

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA



**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR, BASADO EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *I-3* DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* RAZA 3 Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

ANA CRISTINA FULLADOLSA PALMA

Guatemala, mayo de 2009



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR, BASADO EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PARA LA DETECCIÓN DEL GEN I-3 DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* RAZA 3 Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

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

POR

ANA CRISTINA FULLADOLSA PALMA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO  
INGENIERA AGRÓNOMA EN  
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA

Guatemala, mayo de 2009



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR  
LIC. ESTUARDO GÁLVEZ

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	SECRETARIO
VOCAL PRIMERO	ING. AGR. FRANCISCO JAVIER VÁSQUEZ VÁSQUEZ
VOCAL	ING. AGR. WALDEMAR NUFIO REYES
SEGUNDO	ING. AGR. WALTER ARNOLDO REYES SANABRIA
VOCAL	ING. AGR. DANILO ERNESTO DARDÓN ÁVILA
TERCERO	BACHILLER RIGOBERTO MORALES VENTURA
VOCAL CUARTO	BACHILLER MIGUEL ARMANDO SALAZAR DONIS
VOCAL QUINTO	ING. AGR. EDWIN ENRIQUE CANO MORALES

Guatemala, mayo de 2009



Guatemala, 4 de mayo de 2009

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 "Desarrollo de un marcador molecular, basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, para la detección del gen *I-3* de resistencia a la marchitez vascular en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 y servicios realizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala", como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

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

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ana Cristina Fulladolsa Palma



## **ACTO QUE DEDICO**

A Dios, quien día a día me ha mostrado su amor, su gracia y su misericordia; quien me ha fortalecido durante estos años y cuyo rostro he visto resplandecer en mi vida.

A mis padres, Ángel Fulladolsa Forment y Ana Patricia Palma Guerra, hombre sabio y mujer virtuosa, ejemplos de vida y de fe, dedicados al servicio del prójimo, quienes nos han sabido instruir en los caminos de Dios y nos han enseñado que no hay imposibles.

A mi abuela, Trinidad Guerra Lucero, mi maestra y compañera, mujer de fe, incansable, en cuyas palabras he encontrado enseñanzas importantes para la vida, cuyos largos años han servido para dar amor, sabiduría y consejo y quien nos ha demostrado que el camino de Dios es el único.

A mis hermanos, Adrián Fulladolsa Palma, el milagro de amor en mi vida, cuya existencia es razón suficiente para trabajar y luchar por un mejor futuro, y Ángel Fulladolsa Gort, quien con su ejemplo me ha mostrado que con perseverancia y optimismo se alcanzan las metas trazadas.



## **TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO**

A Dios Todopoderoso, mi Buen Pastor, quien ama al justo y al trabajador, en quien he puesto mi fe para vivir en Él por la eternidad.

A mi país, Guatemala, en cuya agua corre la vida, en cuya tierra se encuentra la esencia, en cuyo viento se eleva el clamor del pueblo y en cuyas bellas montañas vive la esperanza.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, Alma Mater, en la cual obtuve los conocimientos y principios necesarios para ser una profesional de excelencia y con actitud de servicio para mi país.

A la Facultad de Agronomía, por medio de la cual descubrí que el mayor esfuerzo es el mejor y que el trabajo que desarrollaré con los conocimientos adquiridos será para el desarrollo de la población.

A mi familia; mis padres, abuela y hermanos, porque hemos compartidos cada logro y así hemos crecido juntos.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por las pruebas que han venido a mí, por darme su mano en momentos de necesidad, porque ha cumplido sus promesas en mi vida, ha alumbrado mi camino con su palabra y porque su fidelidad es para siempre.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, unidad académica en cuyas aulas obtuve los conocimientos y oportunidades necesarios para mi formación académica profesional.

A mis profesores, Ing. Agr. Amílcar Sánchez, Dr. Luis Mejía y Dr. Douglas P. Maxwell, quienes depositaron en mí su confianza y me han apoyado en la etapa final de mi formación académica. Gracias por sus enseñanzas y por su valiosa colaboración en la elaboración de este documento.

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT-, quien a través del proyecto FODECYT 54-2007 me permitió concluir mi formación académica y contribuyó a la realización del trabajo presentado en este documento.

A mi familia, por su incondicional apoyo durante mi carrera universitaria, alentándome con amor, bondad y paciencia en tiempos difíciles.

A mis amigos, quienes han complementado mi formación profesional a través de lecciones de vida, en las cuales he aprendido que la amistad es el regalo precioso de Dios.



## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA</b>	<b>3</b>
<b>1.1. PRESENTACIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1.2. MARCO REFERENCIAL</b>	<b>6</b>
<b>1.3. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
1.3.1. Objetivos Generales	7
1.3.2. Objetivos específicos	7
<b>1.4. METODOLOGÍA</b>	<b>8</b>
1.4.1. Descripción de antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007	8
1.4.2. Análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología	8
A. Integración del equipo de trabajo	8
B. Sesión de trabajo (entrevista)	9
C. Elaboración de lista plana FODA	9
D. Selección y análisis de los problemas	9
E. Ordenamiento, evaluación y priorización de problemas	10
F. Alternativas estratégicas	10
<b>1.5. RESULTADOS</b>	<b>11</b>
1.5.1. Síntesis de resultados, conclusiones y recomendaciones de proyectos anteriores relacionados al proyecto FODECYT 54-2007	11
1.5.2. Proyecto FODECYT 54-2007	13
A. Antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007	14
B. Objetivos del proyecto FODECYT 54-2007	15
C. Resultados esperados en el proyecto FODECYT 54-07	15
1.5.3. Análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía	16
A. Lista plana FODA	16
B. Selección, ordenamiento, evaluación y priorización de problemas	18
C. Alternativas estratégicas para la solución de problemas	19
<b>1.6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>22</b>
<b>1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>23</b>

<b>CAPÍTULO II: DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR, BASADO EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PARA LA DETECCIÓN DEL GEN I-3 DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), CAUSADA POR <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> RAZA 3</b>	<b>25</b>
<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS</b>	<b>27</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>30</b>
<b>2.2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>32</b>
2.2.1. Marco Conceptual	32
A. Origen de la resistencia a enfermedades en plantas	32
B. Marchitez vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 3 y su importancia	34
C. <i>Solanum pennellii</i> y su relación con el tomate cultivado <i>Solanum lycopersicum</i>	35
D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	36
E. Diseño de cebadores	38
F. Electroforesis en gel de agarosa	40
G. Secuenciación de ADN	42
H. Generalidades sobre la selección asistida por marcadores moleculares	44
I. Tipos de marcadores moleculares	46
2.2.3. Marco Referencial	48
A. El gen I-3 de resistencia a la marchitez vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 3 en el tomate	48
B. Germoplasma	49
C. Laboratorios de Investigación	49
<b>2.3. OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
2.3.1. Objetivo General	50
2.3.2. Objetivos específicos	50
<b>2.4. METODOLOGÍA</b>	<b>51</b>
2.4.1. Diseño de cebadores	51
2.4.2. Protocolo de PCR, electroforesis y secuenciación	51
<b>2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
2.5.1. Evaluación de cebadores de PCR para la detección del gen I-3	56
2.5.2. Análisis de secuencias de ADN de fragmentos amplificados por PCR	57
2.5.3. Evaluación de marcadores tipo CAPS	62
2.5.4. Evaluación del marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1	63

<b>2.6. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>2.7. RECOMENDACIONES</b>	<b>67</b>
<b>2.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>68</b>

**CAPÍTULO III: SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** **73**

<b>3.1. PRESENTACIÓN</b>	<b>75</b>
<b>3.2. SERVICIO 1: APOYO AL MANTENIMIENTO Y ORDENAMIENTO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA</b>	<b>76</b>
3.2.1. Objetivos	76
A. Objetivo general	76
B. Objetivos específicos	76
3.2.2. Metodología	76
A. Ordenamiento de equipo y materiales del Laboratorio	76
B. Elaboración de un manual de mantenimiento del equipo del laboratorio	77
C. Compilación de información sobre cebadores para diagnósticos fitopatológicos	77
3.2.3. Resultados	78
3.2.4. Evaluación	79
<b>3.3. SERVICIO 2: DIVULGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULAD DE AGRONOMÍA</b>	<b>80</b>
3.3.1. Objetivos	80
A. Objetivo general	80
B. Objetivos específicos	80
3.3.2. Metodología	81
3.3.3. Resultados	81
3.3.4. Evaluación	82
<b>3.4. SERVICIO 3: APOYO TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO AL PROYECTO FODECYT 54-2007</b>	<b>83</b>
3.4.1. Objetivos	83
A. Objetivo general	83
B. Objetivos específicos	83
3.4.2. Metodología	83
A. Análisis moleculares de plantas	83
B. Apoyo a la administración financiera del proyecto FODECYT 54-2007	84

3.4.3. Resultados	84
A. Análisis moleculares de plantas	84
B. Detalle administrativo-financiero del proyecto FODECYT 54-2007	89
3.4.4. Evaluación	90
<b>3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>
APÉNDICES	93
FIGURAS	95
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>Solanum pennellii</i> Correll	103
EJEMPLO DE DISEÑO DE CEBADORES	105
SECUENCIAS DE ADN DE PRODUCTOS DE PCR	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Diagrama de los tres mecanismos de mutación	32
Figura 2-2. Comparación visual de frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> y <i>Solanum pennellii</i>	35
Figura 2-3. Esquema de una cámara horizontal de electroforesis en gel	41
Figura 2-4. Separación de moléculas de ADN por tamaño en gel de agarosa	42
Figura 2-5. Fórmula molecular para un desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) y para un dideoxirribonucleótido trifosfato (ddNTP)	43
Figura 2-6. Esquema de secuenciación automática de ADN por el método de terminación de cadena	44
Figura 2-7. Comparación de un segmento de las secuencias de Purple Russian ( <i>i-3/i-3</i> ; arriba), NC EBR-8 ( <i>l-3/l-3</i> ; centro) y NC123S ( <i>l-3/l-3</i> ; abajo)	58
Figura 2-8. Comparación de secuencias de Purple Russian ( <i>i-3/i-3</i> ; arriba) y NC EBR-8 ( <i>l-3/l-3</i> ; abajo); fragmentos de PCR producidos con PTG190F1/R1	59
Figura 2-9. Comparación de secuencias de M82 ( <i>i-3/i-3</i> ; arriba) y NC EBR-8 ( <i>l-3/l-3</i> ; abajo); fragmentos de PCR producidos con PTG190F1/R1	60
Figura 2-10. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el par de cebadores P7-43DF1/R1	60
Figura 2-11. Comparación de un segmento de las secuencias de M82 ( <i>i-3/i-3</i> ; arriba) y NC EBR-8 ( <i>l-3/l-3</i> ; abajo)	61
Figura 2-12. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador CAPS PTG190F1/R1	62
Figura 2-13. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador CAPS P7-43BF1/R1	63

Figura 2-14. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador SCAR co-dominante P7-43DF3/R1	64
Figura 2-15. Evaluación de líneas e híbridos comerciales con P7-43DF3/R1	64
Fig. 3-4. Fotografía de gel de agarosa al 1.5%, de fragmentos de ADN producidos por PCR con los cebadores P6-25F2/R5	87
Figura 1-1A. Boleta de discusión para sesión de trabajo FODA	95
Figura 1-2A. Matriz FODA para definir alternativas estratégicas	96
Figura 2-1A. Esquema del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa	97
Figura 2-2A. Cromosoma 7 del tomate	98
Figura 2-3A. Región del cromosoma 7, comprendida entre el marcador TG183 y TG639	99
Figura 3-1A. Imagen del póster científico "Evaluación de la efectividad genética de un gen de resistencia (Ty3) a Begomovirus en el tomate"	100
Figura 3-2A. Imagen del póster científico "Desarrollo de marcadores moleculares CAPS y SCAR para la detección de la introgresión del gen I-3 de resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> raza 3"	101
Figura 3-3A. Imagen del póster científico "Análisis genético de una población F2 para la segregación de dos introgresiones asociadas al padre resistente a Begomovirus, Gc-171"	102
Figura A1. Cebadores diseñados a partir de la secuencia de <i>Vitis vinifera</i>	106

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-1. Resultados, conclusiones y recomendaciones de proyectos de investigación antecedentes al proyecto FODECYT 54-2007	11
Cuadro 1-2. Lista plana FODA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC	16
Cuadro 1-3. Priorización de los principales problemas identificados en el Laboratorio de Biotecnología	18
Cuadro 1-4. Matriz FODA de alternativas estratégicas para la solución de los problemas identificados en el Laboratorio de Biotecnología	20
Cuadro 2-1. Cebadores diseñados para detección del gen <i>I-3</i> , secuencias, marcador utilizado, posición en cromosoma 7	53
Cuadro 2-2. Longitud de fragmentos de PCR producidos por los distintos marcadores moleculares evaluados en materiales homocigotos resistentes y homocigotos susceptibles	56
Cuadro 3-1. Resultados de análisis molecular para 77 plantas F2 provenientes de híbridos portadores de los genes <i>Ty-3a</i> y <i>Ty-4</i>	85
Cuadro 3-2. Segregación de las introgresiones correspondientes a <i>Ty-3a</i> y <i>Ty-4</i> en una población F2	86
Cuadro 3-3. Genotipo de 12 familias F3, portadoras de los genes <i>Ty-3a</i> y/o <i>Ty-4</i>	87
Cuadro 3-4. Genotipos de 57 plantas F2 del cruce Gh13 X CLN2116, para los genes <i>Ty-3</i> y <i>T-y2</i>	88



## TRABAJO DE GRADUACIÓN

**DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR, BASADO EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *I-3* DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* RAZA 3 Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

### RESUMEN

El trabajo realizado para las investigaciones agrícolas en aspectos de Biología Molecular en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía es de gran aporte a la solución de problemas relacionados a esa rama de estudio, a nivel nacional. Además, el Laboratorio lleva a cabo actividades de docencia, por lo cual se abrió un espacio para la realización del Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía (EPSA) en colaboración con el proyecto de investigación titulado "Evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate" (FODECYT 54-2007).

En el presente informe integrado se describen las actividades realizadas para el diagnóstico, la investigación y los servicios prestados en el Laboratorio de Biotecnología. El diagnóstico descrito en el primer capítulo permitió conocer con más detalles los antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007, por medio de la revisión de los objetivos y resultados esperados, como de los resultados de proyectos anteriores relacionados al proyecto FODECYT 54-2007 y de los cuales se obtuvieron las herramientas para iniciar la investigación dirigida a la evaluación de los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-4* de resistencia a Begomovirus en el tomate.

El diagnóstico también sirvió para conocer las condiciones físicas y administrativas del Laboratorio de Biotecnología. Con la participación de los investigadores vinculados al Laboratorio por medio de proyectos de investigación, se determinaron las fortalezas y

oportunidades características del Laboratorio al inicio del año 2008. Por otro lado, la determinación de sus debilidades y amenazas concluyó en la identificación de siete problemas de mayor importancia, cuatro de los cuales se seleccionaron para proponer servicios que aportaran a su solución.

El segundo capítulo se ha dedicado a la presentación de la investigación realizada durante el EPSA en el Laboratorio de Biotecnología y en el laboratorio del Dr. Douglas P. Maxwell, en el Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin-Madison. La investigación pretendía desarrollar marcadores moleculares tipo CAPS y SCAR codominante para la detección de la introgresión del gen *I-3* de resistencia a marchitez vascular en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. Los resultados fueron el desarrollo del marcador tipo CAPS P7-43BF1/R1 y el marcador tipo SCAR codominante P7-43DF3/R1, siendo este último el marcador molecular recomendado para su aplicación en programas de mejoramiento de tomate, con previa evaluación en distintas condiciones y materiales.

En el capítulo tres se describen los servicios prestados al Laboratorio de Biotecnología, los cuales incluyen el apoyo para el ordenamiento y mantenimiento del Laboratorio, por medio del cual se lograron establecer espacios específicos para almacenamiento y uso de materiales y equipo del Laboratorio, como también la elaboración de un Manual de Mantenimiento del equipo y una compilación de información sobre cebadores que puedan aplicarse en diagnósticos fitopatológicos; el inicio de actividades de divulgación de las investigaciones realizadas por medio de la elaboración y presentación de pósters científicos; y finalmente, el apoyo técnico y administrativo al proyecto FODECYT 54-2007, lo cual resultó en el avance de las actividades del proyecto, dirigidas al análisis molecular de plantas por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y la ejecución financiera del proyecto por medio del apoyo al manejo administrativo del mismo.

## **CAPÍTULO I**

**DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**



## 1.1. PRESENTACIÓN

El trabajo realizado para las investigaciones agrícolas en aspectos de Biología Molecular en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala es de gran aporte a la solución de problemas nacionales relacionados a esa rama de estudio de la Agronomía. Tal es el caso de la investigación realizada a través del proyecto *Evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate* (FODECYT 54-2007), dentro del cual se trabajó en colaboración con otros investigadores.

El proyecto FODECYT 54-2007 está financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) y tiene como objetivo principal la evaluación de la efectividad de los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-4*, asociados a la resistencia a Begomovirus en el tomate para ser incorporados a líneas de mejoramiento, que pueden ser utilizadas para el desarrollo de híbridos resistentes de tomate (Mejía et al., 2007).

Dado que el proyecto contempla el uso de marcadores moleculares para la detección de los genes de resistencia a Begomovirus en el tomate, existe una relación estrecha con el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía. Por esta razón, el presente diagnóstico fue elaborado siguiendo dos modalidades. La primera fue la revisión de los antecedentes y objetivos del proyecto FODECYT 54-2007. La segunda modalidad fue la elaboración de un análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología, contando con la participación de seis miembros de los equipos de trabajo de los distintos proyectos de investigación realizados en el Laboratorio.

## **1.2. MARCO REFERENCIAL**

El proyecto FODECYT 54-2007 contempla un período de ejecución de dos años, iniciando en enero de 2008 y finalizando en diciembre de 2009. El trabajo relacionado al cargo de Auxiliar de Investigación en el proyecto FODECYT 54-2007 fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología. Éste pertenece a la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas, Área Tecnológica de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad Universitaria, zona 12, Ciudad de Guatemala.

El Laboratorio se dedica a la investigación y docencia en la rama de Biología Molecular. Las investigaciones realizadas por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología están orientadas a resolver problemas del sector agrícola utilizando técnicas de Biología Molecular e Ingeniería Genética.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivos Generales**

Describir los antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007, relacionado a la evaluación de la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate.

Identificar y priorizar los principales problemas existentes en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

Analizar participativamente las fortalezas, debilidades, oportunidades y amenazas del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía.

Identificar y priorizar los principales problemas encontrados a partir del análisis FODA y proponer alternativas para su solución.

## **1.4. METODOLOGÍA**

### **1.4.1. Descripción de antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007**

Se realizó una revisión de los antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007, titulado "Evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate", tomando en cuenta los objetivos y resultados esperados, así como los resultados obtenidos, las conclusiones y las recomendaciones de proyectos anteriores, directamente relacionados al proyecto FODECYT 54-2007.

### **1.4.2. Análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología**

Se realizó un análisis de las fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía. La metodología del análisis consistió en los siguiente: 1) Integración del equipo de trabajo, 2) Sesión de trabajo (entrevista), 3) Elaboración de lista plana FODA, 4) Selección y análisis de problemas, 5) Ordenamiento de problemas, 6) Evaluación de los problemas, 7) Selección ponderada de los problemas, y 8) Alternativas estratégicas (Pérez, 2005).

#### **A. Integración del equipo de trabajo**

El equipo de trabajo fue conformado por los investigadores que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología (Cuadro 1-1) y están vinculados a los distintos proyectos de investigación que se llevan a cabo en la Facultad de Agronomía.

Cuadro 1-1. Equipo de trabajo para la realización del análisis FODA; personal relacionado con proyectos de investigación en Biología Molecular, realizados en el Laboratorio de Biotecnología, FAUSAC.

<b>Nombre del participante</b>	<b>Cargo en Proyecto</b>
Ana Cristina Barillas Palma (Moderadora)	Auxiliar de Investigación
Dr. Luis Mejía De León	Investigador Principal (FODECYT 54-2007)
M. Sc. Amílcar Sánchez	Investigador Principal/Adjunto
Ing. Agr. Brenda García	Investigadora Adjunta
Ing. Agr. Rudy Teni	Investigador Adjunto (FODECYT 54-2007)
Ing. Agr. Julio Berdúo	Investigador Adjunto
Licda. Isabel Gaitán	Investigadora Adjunta

## **B. Sesión de trabajo (entrevista)**

La discusión de los aspectos relacionados con el trabajo realizado en el Laboratorio y con los proyecto se llevó a cabo por medio de una sesión de trabajo, utilizando una boleta como guía de discusión (Figura 1-1A). Se llevaron a cabo tres sesiones de trabajo, con tres participantes en cada sesión.

## **C. Elaboración de lista plana FODA**

Los resultados obtenidos en la sesión se sintetizaron en una lista plana de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas.

## **D. Selección y análisis de los problemas**

Durante la sesión de trabajo realizada, se les solicitó a los participantes que identificaran los que consideraban los principales problemas. Además, se discutieron posibles soluciones para estos problemas.

### **E. Ordenamiento, evaluación y priorización de problemas**

Luego de seleccionar los principales problemas, se solicitó a los participantes que ordenaran numéricamente los problemas en orden de importancia, calificando con 1 al más importante, con 2 al segundo más importante y así sucesivamente. Se sumaron los valores asignados a cada problema, y posteriormente, se priorizaron los problemas encontrados, para lo cual se colocaron los problemas en orden de menor a mayor según el valor de la suma obtenida anteriormente (Pérez, 2005).

### **F. Alternativas estratégicas**

Para determinar las alternativas estratégicas para la solución de los problemas encontrados, se utilizó la matriz FODA (Figura 1-2A). Se tomaron en cuenta las soluciones planteadas durante la selección y análisis de problemas y se describieron de forma general las alternativas (Instituto Politécnico Nacional, 2002).

## 1.5. RESULTADOS

### 1.5.1. Síntesis de resultados, conclusiones y recomendaciones de proyectos anteriores relacionados al proyecto FODECYT 54-2007

En el Cuadro 1-2 se describen brevemente los principales resultados y conclusiones, y las recomendaciones de cuatro proyectos ejecutados anteriormente y que están directamente relacionados con el proyecto FODECYT 54-2007. Se notó que los proyectos se relacionan entre sí, habiendo seguimiento de actividades anteriores y cumplimiento de recomendaciones, comenzando con la evaluación fenotípica de materiales resistentes a geminivirus, utilizando técnicas moleculares para la detección de ADN de virus en plantas, hasta el desarrollo de líneas resistentes evaluadas y seleccionadas por su fenotipo y por su genotipo, por medio del uso aplicado de marcadores moleculares para la detección de genes de resistencia.

Cuadro 1-2. Resultados, conclusiones y recomendaciones de proyectos de investigación antecedentes al proyecto FODECYT 54-2007.

Título del Proyecto	Síntesis de Resultados y Conclusiones	Recomendaciones
<p><b>PROYECTO FODECYT NO. 48<sup>1</sup></b></p> <p>Evaluación de genotipos de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) para la resistencia a virus géminis-transmitidos por mosca blanca y su detección por PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los costos de producción y presencia de plagas en la producción de tomate en la Unidad de Riego Sansirisay aumentan con el tiempo y los rendimientos disminuyen.</li> <li>• Una de las principales plagas es la mosca blanca, pero se desconoce la relación vector-patógeno que ésta tiene con los geminivirus.</li> <li>• Los agricultores mostraron interés en aceptar soluciones técnicas a sus problemas, pero exigen coordinación y credibilidad.</li> <li>• Se encontraron materiales tolerantes a los virus y se seleccionaron plantas por su alta resistencia y por su alto rendimiento.</li> <li>• Los análisis por PCR mostraron que todas las plantas permitieron la replicación viral, aún cuando eran asintomáticas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Introducir estrategias diferentes a la veda temporal de hospederos al área, informar sobre el ciclo de infección por mosca blanca y mantener una presencia prolongada en la Unidad de Riego Sansirisay para obtener credibilidad por parte de los agricultores.</li> <li>• Probar híbridos comerciales resistentes y de buena calidad, de manera constante para recomendar su adopción en la producción.</li> <li>• Utilizar cebadores específicos para cada virus presente en el área de prueba.</li> <li>• Implementar otros métodos de diagnóstico molecular, más específicos y económicos, en apoyo al programa de mejoramiento genético.</li> </ul>

<sup>1</sup> Tomado de Mejía et al., 2001.

<p><b>PROYECTO FODECYT 83-99<sup>1</sup></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El uso de bioplaguicidas a base de <i>Verticillium lecanii</i> es una buena alternativa para el control de mosca blanca.</li> <li>• Las líneas resistentes, anteriormente seleccionadas en la Unidad de Riego Sansirisay mantuvieron su resistencia y superaron al testigo en rendimiento.</li> <li>• Las líneas FAVI tuvieron frutos de mayor peso y firmeza, y el híbrido F6 X HC-7880 presentó frutos de calidad aceptable para el mercado local y su rendimiento fue superior al control sin protección química.</li> <li>• En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (FAUSAC) se cuenta con cebadores y sondas específicos para la detección de siete geminivirus y cualquier Begomovirus del tomate del Hemisferio Occidental y para Begomovirus del Hemisferio Oriental.</li> <li>• La determinación de la concentración de ADN viral en las plantas es más confiable que la sola evaluación visual de síntomas.</li> <li>• La hibridación molecular es altamente sensible y es un método apto para la detección de geminivirus en plantas.</li> <li>• La resistencia genética a los geminivirus es una alternativa con buenas posibilidades de aplicación para la producción sostenible de tomate.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Continuar con la evaluación de genotipos y la selección de plantas resistentes hasta obtener líneas resistentes.</li> <li>• Tratar de implementar un programa de manejo integrado (MIP) para el control de mosca blanca que incluya aspectos de control cultural, químico, biológico y genético.</li> <li>• Utilizar cebadores y sondas específicos para cada virus presente en el área para vigilar su presencia y frecuencia relativa.</li> <li>• Usar el método de hibridación de ácidos nucleicos como método de diagnóstico molecular, en lugar de PCR.</li> <li>• Determinar la concentración de ADN viral en las plantas para utilizarse como criterio de selección complementario a la evaluación visual.</li> <li>• Realizar estudios para determinar la base genética de la resistencia observada y reunir los genes de resistencia en un mismo genotipo.</li> </ul>
<p><b>PROYECTO FODECYT 11-00<sup>2</sup></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las líneas con resistencia derivada de <i>L. hirsutum</i> y <i>L. chilense</i> presentaron menores síntomas de infección que <i>L. pimpinellifolium</i> y <i>L. peruvianum</i>.</li> <li>• Los híbridos entre líneas resistentes y líneas susceptibles mostraron resistencia a geminivirus, lo cual indica que la resistencia es al menos parcialmente dominante y los sistemas genéticos de resistencia son complementarios.</li> <li>• Los híbridos entre líneas resistentes tuvieron mayor resistencia y rendimiento, aunque los híbridos entre líneas resistentes y líneas susceptibles tuvieron alto rendimiento pero no la calidad que exige el mercado local.</li> <li>• Hubo correlación directa entre la presencia de síntomas y el rendimiento, así como entre la presencia de síntomas y la concentración de ADN viral.</li> <li>• Se encontró que la introgresión de <i>L. hirsutum</i> no se encuentra en la misma región que el gen de resistencia <i>Ty-1</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Continuar la selección de plantas hasta obtener líneas que incorporen características requeridas por productores y mercados locales.</li> <li>• Realizar cruces entre las mejores líneas resistentes con las líneas de frutos firmes para formar nuevos híbridos que puedan transferirse a los productores de inmediato.</li> <li>• Mantener la vigilancia estricta sobre la introducción de TYLCV al territorio nacional y sus posibles consecuencias.</li> <li>• Utilizar el rendimiento y la concentración de ADN viral como criterios de selección de plantas resistentes.</li> <li>• Mapear la introgresión de <i>L. hirsutum</i> en el genoma del tomate.</li> </ul>

<sup>1</sup> Tomado de Mejía et al., 2001.

<sup>2</sup> Tomado de Mejía et al., 2003.

