 200 voltios y 97 miniamperios aproximadamente por 6 horas para luego revelar las láminas de poliacralamida



Figura 8. a) recirculador de agua fría y b) fuente de poder del sistema.

La corrida electroforética se realizó a una temperatura de 4 °C por seis horas, como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Corrida electroforética en ambiente frío.

Posteriormente se desconectó el equipo para colocar las geles en recipientes que contienen las isoenzimas, después se colocó en un agitador y se taparon para que el revelado fuera mejor; aproximadamente este proceso llevó de cinco a seis horas. En este lapso se debe observar las bandas en la misma posición. La del híbrido, la del padre y la de la madre (Figura 10).



Figura 10. Revelado de las bandas.

2.5.5 Cargado de la muestra para el gel de almidón

Para el caso del gel de almidón, después de macerar las muestras vegetales se colocó una mecha de papel filtro para que absorbiera la solución por medio de capilaridad. Luego el gel de almidón se cortó separando la lámina aproximadamente a 3 cm a partir de donde se deseaba realizar la corrida. Luego se colocaron las mechas que contenían la

solución, separadas unas de otras dentro de la misma hendidura, después se unieron las porciones de gel y se procedió a colocarla dentro de la cámara de electroforesis. El aparato de electroforesis se colocó en la refrigeradora y para que el gel hiciera contacto con el buffer de electrodo se le colocó un par de esponjas, una a cada extremo para que por capilaridad el buffer haga contacto con el gel, para esta corrida se empleó corriente de 60 miniampereos, aproximadamente 120-150 voltios por 4 horas (Figura 10) (23).

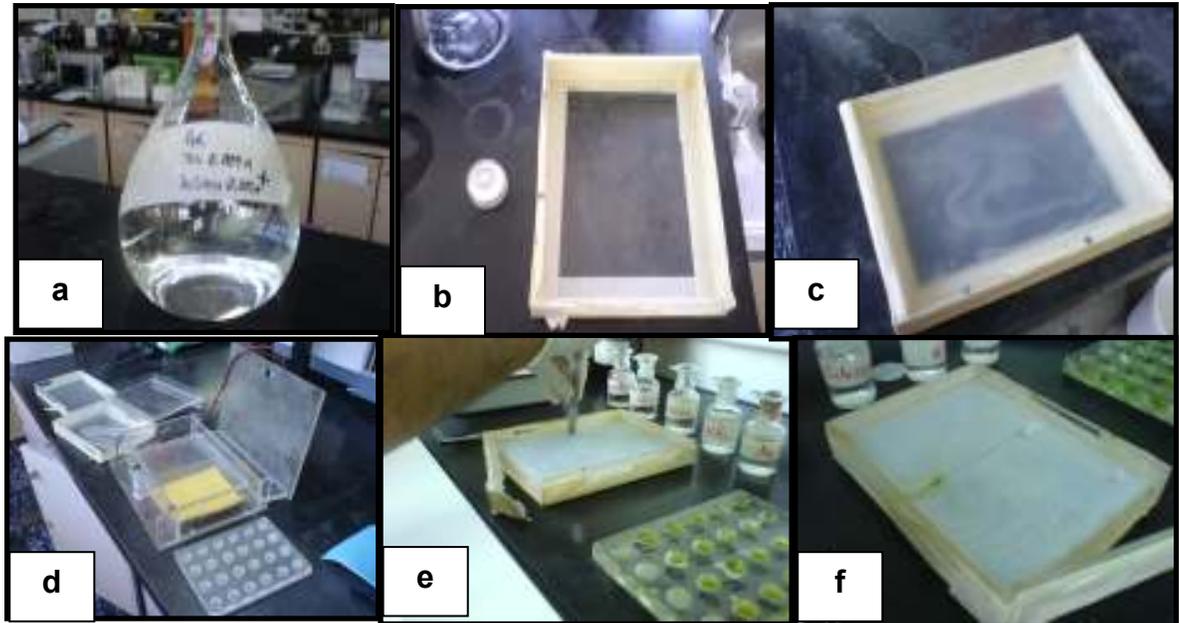


Figura 11. Preparación y montaje de los sistemas enzimáticos en el gel de almidón.

- a. Solución para la elaboración del gel de almidón.
- b. Recipiente donde se aplica la solución.
- c. Gel de almidón
- d. Cámara de electroforesis
- e. Separación del gel de almidón para aplicar las mechas que contienen el extracto vegetal.
- f. Vista del gel de almidón con el extracto vegetal

2.5.6 Sistemas enzimáticos evaluados

Se estudiaron los siguientes sistemas enzimáticos.

A. Para el gel de Poliacralamida las enzimas polimórficas evaluadas fueron

- A) Alcohol Deshidrogenada (ADH)
- B) Acido Shikimico deshidrogenada (SKDH)
- C) Esterasa (EST)
- D) Malato deshidrogenasa (MDH)
- E) Fosfata ácida (ACP)

B. Para el gel de Almidón las enzimas polimórficas evaluadas fueron

- A) Malato deshidrogenasa (MDH)
- B) Esterasa (EST)
- C) Alcohol deshidrogenasa (ADH)
- D) Superóxido dismutasa (SOD)

2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la pureza de híbridos de tomate se procedió a evaluar distintas isoenzimas en gel de almidón y gel de poliacralamida. La formación de bandas en las geles es respuesta positiva del sistema enzimático con la muestra que se está estudiando.

2.6.1 Bando de isoenzimas en gel de almidón

En el Cuadro 3, se presenta el resultado de las isoenzimas en gel de almidón para híbridos de tomate.

Cuadro 4. Bando de las isoenzimas en gel de almidón

Isoenzima	Bando
Malato Deshidrogenasa (MDH)	Negativo
Esterasa (EST)	Negativo
Alcohol Deshidrogenasa (ADH)	Negativo
Superóxido dismutasa (SOD)	Negativo

Ninguna de las isoenzimas evaluadas fueron polimórficas para tomate en el gel de almidón, ya que ninguna presentó bando en el gel.

2.6.2 Bando de isoenzimas en gel de Poliacralamida

En el Cuadro 5, se presenta el resultado de las isoenzimas en gel de poliacralamida para híbridos de tomate.

Cuadro 5. Bando de las isoenzimas en gel de poliacralamida

Isoenzima	Bando
Alcohol Deshidrogenasa (ADH)	Negativo
Acido Shikimico (SKDH)	Negativo
Esterasa (EST)	Negativo
Malato Deshidrogenasa (MDH)	Negativo
Fosfata Acida (ACP)	Positivo

Con el gel de Poliacralamida al 12 % las isoenzimas, Alcohol Deshidrogenasa (ADH), Acido Shikimico (SKDH), Esterasa (EST), Malato Deshidrogenasa (MDH), no presentaron ningún tipo de bando. La isoenzima Fosfata Ácida (ACP) si presentó bando tanto del híbrido como de los parentales, por la presencia de bandas que se observó se

recomienda esta isoenzima para su utilización en la determinación de pureza de híbridos de tomate.