<p><b>PROYECTO AGROCYT 002-2002<sup>1</sup></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se generaron aproximadamente 50 líneas con alta resistencia a virosis transmitida por mosca blanca, con frutos de diferente forma y alta firmeza.</li> <li>• Se produjeron aproximadamente 350 híbridos XA y se seleccionaron seis híbridos XC, dos de los cuales se producen en cantidades comerciales y se evalúan en diferentes localidades.</li> <li>• La detección de SNPs e indeles ha permitido demostrar que la resistencia en las líneas Gh no está asociada con la introgresión de los genes <i>Ty-1</i> (cromosoma 6) y <i>Ty-2</i> (cromosoma 11).</li> <li>• El desarrollo y aplicación de marcadores moleculares permitió determinar el genotipo de varias líneas progenitoras de híbridos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Continuar desarrollando líneas progenitoras para introducir la resistencia a virosis en genotipos de alta calidad.</li> <li>• Continuar la evaluación de híbridos XA.</li> <li>• Utilizar marcadores moleculares ligados a genes de resistencia hasta determinar el genotipo de las principales líneas e híbridos XC.</li> <li>• Realizar inoculaciones para verificar la resistencia a los principales patógenos del tomate.</li> <li>• Continuar la búsqueda de ligamiento a los genes de resistencia derivados de <i>L. hirsutum</i> en líneas de mejoramiento.</li> </ul>
<p>Híbridos resistentes a virosis transmitida por mosca blanca y a otros patógenos de importancia económica para la producción sostenible de tomate en Guatemala</p>		

### 1.5.2. Proyecto FODECYT 54-2007

El proyecto FODECYT 54-2007, titulado "Evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate" está financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) a través del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), que a su vez está a cargo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) (CONCYT, 2009).

El CONCYT es la más alta autoridad en el país, en la dirección y coordinación del desarrollo científico y tecnológico nacional. Cuenta con una Comisión Consultiva, integrada por nueve miembros, creada mediante el Decreto 63-91 del Congreso de la República, "Promoción del Desarrollo Científico y Tecnológico Nacional". La Comisión Consultiva tiene la función de asesorar y apoyar la acción del CONCYT en las funciones enmarcadas en la Ley, así como colaborar con la SENACYT para el buen desarrollo de sus funciones (CONCYT, 2009).

<sup>1</sup> Tomado de Mejía et al., 2006.

La SENACYT es responsable de apoyar y ejecutar las decisiones que emanen del CONCYT y de dar seguimiento a sus respectivas acciones, a través de la utilización eficiente de los recursos del FONACYT. Además, constituye un vínculo entre las instituciones que integran el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología y el CONCYT (CONCYT, 2009).

El FONACYT es el mecanismo financiero que le permite al CONCYT obtener recursos para dirigir, coordinar y financiar en forma eficaz el desarrollo científico y tecnológico nacional. El FONACYT tiene varias líneas de financiamiento, entre ellas el Fondo para el Desarrollo Científico y Tecnológico (FODECYT) (CONCYT, 2009a).

#### **A. Antecedentes del proyecto FODECYT 54-2007**

Se conoce que los Begomovirus, transmitidos por la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, han sido la principal causa de importantes pérdidas en la producción de tomate. Una práctica de manejo que podría ser efectiva en la reducción de las pérdidas es el desarrollo de híbridos de tomate resistentes a Begomovirus y que ofrezcan una calidad hortícola aceptable. Hasta hace poco tiempo no existía un híbrido comercial de este tipo, pero en el año 2007, Semillas Tropicales, S.A., una nueva empresa de semillas localizada en Antigua Guatemala, introdujo varios híbridos con niveles moderados a altos de resistencia a Begomovirus. Estos híbridos fueron desarrollados a partir de líneas desarrolladas por el Dr. Luis Mejía (Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía) y otros colegas internacionales de la Universidad Hebrea de Jerusalén (HUJ) y la Universidad de Wisconsin-Madison. Además, la colaboración del Dr. Douglas P. Maxwell de la Universidad de Wisconsin-Madison con científicos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, la Universidad de Florida (UFL), la Universidad Hebrea de Jerusalén (HUJ) y el Centro Asiático para la Investigación y el Desarrollo de Hortalizas (AVRDC) ha permitido que se desarrollaran métodos moleculares para la detección de los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-4* de resistencia a Begomovirus, los cuales están disponibles para su utilización en la Universidad de San Carlos de Guatemala. Estos métodos son importantes para caracterizar los principales genes asociados a la resistencia en el

germoplasma desarrollado en la Universidad de San Carlos y para cumplir con los objetivos del proyecto FODECYT 54-2007.

## **B. Objetivos del proyecto FODECYT 54-2007**

### **i. Objetivo general**

Evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate.

### **ii. Objetivos específicos**

Separar los genes acoplados *Ty-3a* y *Ty-4*.

Sobreponer los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* (o *Ty-3a*) y *Ty-4*, en una misma línea homocigótica.

Evaluar el nivel de resistencia a Begomovirus en líneas portadoras de los genes *Ty-1*, *Ty-2*, *Ty-3* (o *Ty-3a*) y *Ty-4* con relación a líneas portadoras de sólo uno de los cuatro genes y líneas sin alguno de los genes.

## **C. Resultados esperados en el proyecto FODECYT 54-07**

La realización de cruces entre líneas portadoras de diferentes genes de resistencia y la utilización de marcadores moleculares ligados a los diferentes genes de resistencia, permitirán el desarrollo y la identificación de plantas portadoras de las distintas combinaciones de genes, en poblaciones segregantes (F2). Los resultados obtenidos por medio de la posterior evaluación de campo de la generación F3 de estas líneas, bajo

fuerte presión viral, determinarán la efectividad de cada uno de los genes en forma separada y su efecto en forma conjunta (Mejía et al., 2007).

### 1.5.3. Análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía

#### A. Lista plana FODA

La lista de componentes del análisis discutidos en las tres sesiones de trabajo, se presentan en el Cuadro 1-3.

Cuadro 1-3. Lista plana FODA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC (marzo 2008).

FORTALEZAS	DEBILIDADES
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se han desarrollado líneas e híbridos de tomate resistentes a enfermedades causadas por geminivirus y <i>Ralstonia solanacearum</i>.</li> <li>-Se comercializan cuatro híbridos resistentes a geminivirus: Llanero, San Miguel, Río Blanco y Romelia.</li> <li>-Se han desarrollado marcadores moleculares para la detección de distintos genes de resistencia en tomate.</li> <li>-Se han estandarizado técnicas que antes se desconocían.</li> <li>-El laboratorio cuenta con equipo moderno y funcional.</li> <li>-El equipo de investigadores tiene varios años de trabajar juntos, tienen buena comunicación, voluntad de trabajo, disciplina y responsabilidad.</li> <li>-Algunos investigadores tienen mucha experiencia y conocimiento en mejoramiento genético de plantas.</li> <li>-El laboratorio tiene el apoyo financiero de la DIGI, el CONCYT, la Cooperación Española y USAID.</li> <li>-Se mantienen relaciones de trabajo con el IIA, la Universidad de Wisconsin-Madison, la Universidad de Florida, la Universidad Hebrea de Jerusalén, la Universidad Politécnica de Valencia, AVRCD de Taiwán; y las empresas Pilonos de Antigua y Semillas Tropicales, S.A.</li> <li>-El laboratorio es el centro de prácticas de los cursos de Biotecnología, Introducción a la Ingeniería</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Los híbridos comerciales aún no satisfacen las necesidades de calidad de fruto que exige el mercado.</li> <li>-El programa de mejoramiento genético de tomate ha sido siempre subsidiado por USAID, el CONCYT y ahora por la DIGI.</li> <li>-El equipo de trabajo está formado, en su mayoría, por personas con poca formación en Biología molecular y Fitopatología. Está desactualizado.</li> <li>-El laboratorio está desordenado y sin mantenimiento.</li> <li>-Son necesarios recursos como: algunos reactivos y materiales, un invernadero propio en buenas condiciones, espacio para oficinas.</li> <li>-Existe equipo nuevo sin utilizarse.</li> <li>-Existe equipo deteriorado sin arreglar.</li> <li>-Existe equipo inventariado que no es útil que no puede sacarse del laboratorio.</li> <li>-Hay poca participación de otros profesores o personas interesadas en proyectos de investigación relacionados con el trabajo del laboratorio.</li> <li>-El equipo de trabajo es pequeño.</li> <li>-Las propuestas de investigación son pocas.</li> </ul>

<p>Genética y Genética, impartidos en la Facultad de Agronomía, y apoya a la docencia en distintas unidades académicas.</p> <p>-Se cuenta con una colección de Calahuala, la cual contiene aproximadamente 200 muestras de tres especies de Calahuala presentes en Guatemala.</p> <p>-El laboratorio cuenta con lo necesario para trabajar: agua, luz, computadora, impresora, Internet, espacio suficiente, materiales, reactivos, equipo funcional.</p> <p>-El laboratorio tiene un coordinador asignado por la Facultad de Agronomía para apoyar las actividades de investigación realizadas.</p>	
<b>OPORTUNIDADES</b>	<b>AMENAZAS</b>
<p>-Desarrollo de híbridos comerciales con resistencia a geminivirus y marchitez bacteriana, con frutos de alta calidad que satisfagan las necesidades del mercado nacional.</p> <p>-Expansión del mercado de los híbridos comerciales producidos, a Centroamérica, México, países asiáticos, entre otros.</p> <p>-Prestación de servicios por parte del laboratorio, en el diagnóstico fitopatológico y con marcadores moleculares y/o caracterización de líneas.</p> <p>-Presentación de proyectos de investigación a instituciones nacionales y extranjeras para obtener financiamiento y apoyo técnico.</p>	<p>-Finalización de los financiamientos obtenidos a través de los proyectos de investigación.</p> <p>-La compra de parte o la totalidad GenTropic Seeds (Semillas Tropicales, S.A.) por otra empresa más grande.</p> <p>-Ausencia del coordinador del Laboratorio de Biotecnología por motivos de trabajo o estudio.</p> <p>-Asignación del puesto de coordinador del laboratorio a una persona poco calificada en el tema de Biología Molecular.</p> <p>-Interrupción de actividades normales por cierre de edificios por motivo de manifestaciones.</p> <p>-Retraso de pagos por parte de las instituciones financiadas.</p>

Se observa que algunas de las prioridades del Laboratorio son distintas a las del programa de mejoramiento de tomate (en el cual se incluye el proyecto FODECYT 54-2007). Sin embargo, a través del programa y los proyectos relacionados se realizan muchas de las actividades del Laboratorio. Una preocupación común para los investigadores del Laboratorio y del proyecto es la duración del financiamiento y la sostenibilidad del Laboratorio en el futuro.

Se enumeran 13 fortalezas y cuatro oportunidades que pueden servir para trabajar sobre las debilidades del Laboratorio y disminuir las amenazas.

## B. Selección, ordenamiento, evaluación y priorización de problemas

En las sesiones de trabajo se identificaron siete problemas, a los cuales se les asignó un número para ordenarlos según su importancia, calificando con el 1 al más importante, con el 2 al siguiente y así sucesivamente. Luego, se realizó la sumatoria de valores asignados a cada problema. De acuerdo con esta evaluación, se ordenaron de menor a mayor según el total obtenido, como se observa en el Cuadro 1-4.

Cuadro 1-4. Priorización de los principales problemas identificados en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC (marzo 2008).

PROBLEMA	INTEGRANTE DEL EQUIPO NO.						Total
	1	2	3	4	5	6	
1. Interrupción de actividades normales	0	0	1	1	0	0	2
2. Mejoramiento de híbridos	3	3	0	0	0	0	6
3. Financiamiento del laboratorio	2	2	0	0	1	1	6
4. Capacitación del personal	1	1	2	2	0	0	6
5. Programa de docencia	4	4	0	0	0	0	8
6. Mantenimiento del laboratorio	0	0	3	3	2	2	10
7. Orden del laboratorio	0	0	4	4	3	3	14

Se encontró que el principal problema del Laboratorio es la interrupción de las actividades normales por motivo de manifestaciones en la Universidad. Se considera que este problema es institucional y que su solución debe encontrarse y negociarse a nivel de autoridades y representaciones de la Academia, el cuerpo administrativo y el cuerpo estudiantil.

Los siguientes tres problemas tuvieron el mismo puntaje. Estos son: a) el mejoramiento de híbridos, b) el financiamiento del Laboratorio y c) la capacitación del personal. El primero es un problema en el programa de mejoramiento genético de tomate y su solución radica en encontrar un híbrido que reúna las características de calidad de planta y de fruto para su mayor aceptación en el mercado. Se considera que esto permitiría tener oportunidades de expansión del mercado a nivel internacional.

El problema de financiamiento del Laboratorio es amplio y abarca desde el atraso en pagos de incentivos hasta el riesgo de no contar con financiamiento para la investigación en el futuro. Se realizaron observaciones para su solución, las cuales se describen en la matriz FODA (Cuadro 1-5).

La capacitación del personal también es un tema amplio, debido a que contempla la capacitación de otras personas en las técnicas y métodos utilizados en el Laboratorio, la realización de estudios de post-grado en materias relacionadas con Biología Molecular y la actualización interna y fortalecimiento de los conocimientos del equipo de investigadores.

En cuanto al programa de docencia, durante las sesiones de trabajo se mencionó la necesidad de cambiar el modelo de docencia actual para involucrar a los estudiantes en las actividades realizadas en el Laboratorio como aporte a su formación profesional.

Por último, el mantenimiento y orden del laboratorio son importantes, ya que de no realizarse se produce un estancamiento de las actividades del Laboratorio, un ambiente de trabajo no agradable, la interrupción de algunos procedimientos por fallas en el equipo y el deterioro de los materiales y el equipo.

### **C. Alternativas estratégicas para la solución de problemas**

Se identificaron alternativas estratégicas generales para la solución de problemas, por medio de relacionar distintos componentes del análisis FODA en una matriz (Instituto Politécnico Nacional, 2002). El enfoque de esta matriz se concentró en cuatro combinaciones de factores:

1. Fortalezas-Oportunidades (maximizar las fortalezas y las oportunidades)
2. Fortalezas-Amenazas (maximizar las fortalezas y minimizar las amenazas)
3. Debilidades-Oportunidades (minimizar las debilidades y maximizar las oportunidades)
4. Debilidades-Amenazas (minimizar las debilidades y las amenazas)

Los resultados del análisis de las interacciones entre los componentes, las alternativas de solución, se muestran en el Cuadro 1-5.

Cuadro 1-5. Matriz FODA de alternativas estratégicas para la solución de los problemas identificados en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC.

<b>Factores Internos</b> <b>Factores Externos</b>	<b>FORTALEZAS</b>	<b>DEBILIDADES</b>
<b>O P O R T U N I D A D E S</b>	<p style="text-align: center;"><b>FO (Maxi-Maxi)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desarrollar híbridos comerciales con resistencia a geminivirus y marchitez bacteriana, con frutos de alta calidad, para satisfacer las necesidades de mercados locales y externos, aprovechando que ya se cuenta con líneas resistentes e híbridos comerciales.</li> <li>- Desarrollar híbridos comerciales con resistencia a geminivirus y marchitez bacteriana, con frutos de alta calidad, utilizando los marcadores moleculares ya desarrollados y aprovechando que se ha logrado estandarizar técnicas y se cuenta con equipo moderno.</li> <li>- Presentar propuestas de proyectos de investigación en el tema de desarrollo de líneas e híbridos resistentes a enfermedades, considerando la experiencia adquirida de los miembros del equipo de investigadores y del apoyo financiero brindado por instituciones como el CONCYT, la DIGI y la Cooperación Española.</li> <li>- Realizar una propuesta de prestación de servicios, aprovechando los recursos con los que cuenta el laboratorio y su capacidad adquirida de realizar este trabajo.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>DO (Mini-Maxi)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desarrollar híbridos resistentes y comerciales para satisfacer las necesidades de mercados locales y externos.</li> <li>- Desarrollar propuestas de proyectos de investigación en base a lo logrado para obtener financiamiento y apoyo técnico de distintas instituciones nacionales y extranjeras.</li> <li>- Fortalecer los conocimientos y formación académica de los miembros del equipo de trabajo para el beneficio del programa de mejoramiento genético de tomate, el desarrollo de nuevas propuestas de trabajo y la prestación de servicios por parte del Laboratorio.</li> <li>- Mantener el orden y la limpieza del laboratorio para facilitar la prestación de servicios.</li> <li>- Coordinar y gestionar el mantenimiento del equipo con el que cuenta el Laboratorio para facilitar la prestación de servicios.</li> <li>- Promover la participación de profesores y otras personas interesadas en el trabajo realizado en el Laboratorio e involucrarlos para beneficiar la prestación de servicios y el desarrollo de nuevos proyectos de investigación.</li> <li>- Proponer nuevos proyectos de investigación, buscando aumentar las capacidades del Laboratorio y fortalecer el programa de mejoramiento genético de tomate, así como para obtener nuevos financiamientos.</li> </ul>

<b>A M E N A Z A S</b>	<p style="text-align: center;"><b>FA (Maxi-Mini)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Continuar desarrollando líneas e híbridos resistentes y comerciales para beneficio de agricultores, a través de Semillas Tropicales, S.A. y así fortalecer su oferta.</li> <li>- Desarrollar nuevos materiales genéticos y marcadores moleculares, ganando prestigio en investigación y buscando nuevas oportunidades de financiamiento.</li> <li>- Mantener el puesto de coordinador del Laboratorio para un profesional capacitado en materia de Biología Molecular y Fitopatología, para que haya un buen manejo de los recursos y se fortalezca el programa académico.</li> <li>- Fortalecer las relaciones con instituciones de investigación para obtener financiamiento y continuar el desarrollo de la investigación en el Laboratorio.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>DA (Mini-Mini)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desarrollar híbridos resistentes y comerciales para la venta.</li> <li>- Desarrollar nuevos híbridos comerciales para probar el aporte de la investigación al desarrollo del país, como también para mantener el financiamiento ofrecido por distintas instituciones de investigación.</li> <li>- Fortalecer los conocimientos y formación académica de los miembros del equipo de trabajo para el beneficio y desarrollo del Laboratorio.</li> <li>- Mantener el orden y la limpieza del laboratorio para que las actividades puedan realizarse sin problema.</li> <li>- Coordinar y gestionar el mantenimiento del equipo con el que cuenta el Laboratorio.</li> <li>- Promover la participación de profesores y otras personas interesadas en el trabajo realizado en el Laboratorio para iniciar nuevos proyectos.</li> <li>- Proponer nuevos proyectos de investigación, buscando aumentar las capacidades del Laboratorio y fortalecer el programa de mejoramiento genético de tomate, así como para obtener nuevos financiamientos.</li> </ul>
--	--	---

## 1.6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- En la descripción de los resultados y conclusiones de proyectos ejecutados previo al proyecto FODECYT 54-2007 se observó que existe seguimiento de las actividades iniciadas desde 1998, así como esfuerzos por desarrollar materiales resistentes a geminivirus y que a la vez sean de buena calidad, según las exigencias del mercado local. De acuerdo a los objetivos del proyecto FODECYT 54-2007, se continuará con la investigación relacionada al desarrollo de líneas de mejoramiento de tomate que contengan distintos genes de resistencia, evaluando su efectividad en el campo.
- El análisis FODA, realizado para diagnosticar problemas en el Laboratorio de Biotecnología, abarcó una gama amplia de aspectos administrativos, organizacionales, científicos y académicos. Esto permitió que la información generada fuera dirigida a describir la situación actual del Laboratorio de manera integral.
- Se identificaron siete problemas principales, entre los cuales se encuentra la interrupción de actividades normales por motivo de manifestaciones en la Universidad, la incertidumbre de contar con financiamiento para proyectos de investigación, la necesidad de capacitar a los miembros del equipo de investigación y el mantenimiento y orden del Laboratorio. Algunos de estos problemas pueden ser resueltos en el corto plazo, pero algunos están fuera del alcance de los miembros del Laboratorio y representan amenazas. Sin embargo, las fortalezas del Laboratorio y las oportunidades que se ven al alcance son de gran importancia para el desarrollo de estrategias para solucionar los problemas y para el desarrollo del Laboratorio, por lo que la realización de actividades basadas en las alternativas de solución son recomendables.
- Se recomienda que se continúe con la investigación relacionada al desarrollo de materiales resistentes a geminivirus, debido a que se han obtenido resultados positivos en cuanto a líneas de mejoramiento y algunos híbridos con buen rendimiento y buena calidad, lo cual ha tenido un efecto positivo sobre la producción de tomate en la región.

## 1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONCYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, GT). 2009. Cómo está organizado el SINCYT? (en línea). Guatemala. Consultado 2 mayo 2009. Disponible en: [http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47&Itemid=81](http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=81)
2. \_\_\_\_\_. 2009a. FONACYT (en línea). Guatemala. Consultado 2 mayo 2009. Disponible en: [http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com\\_content&view=category&id=39&Itemid=72](http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com_content&view=category&id=39&Itemid=72)
3. Instituto Politécnico Nacional, MX. 2002. Metodología para análisis de FODA (en línea). México. Consultado 10 feb 2008. Disponible en: [http://uventas.com/ebooks/Analisis\\_Foda.pdf](http://uventas.com/ebooks/Analisis_Foda.pdf)
4. López, V. 2006. Guía para la elaboración del plan de diagnóstico en el ejercicio profesional supervisado, Facultad de Agronomía (en línea). Guatemala, USAC, Consultado 10 feb 2008. Disponible en: [http://cete.iespana.es/pub/plan\\_diagnostico\\_eps.pdf](http://cete.iespana.es/pub/plan_diagnostico_eps.pdf)
5. Mejía, L. 2006. Híbridos resistentes a virosis transmitida por mosca blanca y a otros patógenos de importancia económica para la producción sostenible del tomate en Guatemala: AGROCYT 002-2002: informe final. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 43 p.
6. Mejía, L; Montes, LR; García, BE; Tení, R; Maxwell, DP. 2007. Solicitud de apoyo financiero: línea FODECYT: presentación de proyecto: evaluar la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 24 p. (no publicado).
7. Mejía, L; Palmieri, M; Saenz, S; Teni, R; Matheu, L; Ordóñez, N. 1998. Evaluación de genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para la resistencia a virus géminis-transmitidos por mosca blanca y su detección por PCR: proyecto FODECYT no. 48: informe final. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 52 p.
8. Mejía, L; Teni, RE; Ordóñez, ME. 2001. Mejoramiento genético de tomate para resistencia a virus géminis transmitidos por mosca blanca y su detección por hibridación de ácidos nucleicos: proyecto FODECYT 83-99: informe final. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 42 p.
9. Mejía, L; Ueno, A; Sánchez, A; Tení, R; Ordóñez, M. 2003. Resistencia genética para la producción sostenible del tomate: producción de híbridos tolerantes a virosis transmitida por mosca blanca y su evaluación agronómica y molecular: informe final: proyecto FODECYT 11-00. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 51 p.

10. Pérez, N. 2005. Análisis FODA para los distintos tipos de concursos de obra vigentes en Puebla (en línea). Tesis Ing. Civil. México, Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Civil. Consultado 12 feb 2008. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx:9090/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lic/perez\\_t\\_n/capitulo5.pdf](http://catarina.udlap.mx:9090/u_dl_a/tales/documentos/lic/perez_t_n/capitulo5.pdf)
11. Quigley, J. 1996. Visión: cómo la desarrollan los líderes, la comparten y la sustentan: FODA: un método de análisis de situación (en línea). Colombia, Mc Graw Hill. Consultado 10 feb 2008. Disponible en: <http://idea.ulat.ac.pa/archivos/FODA1.doc>

## CAPÍTULO II

**DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR, BASADO EN LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PARA LA DETECCIÓN DEL GEN *I-3* DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ VASCULAR EN EL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), CAUSADA POR *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* RAZA 3**

**DEVELOPMENT OF A PCR BASED MOLECULAR MARKER FOR THE DETECTION OF THE *I-3* RESISTANCE GENE TO VASCULAR WILT OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.), CAUSED BY *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* RACE 3**



## GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS

Ácido desoxirribonucleico (ADN): material del que están compuestos los genes y lleva la información genética (Gardner et al., 2000).

Cebador: pequeña secuencia de ADN, diseñada para alinearse a una secuencia de ADN molde en los extremos de la región a ser amplificada por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (Nakhla, 2004).

Centimorgan (cM): medida de distancia en mapas genéticos que se basa en el número promedio de eventos de entrecruzamiento que tienen lugar durante la meiosis; un intervalo de 1 cM implica que sólo una de cada 100 cromátides recobradas de la meiosis experimentará un evento de entrecruzamiento en ese intervalo (Gardner et al., 2000).

Clon: una cepa de un organismo que lleva una secuencia de ADN particular (Gardner et al., 2000).

Cromosoma: estructuras filamentosas en la que se asocia el material hereditario de las células y los virus (Watson, 1978); cuerpo de nucleoproteína que se tiñe de modo intenso y se observa en las células durante la división. Cada cromosoma lleva un arreglo lineal de genes (Gardner et al., 2000).

Enzima de restricción: enzima que reconoce una secuencia corta específica de ADN y rompe la molécula en ese sitio (Gardner et al., 2000).

Exón: segmento eucariótico que corresponde a la secuencia del producto de transcripción del ARN final (Gardner et al., 2000).

Fenotipo: la expresión visible de una característica (Gardner et al., 2000); es el producto del genotipo de un organismo y su interacción con el medio (Watson, 1978).

Gen: unidad de herencia (ADN) que se localiza en un lugar fijo del cromosoma; determinante hereditario de una función biológica precisa (Gardner et *al.*, 2000).

Genotipo: constitución genética de un organismo (Watson, 1978).

Heterocigoto: individuo que porta dos alelos distintos de un gen (Gardner et *at.*, 2000).

Hibridación: cruzamiento de especies, razas, variedades, etc. en plantas o animales; proceso de formación de híbridos por polinización cruzada de plantas o por apareamiento en animales (Gardner et *al.*, 2000).

Híbrido: descendiente de progenitores homocigotos, que difieren en uno o más genes (Gardner et *al.*, 2000); individuo de generación F1 cuya constitución genética se deriva de dos líneas que han sido cruzadas por métodos clásicos para transferir genes de una variedad o especie a otra (Watson et *al.*, 1986).

Homocigoto: individuo que porta dos unidades del mismo alelo de un gen (Gardner et *al.*, 2000).

Indel: inserción o delección de uno o muchos pares de bases por otros en una secuencia de ADN (Watson et *al.*, 1986).

Introgresión: la incorporación de genes de un conjunto de poblaciones diferenciadas a otro; incorporación de germoplasma de una especie en otra por medio de retrocruzas de híbridos a las especies parentales (Reiseberg et *al.*, 1993).

Intrón: secuencia de bases del ADN interpuesta dentro de genes eucarióticos y que no está representada en el producto de transcripción maduro del ARN porque es eliminada por corte y empalme del producto de transcripción primario del ARN (Gardner et *al.*, 2000).

Línea pura: conjunto de un individuos producidos por reproducción sexual de un individuo homocigoto para todos los caracteres (Cubero, 2003).

Marcador codominante: marcador que detecta todos los alelos de un gen (Cañón, 2002).

Marcador molecular: secuencia de ADN identificada dentro del genoma de un organismo; señala el locus que controla una diferencia fenotípica o marca un locus próximo que controla algún carácter de interés (Guimarães et al., 2007; Nuez et al., 2000).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP): polimorfismo producido por un cambio nucleotídico único (Cañón, 2002).

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es de gran importancia económica en Guatemala, ya que es fuente de empleo y subsistencia, contribuyendo a una dieta más nutritiva. Además, tiene una alta demanda en el mercado nacional y, más recientemente, el mercado internacional. Sin embargo, enfermedades causadas por distintos patógenos, entre ellos el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, han provocado pérdidas parciales y, en algunos casos, totales del volumen de producción. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causa la marchitez vascular del tomate y se le considera de importancia económica en Centroamérica y México. El uso excesivo de fungicidas para el manejo del hongo ha producido su diversificación y crecimiento poblacional en los suelos cultivables. Esto también causa un considerable efecto negativo al ambiente.

Por estas razones, es importante desarrollar técnicas efectivas para el manejo integrado de estos organismos. Una alternativa para el control de las poblaciones del patógeno es el uso de materiales resistentes a enfermedades, los cuales pueden contribuir a la disminución de las pérdidas en los rendimientos de los cultivos y controlar las poblaciones de los organismos patogénicos.

En Guatemala, se han desarrollado programas de mejoramiento de tomate, en los cuales se utilizan marcadores moleculares para la detección de algunos genes asociados a la resistencia a distintas enfermedades para la obtención de líneas e híbridos comerciales, resistentes a las enfermedades causadas por estos patógenos. Gracias a estas investigaciones, se cuenta con líneas de tomate que contienen los genes de resistencia a Begomovirus, *Meloidogyne* sp., *Ralstonia solanacearum* y a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

En la investigación se desarrollaron dos marcadores moleculares para la detección del gen *I-3*, el cual confiere resistencia genética a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. El marcador CAPS P7-43BF1/R1 fue evaluado para la detección de los distintos genotipos y se determinó que es eficiente para hacer distinción entre ellos. Sin embargo, el marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1 fue aún más eficiente, habiendo sido evaluado en cultivares, líneas e híbridos de genotipo conocido y para los cuales se detectó la presencia o ausencia de la introgresión correspondiente al gen *I-3*. Además, con el apoyo del Dr. David Jones, se analizó la secuencia de los fragmentos de PCR producidos por el marcador y se determinó que el marcador se encuentra a una distancia de aproximadamente 1 cM de la región del gen *I-3*, por lo que puede ser utilizado en programas de mejoramiento de tomate para selección de materiales resistentes.

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Marco Conceptual

#### A. Origen de la resistencia a enfermedades en plantas

La resistencia a enfermedades depende, en su origen, de las mutaciones que se han conservado en una población o acumulado en ella y que representan la diferencia entre que una planta muera sin llegar a la reproducción o que se reproduzca mejor que las demás. Una mutación es un cambio repentino y hereditario en la secuencia de ADN de un organismo; sin ella, no existiría la variabilidad genética (Gardner *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 1986). Los cambios en la secuencia pueden ser provocados por la sustitución, inserción o deleción de uno o muchos pares de bases por otros (Figura 2-1; Watson *et al.*, 1986). En ocasiones no es posible determinar si una mutación es debida a una inserción o deleción, por lo que este tipo de variación es conocida como indel.

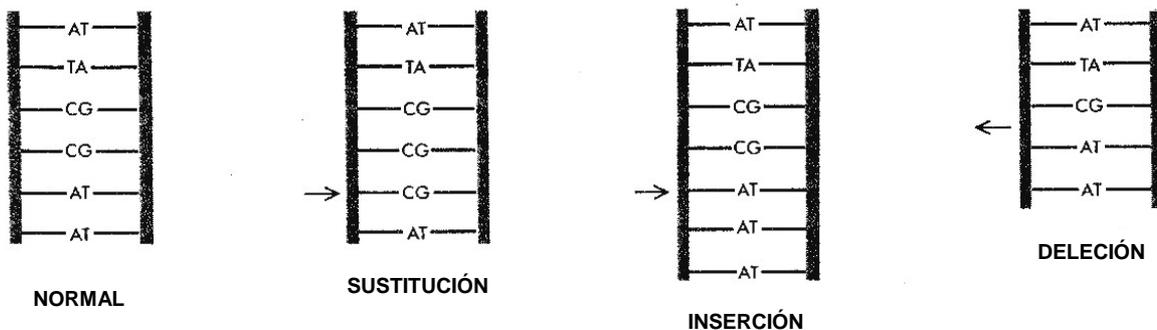


Figura 2-1. Diagrama de los tres mecanismos de mutación. La sustitución consiste en el cambio de un par de bases por otro. La inserción es la introducción de uno o muchos pares de bases. La deleción es la eliminación de uno o muchos pares de bases (Watson *et al.*, 1986).

La variabilidad ya existe en poblaciones de plantas que se reproducen sexualmente y en forma alogámica (Bauer, 1973). Esto sucede por hibridación natural. Sin embargo,

también es posible realizar hibridación entre individuos de la misma especie o entre individuos de distintas especies. La hibridación tiene consecuencias como el incremento en la diversidad genética, la transferencia y el origen de adaptaciones, el origen de ecotipos o especies, la irrupción o el refuerzo de las barreras de aislamiento poblacional, entre otras. La incorporación de genes de un conjunto de poblaciones diferenciadas a otro se conoce como introgresión. En el fitomejoramiento, el término introgresión se refiere a la incorporación de germoplasma de una especie en otra a través de realizar repetidas retrocruzas de los híbridos a las especies parentales (Reiseberg et al., 1993).

Cuando la resistencia entre variedades de plantas cultivadas no se encuentra, se puede buscar entre las poblaciones silvestres de la misma especie o en aquellas filogenéticamente cercanas a la que se cultiva. En estas poblaciones, la planta que no resiste a una enfermedad deja de reproducirse o disminuye su capacidad para hacerlo, mientras que una planta que resistente a una enfermedad, se reproduce normalmente. Al mismo tiempo, el organismo patógeno necesita al huésped para sobrevivir, por lo que si éste muriese antes de que el patógeno llegara a su etapa de reproducción, ambos dejarían de existir. Es por esto que bajo condiciones naturales se requiere la coexistencia del huésped y el patógeno, lo cual conduce a que se desarrollen algunos individuos resistentes o tolerantes a la enfermedad (Bauer, 1973).

Por lo tanto, la resistencia a las enfermedades producidas por organismos patógenos debe buscarse en los lugares en los que la especie cultivada coexiste con el patógeno, o bien entre las especies filogenéticamente cercanas a la cultivada que también conviven con el patógeno (Bauer, 1973). La marchitez vascular es una enfermedad del tomate cultivado, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La resistencia a esta enfermedad se ha encontrado en la especie silvestre *Solanum pennellii* (Scott et al., 1989).

## **B. Marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 y su importancia**

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Zinder & H.N. es una de las enfermedades de gran importancia económica y propagación en el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.). El perfil virulento de muestras aisladas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se ha agrupado en tres diferentes razas de acuerdo a su habilidad para infectar distintos cultivares de tomate, portadores de genes de resistencia específicos.

Los síntomas de la marchitez vascular inician con una leve clorosis en las hojas más jóvenes. Luego, las hojas basales muestran epinastia y se marchitan. Usualmente, se observa amarillamiento hasta que la planta muere, antes de llegar a la etapa de madurez, pero también puede ocurrir achaparramiento, formación de raíces adventicias, marchitez de tallos jóvenes, defoliación y necrosis marginal de las hojas restantes. Al realizar un corte transversal del tallo, se pueden observar franjas oscuras, de color café, que corren de manera longitudinal por el tallo, por lo que la infección está directamente relacionada con el sistema vascular de la planta. El avance ascendente de la decoloración depende de la severidad de la enfermedad (Agrios, 2005; Miller et al., 1996). Las condiciones de mayor propagación del hongo son de alta humedad y alta temperatura (Momol et al., 2004).

La interacción entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el tomate es específica. Se han identificado las tres razas en especies silvestres de tomate (Bohn y Tucker, 1939<sup>1</sup>; Alexander y Tucker, 1945<sup>1</sup>; Volin y Jones, 1982; Grattidge y O'Brien, 1982). La resistencia a este tipo de enfermedades específicas de raza está determinada por genes dominantes o codominantes, relacionados al reconocimiento de genes de avirulencia de patógenos y la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Ellis et al., 2000<sup>1</sup>; Dangl y Jones, 2001<sup>1</sup>; Hoorn et al., 2002<sup>1</sup>).

---

<sup>1</sup> Citado por Hemming et al., 2004.

**C. *Solanum pennellii* y su relación con el tomate cultivado *Solanum lycopersicum***

La descripción botánica de *Solanum pennellii* Correll se encuentra en la sección de Apéndices. En la Figura 2-2 se puede observar la comparación visual de frutos de *Solanum lycopersicum* y *Solanum pennellii*.

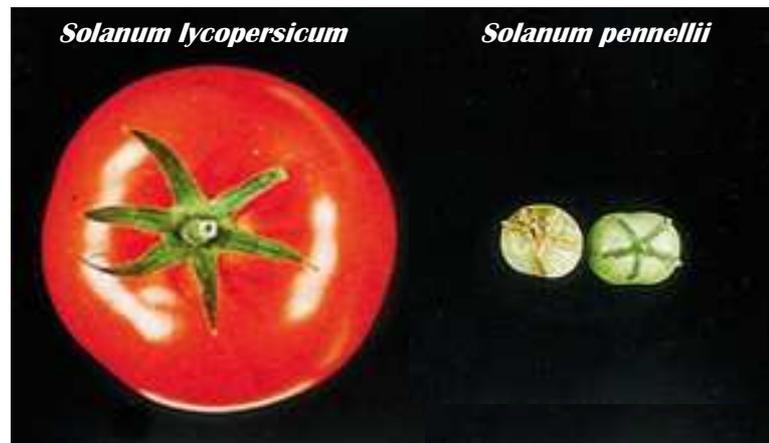


Figura 2-2. Comparación visual de frutos de *Solanum lycopersicum* y *Solanum pennellii* (modif. de Vidavski, F. 2002. Universidad Hebrea de Jerusalén, Israel).

*Solanum pennellii* se encuentra desde el norte de Perú (Piura) hasta el norte de Chile (Tarapaca) en montañas rocosas y áreas arenosas desde 0 hasta los 3,000 msnm (Peralta, 2007).

La sintenia, conservación del contenido de genes y de su orden en los cromosomas de diferentes genomas de plantas (Pérez-Almeida, 2005), y similitudes del tamaño genómico y la estructura entre *Solanum pennellii* y *Solanum lycopersicum* son extraordinarias (Zamir, 2007). Se estima que *S. pennellii* tiene un tamaño genómico de aproximadamente 1,200 Mb<sup>1</sup>, similar al de *S. lycopersicum* que es de aproximadamente

<sup>1</sup> 1 Mb=1,000 kpb; 1 kpb=1,000 pb; pb=pares de bases nitrogenadas.

950 Mb (Arumuganathan, 1991<sup>1</sup>). Ambas especies tienen 12 cromosomas (Rick, 1969<sup>1</sup>; Peralta, 2007), mas el nivel de variación de nucleótidos, o polimorfismo interespecífico es alto, desde 1-3% hasta 5-10% en intrones y regiones intergénicas (Eshed et al., 1995<sup>1</sup>).

#### **D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Creada por Kary Mullis en 1983, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, es ampliamente utilizada en biología molecular y consiste en producir copias de una región específica del ácido desoxirribonucleico, ADN, de un organismo (Mullis, 1990).

En 1995, Arthur Kornberg y su equipo de trabajo de la Universidad de Stanford descubrieron la ADN polimerasa. Esta enzima celular desempeña varias funciones, entre ellas, la replicación de ADN por medio de la adición de nucleótidos al extremo 3' de una cadena de ADN, teniendo una segunda cadena complementaria como molde (Mullis, 1990). A través de los años, la técnica de PCR ha sido simplificada y los resultados han sido uniformizados debido a un evento importante: el aislamiento de ADN polimerasa estable ante cambios de temperatura, la *Taq* polimerasa, a partir de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976).

Para la reacción de PCR se requiere de varios componentes:

- Fuente de nucleótidos (dNTPs): los nucleótidos consisten en un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos (pentosa) y un compuesto cíclico nitrogenado denominado base. Hay cuatro bases diferentes, adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G). Los nucleótidos son las unidades básicas de la molécula de ADN (Gardner et al., 2000).

---

<sup>1</sup> Citado por Zamir, 2007.

- ADN polimerasa: puede soportar altas temperaturas (*Taq* polimerasa). Cataliza la adición covalente de nucleótidos a la cadena simple de ADN. La enzima es activa únicamente en presencia de iones de  $Mg^{2+}$  y de ADN preexistente, el cual debe servir como iniciador o cebador y como molde (Gardner et al., 2000).
- Cebadores de ADN (delantero y reversa): son pequeñas secuencias de ADN, usualmente de 18 a 24 nucleótidos de longitud, diseñados para alinearse a una secuencia de ADN molde en los extremos de la región a ser amplificada (Nakhla, 2004). La ADN polimerasa reacciona sobre el extremo 3' de esta molécula, añadiendo los nucleótidos complementarios al ADN molde (Gardner et al., 2000).
- ADN molde: puede ser monocatenario (una hebra) o bicatenario (dos hebras); aislado de un organismo. Normalmente, existen varios miles de copias de ADN en la mezcla de reacción del PCR (Nakhla, 2004).
- Iones de magnesio: la *Taq* polimerasa necesita cationes divalentes para su actividad. La concentración molar de  $Mg^{2+}$  debe exceder la concentración de los dNTPs y de los cebadores, ya que éstos también capturan los iones y debe quedar disponibilidad del catión para la polimerasa (Nakhla, 2004).
- Amortiguador: sirve para establecer las condiciones de pH correctas para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Generalmente, el amortiguador mantiene un rango de pH de 8.3 a 8.8 a temperatura ambiente y baja a aproximadamente 7.2 al ser incubado a 72°C (Nakhla, 2004).

El procedimiento de PCR consiste en tres pasos que conforman un ciclo de copiado. Cada paso permite que la temperatura de la mezcla cambie para optimizar la reacción. Los ciclos se repiten cuantas veces sea necesario hasta obtener la cantidad de ADN deseada (Figura 2-1A). A continuación se describen los pasos de cada ciclo de PCR (Iowa State University, 2005).

### PASO 1: Desnaturalización

Se eleva la temperatura de la mezcla hasta  $\pm 95^{\circ}\text{C}$ , provocando la ruptura de los enlaces de hidrógeno existentes entre las bases complementarias del ADN bicatenario. Esto permite la separación de las dos hebras de ADN.

### PASO 2: Alineamiento o Hibridación

La temperatura se disminuye hasta  $\pm 58^{\circ}\text{C}$ , para que los cebadores se unan a la secuencia complementaria en la hebra molde de ADN, formando enlaces hidrógeno entre las bases.

### PASO 3: Síntesis de ADN o Extensión

La temperatura se eleva de nuevo, hasta  $\pm 72^{\circ}\text{C}$ , para que la ADN polimerasa incorpore nucleótidos a la nueva copia de ADN. Se unirán bases a la hebra molde hasta que se llegue al final de la región que debe ser copiada.

## **E. Diseño de cebadores**

Los cebadores de ADN son diseñados para alinearse en los extremos de hebras opuestas del ADN molde, en la región a ser amplificada (Nakhla, 2004; Iowa State University, 2005). De esta manera, ambas hebras son sintetizadas al mismo tiempo, de tal modo que los nucleótidos adenina (A) y timina (T) se alinean y citosina (C) y guanina (G) también lo hacen. Debido a que la mezcla de reacción contiene cebadores complementarios a ambas hebras de ADN, los productos de la síntesis de ADN pueden ser copiados (Iowa State University, 2005). En el diseño de cebadores, deben considerarse varios factores (Nakhla, 2004):

- Longitud: un cebador largo es más específico. Sin embargo, el ADN de muchos organismos tiene regiones con secuencias repetitivas y si se diseña un cebador en una de estas regiones, pierde su especificidad. Los cebadores deben alinearse únicamente a la secuencia de interés y no a sitios múltiples. Generalmente, un cebador de 18 a 24 nucleótidos es suficientemente largo para alinearse específicamente en una región particular del ADN (Nakhla, 2004).
- ADN molde: si la región de interés del ADN molde es repetitiva o se alinea consigo misma (auto-complementariedad), es difícil amplificar el ADN luego de la desnaturalización (Nakhla, 2004).
- Auto-complementariedad: los cebadores no deben ser auto-complementarios para que no se alineen con ellos mismos en lugar de alinearse al ADN molde. Asimismo, el cebador delantero no debe ser complementario al cebador reversa (Nakhla, 2004).
- Extremo 3' del cebador: es crucial para la especificidad, debe finalizar con C o G, teniendo cuidado de que no termine en CG o GC en el extremo 5' para evitar la auto-complementariedad. El extremo 5' no tiene que ser complementario a la secuencia de ADN molde (Nakhla, 2004).
- Contenido de C y G: estos nucleótidos se acoplan entre sí por tres enlaces de hidrógeno, a diferencia de A y T que lo hacen por dos enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, los enlaces C-G son más fuertes y el porcentaje de estos nucleótidos en la secuencia de un cebador afectará su alineamiento con el ADN molde. Los cebadores deben contener entre 40 y 60% de C o G (Nakhla, 2004).

- Temperatura de alineamiento (hibridación): debe ser mayor a la temperatura de alineamiento y no mayor a 85°C. Además, debe ser dentro de 3°C entre el cebador delantero y el cebador reversa (Nakhla, 2004).

La longitud del ADN molde está determinada por la posición relativa de ambos cebadores a la región de interés. Debido a que la replicación inicia desde los cebadores, las nuevas hebras de ADN incluyen la secuencia de los cebadores. Esto permite que hayan secuencias en las nuevas hebras sobre las cuales los cebadores se pueden alinear para continuar la amplificación (Iowa State University, 2004).

## **F. Electroforesis en gel de agarosa**

El término electroforesis se refiere al movimiento de partículas cargadas, bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar estas moléculas son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa (Padilla, 2006).

La agarosa es un polisacárido natural purificado de algas, cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2%) en cierto volumen de un amortiguador específico poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50°C y formar un gel semisólido al enfriarse. La estructura tridimensional del gel de agarosa se sostiene por enlaces de hidrógeno. Debido a que no existen enlaces covalentes en esta estructura, el gel puede ser roto por calentamiento (National Diagnostics, 2005; Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2008).

Normalmente, los geles de agarosa se colocan en un aparato horizontal, denominado cámara de electroforesis, el cual constituye un sistema eléctrico-termodinámico. Consiste en una caja dividida en dos compartimentos por medio de una plataforma en el centro (Figura 2-3). El gel se coloca sobre la plataforma y se agrega

amortiguador con pH alrededor de 8. La cámara posee electrodos en cada compartimento. El aparato recibe energía de una fuente de poder y libera energía en forma de calor. Las moléculas de ADN son sometidas a electroforesis y se desplazan al polo positivo, ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa (National Diagnostics, 2005; Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2008; Padilla, 2006).

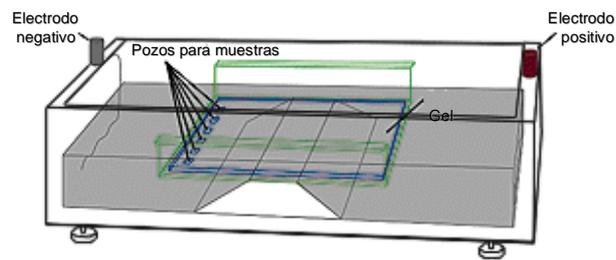


Figura 2-3. Esquema de una cámara horizontal de electroforesis en gel (National Diagnostics, 2005).

La matriz de electroforesis (gel de agarosa) fuerza las moléculas o fragmentos de moléculas de ADN a separarse por tamaño conforme se mueven a través de la estructura porosa. La matriz provee mayor resistencia al movimiento de moléculas más grandes (Figura 2-4). Además, cumple funciones adicionales, incluyendo la reducción de corrientes de convección y la inhibición de la difusión de las muestras, lo cual permite que las moléculas permanezcan como bandas distintivas e intensas. La matriz también sirve como medio sólido en el cual se fijan las muestras y pueden ser detectadas en el análisis posterior a la electroforesis (National Diagnostics, 2005).

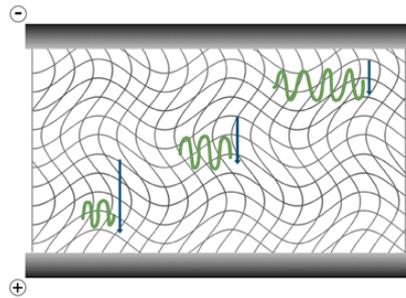


Figura 2-4. Separación de moléculas de ADN por tamaño en gel de agarosa. A pesar de que las moléculas más grandes se exponen a fuerzas eléctricas mayores, estas moléculas más grandes encuentran resistencia friccional opuesta al movilizarse dentro del gel, lo cual resulta en un menor desplazamiento (National Diagnostics, 2005).

Después de la electroforesis, se sumerge el gel de agarosa en bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases de ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Se visualiza el gel con una lámpara de luz ultravioleta, para ver las bandas correspondientes a las muestras de ADN amplificado (Padilla, 2006).

## G. Secuenciación de ADN

El propósito de la secuenciación de ADN es determinar el orden de los cuatro nucleótidos (A, G, C y T) que conforman el código genético en una muestra de ADN. Actualmente, el método de secuenciación de ADN más utilizado se basa en el método desarrollado por Frederik Sanger en 1977. Este método consiste en la secuenciación directa por medio del uso de didesoxirribunucleótidos (ddNTPs - ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) marcados fluorescentemente. Estos ddNTPs se adicionan junto con los dNTPs en una mezcla de reacción de PCR. Los ddNTPs se diferencian de los dNTPs en que llevan un ión de hidrógeno enlazado en el átomo de carbono 3', en lugar de un grupo hidroxilo (Figura 2-5). Esto lleva a la terminación de la reacción de síntesis de ADN, por lo que a esta técnica también se le conoce como el método de terminación de cadena (Ban, 2006).

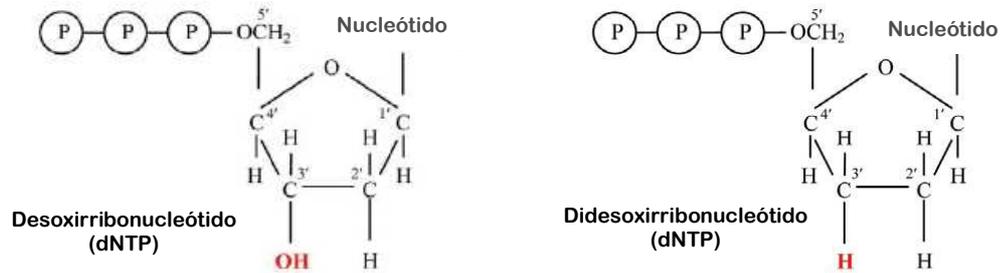


Figura 2-5. Fórmula molecular para un desoxirribonucleótidotrifosfato (dNTP) y para un didesoxirribonucleótidotrifosfato (ddNTP). El ddNTP tiene un átomo de hidrógeno en el carbono 3', por lo que al adicionarse el ddNTP a la hebra de ADN, la extensión termina y no puede adicionarse otro nucleótido debido a la ausencia de -OH en el carbono 3' (Ban, 2006).

El primer paso para la secuenciación es la desnaturalización para producir ADN monocatenario. Luego, la reacción se enfría para permitir que el cebador de secuenciación se alinee al ADN molde y se lleve a cabo la extensión por medio de la ADN polimerasa. La extensión ocurre de manera normal hasta que la ADN polimerasa incorpora a azar un ddNTP. Por esta razón, se adiciona una cantidad excesiva de los cuatro dNTPs y cantidades limitadas de ddNTPs. Es así como millones de copias de ADN se generan y se incorporan al azar los ddNTPs, completándose la reacción con la obtención de millones de hebras de distintos tamaños (Ban, 2006).

La secuencia de ADN se determina por medio de la separación de fragmentos según su tamaño (cada fragmento tendrá un nucleótido más de longitud que el anterior) y se determina qué ddNTP fue incorporado por último en el fragmento. La detección y lectura de la secuencia se realiza en un secuenciador capilar automático (electroforesis automática; Figura 2-6), en el cual se cargan las muestras de ADN para ser separadas por tamaño. Se hace uso de un láser para detectar la fluorescencia específica de cada ddNTP mientras el ADN migra al extremo del capilar. Luego se aplica un programa de secuenciación que analiza la salida del secuenciador y construye un cromatograma de la secuencia de ADN (Ban, 2006).

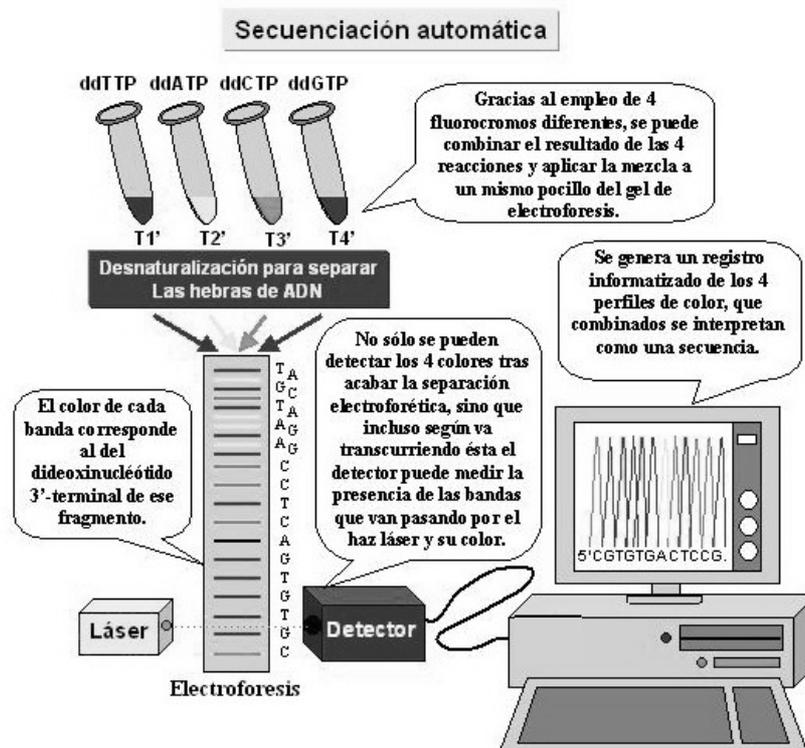


Figura 2-6. Esquema de secuenciación automática de ADN por el método de terminación de cadena (Peña, 2002).

## H. Generalidades sobre la selección asistida por marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN identificadas dentro del genoma de un organismo, que señalan el locus que controla una diferencia fenotípica o marcan un locus próximo que controle algún carácter de interés (Guimarães et al., 2007; Nuez et al., 2000). El uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de plantas por selección cumple con tres objetivos: a) detectar la introgresión, b) desarrollar líneas puras y c) mejorar caracteres cuantitativos (Nuez et al., 2000).

La selección asistida por marcadores moleculares ofrece algunas ventajas. Entre ellas está el elevado grado de polimorfismo que los marcadores ponen de manifiesto y su amplia distribución en el genoma, lo que permite disponer de un gran número de

marcadores adyacentes al gen de interés, aumentando la eficiencia de la selección. Además, los marcadores moleculares se consideran independientes de las condiciones ambientales, lo que da un mayor grado de seguridad a la selección. Por otro lado, para obtener marcadores se requieren cantidades pequeñas de ADN y técnicas de análisis sencillas. No dependen del estado de desarrollo de las plantas, por lo que se disminuye el tiempo necesario para identificar genotipos de interés. Por último, ofrecen la posibilidad de manejar poblaciones grandes para el mejoramiento en un espacio reducido, lo cual facilita la selección de individuos portadores de caracteres cuantitativos complejos (Capel et al., 2000).

La selección asistida por marcadores moleculares se basa en el concepto de ligamiento genético. Dos loci se consideran ligados cuando se encuentran ubicados relativamente cerca en el mismo cromosoma y no segregan de modo independiente. De esta forma, la transmisión a la descendencia es conjunta. En este tipo de selección es necesario considerar algunos aspectos. Primero, un buen marcador molecular se encuentra ligado a una distancia menor de 5 cM del carácter que se desea seleccionar. A distancias superiores se corre el riesgo de perder el carácter seleccionado debido a la recombinación (Capel et al., 2000).

Segundo, la utilidad del marcador molecular está dada por su modo de herencia, siendo los marcadores más útiles aquellos de naturaleza codominante, ya que permiten discernir entre diversos alelos de un locus, o bien los heterocigotos de los homocigotos. Cuando el marcador no es codominante, su utilidad está limitada a un alelo del gen de interés. Tercero, se debe considerar el tipo de marcador que se utilizará. Debe ser metodológicamente sencillo de usar y repetitivo, detectado fácilmente por medio de la técnica de PCR, que pusiera de manifiesto fragmentos que puedan ser asignados a un alelo del gen al que se encuentra ligado. Finalmente, los marcadores moleculares no son universales, por lo que carecen de utilidad en materiales distintos a los descritos (Capel et al., 2000).