Con las otras dos concentraciones del gel de poliacralamida al 10 y 8 por ciento no se presentó bandeo para lectura correcta, pues las bandas se rompían y su apreciación visual era defectuosa.

2.6.3 Protocolo para determinación de pureza de híbridos de tomate

El gel de poliacralamida del 12% presentó mejores características tanto de elasticidad para su manipulación como de la tinción. El gel está compuesto por:

A. Composición del gel de poliacralamida

Nombre:	Cantidad:
Agua destilada	20 ml
Solucion B	15 ml
Solucion A	15 ml
Persulfato de Amonio (10%)	900 microlitros
Temed	80 microlitros

B. Composición del gel de Fosfata ácida

Los reactivos de esta isoenzima se aplican a 100 ml de agua destilada. Esto con el fin de cubrir todo el gel de poliacralamida al 12%.

Los reactivos que se utilizan para esta isoenzima son los siguientes:

Nombre del Reactivo :	Cantidad aplicada	pH
Sodium Acetate 0.1 M	1.36 gr.	Con acido acético se llega a 5.0
Fast Garnet GBC SALT	100 mg	
MgCl ₂	100 mg	
Alpha Naphthyl Acid Phosphate	100 mg	

Todos los reactivos mencionados se aplican a los 100 ml de agua destilada 5 minutos antes de que se introduzca el gel en la solución.

Después de aplicados los reactivos y puesta la gel dentro del recipiente se procede a taparlo para que no se desnaturalicen las isoenzimas y no se puedan observar las bandas.

Se coloca el recipiente en un agitador a una velocidad lenta y se esperan 15 minutos para que se observen las bandas.

Al observar las bandas se le quitan los 100 ml de solución al gel y se le aplica Ácido Acético el cual fijara las bandas que se observan.

C. Lectura de bandas en gel de Poliacralamida con la enzima polimórfica Fosfata Ácida en híbridos de tomate

En la Figura 12, se presenta el resultado para híbridos de tomate en placa de gel de Poliacralamida con la enzima polimórfica Fosfata Ácida.

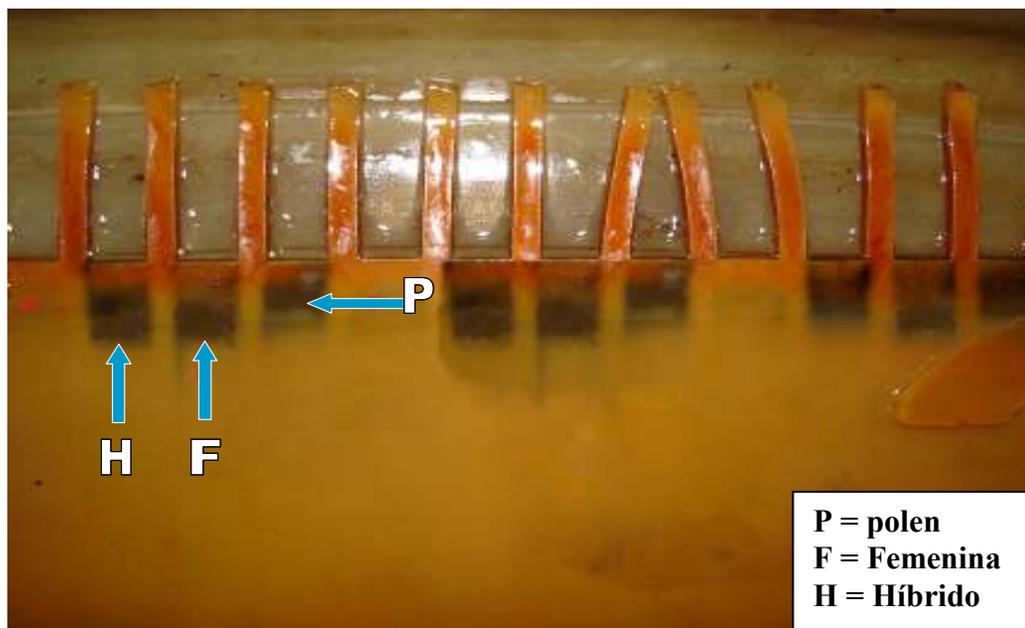


Figura 12. Bando de híbrido de tomate en fosfata ácida en gel de poliacralamida utilizando la isoenzima ACP.

Como se puede observar el Híbrido presenta claramente 2 bandas, en la parte superior la del progenitor femenino, como la del polen o progenitor masculino en la parte inferior. Nótese que están al mismo nivel de las bandas presentadas por cada uno de los progenitores en sus bandas en forma independiente, esto indica que la isoenzima Fosfata Ácida (ACP) es polimórfica para el tomate.

Si en algún caso en el híbrido se presentara solo la banda del progenitor femenino, esto indicaría que ocurrió una auto polinización por lo tanto el híbrido de tomate no es puro.

2.6.4 Comparación de costos de determinación de pureza en campo y en laboratorio

Para la determinación de la pureza en campo de un lote híbrido de tomate (300 semillas) se necesitan tres meses para el desarrollo de la prueba. Los costos de la prueba de pureza en campo ascienden a Q. 9,829.56 y se presentan en el Cuadro 6; en el Cuadro 16 del anexo se presenta el detalle de los insumos empleados.

Cuadro 6. Costos de prueba de pureza en campo.

RUBRO	MONTO
Mano de obra tecnica Q1,200 mensual	Q 3,600.00
Mano de obra Q1,200 mensual	Q 3,600.00
Fungicidas	Q 212.25
Insecticidas	Q 345.81
Fertilizantes Hidrosolubles	Q 398.25
Fertilizantes Granulados	Q 193.25
Otros	Q 1,480.00
TOTAL	Q 9,829.56

Los costos para la determinación de la pureza de un lote híbrido de tomate a nivel de laboratorio empleando la isoenzima polimórfica Fosfata Ácida en gel de Poliacralamida se presenta en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Costos de laboratorio para determinar pureza en híbridos de tomate

El costo de la prueba de pureza tradicional en campo es Q. 9,829.56 y el resultado se obtiene en tres meses; el costo de la prueba de laboratorio es Q. 4,082.00 (58.47 % más económico) y el resultado se obtiene en 48 horas.