El estudio de marcadores moleculares ligados a genes de interés se ha realizado en varios cultivos, incluyendo el tomate (Foolad et al., 2004<sup>1</sup>). Esta técnica es de gran beneficio para analizar plantas cuando el patógeno causante de la enfermedad no puede ser introducido a la región en la cual se realizan las investigaciones. Por esta razón, es necesario asegurar que el ligamiento entre el marcador y el gen es fuerte, especialmente cuando se combinan distintas resistencias. El desarrollo de marcadores moleculares es intensivo, requiere de mucho tiempo y tiene costos elevados. Sin embargo, se cree que el mejoramiento de cultivos ha sido beneficiado por la selección asistida por marcadores moleculares y su demanda crecerá en el futuro (Scott, 2005).

## I. Tipos de marcadores moleculares

Los marcadores moleculares o marcadores de ADN pueden desarrollarse a partir de secuencias no conocidas o en base a secuencias de ADN conocidas (García-Mas et al., 2000). A continuación, se presenta una breve descripción de cuatro distintos tipos de marcadores moleculares.

RFLPs<sup>2</sup> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción): detectan polimorfismos producidos al digerir ADN con enzimas de restricción. Si dos alelos A y B se diferencian a nivel de secuencia de ADN, la digestión con dichas enzimas producirá fragmentos de ADN de diferente tamaño y pueden ser detectados con sondas específicas que hibriden con una parte de estos fragmentos de ADN. El polimorfismo se manifiesta por la longitud de los fragmentos detectados. Esto permite determinar claramente el genotipo y distinguir entre los genotipos heterocigoto y los homocigoto (García-Mas et al., 2000).

RAPDs<sup>1</sup> (Polimorfismos de ADN amplificados al azar): se obtienen por medio de la amplificación del ADN genómico, por la técnica de PCR. Esta técnica permite amplificar de manera aleatoria el genoma de un individuo en las regiones en las

---

<sup>1</sup> Citado por Scott, 2005.

<sup>2</sup> Por sus siglas en inglés.

que se alinean los cebadores con el ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. Generalmente, se encuentran varios lugares de amplificación en el genoma, ya que el cebador es corto y la temperatura de hibridación es muy baja (alrededor de 35°C). Los RAPDs se heredan de manera mendeliana y se tienden a producir marcadores dominantes (García-Mas et al., 2000).

SCARs<sup>1</sup> (Región amplificada caracterizada por una secuencia): marcadores desarrollados en base a una secuencia de ADN conocida, por lo que son más específicos y permiten la amplificación por PCR de una banda de interés. Detectan un único locus, la amplificación es menos sensible a las condiciones del PCR y es posible convertirlo a un marcador de tipo codominante (García-Mas et al., 2000).

CAPS<sup>1</sup> (Región polimórfica escindida amplificada): es un marcador ampliamente usado cuando la amplificación específica con otros marcadores no produce polimorfismos. Consiste en la digestión de los fragmentos amplificados con diversas enzimas de restricción hasta encontrar una que produzca un polimorfismo (García-Mas et al., 2000).

---

<sup>1</sup> Por sus siglas en inglés.

### 2.2.3. Marco Referencial

#### A. El gen *I-3* de resistencia a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 en el tomate

Se han caracterizado tres loci, presentes en el tomate, para la resistencia a la marchitez causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Reis et al., 2005). El locus *I*, proveniente de *L. pimpinellifolium* (Bohn et al., 1940<sup>1</sup>), controla la resistencia a la *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 (Reis et al., 2005). Luego se caracterizó otro locus (Alexander et al., 1945<sup>1</sup>), *I-2*, a partir de un híbrido entre *S. lycopersicum* y *L. pimpinellifolium* (Alexander et al., 1955<sup>1</sup>), que controla la resistencia a la raza 2. Una tercera raza se reportó por primera vez en Australia, causando síntomas típicos de marchitez vascular en un cultivar de tomate portador de los loci *I* e *I-2*. Se identificó un nuevo locus, llamado *I-3*, en la especie silvestre *S. pennellii* (Grattidge et al., 1982). Las razas 1 y 2 están distribuidas en todo el mundo, mientras que la raza 3 tiene una distribución geográfica más limitada (Reis et al., 2005). Hasta el momento, ha sido reportada en Australia (Grattidge et al., 1982), Estados Unidos (Jones et al., 1981; Volin et al., 1982<sup>1</sup>; Chellemi et al., 1992<sup>1</sup>; Davis et al., 1988), Nueva Zelanda, Reino Unido (Urban, 1994<sup>1</sup>), México (Valenzuela-Ureta et al., 1996) y Brasil (Reis et al., 2005). Esta nueva raza representa una amenaza para aquellos países en los que se ha reportado, ya que las condiciones para su control se desconocen, pudiendo propagarse y llegar a otras regiones (Reis et al., 2005).

La resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 fue descubierta en la accesión de *Solanum pennellii* LA716 (Scott et al., 1989). El locus *I-3* fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 7 del tomate (Figura 2-2A) y se determinó que el gen se encuentra en una región cromosómica comprendida entre los marcadores moleculares CT226 y TG572 (Hemming et al., 2004). La investigación realizada por Hemming et al. se basó en la información preexistente para desarrollar marcadores tipo SCAR y CAPS,

---

<sup>1</sup> Citado por Reis et al., 2005.

basados en la técnica de PCR para minimizar el tiempo y uso del equipo para la detección del gen. Lim et al. (2006) reportaron el uso del marcador CAPS CT226 para detectar el gen *I-3* en el mejoramiento de híbridos de tomate resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 en Australia.

## **B. Germoplasma**

Se utilizaron los cultivares M82-1-8 (H.Czosnek, Universidad Hebrea de Jerusalén) y Purple Russian (Seed Savers Exchange, Decorah, Iowa) como homocigotos susceptibles (*i-3/i-3*). L40, una planta F2 proveniente del híbrido Llanero (resistente a Begomovirus, GenTropic Seeds, *i-3/i-3*) y una línea endogámica resistente a Begomovirus de la Universidad de San Carlos de Guatemala, GMh6330 (*i-3/i-3*), también fueron utilizadas como susceptibles. Tres líneas endogámicas, homocigotos para la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3, Fla7547 (J.W. Scott, Universidad de Florida), NC EBR-8 y NC123S (R. Gardner, Universidad Estatal de Carolina del Norte) fueron utilizadas como homocigotos resistentes (*I-3/I-3*). El híbrido F1 comercial Plum Crimson (Harris Moran), un tomate tipo Roma indeterminado, NC07196 (R. Gardner) y tres híbridos F1 experimentales (A, B y C) se utilizaron como heterocigotos (*I-3/i-3*). Tres híbridos comerciales, reportados como resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 por las compañías productoras de semillas, fueron evaluados, como también once líneas endogámicas e híbridos, reportados como portadores de la introgresión del gen *I-2*.

## **C. Laboratorios de Investigación**

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-8, Laboratorio B-12, Ciudad Universitaria, zona 12, Ciudad de Guatemala, Guatemala; y en el laboratorio del Dr. Douglas P. Maxwell en el Departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Wisconsin-Madison, 1630 Linden Drive, Madison, Wisconsin 53703, Estados Unidos de América.

## **2.3. OBJETIVOS**

### **2.3.1. Objetivo General**

Desarrollar un marcador molecular, basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, para la detección del gen *I-3* de resistencia a la marchitez vascular en el tomate, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

### **2.3.2. Objetivos específicos**

Diseñar marcadores CAPS y SCAR codominante para la detección de la introgresión del gen *I-3* en el tomate.

Evaluar marcadores CAPS y SCAR codominante en germoplasma homocigoto resistente y susceptible a la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

## 2.4. METODOLOGÍA

### 2.4.1. Diseño de cebadores

El mapeo del gen *I-3*, realizado por Hemming et al. (2004), indicó que el gen se encuentra en la región del cromosoma 7 comprendida entre los marcadores moleculares TG183 (42 cM) y TG639 (43.3 cM). En esta región se encuentran 19 marcadores moleculares, cuyas secuencias de los fragmentos amplificados se utilizaron para buscar secuencias homólogas en la base de datos GenBank<sup>1</sup>. A partir de una secuencia genómica de una especie distinta al tomate, se diseñaron cebadores sobre secuencias conservadas en los exones, de tal manera que se amplificara una región genómica que incluyera al menos un intrón (ver ejemplo en Apéndice), debido a que los intrones son muy variables en sus secuencias, con diferencias en tamaño desde uno cuantos pares de nucleótidos hasta miles de pares de nucleótidos de longitud (Gardner et al., 2000), por lo que se podrían detectar polimorfismos entre los materiales resistentes y susceptibles. Finalmente, se solicitó la síntesis de los cebadores en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison y se evaluó su efectividad para detectar polimorfismos por medio de la técnica de PCR y secuenciación. El Cuadro 2-1 muestra los cebadores diseñados y evaluados.

### 2.4.2. Protocolo de PCR, electroforesis y secuenciación

Se extrajo ADN de tejido foliar fresco de plantas, utilizando el Kit de Extracción *MasterPure™ Plant Leaf DNA Purification Kit* (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison WI). Se ajustó la concentración del ADN a 15 ng/μL. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 ml, en volumen de 25 μl, lo cual consistió en una mezcla de 2.5 μl 2.5 mM dNTPs, 5μl 10X buffer, 2.5 μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1

---

<sup>1</sup> GenBank, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

$\mu\text{l}$  *Taq* ADN polimerasa (Promega Corp., Madison WI), 2.5  $\mu\text{l}$  de cada cebador delantero y reversa a 10 pM, 2.5  $\mu\text{l}$  de 15 ng/ $\mu\text{l}$  del extracto de ADN y H<sub>2</sub>O.

Los parámetros de PCR fueron los siguientes: desnaturalización a 94°C por 3 min, luego 35 ciclos a 94°C por 30 s, alineamiento a 53°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, seguido de 72°C por 10 min; luego se preservó la reacción a 4°C. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *MJ DNA Engine PT200 Thermocycler™* (MJ Research Inc., Waltham MA).

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en agarosa al 1.5% ó 2.0% en buffer TBE a 0.5X. Luego se realizó la tinción con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Cuadro 2-1. Cebadores diseñados para detección del gen I-3, secuencias, marcador utilizado, posición en cromosoma 7.

Nombre cebador	Secuencia cebador	Marcador de diseño	Posición cromosoma
P7-42F1	CAGCGAATCACAGTTTAGTCAAGTTCTG	cTOS-18-H13	42.00
P7-42R1	CAATCATCCCCGCATGTGCACACA	cTOS-18-H13	42.00
P7-42R2	CGAAACCAATCTCATCAAGCAATAC	cTOS-18-H13	42.00
PTG183F1	CTACTTGTCTGCCAAGGATTA	TG183	42.00
PTG183R2	CGTGCCGTTCAAGAAGAGTG	TG183	42.00
P7-42.5F1	GGCATAAGTATCCAGATTCTCTATTGG	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F2	GCTGCTTGTTACTAGTGTTATGGTTGC	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F3	CATAGATTTAATGTCAATTTAAGAAGTGCTG	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F4	CAATCATTAAATTGCTTTTTRTATTCTTRTTAC	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F5	ATATTWAGTGTGAATTCATATAG	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F6	CATCKAAGSGTAWAATAACTACCCTTG	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5F7	CCTTTTGTAGAACTACACAAGG	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5R1	CTAACAAGAAAAGTAGCTCCAACTCC	C2_At3g21870	42.50
P7-42.5R2	GCTCAACATTTCCCTCTCCAATACTG	C2_At3g21870	42.50
P7-43F1	AGGGGTTTATGCTGAGACGGATTTCAAAGAAG	C2_At3g21820	43.00
P7-43F2	GTGCCCAACATCCTTCAAATAAG	C2_At3g21820	43.00
P7-43R1	TTTTGAAGGGCTAGAAGAACATTCTCC	C2_At3g21820	43.00
P7-43R2	GAACAATGACTCGACCACATCCTTA	C2_At3g21820	43.00
P7-43AF1	GACTTCAACTCATATGGTAGCCGTCGTGG	T1329	43.00
P7-43AF2	GGTACTTTCGCCAATATCCGCCCTTGT	T1329	43.00
P7-43AR1	GGAAGATCAATGGTATAGCGCTCTTG	T1329	43.00
P7-43AR2	GTCAATCCAAGTGATCTGCATCCTC	T1329	43.00
P7-43BF1	CAGTCATTATTAACAAATTTTCAAGGATCG	C2_At2g20830	43.00
P7-43BR1	TCTGAGCAATACGTCTAGCAGC	C2_At2g20830	43.00
P7-43CF1	GGTTCCTGTGACCTAGTTATTG	T1329	43.00
P7-43CF2	GGTGTCGGAGGTATTGAGGCAGAAG	T1329	43.00

Cont. Cuadro 2-1. Cebadores diseñados para detección del gen I-3, secuencias, marcador utilizado, posición en cromosoma 7.

Nombre cebador	Secuencia cebador	Marcador de diseño	Posición cromosoma
P7-43CF3	CATGCTTGCCTAGATAACAAAGTTGG	T1329	43.00
P7-43CR1	CTTCTGCCTCAATACCTCCGACACC	T1329	43.00
P7-43CR2	CAAATCCCTGATAGCTTGAACCCG	T1329	43.00
P7-43CR3	GAAGCAACAGATTCATCCAAGTCCCCAG	T1329	43.00
P7-43DF1	GGTAAAGAGATGCGATGATTATGTGGAG	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF2	CACCTGTGAATGTACTCCTGGATG	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF3	CACGGGATATGTTTGTGATAAGCATGT	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF4	GTCAACCTTACCTTGCGTACATTC	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF5	CCATTTCTACAACCTTGGCCATGRCAAC	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF6	TATACTATCACTCACCAGATTCTCTCG	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DF7	TAAGTCCTACCACTTGTACTTGTG	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DR1	GTCTTTACCACAGGAACCTTATCACC	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DR2	CTCGGTACATCTTAGGAACTCATCACG	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DR3	GAACTCTAACTCTGCATCAAAGGTC	cTOF-21-J12	43.00
P7-43DR4	CGAGAGAATCTGGTGAGTGATAGTATA	cTOF-21-J12	43.00
PCT84F1	GGTGGACTTCATTGCTGATTACTAC	CT84	43.00
PCT84R1	ACGGTAGCACAGAGGAAAAGTG	CT84	43.00
PTG190F1	GCAGTACACTTCTCCTTATCATGTG	TG190	cercana a 43.00
PTG190R1	AGTTTCAGTAGTTGTTCCAAATTCC	TG190	cercana a 43.00
PTG190AF1	GATGCAGAGGGAAATGGAAGAACG	TG190	cercana a 43.00
PTG190AR1	GYTTCTGCCTCCTCTCTGTA	TG190	cercana a 43.00
PTG190AR2	AGAAAAACAAAGAGTAGCAGCATG	TG190	cercana a 43.00
P7-43.3F1	CTCCACCTCCTCCTGACCCAAATGA	C2_At2g20860	43.30
P7-43.3R1	GCAACTTTCTCTACACACCCAGGATCAC	C2_At2g20860	43.30
PGot-2F1	AGTGGCAGTGAAAAGTCAGTTG		
PGot-2R1	CCAAGTAACCAACATTTCCAGTAG		

La secuenciación se llevó a cabo por medio de la digestión de ADN monocatenario en las reacciones de PCR, utilizando fosfatasa alcalina de camarón (Promega Corp.) y exonucleasa I (EPICENTRE® Biotechnologies). Los fragmentos de PCR se secuenciaron directamente en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison, utilizando el Kit de Secuenciación *Big Dye Sequencing Kit*®. Las secuencias se analizaron utilizando los programas DNAMAN (Lynnon BioSoftware Copyright© 1994-2001) y Chromas (Technelysium Pty Ltd, versión 1.5).

La digestión con la enzima de restricción *NsiI* para el marcador CAPS P7-43BF1/R1 fue hecha en tubos Eppendorf de 0.2 ml, en volumen de 25.25 µl, lo cual consistió en una mezcla de 13 µl H<sub>2</sub>O, 3 µl buffer D, 0.25 µl BSA, 1 µl *NsiI* (Promega Corp.) y 8 µl de la mezcla de reacción de PCR. La digestión para el marcador CAPS PTG190F1/R1 fue similar, utilizando la enzima *AluI* (Promega Corp.). La reacción fue colocada en baño de María a 37°C por 8-10 horas. El análisis de la digestión se completó por medio de una electroforesis en gel de agarosa a 1.5% en buffer TBE a 0.5X, tinción con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador de luz UV.

## 2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1. Evaluación de cebadores de PCR para la detección del gen *I-3*

Se evaluaron 32 pares de cebadores de PCR. Como muestra el Cuadro 2-2, de estos pares de cebadores, dos produjeron fragmentos polimórficos para los genotipos homocigoto resistente (*I-3/I-3*) y homocigoto susceptible (*i-3/i-3*) al digerir con una enzima de restricción. Además, se obtuvieron fragmentos polimórficos, sin uso de enzimas de restricción, con tres pares de cebadores. Dos de estos últimos se secuenciaron y se diseñaron seis pares de cebadores más a partir de las secuencias.

Cuadro 2-2. Longitud de fragmentos de PCR producidos por los distintos marcadores moleculares evaluados en materiales homocigotos resistentes y homocigotos susceptibles.

Par de cebadores	Enzima de restricción	Tamaño del fragmento (pares de bases aproximadas)		
		Genotipo resistente ( <i>I-3/I-3</i> )		Genotipo susceptible ( <i>i-3/i-3</i> )
		NC EBR-8	NC123S	
P7-43F1/R1	-	400	400	400
P7-43AF1/R1	-	630	630	630
P7-43AF2/R2	-	510	510	510
PTG183F1/R2	-	1,050	800	1,050
PCT84F1/R1	-	670	670	670
PTG190F1/R1	Alul	400, 249, 90, 60	400, 249, 90, 60	401, 165, 143, 90
PGot-2F1/R1	-	636	636	636
P7-43BF1/R1	Nsil	365, 365	365, 365	730
P7-43.3F1/R1	-	1,100	1,100	1,100
P7-43CF1/R1	-	550	550	550
P7-43CF2/R2	-	980	980	980
P7-43CF3/R3	-	710	710	710
P7-43DF1/R1	-	1,270	1,270	1,060
P7-43DF2/R2	-	1,200	1,200	1,200
P7-42F1/R1	-	650	650	650
P7-42F1/R2	-	850	850	850
P7-42.5F1/R1	-	830	830	800
P7-42.5F2/R2	-	850	850	850
PTG190AF1/R1	-	420	420	420
PTG190AF1/R2	-	650	650	650
P7-42.5F3/R1*	-	530	530	490
P7-42.5F4/R1*	-	550	550	510
P7-42.5F5/R1*	-	625	625	575

P7-42.5F6/R1	-	250	250	250
P7-42.5F7/R1	-	420	420	420
P7-43DF3/R1*	-	875	875	650
P7-43DF4/R1*	-	900	900	720
P7-43DF1/R3	-	550	550	550
P7-43DF1/R4	-	750	750	750
P7-43DF5/R1*	-	650	650	450
P7-43DF6/R1*	-	530	530	320
P7-43DF7/R1	-	400	400	400

\*Derivados de otro par de cebadores

A excepción de los cebadores derivados, los fragmentos producidos por los pares de cebadores resaltados en el Cuadro 2-2 fueron secuenciados y se analizaron las secuencias para determinar con más exactitud sus características.

## 2.5.2. Análisis de secuencias de ADN de fragmentos amplificados por PCR

Hemming et al. (2004) presentaron los cebadores PTG183F1/R2 como marcador SCAR codominante, por lo que fue evaluado desde el inicio de la investigación. Se encontró que este marcador es eficiente para detectar la introgresión del gen *I-3* en genotipos homocigotos resistentes (*I-3/I-3*) cuando la introgresión es más larga, proveniente de *S. pennellii* (Hemming et al., 2004). De los materiales evaluados, se determinó que NC123S tiene la introgresión larga, mientras que Fla7547 y NC EBR-8 tienen la introgresión corta, por lo que el marcador no la detecta. La secuencia del fragmento de aproximadamente 1,050 pb<sup>1</sup> de NC EBR-8 (EU926656<sup>2</sup>) es idéntica a la secuencia de Purple Russian (EU926657<sup>2</sup>). El fragmento de NC123S (FJ004839<sup>2</sup>) fue de aproximadamente 800 pb de longitud (ver Apéndice). Por esta razón, no se puede utilizar este marcador de forma general en programas de mejoramiento basados en selección asistida por marcadores moleculares para detectar el gen *I-3*. En la Figura 2-7 se pueden observar algunas diferencias en las secuencias del germoplasma evaluado.

<sup>1</sup> Pares de bases.

<sup>2</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

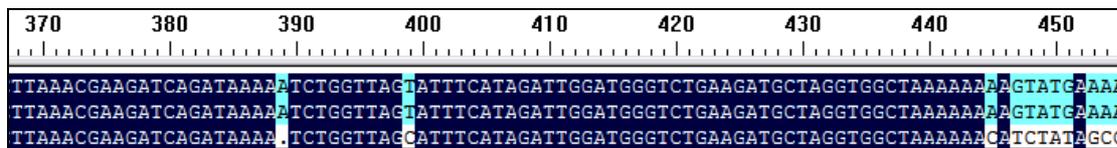


Figura 2-7. Comparación de un segmento de las secuencias de Purple Russian (*i-3/i-3*; arriba), NC EBR-8 (*I-3/I-3*; centro) y NC123S (*I-3/I-3*; abajo); fragmento de PCR producidos con PTG183F1/R2. Se observan los nucleótidos comunes en las tres secuencias marcados de color azul, los nucleótidos comunes para Purple Russian y NC EBR-8 marcados de color aqua y los nucleótidos diferentes de NC123S no se marcan.

Debido a que no hubo polimorfismos evidentes al utilizar los primeros doce pares de cebadores en la reacción de PCR, se secuenciaron todos los fragmentos obtenidos para determinar si existían polimorfismos útiles para el desarrollo de marcadores tipo CAPS. Para el par de cebadores PTG190F1/R1, los genotipos susceptibles (*i-3/i-3*), Purple Russian, L40 y M82, y los resistentes (*I-3/I-3*), Fla7547, NC EBR-8 y NC123S, produjeron fragmentos de PCR de aproximadamente 765 pb. Se compararon las secuencias de Purple Russian (EU926659<sup>1</sup>) y NC EBR-8 (EU926658<sup>1</sup>) y se encontraron diferencias de 12 SNPs y tres indeles (secuencias en Apéndice). Se identificaron cinco sitios de restricción (Figura 2-8) correspondiente a la enzima de restricción *A<sub>lu</sub>I*. La digestión del producto de PCR con esta enzima resultaría en fragmentos de 400, 249, 90, y 60 pb para los genotipos resistentes y 401, 165, 143 y 90 pb para los genotipos susceptibles.

<sup>1</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

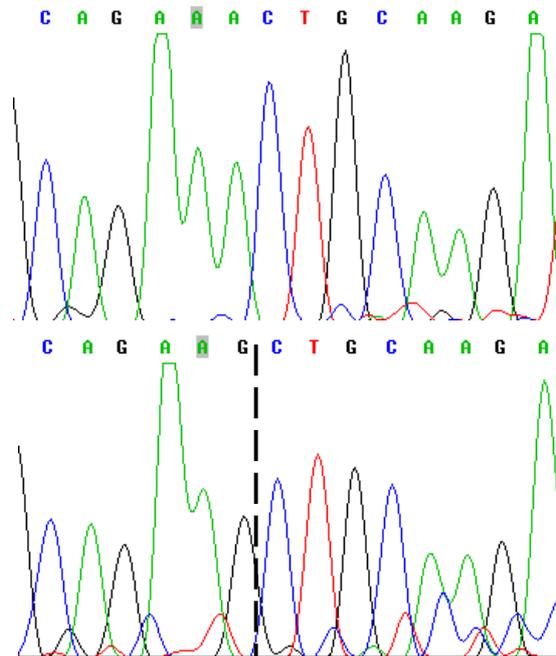


Figura 2-8. Comparación de secuencias de Purple Russian (*i-3/i-3*; arriba) y NC EBR-8 (*I-3/I-3*; abajo); fragmentos de PCR producidos con PTG190F1/R1. Se observa un SNP, en el cual se halla un sitio de restricción correspondiente a la enzima *AluI* (AG/CT), por lo que la digestión ocurriría en este punto solamente en el genotipo resistente.

Otro par de cebadores potencial para uso como marcador tipo CAPS fue P7-43BF1/R1. Los genotipos susceptibles, Purple Russian y M82, y los resistentes, NC EBR-8 y NC123S, resultaron en fragmentos de PCR de aproximadamente 730 pb. Al comparar las secuencias de M82 (EU926651<sup>1</sup>) y NC EBR-8 (EU916652<sup>1</sup>), se encontraron diferencias de 15 SNPs y un indel (secuencias en Apéndice). Además, se identificó un sitio de restricción (Figura 2-9), correspondiente a la enzima de restricción *NsiI* en la secuencia del genotipo resistente. La digestión del producto de PCR con esta enzima produciría dos fragmentos de 362 y 367 pb. El genotipo susceptible no sería digerido. Las secuencias de M82 y NC EBR-8 fueron compatibles con el clon BAC C07HBa0045O10 (141,097 nt<sup>2</sup>, AC212615<sup>1</sup>) con 100 y 97% de identidad de nucleótidos, respectivamente.

<sup>1</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

<sup>2</sup> Nucleótidos; referente a la longitud de la secuencia.

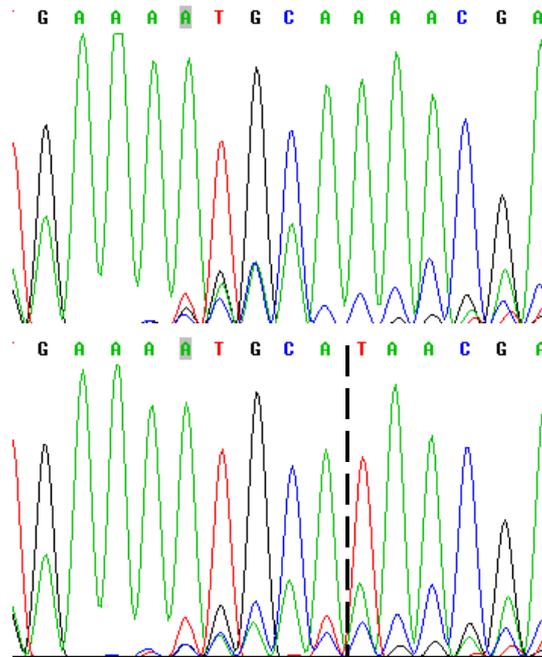


Figura 2-9. Comparación de secuencias de M82 (*i-3/i-3*; arriba) y NC EBR-8 (*I-3/I-3*; abajo); fragmentos de PCR producidos con PTG190F1/R1. Se observa un SNP, en el cual se halla un sitio de restricción correspondiente a la enzima *Nsi*I (ATGCA/T), por lo que la digestión ocurriría en este punto solamente en el genotipo resistente.

El primer par de cebadores que produjo fragmentos de distinta longitud, evidentes por medio de la electroforesis, fue P7-43DF1/R1. Los genotipos susceptibles produjeron fragmentos de aproximadamente 1,060 pb y los resistentes, fragmentos de 1,270 pb (Figura 2-10).

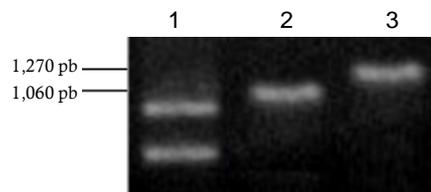


Figura 2-10. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el par de cebadores P7-43DF1/R1. Carriles: 1) Marcador de peso (PCR Marker, Promega Corp.), 2) M82 (*i-3/i-3*), 3) NC EBR-8 (*I-3/I-3*). Se observan fragmentos de distinto tamaño, indicando la existencia del polimorfismo.

Al comparar las secuencias de M82 (EU026653<sup>1</sup>) y NC123S (EU926654<sup>1</sup>), se encontraron diferencias de 28 SNPs y 6 indels (Figura 2-11), uno de estos últimos de 215 pb (ver Apéndice). Sin embargo, los fragmentos eran muy grandes para ser observados eficientemente en el gel de agarosa, por lo que se diseñaron los cebadores P7-43DF3, P7-43DF4, P7-43DF5, P7-43DF6 y P7-43DF7 hacia el extremo 3', y P7-43DR3 y P7-43DR4 hacia el extremo 5' de la secuencia. Éstos permitieron obtener la secuencia clara y completa de P7-43DF1/R1 y además, se encontró que el par de cebadores P7-43DF3/R1 amplificaba la región del indel de 215 pb, produciendo fragmentos de 650 pb para los genotipos susceptibles y de 875 pb para los resistentes. La secuencia de M82 para el fragmento producido por P7-43DF1/R1 es compatible, con 100% de identidad de nucleótidos, con el clon BAC C07HBa0045O10, en el cromosoma 7 y coincide con los nucleótidos 114,068-115,118, los cuales forman parte de una ubicación predicha de gen (gene\_16\_323, SGN-E745364).

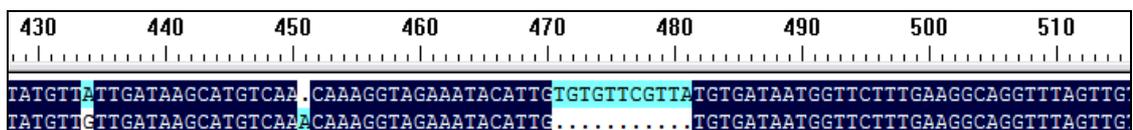


Figura 2-11. Comparación de un segmento de las secuencias de M82 (*i-3/i-3*; arriba) y NC EBR-8 (*I-3/I-3*; abajo); fragmentos de PCR producidos con P7-43DF1/R1. Se observan los nucleótidos comunes en ambas secuencias marcados de color azul y los nucleótidos diferentes marcados de color aqua en la secuencia de M82.

Otro par de cebadores que mostró polimorfismos evidentes fue P7-42.5F1/R1. Los genotipos susceptibles produjeron fragmentos de aproximadamente 800 pb y los resistentes, de 830 pb. Con la finalidad de obtener fragmentos más diferenciados, se diseñaron otros cebadores a partir de la secuencia de P7-42.5DF1/R1; P7-42.5DF3, P7-42.5DF4, P7-42.5DF5, P7-42.5DF6 y P7-42.5DF7 hacia el extremo 3'. Los pares de cebadores P7-42.5F3/R1, P7-42.5F4/R1 y P7-42.5F5/R1 mostraron polimorfismos más

<sup>1</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

claros. Sin embargo, debido a que los resultados obtenidos con el par de cebadores P7-43DF3/R1 fueron más claros, no se continuó trabajando con estos cebadores.

### 2.5.3. Evaluación de marcadores tipo CAPS

El par de cebadores PTG190F1/R1 fue evaluado en materiales con genotipos homocigoto resistente (*I-3/I-3*), homocigoto susceptible (*i-3/i-3*) y heterocigoto (*I-3/i-3*). Los productos de PCR digeridos con la enzima *AluI* y los no digeridos (de 765 pb de longitud) se muestran en la Figura 2-12.

El fragmento de 249 pb de los resistentes y el de 165 pb de los susceptibles son indicadores de los dos genotipos. Los demás fragmentos, no proveen información clara. Por esta razón, este marcador CAPS no sería superior al marcador CT226 reportado previamente (Lim et al., 2006).

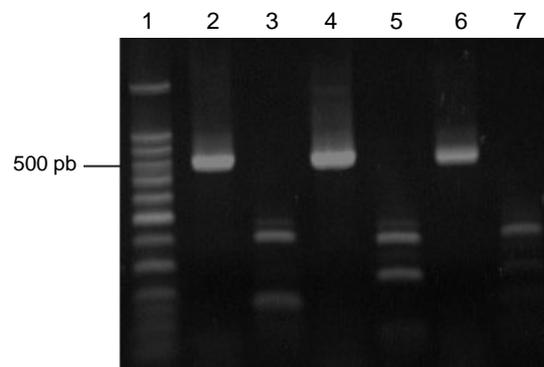


Figura 2-12. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador CAPS PTG190F1/R1. Fragmentos de PCR digeridos con *AluI* para carriles 3, 5 y 7. Carriles: 1) Marcador de peso (100-bp DNA Ladder, Promega Corp.), 2) Purple Russian (*i-3/i-3*)-no digerido-, 3) Purple Russian digerido, 4) NC-EBR-8 (*I-3/I-3*) -no digerido-, 5) NC-EBR-8 digerido, 6) Híbrido F1 A (*I-3/i-3*) -no digerido-, 6) Híbrido F1 A digerido. Nótese que el fragmento de 400 bp de Purple Russian y el de 401 pb de NC-EBR-8 son indistinguibles. Los fragmentos de 165 pb y 143 pb de NC EBR-8 aparecen como una banda y las bandas más pequeñas no se distinguen. Bandas débiles de todos los tamaños fueron detectadas en el Híbrido F1 A.

El marcador CAPS P7-43BF1/R1 fue evaluado utilizando el mismo germoplasma. Los genotipos resistentes (*I-3/I-3*) fueron digeridos por la enzima *NsiI*, resultando dos fragmentos de aproximadamente 365 pb, los cuales se observaron como un solo fragmento. Los genotipos susceptibles (*i-3/i-3*) no fueron digeridos, lo cual resultó en un fragmento de 730 pb (Figura 2-13).

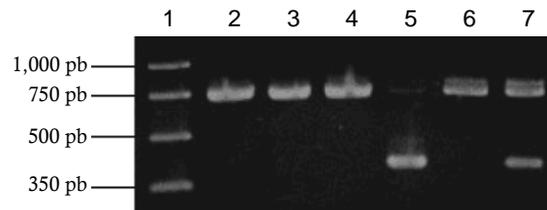


Figura 2-13. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador CAPS P7-43BF1/R1. Fragmentos de PCR digeridos con *NsiI* en carriles 3, 5, y 7. Carriles: 1) Marcador de peso (PCR Marker, Promega Corp.), 2) Purple Russian (*i-3/i-3*) –no digerido-, 3) Purple Russian digerido, 4) NC-EBR-8 (*I-3/I-3*) -no digerido-, 5) NC-EBR-8 digerido, 6) Híbrido F1 A (*I-3/i-3*) –no digerido-, 7) Híbrido F1 A digerido.

Según lo esperado, el híbrido F1 A, con genotipo heterocigoto (*I-3/i-3*), presentó dos fragmentos de 365 pb y 730 pb. Este marcador CAPS fue efectivo para detectar los diferentes genotipos *I-3*. Sin embargo, el uso de este tipo de marcadores es más costoso que los marcadores tipo SCAR, por lo que se continuó la evaluación de P7-43DF3/R1 y su aplicación para la detección de la introgresión.

#### 2.5.4. Evaluación del marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1

Inicialmente, el marcador P7-43DF3/R1 fue evaluado para determinar su efectividad en la detección del gen *I-3* y la determinación de los distintos genotipos. Los genotipos resistentes (*I-3/I-3*) resultaron en fragmentos de aproximadamente 875 pb, mientras que los fragmentos de genotipos susceptibles (*i-3/i-3*) fueron de 650 pb de longitud (Figura

2-14). De acuerdo a lo esperado, se observaron ambos fragmentos en los genotipos heterocigotos (*I-3/i-3*).

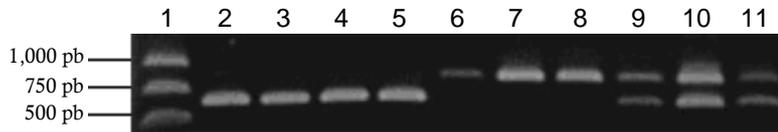


Figura 2-14. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador SCAR co-dominante P7-43DF3/R1. Carriles: 1) Marcador de peso (PCR Marker, Promega Corp.), 2) M82 (*i-3/i-3*), 3) GMh6330 (*i-3/i-3*), 4) L40 (*i-3/i-3*), 5) Purple Russian (*i-3/i-3*), 6) Fla7547 (*I-3/I-3*), 7) NC EBR-8 (*I-3/I-3*), 7) NC123S (*I-3/I-3*), 8) NC07196 (*I-3/i-3*), 9) Plum Crimson (*I-3/i-3*), 10) Híbrido F1 A (*I-3/i-3*).

Además, se evaluó el marcador en distintos genotipos, incluyendo líneas endogámicas susceptibles (*i-3/i-3*), híbridos comerciales con y sin la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 e híbridos portadores del gen de resistencia *I-2* (Figura 2-15).

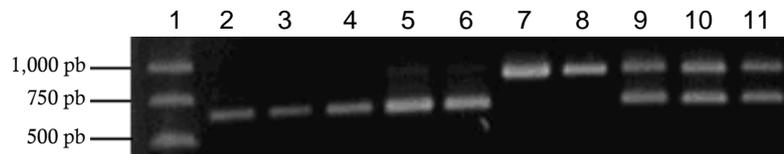


Figura 2-15. Evaluación de líneas e híbridos comerciales con P7-43DF3/R1. Fotografía de gel de agarosa, mostrando los resultados de la electroforesis de productos de PCR con el marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1. Carriles: 1) Marcador de peso (PCR Marker, Promega Corp.), 2) línea endogámica G-38 (*i-3/i-3*), 3) Gc171-1 (*i-3/i-3*), 4) Gc143-2 (*i-3/i-3*), 5) Marina (*i-3/i-3*), 6) Don Raul (*i-3/i-3*), 7) NC-EBR-8 (*I-3/I-3*), 8) NC123S (*I-3/I-3*), 9) Plum Crimson (*I-3/i-3*), 10) Amelia (*I-3/i-3*), 11) Híbrido F1 A (*I-3/i-3*).

Todas las líneas evaluadas y los híbridos portadores de la introgresión del gen *I-2* (El Mohatar et al., 2007) resultaron en fragmentos indicadores del genotipo susceptible para la introgresión del gen *I-3*, según lo esperado. Los híbridos comerciales, Plum

Crimson, Amelia, Crista y Solar Fire (*I-3/I-3*) resultaron en dos fragmentos de diferentes longitudes, indicativo del genotipo heterocigoto.

Estos resultados indican que el marcador es eficiente para detectar la introgresión del gen *I-3*. Sin embargo, para poder utilizar el marcador para seleccionar materiales resistentes, es necesario determinar la relación del marcador SCAR con la ubicación del gen *I-3* en el cromosoma 7. Para esto, la secuencia de NC123S fue enviada al Dr. David Jones<sup>1</sup>, quien junto a su equipo de investigación, publicó un diagrama simplificado de la región de la introgresión *I-3* (Lim et al., 2006). El Dr. Jones indicó que el marcador P7-43DF3/R1 se encuentra afuera del segmento del clon BAC que abarca el gen *I-3*, desarrollado por el mismo equipo de investigación. Se estima que el marcador está a menos de 1 cM del gen *I-3*. Es así como se confirma que el marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1 puede utilizarse en programas de mejoramiento de tomate, para la selección de líneas con resistencia a la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

---

<sup>1</sup> Plant Cell Biology, Research School of Biological Sciences, The Australian National University, Canberra, Australia

## 2.6. CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado para desarrollar un marcador molecular para la detección de la introgresión del gen *I-3* en el tomate, resultó en la obtención del marcador molecular CAPS P7-43BF1/R1 y el marcador SCAR codominante P7-43DF3/R1. Ambos marcadores detectan la introgresión y distinguen los genotipos homocigoto resistente (*I-3/I-3*), homocigoto susceptible (*i-3/i-3*) y heterocigoto (*I-3/i-3*).

El marcador CAPS P7-43BF1/R1, el cual utiliza la enzima de restricción *NsiI*, se puede utilizar para la detección de la introgresión del gen *I-3*, distinguiendo entre los diferentes genotipos.

El marcador P7-43DF3/R1 fue evaluado en cultivares, líneas e híbridos con genotipos conocidos para el gen *I-3* y los resultados se obtuvieron según lo esperado. Además, la información brindada por el Dr. David Jones indicó que este marcador se encuentra cerca de la región del gen *I-3* en el cromosoma 7 del tomate. Debido a que aún no se ha desarrollado un marcador SCAR codominante que detecte la introgresión del gen *I-3* (sea larga o corta), para ser aplicado en los programas de mejoramiento de tomate que utilizan la selección asistida por marcadores moleculares, esta investigación podría ser un aporte importante para esos programas.

## 2.7. RECOMENDACIONES

El marcador molecular SCAR codominante P7-43DF3/R1 puede ser utilizado para la detección de la introgresión del gen *I-3* en tomate, por su eficiencia en la distinción de genotipos y su cercanía a la región del gen *I-3* en el cromosoma 7.

Se recomienda que, antes de aplicarse el marcador molecular en programas de mejoramiento de tomate, éste se evalúe en otro germoplasma, utilizando otros reactivos y equipo de PCR, puesto que los resultados pueden variar al cambiar las condiciones de la reacción.

Por último, se recomienda que se realice un ensayo de campo, en el cual se evalúe el fenotipo de plantas con genotipos determinados con el marcador. El análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo, permitirán determinar si el genotipo define la resistencia y, por ende, si se ha detectado correctamente la presencia del gen.

## 2.8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5 ed. Massachusetts, US, Elsevier Academic Press. 922 p.
2. Ban, M. 2006. DNA sequencing and PCR methods. *Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation* 5(6):18-19.
3. Brauer, O. 1973. Fitogenética aplicada. México, Limusa. p. 176-177.
4. Cañón, DJ. 2002. Genómica en las ciencias veterinarias. España, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal. Consultado 20 abr 2009. Disponible en: <http://www.racve.es/actividades/zootecnia/2002-01-16JavierCanon.htm>
5. Capel, J; Santalla, M; Ferreira, JJ; Ron, AM de; Lozano, R. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal: selección asistida por marcadores moleculares. España, Universidad Politécnica de Valencia, Sociedad Española de Genética. p. 355-381.
6. Chien, A; Edgar DB; Trela, JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 174:1550-7.
7. Cubero, JI. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2 ed. España, Mundi-Prensa. 565 p.
8. El Mohatar, CA; Atamian, HS; Dagher, RB; Abou-Jawdah, Y; Salus, MS; Maxwell, DP. 2007. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the *I-2* gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. *Plant Dis.* 91:758-762.
9. García-Mas, J; Graziano, E; Aranzana, MJ; Monforte, A; Oliver, M; Ballester, J; Viruel, MA; Arus, P. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal: marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos. España, Universidad Politécnica de Valencia / Sociedad Española de Genética. p. 91-151.
10. Gardner, EJ; Simmons, MJ; Snustad, DP. 2000. Principios de genética. 4 ed. Trad. por Angélica Santana Calderón. MX, Limusa. 119 p.
11. Grattidge, R; O'Brien, RG. 1982. Occurrence of a third race of fusarium wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* 66:165-166.
12. Guimaraes, EP; Ruane, J; Scherf, BD; Sonnino, A; Dargie JD. 2007. Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Roma, Italia, FAO. 494 p.

13. Hemming, MN; Basuki, S; McGrath, DJ; Carroll, BJ; Jones, DA. 2004. Fine mapping of the tomato *I-3* gene for fusarium wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3*. *Theoretical Applied Genetics* no. 109:409-418.
14. Instituto de Investigaciones Biomédicas, CO. 2008. Electroforesis en gel de agarosa. Colombia, Universidad de San Buenaventura. Consultado 26 mar 09. Disponible en: <http://idibam.blogspot.com/2008/09/electroforesis-en-gel-de-agarosa.html>
15. Iowa State University, US. 2005. From Mendel to markers: impact of molecular technologies on animal, plant and human genetics, lesson module II- marker assisted selection. Iowa, US, Universidad Estatal de Iowa, Oficina de Biotecnología. p. 57-115.
16. Lim, GTT; Wang, GP; Hemming, MN; Basuki, S; McGrath, DJ; Carroll, BJ; Jones, DA; 2006. Mapping the *I-3* gene for resistance to Fusarium wilt in tomato: application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. *Austral. Plant Pathol.* 35:671-680.
17. Lyons, RH. 2008. How do we sequence DNA?. Michigan, US, Universidad de Michigan, DNA Sequencing Core. Consultado 12 abr 2008. Disponible en: <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/educ/dnapr/sequencing.html>
18. Miller, SA; Rowe, RC; Riedel, RM. 1996. Extension Factsheet: Fusarium and Verticillium wilts of tomato, potato, pepper, and eggplant. Ohio, US, Universidad de Ohio, Departamento de Patología Vegetal. 3 p. Consultado 5 feb 2008. Disponible en: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/pdf/3122.pdf>
19. Momol, T; Ji, P; Pernezny, K; McGovern, R; Olson, S. 2004. Three soilborne tomato diseases caused by *Ralstonia* and *Fusarium* species and their field diagnostics. Florida, US, Universidad de Florida, Extensión IFAS. Consultado 3 feb 2008. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/PP/PP12700.pdf>
20. Mullis, KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4):56-61, 64-65.
21. Nakhla, MK. 2004. Seminario: métodos de laboratorio para la detección de patógenos – PCR. *In* Métodos moleculares para el diagnóstico de patógenos y mejoramiento para resistencia en vegetales. Guatemala, Universidad de San Carlos, Facultad de Agronomía.
22. National Diagnostics, US. 2005. Electrophoresis techniques. Georgia, US. Consultado 26 mar 2009. Disponible en: <http://nationaldiagnostics.com/articles.php/tPath/1>

23. Nuez, F; Carrillo, JM; Ron, AM de. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal: introducción. España, Universidad Politécnica de Valencia / Sociedad Española de Genética. p. 3-22.
24. Padilla, CA; Diez, J; Martínez, E; Bárcena, JA; García, C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa: aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. Cordova, España, Universidad de Córdoba, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Consultado 26 mar 2009. Disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
25. Peña, A De la; Figueiras, A. 2002. Secuenciación de ADN. España, Universidad Complutense de Madrid. Consultado 17 mar 2009. Disponible en: <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>
26. Peralta, IE; Knapp, S; Spooner, DM. 2007. *Solanum pennellii* Correll (en línea). United Kingdom, Natural History Museum, Solanaceae Source. Consultado 10 abr 2009. Disponible en: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/taxonomy/description-detail.jsp?spnumber=4528>
27. Pérez-Almeida, I. 2005. Biotecnología, sintenia y genómica comparativa I: conceptos. Maracay, Venezuela, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, CENIAP HOY. Consultado 19 mar 2009. Disponible en: [http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy3/articulos/n8/arti/perez\\_i2/perez\\_i2.htm#Sintenia](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy3/articulos/n8/arti/perez_i2/perez_i2.htm#Sintenia)
28. Reis, A; Costa, H; Boiteux, LS; Lopes, CA. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 30(4):426-428. Consultado 25 ene 2008. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582005000400017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582005000400017&lng=en&nrm=iso). ISSN 0100-4158. doi: 10.1590/S0100-41582005000400017
29. Rieseberg, LH; Wendel, JF. 1993. Hybrid zones and evolutionary process: introgression and its consequences in plants. New York, US, Oxford University Press. p. 70-109.
30. Scott, JW; Jones, JP. 1989. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica* 40:49-53.
31. Scott, JW. 2005. Perspectives on tomato disease resistance breeding: past, present, and future. *Acta Hort.* 695:217-224
32. Valenzuela-Ureta, JG; Lawn, DA; Heisey, RF; Zamudio-Guzman, V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Dis.* 80:105.
33. Watson, JD. 1978. *Biología molecular del gen*. 3 ed. Trad. por Peter Fiedler. España, Fondo Educativo Interamericano. 739 p.

34. Watson, JD; Tooze, J; Kurtz, DT. 1986. ADN recombinante: introducción a la ingeniería genética. Trad. por Enrique Cerdá Olmedo. Barcelona, España, Labor. 208 p.
35. Zamir, D. 2007. Sequencing *Solanum pennellii* – the wild parent of tomato introgression lines (ILs) that reveal a molecular and a system view of complex phenotypes (en línea). US, Cornell University, SOL Genomics Network. *Solanum pennellii* ILs, Community Sequencing Program: Project proposal. 22 p. Consultado 17 mar 2009. Disponible en: <http://sgn.cornell.edu/documents/solanaceae-project/docs/JGI-Submitted.pdf>



### **CAPÍTULO III**

**SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**



### 3.1. PRESENTACIÓN

Luego de realizar un diagnóstico de los problemas principales existentes en el Laboratorio de Biotecnología, se priorizaron y se definieron posibles soluciones para algunos de ellos. Se seleccionaron cuatro problemas y se tomaron de base para la planificación y ejecución de tres servicios.

El primer servicio consistió en apoyar el mantenimiento y ordenamiento del Laboratorio, para el cual se realizaron actividades de limpieza y ordenamiento de materiales, recopilación de información sobre el mantenimiento del equipo del laboratorio para la elaboración de un manual de mantenimiento y la búsqueda de información sobre cebadores para la detección de enfermedades para ser utilizados en diagnósticos fitopatológicos.

El segundo servicio se realizó con la finalidad de divulgar las actividades de investigación realizadas en el Laboratorio. Para esto, se elaboraron pósters científicos en los cuales se presentaron algunos de los resultados más importantes obtenidos en distintos proyectos de investigación. Los pósters fueron presentados en diferentes eventos científicos y en la Facultad de Agronomía.

La mayor parte del trabajo realizado fue en apoyo al proyecto de investigación FODECYT 54-2007, por medio de la aplicación de técnicas y métodos para análisis moleculares de tejido vegetal y el cumplimiento de algunas funciones administrativas, por lo que constituyó el tercer servicio. Cabe mencionar que, durante el período comprendido entre el 14 de junio al 3 de agosto, se realizó un viaje a la Universidad de Wisconsin-Madison, para recibir una capacitación por medio de la investigación en el uso y aplicación de técnicas de Biología Molecular para la detección de introgresiones de genes de resistencia en plantas de tomate.

### **3.2. SERVICIO 1: APOYO AL MANTENIMIENTO Y ORDENAMIENTO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA**

#### **3.2.1. Objetivos**

##### **A. Objetivo general**

Mejorar las condiciones físicas y los recursos técnicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía.

##### **B. Objetivos específicos**

Ordenar el equipo y material de trabajo en áreas específicas del Laboratorio.

Definir claramente el tipo de mantenimiento necesario para el equipo.

Realizar una búsqueda de información sobre cebadores de PCR para su aplicación en actividades de diagnóstico fitopatológico.

#### **3.2.2. Metodología**

##### **A. Ordenamiento de equipo y materiales del Laboratorio**

Con la colaboración de todos los investigadores del Laboratorio, se clasificaron la cristalería, plásticos, reactivos y demás materiales. Se limpiaron los materiales y el equipo

y se ubicaron en áreas específicas del laboratorio, de tal manera que, de acuerdo a la actividad que se realizara, se tuviera fácil acceso al equipo y los materiales.

Se rotularon los casilleros de acuerdo a los materiales almacenados en su interior y se desecharon los materiales que ya no eran útiles. El equipo que no se utiliza con regularidad, se colocó en espacios de poco acceso para evitar que se convirtieran en un obstáculo para el paso de personas.

Este ordenamiento se realizó en espacio de una semana, en la cual además se ordenaron los recursos bibliográficos, como libros de texto, informes de investigaciones, revistas y artículos científicos, manuales de mantenimiento de equipo, entre otros, y se dio una limpieza total al laboratorio.

## **B. Elaboración de un manual de mantenimiento del equipo del laboratorio**

Se identificó el equipo con más uso en el laboratorio y se realizó una búsqueda de la información de mantenimiento para cada caso, en el manual de uso correspondiente o en otras fuentes bibliográficas relativas al tema. Luego, se tomaron fotografías digitales del equipo y se elaboró el "Manual de Mantenimiento del Equipo del Laboratorio de Biotecnología".

## **C. Compilación de información sobre cebadores para diagnósticos fitopatológicos**

Se realizó una revisión de literatura en manuales de laboratorio, informes de investigaciones científicas, artículos y revistas científicas, específicamente en temas de Biología Molecular, sobre cebadores de PCR que permitan la detección de algunos de los patógenos más importantes en el país. Se compiló esta información en un solo documento.

### 3.2.3. Resultados

Se ordenó el equipo y materiales utilizados en el laboratorio de acuerdo a su uso frecuente y su aplicación. Los materiales almacenados en los casilleros se mantuvieron en orden durante el período de trabajo y su ubicación fue más efectiva al haber rótulos indicativos en la parte exterior. Además, fue más fácil la identificación del agotamiento de los materiales, por lo que se pudo solicitar la compra de más materiales antes de que se terminaran.

Uno de los resultados más importantes fue el manejo de los desechos de materiales y la identificación de áreas contaminados con bromuro de etidio, un reactivo utilizado para la tinción de ADN en geles de agarosa. Este reactivo es dañino a la salud, pudiendo causar mutagénesis celular (UC Santa Cruz, 2003), por lo que es necesario rotular las áreas contaminadas y desechar por incineración los materiales que lo contienen (Princeton University, 2008).

Por otro lado, se elaboró el "Manual de Mantenimiento del Equipo del Laboratorio de Biotecnología", el cual contiene la información necesaria para darle mantenimiento regular al equipo. Se describen los pasos a seguir para la limpieza del equipo y se mencionan los repuestos adecuados en caso sea necesaria una reparación. Para cada equipo se muestra una fotografía como se encuentra en el laboratorio y se menciona la fuente de la cual fue obtenida la información.

Finalmente, se realizó la compilación de información sobre cebadores de PCR para diagnósticos fitopatológicos, la cual incluyó las secuencias de los cebadores, su aplicación y la fuente consultada. El documento contiene información sobre cebadores para la detección de algunos hongos, bacterias y virus fitopatógenos, y algunos nemátodos fitoparasíticos.

### 3.2.4. Evaluación

Antes de la ejecución del servicio, se definieron algunas metas para su evaluación. La primera fue tener un documento con la información necesaria para el mantenimiento del equipo de laboratorio, con la finalidad de que el acceso a esta información fuera sencillo y la información fuera comprensible. Esta meta se logró con la elaboración del "Manual de Mantenimiento del Equipo del Laboratorio de Biotecnología", en el cual se identifica el equipo del laboratorio, tal y como se encuentra en el mismo, y se describen los pasos necesarios para su mantenimiento. Esto será de gran utilidad para los usuarios del equipo, investigadores, técnicos y estudiantes, permitiendo que los procesos dentro del laboratorio, estrictamente los relacionados al cuidado del equipo, sean más organizados y estandarizados.

La segunda meta fue tener por lo menos 25% más de espacio libre para trabajar sobre las mesas en el laboratorio. Al inicio, las áreas de trabajo ya estaban definidas. Sin embargo, muchos materiales no tenían un espacio específico para su almacenamiento, ni existían espacios definidos para los materiales de uso frecuente. El ordenamiento del laboratorio permitió que estas áreas se definieran, por lo que se obtuvo mayor espacio libre sobre las mesas, resultando en más comodidad y orden en el trabajo.

Se recomienda que se contrate a un Asistente de Laboratorio, el cual cumpla con las siguientes funciones: a) hacer limpieza general del laboratorio; b) darle mantenimiento al equipo con regularidad, según indicaciones específicas para cada caso; y c) apoyar las actividades regulares (de rutina) del laboratorio, tales como lavar y autoclavear cristalería y plásticos, entre otras. Además, se recomienda que se elaboren documentos o instrumentos en los cuales se expliquen las metodologías a seguir para los distintos métodos y técnicas utilizados en el laboratorio, como también realizar capacitaciones técnicas a estudiantes, profesores o interesados, como parte de la proyección y responsabilidad docente del Laboratorio.

Por último, con la elaboración del documento de compilación de información sobre cebadores de PCR para diagnósticos fitopatológicos, se logró apoyar al Laboratorio en actividades relacionadas a su fortalecimiento para la prestación futura de servicios, como parte de la búsqueda de alternativas para su autofinanciamiento.

### **3.3. SERVICIO 2: DIVULGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULAD DE AGRONOMÍA**

#### **3.3.1. Objetivos**

##### **A. Objetivo general**

Fortalecer el Laboratorio de Biotecnología por medio de la divulgación del trabajo que se realiza en el mismo.

##### **B. Objetivos específicos**

Elaborar algunos instrumentos para la comunicación de los hallazgos científicos de los investigadores que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología.

Involucrar a más personas en los trabajos de investigación realizados en el Laboratorio de Biotecnología.