2.7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

2.7.1 CONCLUSIONES

- A. De los 9 sistemas isoenzimáticos evaluados se determinó que la enzima Fosfata Ácida (ACP) es la isoenzima polimórfica para la determinación de la pureza de híbridos de tomate, la cual en este estudio se corrió en gel de poliacrilamida.
- B. Con este estudio se desarrolló un protocolo para la determinación de la pureza de híbridos de tomate mediante la identificación del polimorfismo isoenzimático.
- C. La determinación de la pureza de híbridos de tomate por medio de polimorfismo isoenzimático empleando la Fosfata Ácida (ACP) en gel de poliacralamida, es un proceso que reduce los costos en un 58.47 % respecto a las pruebas tradicionales de campo y además el resultado se obtiene en 48 horas.

2.7.2 RECOMENDACIONES

- A. Para la determinación de la pureza de híbridos de tomate comerciales, se recomienda el empleo de la isoenzima polimórfica Fosfata Ácida (ACP), en gel de poliacralamida, cuyo protocolo fue establecido en este trabajo.

2.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Ávalos, I. 1990. Biotecnología e industria, un ensayo de interpretación teórica. San José, Costa Rica, IICA. p. 10-14. (Serie de Documentos de Programa no. 2).
2. Azurdia, C. 1994. Breeding system and genetic structure in *Phaseolus* spp. (*Phaseolus coccineus*, *Phaseolus polyanthus*, and *Phaseolus lunatus*) in Guatemala. Davis, US, University of California. 138 p.
3. Azurdia, C; Mejía, L; Baltazar, N. 1999. Variabilidad en frutales tropicales nativos de *Pouteria*, Sapotaceae, utilizando marcadores isoenzimáticos. Ciencia y Tecnología (GT) no. 2:57-67.
4. Bidwell, RG. 1979. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Gerónimo Cano y Cano. México, D.F., AGT. 784 p.
5. Cruz S, JR De la. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, basada en el sistema de Holdridge. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
6. Depestre, T; Gómez, O. 1999. Mejoramiento de tomate y chile pimiento. La Habana, Cuba, Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". Presentado en: Curso de mejoramiento de hortalizas (1999, Guatemala). Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 6-36.
7. Doe, RP; Mellinger, GT; Seal, US; 1965. Isoenzymes test. Clin. Chem. 11:943.
8. EDIFARM, GT. 2003. Manual de hortalizas. Guatemala. 522 p.
9. Edmon, JB *et al.* 1985. Principios de horticultura. Trad. por Federico Garza. México, Continental. 575 p.
10. FASAGUA (Federación de Sociedades Agrícolas de Guatemala, GT). 2007. Manual técnico del cultivo de tomate en campo. Guatemala. 44 p.
11. Figueroa, S. 1999. Determinación del sistema reproductivo y estructura genética del zapote (*Pouteria sapota* (Jack.) Moore Stearm) usando marcadores isoenzimáticos en la parte alta de la cuenca Río Hato, municipio de San Agustín Acasaguastlán, El Progreso. Tesis, Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 39 p.
12. Fisher, L. 1975. Introducción a la cromatografía en gel. Trad. Albert Sandoval. México, DF, ACT. 210 p. (Manual Moderno).
13. Herkivitz, I. 1979. Genética. Trad. Antonio Morino Ambrosio. 6 ed. México, Continental. 765 p.
14. Hillman, GF. 1971. Isoenzymes. Biochem. 3:273.

15. Horton, R. 1993. Bioquímica. Trad. María de Consuelo Hidalgo. México, Hispanoamericana. p. 22-36.
16. Iglesias, L; González, MC. 1995. Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales 16(1):64-69.
17. INE (Instituto Nacional de Estadística, GT). 2004. IV censo nacional agropecuario 2003: número de fincas censales, superficie cosechada, producción obtenida de cultivos anuales o temporales y viveros. Guatemala. tomo 2, 267 p.
18. León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica, IICA. p. 166-170.
19. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, GT). 2000. Mapas temáticos digitales de la república de Guatemala, a escala 1:250,000. Guatemala. 1 CD.
20. Mejía, L. 1992. Estudios con isoenzimas como marcadores genéticos en plantas. Tikalia (GT) 10(1/2):15-35.
21. Rodríguez, N. 1999. Determinación de la tasa de cruzamiento con marcadores bioquímicos (isoenzimas) en una población de zapote (*Pouteria zapota* (Jacq.) Moors Stearn), de la parte baja del río Hato, en San Agustín Acasaguastlán, El Progreso. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 104 p.
22. Simmons, CH; Tárano, JM; Pinto, JH. 1959. Clasificación y reconocimiento de los suelos de la república de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulsona. Guatemala, José De Pineda Ibarra. 1,000 p.
23. Soltis, DE; Soltis, PS. 1990. Isoenzymes in plant biology. Massachusetts, US, Cornell University. 265 p.
24. Tello, J; Cuarteto, J; Segura, B. 2001. El cultivo del tomate. España, Mundi-Prensa. 766 p.
25. University of California, US. 2004. Tomato research progress report (en línea). US. Consultado 10 dic 2007. Disponible en <http://cemerced.ucdavis.edu/files/18195.pdf>
26. Valadez Moctezuma, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. México, Universidad Autónoma Chapingo. 147 p.
27. Vides, L. 2006. El tomate. MAGActual 3(19):15-22.
28. Villareal, R. 1952. Tomates. San José, Costa Rica, IICA. 184 p.

29. Villeda Ramírez, JD. 1993. El cultivo del tomate. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. 147 p.
30. Young, DS. 1990. Effects of drugs on clinical laboratory tests. 3 ed. Washington, US, AACC Press. 25 p.

3. SERVICIOS PRESTADOS EN LA EMPRESA GENTROPIC SEEDS

3.1 PRESENTACIÓN

Como parte de las actividades que conforman el EPS está la de realizar servicios en la empresa donde se ha desarrollado la práctica.

En este capítulo se describe la metodología que se utiliza en la empresa Gentropic Seeds para el proceso de siembra, chequeo de líneas parentales, polinización y extracción de semilla híbrida, así como los procesos de verificación de la pureza de los diferentes híbridos producidos, hasta llegar a obtener semilla lista para su comercialización. Este servicio reviste de importancia por constituirse básicamente en un manual de procedimientos que describe detalladamente cada uno de los pasos para producir semilla híbrida, el cual no solo servirá para el personal de la empresa, sino que también como una fuente de consulta para estudiantes y docentes.

Un segundo servicio lo constituye la elaboración de un inventario de los reactivos que se tienen en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía que fueron utilizados para la realización de la investigación que se desarrolló en el laboratorio para la determinación de pureza de híbridos de tomate.

Se presenta el listado de reactivos según el número de locker donde se ubica y la disponibilidad del mismo, es decir si el envase aún dispone de suficiente reactivo. Con éste servicio se facilitó la localización inmediata de cada uno de los reactivos para realizar la prueba de pureza en campo y además constituye de una buena base de datos para que se continúe alimentando según hallan nuevos ingresos de reactivos.

3.2 ELABORACIÓN DE UN MANUAL QUE DETALLA LOS PROCESOS QUE SE UTILIZAN PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA HIBRIDA DE TOMATE

3.2.1 Objetivo

Colaborar con el proceso de producción de semilla híbrida, aportando un manual, el cual detalle paso a paso el proceso de producción de la semilla híbrida desde la siembra de los parentales hasta la venta comercial.

3.2.2 Metodología

La empresa GenTropic Seeds ha venido investigando y desarrollando híbridos de tomate desde hace 10 años. Hasta el año 2008 se siguen evaluando más de 250 materiales con hábito de crecimiento determinado y semi-determinado en etapas de F2 F6, como también materiales indeterminados, para estos se cuentan con más de 200 líneas en etapas entre F4 y F5 con resistencia a chocolate, virus transmitidos por mosca blanca, TMV, alta firmeza y productividad como también forma y calidad. Además también se están investigando materiales de tomates manzanos con los que cuentan con más de 85 líneas. Estas investigaciones se realizan en distintas instalaciones de la empresa Gentropic Seeds. El método que se utilizó para la realización de este manual fue haciendo un recorrido por las instalaciones observando el proceso detalladamente que se lleva a cabo en estas instalaciones y luego registrando en forma escrita cada una de las actividades.

3.2.3 Resultados

La producción de semilla híbrida lleva consigo un proceso bastante completo y técnico el cual se tiene que seguir paso a paso, de lo contrario no se lograría el cometido, la producción de materiales que llenen las características necesarias para que el agricultor pueda comprar estos híbridos.

A. Siembra de parentales

Como primer paso se procede a la siembra de las semillas que serán utilizadas para la producción del híbrido (Figura 13). Para cada híbrido se cuenta con diferentes parentales (Figura 14). Esta semilla permanece sellada e identificada con un número de

lote que se le asigna al entrar a la bodega de semillas el cual contiene información como lo es la procedencia de la semilla, la fecha de producción, la cantidad de semilla producida, el peso de esta en gramos, y el número de semillas por gramo. Cuando se siembra se le identifica con una estaca donde lleva el nombre del parental y el número del lote. Desde que se siembra la semilla hasta cuando esta lista para el trasplante transcurren entre 30 a 35 días.



Figura 13. Siembra de la semilla de tomate en contenedores.



Figura 14. Identificación de diferentes parentales de híbridos de tomate.

B. Manejo fitosanitario

Cuando las plantas están de punto para ser trasplantadas se le aplican dos productos químicos que son el Banrot (Fungicida) y Confidor (Insecticida), con el propósito de proteger a la planta de hongos e insectos ya que pueden llegar a causar daños fisiológicos y mecánicos a las plantas. Para el trasplante se identifica previamente los surcos con el nombre de la variedad y fecha de siembra, a fin de determinar el tiempo indicado para la emasculación de las plantas y luego su polinización. En la entrada de los invernaderos se encuentran pequeñas piletas y atomizadores que contienen Banodine (25 cc por litro de agua), que es un desinfectante que ayuda a prevenir la transmisión de enfermedades a las plantas.

C. Trasplante

Al momento del trasplante se siembran primero las plantas que se emplearán como pólenes, las cuales han sido seleccionadas y evaluadas previamente; estas plantas son de una generación F8 por lo que ya no se encuentra segregación sino líneas puras. A los ocho días de haber sembrados los pólenes se siembran las plantas que se utilizarán como femeninas, que también han pasado por un proceso de selección anteriormente. Tanto los pólenes como las femeninas se identifican con cintas de diferente color para que sirva de guía a la hora de hacer la polinización

D. Emasculación y polinización

La emasculación es el proceso en el cual se procede a preparar la flor del tomate para que sea receptiva al polen. Los órganos relacionados con la reproducción en la flor son los estambres y el gineceo. Los estambres son los órganos masculinos de la flor y colectivamente se les conoce como androceo. Cada estambre consta de un filamento delgado y una antera terminal, que contiene dos sacos polínicos; los carpelos son los órganos femeninos de la flor, colectivamente conforman el gineceo, cada uno de los carpelos separados o unidos se le llama pistilo. El pistilo posee tres partes bien diferenciadas: El ovario en la base contiene a los óvulos, el estigma en la parte superior, es el que recibe los granos de polen y se une al ovario por el estilo. En los estambres se

desarrolla la producción de los gametos masculinos o granos de polen (microsporogenesis) y en el pistilo se producen los gametos femeninos u óvulos (1).

La preparación de las plantas lo realizan manualmente, la cual consta de la emasculación para con ello dejar el pistilo expuesto protegido por dos sépalos, para evitar quemadura del pistilo causado por el sol (Figura 15).



Figura 15. Emasculación de flores en tomate.

Después de 48 horas de la emasculación se poliniza el pistilo con polen recolectado de las plantas que previamente se sembraron como plantas masculinas. Este proceso dura aproximadamente 30 días, con ellos se pretende lograr unos 60 frutos polinizados por planta, que en promedio se logran unas 1000 semillas por planta (Figura 16).



Figura 16. Polinización en tomate.

E. Fecundación

El proceso de fusión del gameto masculino con el femenino para formar el cigoto se conoce como fecundación. En muchos casos ocurre polinización pero no fecundación, esto sucede cuando no existe compatibilidad. El estigma es la porción que es receptiva del polen, es aquí donde la superficie estigmática reconocerá, por reacciones bioquímicas el tipo de polen que está arribando a su superficie y dependiendo de su morfología y composición genética se le permitirá o no germinar, es decir emitir su tubo polínico. La superficie estigmática puede ser ramificada o pilosa, de tal manera que puede captar los granos de polen en sus ramas o secretar un fluido estigmático denso al cual se adhieren los granos de polen. El polen germina sobre el estigma y un tubo polínico delgado crece a través del estilo y penetra en la punta del ovulo a través de una abertura conocida con el nombre de micrópilo. Por medio de división del núcleo generativo del grano de polen se forman dos células germinales macho, llamados espermias o núcleos generatrices. Los espermias se mueven a través de del tubo polínico y son descargados dentro del saco embrionario (2).