### 3.3.2. Metodología

Se identificaron algunos resultados importantes de distintas investigaciones que se realizaban dentro del Laboratorio de Biotecnología, entre las cuales se encontró el proyecto FODECYT 54-2007. Teniendo esta información, se hizo una síntesis y se ordenó la información a exponer en cada caso. Luego se hizo el diseño de los pósters, tomando en cuenta que se buscaba captar la atención de las personas que pasaran frente a ellos, transmitir efectivamente el mensaje y estimular el diálogo sobre el mismo (Erren, 2007). Luego, el diseño fue revisado por los investigadores involucrados. Finalmente, se hizo la impresión de los pósters sobre manta vinílica para su posterior exposición.

### 3.3.3. Resultados

Se elaboraron tres pósters científicos titulados "Evaluación de la efectividad genética de un gen de resistencia (Ty3) a Begomovirus en el tomate" (Figura 3-1A; García et al., 2008), "Desarrollo de marcadores moleculares CAPS y SCAR para la detección de la introgresión del gen *I-3* de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3" (Figura 3-2A; Barillas et al., 2008) y "Análisis genético de una población F<sub>2</sub> para la segregación de dos introgresiones asociadas al padre resistente a Begomovirus, Gc-171" (Figura 3-3A; García et al., 2008).

El primer póster fue presentado en la Semana de Ciencia y Tecnología e Innovación 2008, organizada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en el espacio otorgado a la Facultad de Agronomía (USAC) para su participación en el componente de "Investigación y desarrollo tecnológico" (CONCYT, 2009). El segundo póster se presentó en el III Encuentro Panamericano de Ingenieros Agrónomos, "Agricultura y Comercio, Alimentos y Riqueza de las Naciones", Guatemala, 2008, como también en la cartelera del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Agronomía. El último póster no fue

presentado en ninguna reunión científica. Sin embargo, servirá para futuras exposiciones en actividades de divulgación de la investigación científica, similares a las anteriores.

#### **3.3.4. Evaluación**

Se divulgaron las actividades realizadas en el Laboratorio de Biotecnología por medio de la elaboración y presentación de pósters científicos. Se tuvo la oportunidad de que las personas que participaron en los distintos eventos en los cuales fueron presentados los pósters, conocieran algunos de los resultados más importantes obtenidos por medio de la investigación relacionada a la Biología Molecular.

Este medio de comunicación es importante en la comunidad científica y la elaboración de estos instrumentos, que permiten dar a conocer los resultados de investigaciones, es útil para el desarrollo de la ciencia y tecnología, ya que se alcanza a un público interesado en la investigación y puede aportar a la generación de nuevas investigaciones que involucren a otros investigadores.

### **3.4. SERVICIO 3: APOYO TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO AL PROYECTO FODECYT 54-2007**

#### **3.4.1. Objetivos**

##### **A. Objetivo general**

Dar apoyo técnico y administrativo al proyecto FODECYT 54-2007 durante el primer año de su ejecución.

##### **B. Objetivos específicos**

Realizar actividades de laboratorio para el análisis molecular de plantas a evaluar en el proyecto FODECYT 54-2007.

Realizar actividades administrativas de gestión y control para el proyecto FODECYT 54-2007.

#### **3.4.2. Metodología**

##### **A. Análisis moleculares de plantas**

De acuerdo a los objetivos del proyecto y las actividades programadas para su ejecución, se realizaron análisis moleculares dentro del laboratorio, en colaboración con la Inga. Agr. Brenda García, investigadora adjunta. Estos análisis estuvieron dirigidos hacia

la detección de los genes *Ty-2*, *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-4*, de resistencia a Begomovirus en plantas de tomate.

Para la detección de los distintos genes, se inició con la extracción de ADN de tejido foliar fresco, para la cual se utilizó el Kit de Extracción *MasterPure™ Plant Leaf DNA Purification Kit* (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison WI). Luego se llevó a cabo la técnica de PCR, utilizando los cebadores T0302F/Ty2R1 para la detección del gen *Ty-2*, P6-25F2/R5 para la detección de los genes *Ty-3* y *Ty-3a* y DM6-Ty4F1/R1 para detectar el gen *Ty-4*. Finalmente, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en agarosa al 1.5%, tinción con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador de luz UV.

## **B. Apoyo a la administración financiera del proyecto FODECYT 54-2007**

Durante el período comprendido entre el 1 de febrero y el 31 de noviembre de 2009, se llevaron a cabo actividades relacionadas con la administración financiera del proyecto FODECYT 54-2007, tales como la elaboración de informes mensuales de actividades realizadas, colaboración en la elaboración de informes técnicos trimestrales, solicitudes mensuales de incentivos a la investigación científica en el proyecto, solicitudes de compra de materiales y gestión de viáticos al extranjero.

### **3.4.3. Resultados**

#### **A. Análisis moleculares de plantas**

Uno de los componentes del proyecto FODECYT 54-2007 es la separación de los genes *Ty-3a* y *Ty-4*. Para lograr esta separación, se sembró la generación F2 de un híbrido resultante del cruce de la línea resistente Gc171-1, portadora de los genes *Ty-3a* y

*Ty-4*, con una línea susceptible (*ty-3/ty-3;ty-4/ty-4*). Se determinó el genotipo de 77 plantas F2, con relación a la presencia de ambos genes (Cuadro 3-1). Para el gen *Ty-3a* se encontraron 17 plantas homocigotas dominantes (*Ty-3a/Ty-3a*), 12 homocigotas recesivas (*ty-3/ty-3*) y 48 heterocigotas (*Ty-3a/ty-3*). Mientras que para el gen *Ty-4* se encontraron 10 homocigotas dominantes (*Ty-4/Ty-4*), 42 homocigotas recesivas (*ty-4/ty-4*) y 25 heterocigotas (*Ty-4/ty-4*) (Mejía, 2008).

Cuadro 3-1. Resultados de análisis molecular para 77 plantas F2 provenientes de híbridos portadores de los genes *Ty-3a* y *Ty-4* (Mejía, 2008).

Planta	Genotipo para Ty3	Genotipo para Ty4	Planta	Genotipo para Ty3	Genotipo para Ty4
L1	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L40	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L2	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	L41	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L3	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L42	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L4	Ty3a/Ty3a	Ty4/Ty4	L43	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L5	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L44	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L6	ty3a/ty3a	Ty4/Ty4	L45	ty3a/ty3a	ty4/ty4
L7	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L46	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L8	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L47	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L9	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L48	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L10	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L49	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L11	ty3a/ty3a	ty4/ty4	L50	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L12	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L51	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L13	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L52	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L14	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L53	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L15	Ty3a/ty3a	Ty4/Ty4	L54	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L16	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L55	Ty3a/ty3a	Ty4/Ty4
L17	ty3a/ty3a	ty4/ty4	L56	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L18	Ty3a/Ty3a	Ty4/Ty4	L57	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L19	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L58	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L20	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L59	ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L21	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L60	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L22	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L61	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L23	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L62	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L24	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L63	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L25	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	L64	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L26	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L65	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4
L27	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	L66	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L28	ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L67	Ty3a/ty3a	Ty4/Ty4
L29	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L68	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L30	ty3a/ty3a	Ty4/Ty4	L69	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L31	Ty3a/ty3a	ty4/ty4	L70	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L32	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L71	Ty3a/ty3a	ty4/ty4
L33	ty3a/ty3a	Ty4/Ty4	L72	Ty3a/ty3a	ty4/ty4

L34	ty3a/ty3a	ty4/ty4	L73	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L35	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L74	ty3a/ty3a	ty4/ty4
L36	ty3a/ty3a	Ty4/Ty4	L75	ty3a/ty3a	ty4/ty4
L37	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L76	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L38	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4	L77	Ty3a/ty3a	Ty4/ty4
L39	Ty3a/ty3a	Ty4/Ty4			

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de las plantas F2 (Cuadro 3-2) indicó que el gen *Ty-3a* presenta una segregación Mendeliana normal de 1:2:1. Sin embargo, los resultados para el gen *Ty-4* muestran una segregación anormal, con un déficit de los genotipos portadores de este gen, lo cual indica la presencia de factores negativos que afectan la fertilidad asociados a la introgresión del gen (Mejía, 2008a).

Cuadro 3-2. Segregación de las introgresiones correspondientes a *Ty-3a* y *Ty-4* en una población F2 (Mejía, 2008a).

Introgresión	Homocigota dominante	Heterocigota	Homocigota recesivo	Total	$\chi^2$	Valor de p
<i>Ty-3a</i>	17	48	12	77	5.42	0.05-0.1-
<i>Ty-4</i>	10	24	43	77	38.37	<0.005
Esperado	19	38	19	1:2:1		

Se conservaron 12 plantas F2, para su posterior evaluación de campo en la generación F3. Previo a llevarlas al campo, se verificó su genotipo (Cuadro 3-3) y se encontraron diferencias en el genotipo de 5 familias. Sin embargo, todas las familias fueron evaluadas para determinar su fenotipo en el campo para luego determinar el grado de correlación del genotipo y el fenotipo (Mejía, 2008b).

Cuadro 3-3. Genotipo de 12 familias F3, portadoras de los genes *Ty-3a* y/o *Ty-4* (Mejía, 2008b).

Fam	Genotipo obtenido		Genotipo esperado		Fam	Genotipo obtenido		Genotipo esperado	
	Ty3a	Ty4	Ty3a	Ty4		Ty3a	Ty4	Ty3a	Ty4
L6	ty3/ty3	Ty4/Ty4	ty3/ty3	Ty4/Ty4	L36	ty3/ty3	Ty4/Ty4	ty3/ty3	Ty4/Ty4
L7	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L47	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L8	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L51	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L9	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	L54	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L17	ty3/ty3	Ty4/ty4	ty3/ty3	ty4/ty4	L57	Ty3a/Ty3a	Ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4
L30	ty3/ty3	Ty4/Ty4	ty3/ty3	Ty4/Ty4	L68	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4	Ty3a/Ty3a	ty4/ty4

\*Los cuadros sombreados muestran las familias con diferencias entre el genotipo obtenido y el genotipo esperado.

Otros componentes del proyecto están relacionados con la sobreposición de genes de resistencia en una misma línea. Para esto, se realizaron varios cruces, uno de los cuales fue entre la línea resistente Gh13, portadora del gen *Ty-3* y la línea CLN2116, portadora del gen *Ty-2*. Las plantas F1 fueron sembradas para la obtención de semilla F2 y se inició la determinación de sus genotipos, utilizando los marcadores moleculares correspondientes (Figura 3-4) para encontrar al menos tres plantas con los genotipos esperados *Ty-2/Ty-2*, *ty-3/ty-3*, *ty-2/ty-2*, *Ty-3/Ty-3*, *Ty-2/Ty-2*, *Ty-3/Ty-3*, y *ty-2/ty-2*, *ty-3/ty-3*. El Cuadro 3-4 muestra los resultados obtenidos del análisis de 57 plantas F2 (Mejía, 2008b).

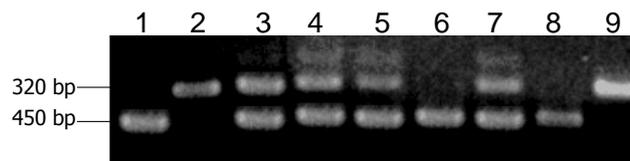


Fig. 3-4. Fotografía de gel de agarosa al 1.5%, de fragmentos de ADN producidos por PCR con los cebadores P6-25F2/R5. Carriles: 1) F1 (*ty-3/ty-3*), 2) F2 (*Ty-3/Ty-3*), 3) F3 (*Ty-3/ty-3*), 4) F7 (*Ty-3/ty-3*), 5) F8 (*Ty-3/ty-3*), 6) F9 (*ty-3/ty-3*), 7) F10 (*Ty-3/ty-3*), 8) Gh13 (*Ty-3/Ty-3*), 9) W173 (*ty-3/ty-3*) (Mejía, 2008b).

Cuadro 3-4. Genotipos de 57 plantas F2 del cruce Gh13 X CLN2116, para los genes *Ty-3* y *T-y2* (Mejía, 2008b).

Planta	Genotipo Ty3	Genotipo Ty2	Planta	Genotipo Ty3	Genotipo Ty2
F1	Ty3/Ty3	Ty2/Ty2	F31	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F2	Ty3/Ty3	ty2/ty2	F32	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F3	ty3/ty3	ty2/ty2	F33	ty3/ty3	Ty2/ty2
F5	ty3/ty3	Ty2/ty2	F34	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F6	ty3/ty3	Ty2/ty2	F35	Ty3/ty3	ty2/ty2
F7	Ty3/Ty3	Ty2/ty2	F36	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F8	ty3/ty3	ty2/ty2	F37	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F9	ty3/ty3	Ty2/Ty2	F38	Ty3/Ty3	Ty2/Ty2
F10	Ty3/ty3	ty2/ty2	F39	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F11	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F40	ty3/ty3	Ty2/ty2
F12	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F41	ty3/ty3	Ty2/ty2
F13	Ty3/ty3	ty2/ty2	F42	Ty3/Ty3	Ty2/ty2
F14	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F43	Ty3/ty3	ty2/ty2
F15	Ty3/ty3	ty2/ty2	F45	Ty3/ty3	Ty2/Ty2
F16	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F47	Ty3/ty3	Ty2/Ty2
F17	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F48	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F18	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F49	ty3/ty3	Ty2/ty2
F19	ty3/ty3	ty2/ty2	F50	Ty3/ty3	ty2/ty2
F20	Ty3/ty3	Ty2/Ty2	F51	ty3/ty3	Ty2/ty2
F21	Ty3/ty3	ty2/ty2	F52	Ty3/Ty3	ty2/ty2
F22	ty3/ty3	Ty2/ty2	F53	Ty3/ty3	Ty2/ty2
F23	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F54	Ty3/Ty3	Ty2/ty2
F24	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F55	Ty3/Ty3	ty2/ty2
F25	Ty3/ty3	ty2/ty2	F56	Ty3/ty3	ty2/ty2
F26	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F57	ty3/ty3	Ty2/ty2
F27	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F58	ty3/ty3	Ty2/ty2
F28	Ty3/ty3	Ty2/ty2	F59	ty3/ty3	Ty2/ty2
F29	ty3/ty3	Ty2/ty2	F60	Ty3/ty3	Ty2/Ty2
F30	Ty3/ty3	Ty2/Ty2			

\*Los cuadros sombreados corresponden a plantas seleccionadas para transplantar y obtener semilla F3.

## **B. Detalle administrativo-financiero del proyecto FODECYT 54-2007**

Durante el período comprendido entre el 1 de febrero y el 31 de noviembre, se elaboraron 10 informes mensuales de actividades, en los cuales se describieron los resultados obtenidos en el laboratorio durante cada mes; se colaboró en la elaboración de tres informes técnicos trimestrales, en los cuales se informó de los avances en el cumplimiento de los objetivos del proyecto; se realizaron 10 solicitudes de pago de incentivos a la investigación realizada por el equipo de trabajo del proyecto, para lo cual se presentaron los informes mensuales de cada investigador, una factura contable por prestación de servicios técnicos para la investigación, una carta de solicitud de pago de incentivos y la planilla correspondiente. Además, se solicitó, administró y liquidó una caja chica durante el mes de agosto.

Por otro lado, se solicitó la compra de reactivos y materiales necesarios para análisis por PCR. Estas solicitudes se realizaron por medio de la presentación de una requisición con formato definido y tres cotizaciones de distintos proveedores. Luego de autorizada la compra, ésta se confirmó a los proveedores y se presentaron las facturas respectivas para el pago. Adicionalmente, se realizó la solicitud de compra de dos boletos aéreos y la solicitud de viáticos al exterior para viajar, junto a la Inga. Agr. Brenda García a la Universidad de Madison-Wisconsin, para recibir capacitación en técnicas de Biología Molecular por medio de la investigación, en el laboratorio del Dr. Douglas P. Maxwell, en el Departamento de Patología Vegetal. Para esto, se presentaron las requisiciones correspondientes, tres cotizaciones de boletos aéreos, una carta de invitación por parte del Dr. Douglas P. Maxwell a participar en la capacitación, una carta de respuesta en aceptación a la invitación y un programa de actividades a realizar. Al retornar, se presentó la liquidación de viáticos.

Todos los documentos mencionados fueron presentados a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) y se archivaron en el laboratorio para el uso de los investigadores del proyecto.

#### **3.4.4. Evaluación**

Se logró cumplir con las actividades programadas para el proyecto FODECYT 54-2007 en el período del 1 de febrero al 31 de noviembre de 2008. Las actividades realizadas en el Laboratorio de Biotecnología resultaron en el avance positivo del proyecto, pudiendo cumplir con la programación de actividades dirigidas a la evaluación de la efectividad de los distintos genes de resistencia a Begomovirus en plantas de tomate. Además, las actividades administrativas fueron realizadas de acuerdo a lo requerido por la SENACYT, por lo que no hubo inconvenientes para la ejecución financiera del proyecto.

### 3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barillas, AC; Mejía, L; Sánchez-Pérez, A; Maxwell, DP. 2008. CAPS and SCAR markers for detection of *I-3* gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. Tomato Genetics Cooperative Report 58:11-17. Consultado 10 oct 2008. Disponible en: <http://tgc.ifas.ufl.edu/>
2. CONCYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, GT). 2009. Semana nacional de ciencia, tecnología e innovación 2008. Guatemala. Consultado 25 abr 2009. Disponible en: [http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com\\_content&view=article&id=143&Itemid=202](http://www.concyt.gob.gt/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=202)
3. Erren, T; Bourne, P. 2007. Editorial: diez reglas simples para hacer una buena presentación en póster. Trad. por Diego Cosentino y Olga Heredia. PLoS Comput Biol 3(5):102. Consultado 13 mar 2008. Disponible en: [http://www.suelos.org.ar/adjuntos/diez\\_reglas\\_simples\\_para\\_hacer\\_una\\_buena\\_presentacion\\_en\\_poster.pdf](http://www.suelos.org.ar/adjuntos/diez_reglas_simples_para_hacer_una_buena_presentacion_en_poster.pdf)
4. Garcia, BE; Barillas, AC; Maxwell, DP.; Mejía, L. 2008. Genetic analysis of an F2 population for the segregation of two introgressions associated with the begomovirus-resistant parent, Gc171. Tomato Genetics Cooperative Report 58:18-21. Consultado 10 oct 2008. Disponible en: <http://tgc.ifas.ufl.edu/>
5. Garcia, BE; Mejía, L; Melgar, S; Teni, R; Sánchez-Pérez, A; Barillas, AC; Montes, L; Keuler, NS; Salus, M.S; Havey, MJ; Maxwell, DP. 2008. Effectiveness of the *Ty-3* introgression for conferring resistance in F3 families of tomato to bipartite begomoviruses in Guatemala. Tomato Genetics Cooperative Report 58:22-28. Consultado 10 oct 2008. Disponible en: <http://tgc.ifas.ufl.edu/>
6. Mejía, L. 2008. Evaluación de la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate: FODECYT 054-2007, segundo informe trimestral. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 8 p. (no publicado).
7. \_\_\_\_\_. 2008a. Evaluación de la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate: FODECYT 054-2007, tercer informe trimestral. Guatemala, CONCYT / FAUSAC. 8 p. (no publicado).
8. \_\_\_\_\_. 2008b. Evaluación de la efectividad genética de cinco genes de resistencia a Begomovirus en el tomate: FODECYT 054-2007, cuarto informe trimestral. Guatemala, CONCYT / FAUSAC 8 p. (no publicado).
9. Princeton University, US. 2008. Ethidium bromide disposal. US, Princeton University, Environmental Health and Safety. Consultado 28 abr 2009. Disponible en: <http://web.princeton.edu/sites/ehs/chemwaste/etbr.html>

10. UC Santa Cruz, US. 2003. Ethidium bromide: chemicals information sheet. US, UC Santa Cruz, Laboratory Safety Services. 2 p. Consultado 28 abr 2009. Disponible en: [http://ehs.ucsc.edu/lab\\_research\\_safety/pubs/facts/ETBR.pdf](http://ehs.ucsc.edu/lab_research_safety/pubs/facts/ETBR.pdf)

## APÉNDICES



## FIGURAS

<b>BOLETA DE ENTREVISTA</b>	
<p><b>Objetivo:</b> con esta boleta se pretende recopilar la información necesaria para la elaboración de un análisis FODA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC en relación al programa de mejoramiento genético de tomate para la resistencia a geminivirus.</p>	
<p><b>Nombre del entrevistado:</b> _____</p>	
<p><b>Cargo:</b> _____</p>	<p><b>Fecha:</b> _____</p>
<b>Cuestionario</b>	
<p>-FORTALEZAS-</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ¿Cuáles han sido los mayores logros en los últimos cinco años?</li> <li>2. ¿Cómo se han aprovechado esos logros?</li> <li>3. ¿Qué acciones son necesarias para aprovechar los logros?</li> <li>4. ¿Cuáles son las principales fortalezas del equipo de investigación?</li> <li>5. ¿Cómo se han aprovechado esas fortalezas?</li> <li>6. ¿Cómo se pueden aprovechar esas fortalezas desde el punto de vista operativo y estratégico?</li> <li>7. ¿Con qué recursos se cuenta? (Equipo, recursos humanos, recursos financieros, activos intangibles)</li> </ol>	
<p>-DEBILIDADES-</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>8. ¿Cuáles han sido las principales deficiencias durante los últimos cinco años?</li> <li>9. ¿Qué medidas se deben tomar para reducir el efecto de estas desventajas?</li> <li>10. ¿Cuáles son las principales debilidades del equipo de investigación?</li> <li>11. ¿Cómo se pueden corregir o reducir al mínimo sus efectos?</li> <li>12. ¿Qué recursos son necesarios aún?</li> </ol>	
<p>-OPORTUNIDADES-</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>13. ¿Qué factores externos fundamentales favorecerán al equipo en los próximos cinco años? (económicos, políticos, reguladores, demográficos, competitivos)</li> <li>14. ¿Cuáles son las oportunidades al alcance del equipo en los próximos cinco años?</li> <li>15. ¿Qué se puede hacer para aprovechar esas oportunidades?</li> </ol>	
<p>-AMENAZAS-</p>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>16. ¿Cuáles son los factores externos que puedan afectar negativamente al seguimiento, continuación e inicio de nuevas investigaciones en los próximos cinco años?</li> <li>17. ¿Qué se puede hacer para enfrentarlas o disminuir sus efectos?</li> <li>18. ¿Cuáles son las tareas más importantes que se enfrentarán en los próximos cinco años?</li> </ol>	

Figura 1-1A. Boleta de discusión para sesión de trabajo FODA.

<p>FACTORES INTERNOS</p> <p>FACTORES EXTERNOS</p>	<p><b>Lista de Fortalezas</b>  <b>F1.</b>  <b>F2.</b>          ...  <b>Fn.</b></p>	<p><b>Lista de Debilidades</b>  <b>D1.</b>  <b>D2.</b>          ...  <b>Dr.</b></p>
<p><b>Lista de Oportunidades</b>  <b>O1.</b>  <b>O2.</b>          ...  <b>Op.</b></p>	<p><b>FO (Maxi-Maxi)</b>  <i>Estrategia para maximizar tanto las F como las O.</i>  <b>1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX</b>  <b>(O1, O2, F1, F3 ...)</b></p>	<p><b>DO (Mini-Maxi)</b>  <i>Estrategia para minimizar las D y maximizar las O.</i>  <b>1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX</b>  <b>(O1, O2, D1, D3, ...)</b></p>
<p><b>Lista de Amenazas</b>  <b>A1.</b>  <b>A2.</b>          ...  <b>Aq.</b></p>	<p><b>FA (Maxi-Mini)</b>  <i>Estrategia para maximizar las fortalezas y minimizar las amenazas.</i>  <b>1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX</b>  <b>(F1, F3, A2, A3, ...)</b></p>	<p><b>DA (Mini-Mini)</b>  <i>Estrategia para minimizar tanto las A como las D.</i>  <b>1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX</b>  <b>(D1, D3, A1, A2, A3, ...)</b></p>

Figura 1-2A. Matriz FODA para definir alternativas estratégicas (Instituto Politécnico Nacional, 2002).

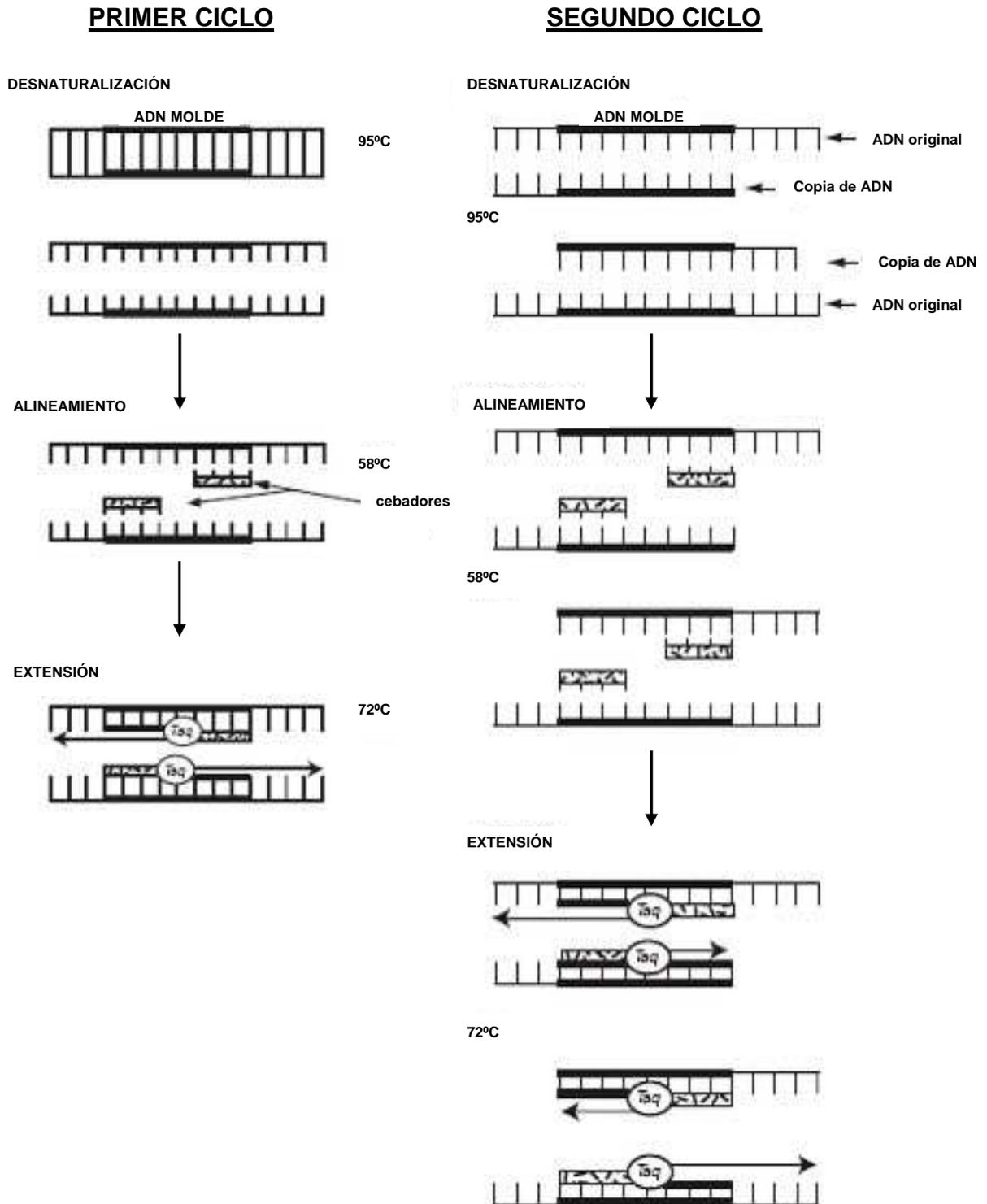


Figura 2-1A. Esquema del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (Iowa State University, 2005).