Dentro de cada ovulo se encuentra una célula individual llamada célula madre megaspora la cual como en el caso de las células madres de la microspora sufre dos divisiones nucleares sucesivas para producir una tétrada de cuatro megasporas. Tres de estas se desintegran, la otra que es generalmente la más alejada del micrópilo continúa sufriendo divisiones nucleares adicionales y forma un ovoide, que es el saco embrionario y los dos restantes conocidos como nucleolos polares que quedan en el área central. Después de que los dos espermias son descargados dentro del saco embrionario, uno de ellos se fusiona con el huevo para formar un cigoto ($2n$); Este proceso constituye la fertilización y fecundación (2).

Las plantas después de haber sido emasculadas a los 30 días de haberse sembrado en las 48 hrs. siguientes se les aplica el polen y pasadas otras 48 horas se puede observar si pega o no pega, este proceso dura aproximadamente un mes. Las plantas que se le observan pegadas se les corta un cáliz el cual nos sirve de indicador de que es una fruta polinizada y no una auto polinización.

F. Recolección de la fruta

Cuando la planta llega a la edad de producción que es aproximadamente a los 75 días después de la siembra en campo se empieza a recolectar la fruta que empieza a dar color (Figura 17). Se recolectan únicamente las frutas que tienen recortado el cáliz, pues esto indica que es una fruta polinizada manualmente; se almacenan en cajas plásticas o de madera que previamente fueron identificadas con una cinta de color fuerte que lleva escrito el nombre del material que se está recolectando, el invernadero o el campo de donde se está recolectando y el número de semana del año. Posteriormente se tapa la caja con papel periódico para evitarle daño a la fruta y se manda al área de extracción de semilla.



Figura 17. Recolección de la fruta de tomate

G. Extracción de la semilla

La extracción de la semilla se realiza manualmente y mecánicamente; cuando se realiza manualmente se parte la fruta de forma vertical y con las manos se procede a sacar dentro de la fruta toda la semilla que se encuentre, esto se hace dentro de recipientes plásticos que luego servirán para fermentar la semilla. Cuando la extracción se hace mecánicamente la fruta se deposita en un tonel de 200 litros que en el fondo contiene un aspa la cual su función es la de licuar la fruta que se aplica. Es importante mencionar que como se cosechan distintos híbridos se aparta la fruta por número de lote y variedad y una por una se le va extrayendo la semilla, esto sirve para evitar confusiones de materiales. Los utensilios (cuchillos, palanganas, toneles), se lavan cada vez que se va

a extraer semilla de otro material. Una vez extraída la semilla se vacía el tonel en recipientes que sirven para fermentar la semilla (Figura 18).



Figura 18. Extracción de la semilla.

H. Fermentación de la semilla

Después que se extrajo la semilla de las frutas, esta se vacía en recipientes plásticos, los cuales se ponen en un cuarto a una temperatura de 35 grados centígrados por 48 horas lo cual nos ayuda a que la semilla obtenga un punto en el cual a la hora de sembrarla tenga una buena germinación.

I. Lavado de la semilla

Después de pasadas las 48 horas en fermentación, se procede a lavar la semilla. La cual se saca de los recipientes con coladores y se les aplica suficiente agua para que limpie la pulpa que produjo la fruta, cuando se realiza esta limpieza hay semilla que flota, esta semilla se desecha puesto que se ha comprobado a través de pruebas de germinación y esta semilla no germina. La semilla que queda en el fondo es la que se utiliza para la venta. Cuando la semilla está totalmente limpia se procede a hacerle un tratamiento químico.

a. Tratamiento químico

Cuando la semilla está limpia y almacenada en bolsas se procede a hacerle este tratamiento con la finalidad de proteger a la semilla de hongos que puedan afectar más adelante a las plantas. Los productos que se utilizan son: Hipoclorito de sodio (NaOCL) al 10% y el fosfato Trisodico (TSP) al 10%.

i. Aplicación de hipoclorito de sodio

El hipoclorito se utiliza como un desinfectante. La semilla se sumerge en una solución de NaOCL al 10% (125 cc de cloro, 10% por litro de agua por libra de semilla), durante 30 minutos. Luego a la semilla se le aplica suficiente agua por 5 minutos, esto se hace para eliminar restos de NaOCL, para evitar toxicidad en la semilla. Esto se realiza en una pila diseñada para este proceso, no se recomienda utilizar agua estancada para este proceso, tiene que ser agua que este corriendo constantemente, esto para evitar enfermedades.

ii. Aplicación de fosfato trisódico (TSP)

El Fosfato Trisódico (TSP) se usa como un detergente/protectante. Se prepara una solución de TSP. En una relación de 28gr de producto por litro de agua para una libra de semilla, la semilla se sumerge durante 15 minutos dentro de esta solución y luego la semilla se encuentra preparada para pasar al área de secado.

J. Secado de la semilla

El secado de la semilla juega un rol muy importante en el proceso de producción de semilla híbrida puesto que de la humedad que tenga la semilla puede influir para la generación de hongos u otros agentes que puedan causarle daños a esta en el empaque de la misma. La finalidad de secar la semilla es la de quitarle el exceso de humedad que esta tenga después de haber sido pasada por el proceso de lavado y desinfección, es por esto que utilizamos en este proceso 2 métodos de secado.

a. Secado a máquina

Para este secado se utiliza una secadora, la cual fue adaptada a las necesidades que se requieren para el secado de la semilla. La semilla se mete durante la secadora por un periodo de 2 horas en bolsas, estas no están llenas, esto para que la semilla pueda dar vueltas dentro de ellas y así se facilite su secado. Deben de estar bien amarradas para que no se salga la semilla. La temperatura varía entre 32 y 46 grados centígrados, esta temperatura se mantiene durante el tiempo que esta la semilla adentro.

b. Secado tendido

Luego de haber estado durante dos horas en la secadora se procede a sacar la semilla y colocarla en bandejas que están colocadas en una secadora grande que genera aire que corre de abajo hacia arriba, las bandejas contienen cedazo, esto es para que fluya el aire por las semillas. Este proceso tarda 12 horas a 32 grados centígrados, cuando termina este tiempo siempre se revisa la semilla con el fin de revisar que no tengan humedad para así poderlas almacenar.



Figura 19. Secado tendido de la semilla de tomate.

K. Almacenado e identificación de la semilla

Después de haber secado la semilla se procede a almacenarla, el procedimiento es el siguiente:

- Revisar si las bolsas de semilla traen la cinta donde se indica que materiales son, el número de semana y la procedencia.
- Se pesa un gramo de la semilla recibida previamente homogenizada y se determina que número de semillas tiene.
- Se pesa el volumen total de la semilla recibida y se le asigna un número de lote en la bitácora, el número de lote contiene la fecha de ingreso, la procedencia de la

semilla, los parentales de la semilla, el total de semillas producidas, y el número de gramos recibido.