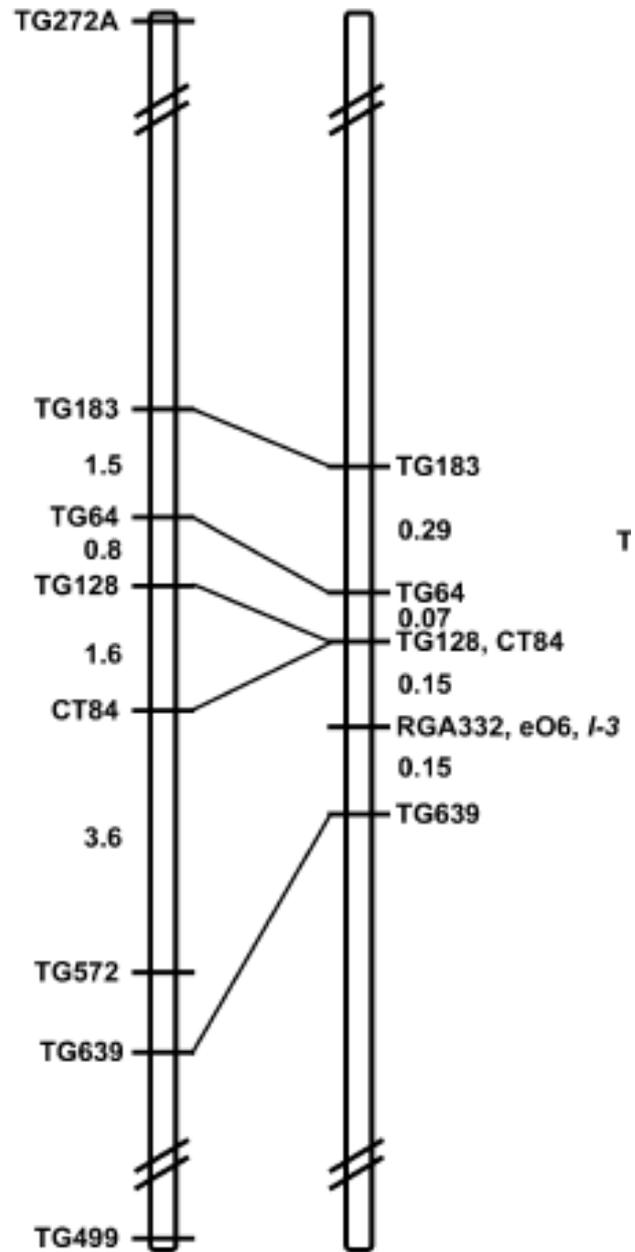


Figura 2-2A. Cromosoma 7 del tomate (Hemming et al., 2004).

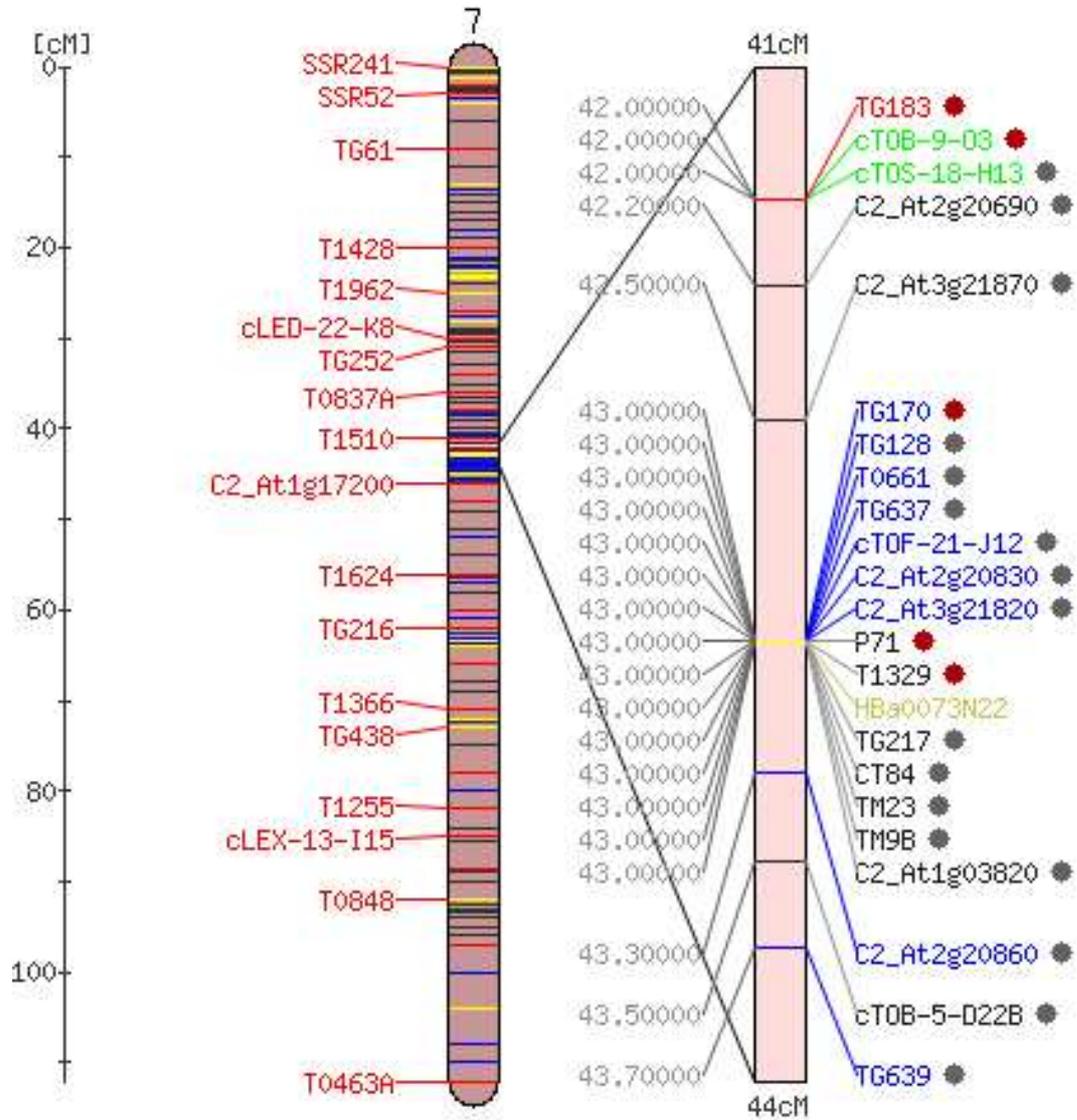


Figura 2-3A. Región del cromosoma 7, comprendida entre el marcador TG183 y TG639. En base a las secuencias de los marcadores encontrados en esta región se hizo el diseño de cebadores (Tomato-EXPEN 2000 Map; [www.sgn.cornell.edu](http://www.sgn.cornell.edu)).

# Evaluación de la efectividad genética de un gen de resistencia (Ty3) a Begomovirus en el tomate

Brenda E. García C., Ana Cristina Barillas P., Rudy E. Teni C., Luis Mejía (Facultad de Agronomía, USAC), Douglas Maxwell (Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison)

Los Begomovirus han sido la principal causa de importantes pérdidas en la producción de tomate en Centro América y otras regiones productoras de tomate del mundo durante los últimos 20 años. El manejo de esta enfermedad ha sido difícil debido a la alta diversidad de los Begomovirus (Nakhla et al., 2005) y al aumento en las poblaciones del vector, la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, que se han producido debido principalmente a cambios en las prácticas de cultivo y biotipo del vector (Morales y Anderson, 2001). El uso de cultivares resistentes podría ser una práctica efectiva en la reducción de estas pérdidas. Hasta hace poco tiempo, no existía ningún cultivar comercial de este tipo. En el 2007, GenTropic Seeds, una nueva compañía de semillas localizada en Antigua, utilizando líneas resistentes desarrolladas en la Facultad de Agronomía de la USAC, introdujo varios híbridos con niveles de moderados a altos de resistencia a los begomovirus transmitidos por mosca blanca.

Por medio de la utilización de métodos de marcadores moleculares ha sido posible identificar los principales genes asociados con la resistencia a los Begomovirus en el germoplasma resistente desarrollado en la USAC. En este trabajo se describe la evaluación de la efectividad genética de uno de estos genes, el gen Ty3. La utilización de cultivares resistentes adquiere especial relevancia ahora, cuando fue detectada la presencia de un Begomovirus exótico (no nativo de Guatemala o Centro América), el Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), procedente del Hemisferio Oriental, según lo reportado por R. Gilbertson (Universidad de California-Davis) quien realizó su detección en el valle de Salamá y García, Maxwell y Mejía en el departamento H Progreso y otras áreas de Guatemala (datos no publicados).

Debido a que el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) es susceptible a Begomovirus, ha sido necesario introducir genes de resistencia a partir de las especies silvestres (Mejía et al., 1995; Ji et al., 2007a). Una de estas introgresiones, proveniente de la especie silvestre *Solanum trichocarpes* (Vidavsky y Czizonek, 1998), contiene el gen de resistencia Ty3 en el cromosoma 6, como otros 75 cM (Marín, Solís, Mejía y Maxwell, datos no publicados).

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la efectividad genética de un gen de resistencia (Ty3) a los Begomovirus en el tomate.

### Específicos

Determinar la presencia del gen Ty3 en las genotipos a ser evaluados por medio de técnicas moleculares utilizando el marcador SCAR codominante P6-25 (Ji et al., 2007c).

Determinar la efectividad genética del gen Ty3 en la resistencia a los Begomovirus presentes en Guatemala.

## METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LA EFECTIVIDAD GENÉTICA DEL GEN Ty3

Se realizó un cruce entre la línea resistente a Begomovirus Gh13, homocigota dominante para el gen Ty3, con la línea susceptible M82 (ty3). Se permitió la autofecundación de las plantas F1 para obtener semilla F2. Se determinó el genotipo para el gen Ty3 en las plantas F2. La segregación del marcador fue Mendeliana (1:2:1). Se descartaron las plantas heterocigotas y las plantas homocigotas se avanzaron a la generación F3. Se recombinó el genotipo homocigoto de las familias F3 y estas se transplantaron en Sonarate el 18 de diciembre, 2007. Se sembraron tratamientos al azar de cinco plantas de cada familia en tres repeticiones. Se realizaron lecturas de sírnomas a los 30 y 42 días después del trasplante, embase a un índice de severidad de la enfermedad (DSI) en escala de 0-6. En esta escala se considera que los valores menores de 2.6 son indicativos de resistencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de severidad (DSI) a los 30 y 42 días después del trasplante (DDT) fueron similares. Aquí se presentan los datos de 42 DDT. Las calificaciones de DSI fueron analizadas utilizando un ANDEVA en dos direcciones y no se encontró efecto de bloque. Los DSI promedio para cada línea progenitora y las familias F3 se presentaron en el Cuadro 1. Los DSI promedio para el progenitor susceptible, M82, y el progenitor resistente, Gh13, fueron 6.0 y 0.9 respectivamente. Las 15 familias F3 con el genotipo ty3/ty3 (sin introgresión) tuvieron un DSI promedio de 4.5, t.S., 0.12 y las 12 familias F3 con el genotipo Ty3/Ty3 (con la introgresión) tuvieron un DSI promedio de 2.0, t.S., 0.12. Dos de las familias Ty3/Ty3 presentaron plantas resistentes y susceptibles (las familias F3 número 3 y 39). Los otros 10 familias F3 presentaron solo plantas resistentes. El análisis estadístico indicó que hubo una correlación significativa entre el genotipo y el fenotipo, por lo tanto el gen Ty3 (introgresión de una especie silvestre) está relacionado con la resistencia.

Es probable que, en el caso de las dos familias F3 de genotipo ty3/ty3 que presentaron plantas resistentes y susceptibles, haya ocurrido un evento de recombinación entre el marcador P6-25 y el gen de resistencia. Las plantas susceptibles en estas dos familias serán utilizadas para determinar el largo de la introgresión y compararlo con la introgresión en el progenitor Gh13. Es de esperarse que la introgresión en las plantas susceptibles F3 que poseen el marcador P6-25 sea menor y que la parte de la introgresión que fue perdida contenga el gen de resistencia.

Debido a que, como se demostró, el marcador P6-25 está efectivamente asociado con el fenotipo resistente, este podría ser utilizado en programas de selección asistida por marcadores para facilitar la selección (o eliminación) de genes de resistencia provenientes de diferentes especies silvestres (Vidavsky et al., 2006).

Tabla 1. Comparación del análisis molecular y los resultados de campo para plantas de las familias F3. Los datos de DSI son un promedio de 15 plantas a los 42 días después del trasplante. Si el DSI fue <2.6 la familia se considera resistente y se le asignó un fenotipo R y si la familia tuvo un DSI >2.6 se designó como S.

Familias F3	Genotipo	DSI	Fenotipo
M82	ty3/ty3	6	S
Gh13	Ty3/Ty3	0.9	R
44	ty3/ty3	4.9	S
46	ty3/ty3	4.1	S
48	ty3/ty3	4.6	S
34	ty3/ty3	4.5	S
40	ty3/ty3	4.1	S
32	ty3/ty3	4.9	S
11	ty3/ty3	3.9	S
49	ty3/ty3	4	S
62	ty3/ty3	4.7	S
55	ty3/ty3	4.8	S
51	ty3/ty3	4.7	S
68	ty3/ty3	4.1	S
64	ty3/ty3	5.1	S
60	ty3/ty3	4.1	S
67	ty3/ty3	4.9	S
61	Ty3/Ty3	1.9	R
56	Ty3/Ty3	1.6	R
10	Ty3/Ty3	1.7	R
18	Ty3/Ty3	1.8	R
25	Ty3/Ty3	1.8	R
4	Ty3/Ty3	1.7	R
52	Ty3/Ty3	1.6	R
57	Ty3/Ty3	1.7	R
1	Ty3/Ty3	1.7	R
46	Ty3/Ty3	1.8	R
39	Ty3/Ty3	3	S
3	Ty3/Ty3	3.2	S

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ji, Y., Solís, M.E., van Bortov, B., Smolke, J., Johnson, E., Martin, C.T., Meek, L., Scott, J.W., Harvey, M.J., and Maxwell, D.P., 2007a. Co dominant SCAR markers for detection of the Ty3 and Ty3-like transposons in tomato. *Tomato Genetics, Crop Genetics and Breeding* 37:2628.

Ji, Y., Solís, M.E., Mariani, P., Galavotti, P., and Maxwell, D.P., 2007b. Sources of Ty3-like transposons, identified as novel insertion of genes, in a line carrying resistance to tomatoes of the tomato yellow leaf curl virus. *Acta Hort.* 753:1023.

Mejía, L., Teni, R., Vidavsky, I., Cornejo, H., Lopez, M., Nakhla, M.K., and Maxwell, D.P., 2007. Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomovirus in Guatemala. *Acta Hort.* 692:211-220.

Maxwell, D. P., and Anderson, P. K., 2001. The emergence and dissemination of whitefly transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:417-441.

Nakhla, M.K., Johnson, A., Mejía, L., Ramirez, P., Kankshakar, J.P., and Maxwell, D.P., 2005. Molecular Characterization of Tomato Infecting Begomovirus in Central America and Development of DNA Based Detection Methods. *Acta Hort.* 695:277-288.

Nakhla, M.K., Solís, M.E., Ramirez, P., Kankshakar, J.P., and Maxwell, D.P., 2005. Molecular Characterization of Tomato Infecting Begomovirus in Central America and Development of DNA Based Detection Methods. *Acta Hort.* 695:277-288.

Vidavsky, P., and Czizonek, M., 1998. Tomato leaf curling virus transmitted by whitefly to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) based transposon insertion. *Phytopathology* 89:1354-4.

Vidavsky, I., Lopez, M., and Cornejo, H., 2006. Use of ty3-like resistance genes to TYLCV in wild species to produce resistant cultivars. *International Horticultural Congress* 1:230.

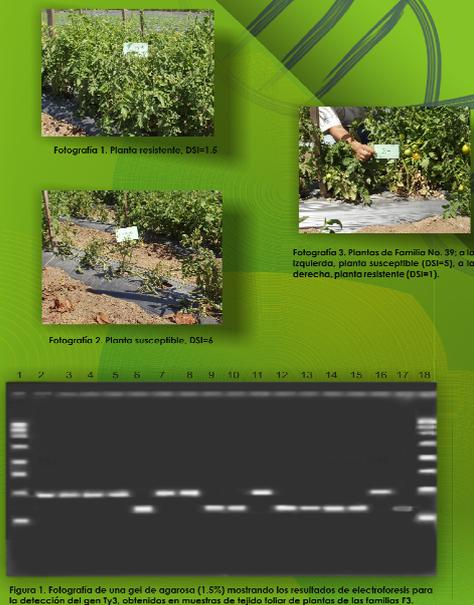


Figura 1. Fotografía de una gel de agarosa (1.8%) mostrando los resultados de electroforesis para la detección del gen Ty3, obtenidos en muestras de tejido foliar de plantas de las familias F3.

Figura 3-1A. Imagen del póster científico "Evaluación de la efectividad genética de un gen de resistencia (Ty3) a Begomovirus en el tomate".

# Desarrollo de marcadores moleculares CAPS y SCAR para la detección de la introgresión del gen I-3 de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3

Ana Cristina Barillas P, Luis Mejía, Amílcar Sánchez Pérez (Facultad de Agronomía, USAC) y Douglas P. Maxwell (Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison).

## INTRODUCCIÓN

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 3 es el patógeno responsable de la marchitez vascular en el tomate. Fue reportado por primera vez en Australia en 1979 (Grattidge et al., 1982) y se considera una enfermedad importante en América, habiendo sido recientemente reportado el Brazzil (Reis et al., 1982). La resistencia a FOL raza 3 fue descubierta en la línea LA716, que tiene una introgresión proveniente de la especie silvestre *Lycopersicon pennellii* (Scott et al., 1989) y el mapeo genético del gen I-3, en el cromosoma 7, indica que el gen se encuentra en un intervalo de 0.3 cM entre los marcadores CT226 y TG572 (Hemming et al., 2004). Se ha reportado el uso del marcador CAPS CT226 para la detección del gen I-3 en programas de mejoramiento genético de tomate en Australia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñaron cebadores a partir de las secuencias de marcadores en la región cromosomal comprendida entre 42 cM y 43.3 cM.

Se evaluaron 52 cebadores utilizando técnicas de PCR y secuenciación. Se seleccionó un par de cebadores potenciales para su uso como marcador tipo CAPS, P7-43BF1/RI, para lo cual se realizaron digestiones, utilizando la enzima de restricción NsiI. También se desarrolló un marcador SCAR a partir del par de cebadores P7-43DF1/RI, del cual se derivó P7-43DF3/RI.

Los marcadores fueron evaluados en ADN de cultivares, líneas, híbridos comerciales e híbridos experimentales con genotipos conocidos para el gen I-3.

## RESULTADOS

### Marcador CAPS P7-43BF1/RI

Se obtuvieron fragmentos de PCR de aproximadamente 730 bp con los distintos genotipos. Como muestra la Figura 1, se compararon las secuencias de M82 (I-3/I-3) y NC-EBR-8 (I-3/I-3) y se encontró un sitio de restricción asociado a un SNP (Polimorfismo de nucleótido simple), correspondiente a la enzima NsiI. La digestión con esta enzima produciría dos fragmentos de 362 y 367 bp para el genotipo resistente y el genotipo susceptible no sería digerido (fragmento de 730 bp). Este marcador fue efectivo para detectar los tres genotipos diferentes (Figura 2).



Figura 1. Composición de secuencias de M82 (I-3/I-3; arriba) y NC-EBR-8 (I-3/I-3; abajo). Fragmentos de PCR con P7-43BF1/RI. Se observa un SNP en el cual se halla el sitio de restricción correspondiente a la enzima NsiI. Los fragmentos de 362 y 367 bp corresponden solamente al genotipo resistente.

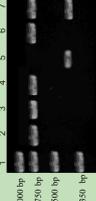


Figura 2. Marcador-CAPS P7-43BF1/RI. Fragmentos de PCR con P7-43BF1/RI. Se muestra el control de M82 (I-3/I-3) (Promega Corp.), Purple Russian (I-3/I-3) (no digerido), Purple Russian digerido, NC-EBR-8 (I-3/I-3) (no digerido), NC-EBR-8 digerido, Híbrido F1 A (I-3/I-3) (no digerido), Híbrido F1 A digerido, Híbrido F1 B (I-3/I-3) (no digerido), Híbrido F1 B digerido, Híbrido F1 C (I-3/I-3) (no digerido), Híbrido F1 C digerido, Híbrido F1 D (I-3/I-3) (no digerido), Híbrido F1 D digerido. Se usó un esperado de heterocigoto como dos bandas de 365 bp/700 bp.

### Marcador SCAR P7-43DF3/RI

Inicialmente, se diseñó el par de cebadores P7-43DF1/RI, los cuales produjeron fragmentos de PCR de 1.060 bp para los genotipos susceptibles y 1.270 bp para los resistentes. Al comparar las secuencias de NC1235 (I-3/I-3) y M82 (I-3/I-3), se encontró una inserción-delección (indel) de 215 bp. Debido a que los fragmentos eran muy largos, se diseñó el primer P7-43DF3 hacia el extremo 5' del indel, para producir fragmentos de PCR de 875 bp para los genotipos resistentes y 650 bp para los susceptibles, al ser utilizado con P7-43DR1 (Figura 3).

Además, se evaluó el par de cebadores en híbridos y líneas endogámicas con el gen de resistencia a I-2 e híbridos comerciales, con y sin la resistencia a FOL raza 3. Los resultados fueron los esperados (Figura 4).

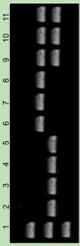


Figura 3. Marcador-SCAR co-dominante P7-43DF3/RI. Cortiles: 1) PCR Marker (Promega Corp.), M82 (I-3/I-3), GM4330 (I-3/I-3), L40 (I-3/I-3), Purple Russian (I-3/I-3), 6) H747 (I-3/I-3), 7) NC-EBR-8 (I-3/I-3), 7) NC-EBR-8 (I-3/I-3), 8) NC1235 (I-3/I-3), 9) Plum Crimson (I-3/I-3), 10) Híbrido F1 A (I-3/I-3).

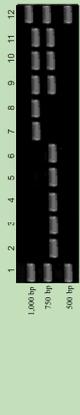


Figura 4. Evaluación de líneas e híbridos comerciales con P7-43DF3/RI. Cortiles: 1) PCR Marker (Promega Corp.), 2) Inred-G-38 (I-3/I-3), 3) G471 (I-3/I-3), 4) G472 (I-3/I-3), 5) Yuma (I-3/I-3), 6) Don Paul (I-3/I-3), 7) NC-EBR-8 (I-3/I-3), 8) NC1235 (I-3/I-3), 9) Plum-Crimson (I-3/I-3), 10) Amella (I-3/I-3), 11) Híbrido F1 A (I-3/I-3), 12) PCR Marker.

De acuerdo con información provista por el Dr. David Jones (com. pers.), se estima que el marcador P7-43DF3/RI esté a menos de 1 cM del gen I-3, por lo que hay ligamiento entre el marcador y el gen. Se concluye que este marcador puede ser utilizado como SCAR codominante para la selección de líneas endogámicas con resistencia a FOL raza 3 en programas de mejoramiento de tomate.

Plant Cell Biology, Research School of Biological Sciences, The Australian National University, Canberra ACT 2601, Australia

Reconocimientos: Este proyecto fue financiado en parte por la Universidad de San Carlos de Guatemala, por el proyecto FODECYT 54-07, otorgado al Dr. Luis Mejía, y por la Universidad de Wisconsin-Madison. Los autores expresan su agradecimiento al J.W. Scott, R. Gardiner, H. Czerny y a las compañías de semillas Harris Horris y GenTropico-Saada, por proveer el germoplasma.

Referencias: Grattidge, R., O'Brien, R.G., 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium wilt* of tomatoes in Queensland. Plant Dis. 66:165-166. Hemming, M.N., Basuki, S., McGrath, D.J., Jones, D.A., 2004. Fine mapping of the tomato I-3 gene for *Fusarium wilt* resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for I-3. Theor. Appl. Gen. 109:409-418. Lin, G.T.T., Wang, G.-P., Hemming, M.N., Basuki, S., McGrath, D.J., Carroll, B.J., Jones, D.A., 2006. Mapping the I-3 gene for resistance to *Fusarium wilt* in tomato: application of an I-3 marker in tomato improvement and progress towards the cloning of I-3. Austral. Plant Pathol. 35:671-680. Reis, A., Costa, H., Boiteux, L.S., Lopes, C.A., 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. Fitopatol. Bras. 30:424-428. Scott, J.W., Jones, J.P., 1989. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. Euphytica 40:49-53.

Figura 3-2A. Imagen del póster científico "Desarrollo de marcadores moleculares CAPS y SCAR para la detección de la introgresión del gen I-3 de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3".



## DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Solanum pennellii* Correll<sup>1</sup>

### "Habit

Spreading perennial herb, woody at the base, to 1 m tall, to 0.4-0.5 m in diameter. Stems 9-12 mm in diameter at base, although with some pith even in larger stems, brittle, yellowish-green, sparsely to densely pubescent, the plants usually glutinous-viscose, the glandular trichomes always present, most frequently simple uniseriate 1-2-celled trichomes with a multicellular glandular head, , sparsely to densely pubescent with 6-8-celled uniseriate simple trichomes 1.5-2.5 mm long, these with a unicellular glandular head in some populations, both lamina surfaces with underlying velvety pubescence of uniseriate simple trichomes to 0.1 mm long.

### Sympodial structure

Sympodial units 2-foliolate; internodes 1-6 cm long.

### Leaves

Leaves interrupted imparipinnate to imparipinnate, (1.5-) 3.5-13 cm long, (1.2-) 2.2-7.5 cm wide, yellowish green, pubescent like the stems, adaxially almost glabrous in some populations, the trichomes only on the veins and margins, abaxially the pubescence more abundant but usually the same as that of the adaxial face; primary leaflets 2-4 pairs, broadly elliptical to orbicular, the base cordate, not markedly oblique, the margins irregularly crenate to occasionally almost entire, the apex rounded; terminal leaflet usually wider than long, 0.8-3 cm long, 0.8-4 cm wide, the petiolule 0.4-1.5 cm long; lateral leaflets 0.5-5 cm long, 0.4-4.5 cm wide, the petiolule 0.15-1 cm long; secondary leaflets absent; tertiary leaflets absent; interjected leaflets few or more usually absent; petiole 0.5-4 cm long; pseudostipules present and well developed on all nodes, 0.5-1 cm long, 0.7-1.5 cm wide, orbicular, the margins crenate.

### Inflorescences

Inflorescences 4-11 cm long, simple or once-branched, with 6-15 flowers, bracteate at all nodes, the bracts 0.2-1.5 cm long, 0.2-1.5 cm wide, the margins crenate, peduncle 1-4 (-7) cm long, pubescent like the stems and leaves. Pedicels 1-2 cm long, articulated at the base. Buds 0.8-1 cm long, 0.4-0.5 cm wide, elongate ellipsoidal, strongly curved, with the corolla exerted more than halfway from the calyx just before anthesis.

### Flowers

Flowers with the calyx tube ca. 0.5 cm long, the lobes 0.4-0.5 cm long, 0.1-0.15 cm wide, triangular to spatulate, pubescent like the rest of the inflorescence, the apex rounded; corolla 2-2.1 cm in diameter, pentagonal and slightly zygomorphic with the upper petal longer, golden yellow, the tube 0.7-0.8 cm long, the lobes 0.6-0.7(-1) cm long, 0.5-0.6(-0.9) cm wide, densely pubescent abaxially with weak uniseriate trichomes, these more abundant on the midveins and lobe tips, the lobes slightly reflexed at anthesis; staminal column absent or only partially coherent with lateral papillae, strongly curved, the filaments less than 0.5 mm long, united into a tube ca. 1 mm long, the anthers 0.6-0.8(-1) cm long, the upper two usually larger and the anther tube curved, the sterile apical appendage absent, the tips of the anthers with a minute deltate appendage distal to the introrse pores; ovary globose, glabrous; style 0.9-1 cm long, ca. 0.5 mm in diameter, curved, finely pubescent in the basal 3/4, exerted 2-3 mm beyond the anthers; stigma large capitate or slightly bifid, green.

### Fruits

Fruit 1-1.3 cm in diameter, globose, 2-locular, green, sparsely to moderately pubescent with uniseriate simple trichomes with 4-celled and 1-celled glandular tips and eglandular trichomes ca. 0.5 mm long; fruiting

---

<sup>1</sup> Extraído de Peralta et al., 2007.

pedicels 2-2.5 cm long, straight or slightly bent at the articulation; calyx lobes in fruit 0.9-1 cm long, 0.2-0.5 cm wide, spreading.

### Seeds

Seeds 1.4-2.4 mm long, 0.7-1.2 mm wide, 0.5-0.6 mm thick, obovate, pale brown, pubescent with hair-like outgrowths of the lateral testa cell walls, which give a silky appearance to the surface, narrowly winged (0.2 mm wide) at the apex and acute at the base.