- Se pesa la semilla para hacer presentaciones de 500 semillas, 1000 semillas, 5000 semillas, 10,000 semillas, hasta llegar a 100,000 semillas.
- Se apartan de cada lote producido aproximadamente 3,000 semillas que nos servirán para realizar pruebas de germinación y pruebas de pureza.
- La semilla se almacena en una bodega la cual se mantiene a una temperatura de 35 grados centígrados y una humedad relativa del 40 %.
- Todas las presentaciones se identifican con el nombre del material, el número del lote que se le asigno y el porcentaje de germinación que obtuvo en las pruebas realizadas (Figura 20).



Figura 20. Pesado y almacenaje de la semilla de tomate.

L. Prueba de pureza

Es de mucha importancia el verificar si la semilla híbrida que se produjo llena las características necesarias para poder ser puesta a la venta, en la actualidad se está llevando a cabo un método práctico el cual consiste en sembrar 300 semillas por cada lote producido. Aproximadamente a los 75 días de haberse sembrado en el campo se procede a evaluar las características de las plantas, de las cuales se espera obtener plantas con características deseadas como lo son: Tipo de crecimiento esperado, forma de la fruta definida, resistencia a gemminivirus y alta productividad.

En esta evaluación se acepta un máximo de una planta fuera de tipo o auto polinizada, esto nos da el 99.999 % de pureza, entonces solamente después de realizar esta evaluación se puede poner a la venta el lote producido.

3.2.4 Evaluación

A través de la información para la producción de híbridos de tomate que el autor recopiló, se espera que sea una fuente de consulta práctica para poder llevar a cabo el proceso detallado, con lo cual se colabora con el proceso de producción de semilla híbrida al disponer con un manual de referencia.

3.3 INVENTARIO DE REACTIVOS DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA EMPLEADOS EN LA PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE PUREZA DE HÍBRIDOS DE TOMATE

3.3.1 Objetivo

Crear un inventario para facilitar la fácil búsqueda y ubicación física de reactivos con el fin de optimizar el tiempo y de esta manera contribuir a que no se degraden.

3.3.2 Metodología

Para lograr este inventario se hizo un recorrido en las instalaciones del laboratorio de biotecnología e la Facultad de Agronomía, revisando todos los lockers y refrigeradoras con la finalidad de tener un inventario correcto, como referencia se anotó si tenían o no suficiente contenido.

3.3.3 Resultados

En los cuadros siguientes se presenta el inventario de reactivos del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía.

Cuadro 8. Reactivos en el locker 3-A1

No	Ubicación	Reactivo	Contenido	Sin contenido
1	arriba	2,6-dichlorophenol-indo-henol	si	
2	arriba	3-dimethylaminobenzoic acid	si	
3	arriba	acetone	si	
4	arriba	acrylamide	si	
5	arriba	acrylamide	si	
6	arriba	acrylamide ultrapure	si	
7	arriba	acrylamide ultrapure	si	
8	arriba	acrylamide-bis-arylamide	si	
9	arriba	acrylamide-bis-arylamide	si	
10	arriba	agua oxigenada	si	
11	arriba	ammonium persulfate	si	
12	arriba	ammonium persulfate, crystal	si	
13	arriba	billiant blue g	si	
14	arriba	blilliant blue G	si	
15	arriba	blilliant blue R	si	
16	arriba	boric acid	si	
17	arriba	boric acid	si	
18	arriba	bromophenol blue	si	
19	arriba	bromophenol blue	si	
20	arriba	bromophenol blue, sodium salt	si	
21	arriba	bromophenol blue, sodium salt	si	
22	arriba	bromphenol blue	si	
23	arriba	calcium chlroride	si	
24	arriba	charcoal, activatd	si	
25	arriba	cloruro de magnesio hexahidratado	si	
26	arriba	coomassie blilliant blue g-250	si	
27	arriba	DL-aspartic acid	si	
28	arriba	dodecylsulfat natriumsalz	si	
29	arriba	ethidium bromide3-dimethylaminobenzoic acid	si	
30	2	galones alcohol 95%	si	
31	arriba	n,n-methylene-bis-acrylamide	si	
32	abajo	8-hydroxyquinoline	si	
33	abajo	ethanol 96%	si	
34	abajo	fast black K salt	si	
35	abajo	formic acid	si	
36	abajo	glicina	si	
37	abajo	glycine	si	
38	abajo	guanidime thiocyanate ultrapure	si	
39	abajo	guanidine HCl ultrapure	si	
40	abajo	hepes	si	
41	abajo	hepes	si	
42	abajo	hypoxanthine	si	
43	abajo	l-aspartic acid	si	
44	abajo	l-glutamic acid	si	
45	abajo	l-histidine	si	
46	abajo	n,n-dimethyl-formamide	si	
47	abajo	n,n-methylene-bis-acrylamide	si	
48	abajo	sodium dodecyl sulfate 95%	si	
49	abajo	sodium dodecyl sulfate ultrapure	si	
50	abajo	tris-base	si	

Cuadro 9. Reactivos en el locker 3-A2.

No	Ubicación	Reactivo	Contenido	Sin contenido
51	arriba	azo-B-naphthol-3,6-disulfonc acid sodium salt	si	
52	arriba	bioreagent ultrapure	si	
53	arriba	cloro	si	
54	arriba	cloro (gotero)	si	
55	arriba	DL. Malic acid	si	
56	1.25 Gl	glicerina	si	
57	arriba	HCl (1N)	si	
58	arriba	hidroxido de amonio	si	
59	arriba	manganese chloride	si	
60	arriba	methanol, absolute, low in acetone	si	
61	arriba	methylene blue	si	
62	arriba	n,n-methylene-bis-acrylamide	si	
63	arriba	polyvinylpoly-pyrrolidone	si	
64	arriba	polyvinylpyrrolidone	si	
65	arriba	polyvinylpyrrolidone	si	
66	abajo	(-) Shikimic acid	si	
67	abajo	almidón, (potato)	si	
68	abajo	bicarbonato de sodio	si	
69	abajo	bioreagent ultrapure	si	
70	abajo	carbonato de sodio anhidro	si	
71	abajo	HCl concentrado	si	
72	abajo	hidrogenocarburo de sodio	si	
73	abajo	mikrobiologie	si	
74	abajo	sodium phosphate	si	
75	abajo	sodium phosphate	si	
76	abajo	sulfito de sodio anhidro	si	
77	abajo	tris ultrapure	si	
78	abajo	triton X-100 electrophoresis reagent	si	
79	abajo	urea ultrapure	si	

Cuadro 10. Reactivos en el locker 3-A3

No	Ubicación	Reactivo	Contenido	Sin contenido
80	arriba	(-) Shikimic acid		no tiene
81	arriba	2-mercaptoetanol	si	
82	arriba	8-dimethylamino-2,3-benzophenoxazine	si	
83	arriba	acido acético, glacial	si	
84	arriba	acido clorhidrico fumante	si	
85	arriba	acrylamide, electrophoresis reagent	si	
86	arriba	chloroform		no tiene
87	arriba	chloroform		no tiene
88	arriba	cloroformo		no tiene
89	arriba	DL-isocitric acid	si	
90	arriba	Fast Black K salt	si	
91	arriba	Fuchsin (NB) Pulver	si	
92	arriba	l-leucine B-naphthylamide, hydrochloride	si	
93	arriba	methanol, absolute, low in acetone	si	
94	arriba	phenol-chloroform-isoamyl alcohol 25:24:1	si	
95	arriba	urceina acética	si	
96	abajo	2-mercaptoetanol	si	
97	abajo	acido clorhídrico	si	
98	abajo	ethidium bromide	si	
99	abajo	lithium hydroxide	si	
100	abajo	phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1	si	
101	abajo	acido acético, glacial	si	

Cuadro 11. Reactivos en el locker 2-A1

No	Ubicación	Reactivo	Contenido	Sin contenido
102	arriba	Agar 8g	si	
103	arriba	Agarose	si	
104	arriba	Crystal violet	si	
105	arriba	Ficoll	si	
106	arriba	d-(+)-Glucose	si	
107	arriba	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	si	
108	arriba	Glycerin	si	
109	arriba	Acid Hidrolized	si	
110	arriba	Tripxona	si	
111	arriba	Peptone	si	
112	arriba	Calciumnitrat-Tetrahydrat	si	
113	arriba	Glycerin 86-88%	si	
114	arriba	Bacto tm Peptone	si	
115	arriba	EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Crystal	si	
116	arriba	1-Butanol.	si	
117	arriba	Cycloheximide, From microbial source, Minimum	si	
118	arriba	Bacitracin	si	
119	arriba	etanol absoluto	si	
120	arriba	2-propanol	si	
121	arriba	Penicilin-G Potassium	si	
122	arriba	8-Hidoroquinolina	si	
123	arriba	Peniciin	si	
124	arriba	Phenylmethylsulfonyl Fluoride	si	
125	arriba	Agarose Low EEO, Electrophresis Grade	si	
126	arriba	Carbonato de calcio	si	
127	arriba	Ficoll 400 Sigma F 4375	si	
128	arriba	EDTA	si	
129	Abajo	Yeast Extract	si	
130	Abajo	D- Glucosa	si	
131	Abajo	cloruro de potasio	si	
132	Abajo	potasio dihidrogenofosfato	si	
133	Abajo	boric acid	si	
134	Abajo	lithium hiroxide	si	
135	Abajo	etanol 96%	si	
136	Abajo	potassium hidroxide	si	
137	Abajo	acetato de potasio	si	
138	Abajo	mineral oil	si	
139	Abajo	2-propanol	si	
140	Abajo	D(+)-Glucosa anhidra	si	
141	Abajo	Casein hydrolysate (acid)	si	
142	Abajo	potassium acetate	si	
143	Abajo	magnesium chloride	si	
144	Abajo	nonidet p-40	si	
145	Abajo	Agar, granulated	si	
146	Abajo	magnesio sulfato heptahidrato	si	
147	Abajo	trzima base	si	
148	Abajo	potassium ethyl xanthogenate	si	
149	Abajo	NaCl	si	
150	Abajo	polyvinylpoly-pyrrolidone	si	
151	Abajo	agar NN69	si	
152	Abajo	acido clorhídrico	si	
153	Abajo	glicerol	si	
154	Abajo	cloruro de sodio	si	
155	Abajo	alcohol isoamílico	si	

Cuadro 12. Reactivos en el locker 2-A2

No	Ubicación	Reactivo	Contenido	Sin contenido
156	arriba	peptona de carne obtenida pordigestión péptica	si	
157	arriba	cloruro de magnesio hexahidratado	si	
158	arriba	pH standard, 9	si	
159	arriba	acetado de sodio	si	
160	arriba	sodium phosphate	si	
161	arriba	lauryl sulfate	si	
162	arriba	hidróxido de sodio en lentejas	si	
163	arriba	HCl 1N	si	
164	arriba	sucrose, crystal	si	
165	arriba	tris hydroxymethyl aminomethane hydrochloride	si	
166	arriba	sodium acetate	si	
167	arriba	xylene cyanole FF	si	
168	arriba	Sodium citrate, dihydrate, molecular, biology grade	si	
169	arriba	Tris purity reagente	si	
170	arriba	EDTA Disodium Salt	si	
171	arriba	sucrose, crystal	si	
172	arriba	sodio dihidrogenofosfato monohidrato	si	
173	arriba	hidróxido de sodio 1 M	si	
174	arriba	sodium acetate anhydrous	si	
175	arriba	sodium phosphate	si	
176	arriba	lauryl sulfate	si	
177	arriba	sodium acetate	si	
178	arriba	ácido bórico	si	
179	arriba	cloruro de sodio	si	
180	abajo	TWEEN 20,	si	
181	abajo	Toluidine Blue O	si	
182	abajo	Sulfato de amonio	si	
183	abajo	Triton X-100	si	
184	abajo	Starch	si	
185	abajo	Xilencianol	si	
186	abajo	urea	si	
187	abajo	tryptone	si	
188	abajo	titriplex III	si	
189	abajo	trizma, hydrochloride	si	
190	abajo	tris hydroxymethyl aminomethane hydrochloride	si	
191	abajo	2,3,5-triplienyletra-zoliumchlorid	si	
192	abajo	sodium citrate tribasic dihydrate, approx 99%	si	
193	abajo	trizma, hydrochloride	si	
194	abajo	trizma, base	si	
195	abajo	tris hydroxymethyl aminomethane hydrochloride	si	
196	abajo	maxima vacuum pump oil	si	
197	abajo	Buffer PB	si	
198	abajo	Buffer N3	si	
199	abajo	Buffer ED	si	
200	abajo	Buffer P2	si	
201	abajo	Buffer PERNase A		no tiene

Cuadro 13. Reactivos en la refrigeradora 1.

No.	Reactivo	# Stand	Contenido	Sin Contenido
202	Piridoxal S-Phosphate	2	si	
203	MgCL2	2	si	
204	DNA-Polimerasa Buffer (-MgCL2)	2	si	
205	Alcaline Phosphate Direct	1	si	
206	Blocking reagent	1	si	
207	Alcaline Phosphatase Diethanolamine	1	si	

Cuadro 14. Reactivos en la refrigeradora 2.

No.	Reactivo	# Stand	Contenido	Sin Contenido
208	Antimouse	1	si	
209	Anti rabbit	1	si	
210	Indirect sample extraction buffer 10x.Concentr.	1	si	
211	ECL buffer 5x Concentr.	1	si	
212	PNP Substrate buffer 5x Concentrate	1	si	
213	General Extract buffer	1	si	
214	Tween 20	1	si	
215	3 M Sodium hidroxide	1	si	
216	Substrate solution bottle	1		no
217	Enzime conjugate bottle	1		no
218	DNA substratetablets	1	si	
219	Buffer concentrate PBS-Tween	1	si	
220	2,3,5- Triphenyltetrazolium chloride	2	si	
221	() Ketoglutanc Acid	2	si	
222	BSA Fisher 1605100	2	si	
223	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	2		no
224	Malic Dehydrogenase	2	si	
225	SL Buffer () SX	2	si	
226	anti -TMV-C	2		no
227	Phenazine Methosulphate	4	si	
228	6-CY,Y-Dymethylallylamina purine Riboside	4	si	
229	B-Naphthyl Acid Phosphate	4	si	
230	Fast Blue RR Salt	4	si	
231	MT 1	4	si	
232	()- Naphtyl Acetate	4	si	
233	b-Phosphogluconic Acid	4	si	
234	Fast gamet GBC SALT	4	si	
235	Glucose -6-phosphate Dehydrogenase	4	si	
236	DL-Dithiothereital	4	si	
237	D-Fructose 6- Phophate	4	si	
238	Retinol Acetate	4	si	
239	Fast Blue BB salt	4	si	
240	Sigmacote B-Naphthyl- Acetate	4	si	

Cuadro 15. Reactivos en la refrigeradora 3.

No.	Reactivo	# Stand	Contenido	Sin Contenido
241	Buffer P1	1	si	
242	Ridampin	1	si	
243	Poty ACL InmunoStrips	1	si	
244	CMV InmunoTest	1	si	
245	RS InmunoTest	1	si	
246	MTT InmunoTest	1	si	
247	Isoprophyl B-D-1 Thiogalacto pyranoside	1	si	
248	3-Amino-9-ethyl Carbazole	1	si	
249	B-Micotinamide adenine dinocleotide	1	si	
250	NAPP	1	si	
251	Nitro Blue tetrazolium	1	si	
252	Ampillicin	1	si	
253	RS InmunoStrips for Ralstonias	1	si	
254	Bacitracin	1	si	
255	Cyloheximide	1	si	
256	CDP-Star tm detetium veagent	1	si	
257	Proteinase K	1		no
258	Chloramphenical	1	si	
259	Rnase-A	1	si	
260	BEB I extractium Buffer	1	si	
261	2,3,5-Trophenytetrazolium Chloride	1	si	
262	2-Mercaptoethanol	1	si	
263	Blue detectro solution	1	si	
264	Albumin Fraction	1	si	
265		2	si	
266	() - NaphthylAcetate	2	si	
267	L-leucine B -Naphhthylamide	2	si	
268	B-Nicotinamide Adenine	2	si	
269	Dinucleotide Phosphate	2	no	
270	() Naphthyl Acid Phosphate	2	si	
271	D- Fructose 6 - Phosphate	2	si	
272	D- Nucleotide	2	si	
273	() - D- Glucose-Phosphate	2	si	
274	6- Phosphogluconic Acid	2	no	
275	Blocking reagent	2	si	
276	Polyvinylpyrolidone	2	si	
277	HI 70300	2	si	
278	Vitrapure Bioregent	2	si	
279	Y- Methacryloxypropyl	2	si	
280	Trimetroxypropyl	2	si	
281	Phenol Cloroform Isoanyl alcohol 25,24,1	2	si	
282	2-percaptoethanol	2	si	
283	Fenocloro	2	si	

3.3.4 Evaluación

A través de la realización del presente servicio se facilitó la búsqueda rápida y eficiente de reactivos en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía para realizar las pruebas de pureza a través de marcadores moleculares por parte del epesista. Además se constituye en un primer paso para tener sistematizada la información de reactivos del laboratorio, por lo que es aconsejable a partir de la información guardada en forma digital, actualizarla según se vayan utilizando los reactivos o ingresen nuevos reactivos.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

1. Vásquez Vásquez, F. 2000. Apuntes de tecnología de semillas y viveros. USAC, FAUSAC. Sub-área de Manejo y Mejoramiento de plantas. 41 p.
2. Sánchez Durón. A. 1970. Fisiología vegetal. México, Limusa. 453 p.

4. ANEXO

Cuadro 16. Detalle de los costos de insumos para la prueba de pureza en campo

FUNGICIDAS	Presentación	Costo	4 aplicaciones de cada uno
MANCOZEB	1 Kilogramo	Q 32.00	Q 8.00
CLOTALONIL	1 Litro	Q 100.00	Q 25.00
METALOXIL	1 Kilogramo	Q 195.00	Q 48.75
OXITETRACICLINA	1/2 Kilogramo	Q 446.00	Q 111.50
COBRE AZUFRE	1 Kilogramo	Q 76.00	Q 19.00
TOTAL			Q 212.25
INSECTICIDAS	Presentación	Costo	4 aplicaciones de cada uno
IMIDACLOPRID	250 Gramos	Q 756.25	Q 189.06
ENDOSULFAN	1 Litro	Q 88.00	Q 22.00
TIOICLAM-HOXALATO	1 Litro	Q 413.00	Q 103.25
THIACLOPRID,BETA	1/2 Litro	Q 126.00	Q 31.50
TOTAL			Q 345.81
FERTILIZANTES HIDROSOLUBLES	Presentación	Costo	4 aplicaciones de cada uno
20-20-20	25 kilogramos	Q 286.00	Q 71.50
11-44-11	25 kilogramos	Q 325.00	Q 81.25
NITRATO DE CALCIO	25 kilogramos	Q 245.00	Q 61.25
SULFATO DE POTASIO	25 kilogramos	Q 180.00	Q 45.00
MURIATO DE POTASIO	50 kilogramos	Q 250.00	Q 62.50
12--5--40	50 kilogramos	Q 307.00	Q 76.75
TOTAL			Q 398.25
FERTILIZANTES GRANULADOS	Presentación	Costo	4 aplicaciones de cada uno
HIDROCOMPLEX	25 kilogramos	Q 278.00	Q 69.50
10--50--0	1 quintal	Q 250.00	Q 62.50
NITRATO DE CALCIO	1 quintal	Q 245.00	Q 61.25
TOTAL			Q 193.25
OTROS	Unidades	Costo	Total
Postes para tutores	100	Q 13.00	Q 1,300.00
Rollos de rafia	3	Q 60.00	Q 180.00
TOTAL			Q 1,480.00