### Chromosome number

n = 12 voucher: LA0716 (TGRC)

### Distribution

Northern Peru (Piura) to northern Chile (Tarapaca) in dry rocky hillsides and sandy areas from sea level to 3000 m.

### Phenology

*Solanum pennellii* flowers and fruits sporadically throughout the year in response to moisture, but a flowering peak occurs in October-November, during the wet, foggy season on the coast.

### Phylogeny

*Solanum pennellii* is a member of the Potato clade (sensu Weese & Bohs, 2007); within the tomatoes and wild relatives it is the sole member of the "Neolycopersicon group" and is a member of section *Lycopersicon*.

### Commentary

*Solanum pennellii*, with its compound leaves with almost orbicular leaflets and anther cones (tubes) with lateral hairs connecting the anthers but without a sterile apical appendage, is easy to distinguish from all other tomato relatives. Carrizo García (2003) recognized *S. pennellii* in the genus *Solanum*, and the other species of sect. *Lycopersicon* in the genus *Lycopersicon* due to this anther difference. In contrast, D'Arcy (1972) placed *S. pennellii* in *Lycopersicon*. The spatulate calyx lobes and slightly zygomorphic flowers are also unique (in the tomatoes) in *S. pennellii*. Despite these distinctive characteristics, specimens of *S. pennellii* can be confused with *S. corneliomulleri*, especially when sterile or in fruit. *Solanum pennellii* never has the long glandular trichomes characteristic of *S. corneliomulleri*, but instead has shorter, stickier pubescence. Pubescence morphs in *S. pennellii* have been described as subspecific taxa, but the differences are not consistent either geographically or in terms of habitat, suggesting the trait is of little taxonomic importance. Interestingly, in more pubescent individuals of *S. pennellii*, this increase in pubescence extends to the anthers (interlocking papillae) and may be of interest in further investigations of anther morphology in the groups (see Glover et al. 2004).

*Solanum pennellii* is an important component of the lomas vegetation of the west coast of South America in the desert regions, but also occurs in dry valleys along the western Andean slope. Blooming times of populations in the lomas and in other habitats appear to differ, with lomas populations blooming in September to November, coinciding with the foggy season on the Peruvian coast."

## EJEMPLO DE DISEÑO DE CEBADORES

- PASO 1: Se obtuvo la secuencia del marcador COSII C2\_At3g21820 (Figura 2-3a).
- PASO 2: Se buscaron secuencias homólogas en la base de datos de GenBank<sup>1</sup>. Se seleccionó la secuencia de *Vitis vinifera* (AM482072<sup>2</sup>).
- PASO 3: Como se muestra en la Figura A1, se diseñaron dos cebadores delanteros sobre la secuencia conservada de un exón y dos cebadores reversas sobre la secuencia de otro exón, de tal manera se amplificara un intrón. Los cebadores del primer par se muestran resaltados con color celeste y los del segundo par con color amarillo.

### PAR #1:

- P7-43F1: AGGGGTTTATGCTGAGACGGATTTC AAAGAAG
- P7-43R1: TTTTGAAGGGCTAGAAGAACATTCTCC

### PAR #2

- P7-43F1: GTGCCCAACATCCTTCAAATAAG
- P7-43R1: GAACAATGACTCGACCACATCCTTA

---

<sup>1</sup>GenBank, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

<sup>2</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

```

emb|AM482072.1| D Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence,
contig VV78X133267.12,
clone ENTAV 115
Length=44451

alignments for this subject sequence by:
Sort
E value
Score Percent identity Query
start position Subject start position

Score = 80.6 bits (88), Expect = 8e-12
Identities = 71/90 (78%), Gaps = 0/90 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 274
AGGGGTTTATGCTGAGACGGATTTCAAAGAAGAGGACCTTGTCTTGAAGGATCAAATGCT 333
|||||
Sbjct 41141
AGGYGTCTATGCGGACTCGGATTTTGGAGAAGGRGAGCTTGTCTSTAAAGACCAAATGCT 41200

Query 334 TGCTGTGCCCCAACATCCTTCAAATAAGGT 363
| |||||
Sbjct 41201 AGTGGGTGCTCAACATTCTTCAAATAAGGT 41230

Score = 60.8 bits (66), Expect = 7e-06
Identities = 68/92 (73%), Gaps = 0/92 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 366
ACTGCTTGGTATGTAGTTATGTTTCTGCTTTGTTGGGTCTATAGAGCTTCAAATTGGGA 425
|||||
Sbjct 41335
ACTGTTTAGTGTGTAGCTTCTGTTTCCRTTTTATTGGCTCCATAGAACTTCAAATTGGAA 41394

Query 426 GGAAGCTATATTTAGAACAGCTGGGTGTCTCC 457
||| |||||
Sbjct 41395 GGAGACTCTATTTGCAAGGTCTAGGTGTTTCC 41426

Score = 69.8 bits (76), Expect = 1e-08
Identities = 92/129 (71%), Gaps = 0/129 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 499
TGATTCATCTGTTGGTGAAGATGATTCTGATGTAGAAGATCAGCAAGTATCTGGAGAATG 558
|||||
Sbjct 41486
TGATTCATCTGAGGATGAAGACAATTGTTACATGGAAGAKCATGATGAATTGGGAGAATG 41545

Query 559
TTCTTCTAGCCCTTCAAAAATAAAAATTTCTCTCCCTAAGGATGTGGTTCGAGTCATTGTT 618

```

Figura A1. Cebadores diseñados a partir de la secuencia de *Vitis vinifera* (AM482072<sup>1</sup>).

<sup>1</sup> Código de acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

## SECUENCIAS DE ADN DE PRODUCTOS DE PCR

### SECUENCIAS OBTENIDAS CON PTG183F1/R2

#### Purple Russian, i3/i3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926657

```

1      CAATTTACTC TTATTGAAAA ATTGTATAGA GGTAAGCCTA ATGGATGAGA TGAGGGGAAGT
61     CTTATTAGAC AACTTCAGTT GATTGGGTAT GTGAAGATTG CTATCAACAT GTCTACTTAG
121    ATTTCACTAA TGAGGTGGAC TATAACCATG TTCTCTCTAA AGAATTTGTG GAAATTTGATA
181    AATACCCTAT GAAAATACTC AAGTGGATTG CGAATTTCAA ACTGGATGAG GAAACATCTA
241    TAGCCCCTGT GTGGATTCTA GTCCATCAAT TACCATGGCA TCTATTCAAG TGGCGTATCA
301    TCTCCAAATT AGTAAGTCTT GTGGTAATGT TGCTAAAGTT AAGGTCAAAA TAGATCTACT
361    TAAACGAAGA TCAGATAAAA ATCTGGTTAG TATTTCATAG ATTGGATGGG TCTGAAGATG
421    CTAGGTGGCT AAAAAAAGT ATGAAAAAGT ACAAAGTTAT AGTCTTTATF GCAATATCCA
481    AGGCCATCTC GAATCTCAAT GCAGAAACAA AGCAAGGGAC GACAAAGTTA AAGCTCAAAA
541    GGAAGAACAT AACATGAAAG AAACAGAAAT GATCAGACAA TGGTTATTCC TTTGTTTGGG
601    TTGTGGCATA TAATGAGAGT TCACAAGCCT CATCTTTTCA CCTCTTCTAT CATTTGAGACA
661    AAAATTCCTT TCAAGATATC ATCTGTTATG CTTAGATGCT GGAAAAATAA ATTCCATACAG
721    ATGTTGCTCT CAAAAAACTG GAAGTTCCTA TCCCCTCAAT ACTCATGCAG ACGAAACTAC
781    TATGCATTTT TTTGGTAGTA GTCAGATTGC TTATCAAGTT TGGTCTTACT TTTGTTCAAG
841    TTGTGGCGTC CCTCTTAAAT TTGGCAACAT TAGAAAAATC GTTTTGTCTT GTGGCTTGCT
901    AAAACTAAGA ATAAGATTCA CAAAGCTTTC ATACAATGTT TGCCTACTAT AATTAGCTGG
961    CGAATTTGGA AGAGTTAGTA GATATAGTGC TAGATTTGAT AATACGTGAG ATGTCTGCTA
1021   ACTTTATTAG TAAACAGGTG ACCAAGAAAA TGCATATGTC CTTCAACAGC TTCTC

```

#### NC EBR-8, I3/I3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926656

```

1      GCCAGCNTGC AATTTACTCT TATTGAAAAA TTGTATAGAG GTAAGCCTAA TGGATGAGAT
61     GAGGGAAGTC TTATTAGACA ACTTCAGTTG ATTGGGTATG TGAAGATTGC TATCAACATG
121    TCTACTTAGA TTTCACATAAT GAGGTGGACT ATAACCATGT TCTCTCTAAA GAATTTGTGG
181    AAATTGATAA ATACCCTATG AAAATACTCA AGTGGATTGC GAATTTCAA CTGGATGAGG
241    AAACATCTAT AGCCCCTGTG TGGATTCTAG TCCATCAATT ACCATGGCAT CTATTCAAGT
301    GGCGTATCAT CTCCAAATTA GTAAGTCTTG TGTAATGTT GCTAAAGTTA AGGTCAAAAT
361    AGATCTACTT AAACGAAGAT CAGATAAAAA TCTGGTTAGT ATTTCATAGA TTGGATGGGT
421    CTGAAGATGC TAGGTGGCTA AAAAAAAGTA TGAAAAAGTA CAAAGTTATA GTCTTTATTG
481    CAATATCCAA GGCCATCTCG AATCTCAATG CAGAAACAAA GCAAGGGACG ACAAAGTTAA
541    AGCTCAAAAG GAAGAACATA ACATGAAAGA AACAGAAATG ATCAGACAAT GGTTATTCCCT
601    TTGTTTGGAT TGTGGCATAT AATGAGAGTT CACAAGCCTC ATTCTTTTAC CTCTTCTATC
661    ATTTGGACAA AAATTCCTTT CAAGATATCA TCTGTTATGC TTAGATGCTG GAAAAATAAA
721    TTCATACAGA TGTTGCTCTC AAAAAACTGG AAGTTCCTAT CCCCTCAATA CTCATGCAGA
781    CGAAACTACT ATGCATTCTT TTGGTAGTAG TCAGATTGCT TATCAAGTTT GGTCTTACTT
841    TTGTTCAAGT TGTGGCGTCC CTCTTAAATT TGGCAACATT AGAAAAATCG TTTTGTCTTG
901    TGGCTTGCTA AACTAAGAA TAAGATTAC AAAGCTTTCA TACAATGTTT GCCTACTATA
961    ATTAGCTGGC GAATTTGGAA GAGTTAGTAG ATATAGTGCT AGATTTGATA ATACGTGAGA
1021   TGTCTGCTAA CTTTATTAGT AAACAGGTGA CCAAGAAAAT GCATATGTCC TTCAACAGCT
1081   TC

```

NC123S, I3/I3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: FJ004839

```

1      GCCCAGATGC AATTTACTCT TATTGAAAAG TTGTATAGAG GTAAGCCTAA TGGATGAGAT
61     AAGGGAAGTC TTATTAGACA ATTTTCAGTTG ATTGGGTATG TGAAGATTGC TATCAACATG
121    TCTACTTAGA TTTCACATAAT GAGGTGGACT ATAACCATGT TCTCTCTAAA AAATTTGTGG
181    AAATTGATAA ATACCCTATG AAAATACTCA AGTGGATTGC GAATTTCAA CTGGATGAGG
241    AAACATCTAT AGCCCCTGTG TGGATTCTAG TCCATCAATT ACCATGGCAT CTATTCAAGT
301    GGCATATCAT CTCCACGTTA GTAAGTCTTG TGGTAATGTT GCTAAAAGTTA AGGTCAAAAT
361    AGATCTACTT AAACGAAGAT CAGATAAAAT CTGGTTAGCA TTTCATAGAT TGGATGGGTC
421    TGAAGATGCT AGGTGGCTAA AAAACATCTA TAGCCCCTCA ATGTGTTCTT GCTGCAATAC
481    TCATGTTGAC GAAACTACTA TGCATTTCTT TGGTAGTAGT CAGATTGCTT ATCAAGTTTG
541    GTCCTACTTT TGTTCAGTTT GTGGAGTCCC TCTTAAATTT GGCAACATTA GAAAAATCGT
601    TTTGTCTTGT GGCTTGCTAA AACTTAGAAT AAGATTCACT TTGCCTACTA TAATTAGCTG
661    GCGAATTTGG AAGAGTTAGT AGATATAGTG CTAGATTTGA TAATACTAAG ATGTCTGCTA
721    ACTTTATTAG TAAACAGGTG ACCAAGACAA TGCATATGTC CTTCAACAGT CTTTTTCTAT
781    CTTTAACACT CTTCTTGAAC GGCACG

```

Comparación de secuencias (3'-5') de Purple Russian (arriba) con NC EBR-8 (medio) y NC123S (abajo)

```

PURPLE_RUSSIAN . . . . .CAATTTACTCTTATTGAAAAATTGTATAGAGGTAAGCCTAATGGATGAGAT 51
NC EBR-8       GCCCAGATGCAATTTACTCTTATTGAAAAATTGTATAGAGGTAAGCCTAATGGATGAGAT 60
NC123S        GCCCAGATGCAATTTACTCTTATTGAAAAATTGTATAGAGGTAAGCCTAATGGATGAGAT 60
Consensus     caatTTactcttattgaaaa ttgtatagaggtaagcctaattggatgagat

PURPLE_RUSSIAN GAGGGAAGTCTTATTAGACAACCTTCAGTTGATTGGGTATGTGAAGATTGCTATCAACATG 111
NC EBR-8       GAGGGAAGTCTTATTAGACAACCTTCAGTTGATTGGGTATGTGAAGATTGCTATCAACATG 120
NC123S        AAGGGAAGTCTTATTAGACAATTTTCAGTTGATTGGGTATGTGAAGATTGCTATCAACATG 120
Consensus     aggggaagtcttattagacaa ttcagttgattgggtatgtgaagattgctatcaacatg

PURPLE_RUSSIAN TCTACTTAGATTTCCTAATAAGGTTGGACTATAACCATGTTCTCTCTAAAGAATTTGTGG 171
NC EBR-8       TCTACTTAGATTTCCTAATAAGGTTGGACTATAACCATGTTCTCTCTAAAGAATTTGTGG 180
NC123S        TCTACTTAGATTTCCTAATAAGGTTGGACTATAACCATGTTCTCTCTAAAGAATTTGTGG 180
Consensus     tctacttagatttcactaataaggttggactataaccatgttctctctctaaa aatTTgtgg

PURPLE_RUSSIAN AAATTGATAAATACCTATGAAAATACTCAAGTGGATTGCGAATTTCAAACCTGGATGAGG 231
NC EBR-8       AAATTGATAAATACCTATGAAAATACTCAAGTGGATTGCGAATTTCAAACCTGGATGAGG 240
NC123S        AAATTGATAAATACCTATGAAAATACTCAAGTGGATTGCGAATTTCAAACCTGGATGAGG 240
Consensus     aaattgataaatacctatgaaaatactcaagtggattgccaatttcaaactggatgagg

PURPLE_RUSSIAN AAACATCTATAGCCCCTGTGTGGATTCTAGTCCATCAATTACCATGGCATCTATTCAAGT 291
NC EBR-8       AAACATCTATAGCCCCTGTGTGGATTCTAGTCCATCAATTACCATGGCATCTATTCAAGT 300
NC123S        AAACATCTATAGCCCCTGTGTGGATTCTAGTCCATCAATTACCATGGCATCTATTCAAGT 300
Consensus     aaacatctatagcccctgtgtggattctagTccatcaattaccatggcatctattcaagt

PURPLE_RUSSIAN GCGTATCATCTCCAAATTAGTAAGTCTTGTGGTAATGTTGCTAAAGTTAAGGTCAAAT 351
NC EBR-8       GCGTATCATCTCCAAATTAGTAAGTCTTGTGGTAATGTTGCTAAAGTTAAGGTCAAAT 360
NC123S        GCGTATCATCTCCAAATTAGTAAGTCTTGTGGTAATGTTGCTAAAGTTAAGGTCAAAT 360
Consensus     ggc tATcatctcca ttagtaagtcttgtggtaatgttgctaaagTTAaggtcaaaat

PURPLE_RUSSIAN AGATCTACTTAAACGAAGATCAGATAAAAAATCTGGTTAGTATTTTCATAGATTGGATGGGT 411
NC EBR-8       AGATCTACTTAAACGAAGATCAGATAAAAAATCTGGTTAGTATTTTCATAGATTGGATGGGT 420
NC123S        AGATCTACTTAAACGAAGATCAGAT.AAAATCTGGTTAGTATTTTCATAGATTGGATGGGT 419
Consensus     agatctacttAAACgaagatcagat aaaaatctggttag atttcatagattggatgggt

PURPLE_RUSSIAN CTGAAGATGCTAGGTGGCTAAAAAAAGTATGAAAAAGTACAAAGTTATAGTCTTTATTG 471
NC EBR-8       CTGAAGATGCTAGGTGGCTAAAAAAAGTATGAAAAAGTACAAAGTTATAGTCTTTATTG 480
NC123S        CTGAAGATGCTAGGTGGCTAAAAAAAGTATGAAAAAGTACAAAGTTATAGTCTTTATTG 459
Consensus     ctgaagatgctaggtggctaaaaaa a a t

```

PURPLE_RUSSIAN	CAATATCCAAGGCCATCTCGAATCTCAATGCAGAAACAAAGCAAGGGACGACAAAGTTAA	531
NC EBR-8	CAATATCCAAGGCCATCTCGAATCTCAATGCAGAAACAAAGCAAGGGACGACAAAGTTAA	540
NC123S	.....	459
Consensus		
PURPLE_RUSSIAN	AGCTCAAAGGAAGAACATAACATGAAAGAAACAGAAATGATCAGACAATGGTTATTCTCT	591
NC EBR-8	AGCTCAAAGGAAGAACATAACATGAAAGAAACAGAAATGATCAGACAATGGTTATTCTCT	600
NC123S	.....	459
Consensus		
PURPLE_RUSSIAN	TTGTTTGGATTGTGGCATATAATGAGAGTTCACAAGCCTCATTCTTTACCTCTTCTATC	651
NC EBR-8	TTGTTTGGATTGTGGCATATAATGAGAGTTCACAAGCCTCATTCTTTACCTCTTCTATC	660
NC123S	.....	459
Consensus		
PURPLE_RUSSIAN	ATTTGGACAAAAATTCCTTTCAAGATATCATCTGTTATGCTTAGATGCTGGAAAATAAAA	711
NC EBR-8	ATTTGGACAAAAATTCCTTTCAAGATATCATCTGTTATGCTTAGATGCTGGAAAATAAAA	720
NC123S	.....	459
Consensus		
PURPLE_RUSSIAN	TTCATACAGATGTTGCTCTCAAAAACTGGAAGTTCCTATCCCCTCAATACTCATGCAGA	771
NC EBR-8	TTCATACAGATGTTGCTCTCAAAAACTGGAAGTTCCTATCCCCTCAATACTCATGCAGA	780
NC123S	.....AATGTGTTCTTGCTGCAATACTCATGTTga	489
Consensus	aa t t t c caatactcatg ga	
PURPLE_RUSSIAN	CGAAACTACTATGCATTTCTTTGGTAGTAGTCAGATTGCTTATCAAGTTTGGTCTTACTT	831
NC EBR-8	CGAAACTACTATGCATTTCTTTGGTAGTAGTCAGATTGCTTATCAAGTTTGGTCTTACTT	840
NC123S	CGAAACTACTATGCATTTCTTTGGTAGTAGTCAGATTGCTTATCAAGTTTGGTCTTACTT	549
Consensus	cgaaactactatgcatttctttggtagtagtcagattgcttatcaagtttggcttactt	
PURPLE_RUSSIAN	TTGTTCAAGTTGTGGCGTCCCTCTTAAATTTGGCAACATTAGAAAAATCGTTTTGTCTTG	891
NC EBR-8	TTGTTCAAGTTGTGGCGTCCCTCTTAAATTTGGCAACATTAGAAAAATCGTTTTGTCTTG	900
NC123S	TTGTTCAAGTTGTGGAGTCCCTCTTAAATTTGGCAACATTAGAAAAATCGTTTTGTCTTG	609
Consensus	ttgttcaagttgtgg gtcctctttaaatttggcaacattagaaaaatcgtttvtgcttg	
PURPLE_RUSSIAN	TGGCTTGCTAAAACTAAGAATAAGATTACAAAGCTTTTCATACAATGTTTGCTACTATA	951
NC EBR-8	TGGCTTGCTAAAACTAAGAATAAGATTACAAAGCTTTTCATACAATGTTTGCTACTATA	960
NC123S	TGGCTTGCTAAAACTTAGAATAAGATTAC.....TTTGCTACTATA	652
Consensus	tggcttgctaaaaact agaataagattcac tttgcctactata	
PURPLE_RUSSIAN	ATTAGCTGGCGAATTTGGAAGAGTTAGTAGATATAGTGCTAGATTTGATAACTAAGAT	1011
NC EBR-8	ATTAGCTGGCGAATTTGGAAGAGTTAGTAGATATAGTGCTAGATTTGATAACTAAGAT	1020
NC123S	ATTAGCTGGCGAATTTGGAAGAGTTAGTAGATATAGTGCTAGATTTGATAACTAAGAT	712
Consensus	attagctggcgaatttggaagagttagtagatatagtgctagatttgataactaagat	
PURPLE_RUSSIAN	GTCTGCTAACTTTATTAGTAAACAGGTGACCAAGAAAAATGCATATGTCCTTCAACAG...	1068
NC EBR-8	GTCTGCTAACTTTATTAGTAAACAGGTGACCAAGAAAAATGCATATGTCCTTCAACAG...	1077
NC123S	GTCTGCTAACTTTATTAGTAAACAGGTGACCAAGAACAAATGCATATGTCCTTCAACAGTCT	772
Consensus	gtctgctaactttattagtaaacaggtgaccaaga aatgcatatgtccttcaacag	
PURPLE_RUSSIAN	.....	1068
NC EBR-8	.....	1077
NC123S	TTTTCTATCTTAACTCTTCTTGAACGGCACG	806
Consensus		



241 ACTATTTATGAACTATATCTTTTCTGCTAGTGAATCTGAAAGATAAATCATGTTTCTTTA  
 |||  
 241 ACTATTTATGAACTATATCTTTTCTGCTAGTGAATCTGAAAGATAAATCATGTTTCTT.A

301 AATGTATAGGGATCCAATTCCAGTTCCTGAGAAAAGTACGTAAGCCCCTCACTCAAGTTCA  
 |||  
 300 AATGTATAGGGATCCAATTCCAGTTCCTGAGAAAAGTACGTAAGCCCCTCACTCAAGTTCA

361 GGAATTTAATCTACACGTAGATCATCGTGCACCAGATAGAGCTGAGTTTGATAAGAAGGT  
 |||  
 360 GGAATTTAGTCTACACGTAGATCATCGTGCACCAGATAGAGCTGAGTTTGATAAGAAGGT

421 AAAACTTTTTGTCAATGGCGTACCCTTTCTCTGAGAAGCCTATTATAGCCACACTCACT  
 |||  
 420 AAACTTTTTGTCAATGGCGTACCCTTTCTCTGAGAGGCCTATTATAGCCACACTCACT

481 CATATTATAAGCTGTTGTGCAGATTAAGGAGAAAGAAATGATGTATCAAAAATACAGAGA  
 |||  
 480 CATATTATAAGCTGTTGTGCAGATCAAGGAGAAAGAAATGATGTATCAAAAATACAGAGA  
 Sitio de restricción - AG/CT

541 GGAGGCAGAAACTGCAAGATTGGTATGCATATTAATAAATATGGTGTATTTCGAGC  
 |||  
 540 GGAGGCAGAAAGCTGCAAGATTGGTATGCATATTA...TAACTATGGTGTATTTCGAGC

601 ACCGCTAATGATATGATTAGACTAATTCTCTAATGGTGGTTAGATGGAAGAAAGAGCTGG  
 |||  
 597 ACCGCTAATGATATGATTAGACTAATTCTCTAATGGTGGTTAGATGGAAGAAAGAGATGG

661 CCCTGAAACAACCTACGAAAACCTTGGTGCCTCATGCAAGACCTTTGCCTAAATTTGATC  
 |||  
 657 CCCTGAAACAACCTACGAAAACCTTGGTGCCTCATGCAAGACCTTTGCCTAAATTTGATC  
 Sitio de restricción - AG/CT

721 ATCCTTTCCTGCCACAAAAGTAAGAATAA.....TTCTTTGTTTTTCTTTTAC  
 |||  
 717 ATCCTTTCCTGCCACAAAAGTAAGAATAATTCAAGCTGCTACTCTTTGTTTTTCTTTTAC

769 ATAAT.TGGAATTTGGAACAACCTACTGAAACT  
 |||  
 777 ATAATATGGAATTTGGAACAACCTACTGAAACT

## SECUENCIAS OBTENIDAS CON P7-43BF1/R1

### M82, i3/i3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926651

```

1      CAGTCATTAT TAACAAATTT CAGGATCGTG ATTACAATCG TGTGAACTAC ACTCTTGTAT
61     CATATGTTAT TCATGACAGC ACAGGCTGTC CTATTTATAG TCCCTTGCAT CAAACTGTCTG
121    TAGCCATGGT TGCTGCAGCC TATGACGCGA TAAACCTTGA GCAGCACTCT GGTGCACATC
181    CTCGCCTTGG CGTTGTGGAT GACATTCTCA TTCATCCATT AGCGCGAGCT TCACTGGATG
241    AAGCTTCTTG GCTTGCTAAA AAGATTGCAG CTGATATTGG AAACCGGTTT CAAGGTTAGT
301    AAAAAGTTTG TAACTTTAAA TGACTTCTTC TTTTCTATCA TGTGATGTGC TGTACTGACT
361    TGAAAATGCA AAACGAACCG GTTTTAGAGC TCAAAGTATG TGTATATATG AAAAACTTTT
421    TGCACGCCGT TCTTGACTTT ACATTCTTGA TTCGCCTCTG AATACAGTAC CTGTTTATTT
481    ATATGCTGCT GCTCACCCAA TGGGGAAAGC ACTGGACACC ATAAGGAGGG AGCTAGGTTA
541    TTACCGGCC TAACTTCAGGG GCATCCAATG GGCAGGGTGG GCTCAACCAG AGCAGGTCTC
601    GGTCAAACCT GATGAAGGTC CAGAGGTGGT GTCTCGTGCT AGAGGTGTCTG TGATGATTGG
661    AGCTCATAAA TGGGTAGCAA TGTACAACAT CCCAATAATG TCCACGGATC TCTCAGCTGC
721    TAGACGTATT GCTCAGA

```

### NC EBR-8, I3/I3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926652

```

1      CAGTCATTAT TAACAAATTT CAGGATCGTG ATTACAATCG TGTGAACTAT ACTCTTGTAT
61     CATATGTTAT TCATGACAGC ACAGGCTGTC CTATTTATAG TCCCTTGCAT CAAACTGTCTG
121    TAGCCATGGT TACTGCAGCC TATGACGCGA TAAACCTTGA GCAGCACTCT GGTGCACATC
181    CTCGCCTTGG CGTTGTGGAT GACATTCTCA TTCATCCATT AGCGCGAGCT TCACTCGATG
241    AAGCTTCTTG GCTTGCTAAA AAGGTTGCAG CTGATATTGG AAACCGATTT CAAGGTTAGT
301    AAAAAGTTTG TAACTTTAAA TGACTTCTTC TTTTCTATCA TGTGATGTGC TGTACTGACT
361    CATAACGAAC CGGTTTTAGA GCTCAAAGTA TGTGTATATA TGAAAAAACT TTTGCACGCC
421    GTTCTTGACT TTAAATCTTT GATTTCGCCTC TGAATACAGT ACCTGTTTAT TTATATGCTG
481    CTGCTCACCC AATGGGAAAA GCACTGGACA CCATAAGGAG GGAGTTAGGC TATTACCGGC
541    CTAACCTCAG GGCATTCAA TGGGCAGGGT GGGTCAACC AGAGCAGGTC CCGGTCAAAC
601    CTGATGAAGG TCCAGAGGTG GTGTCTCGTG CTAGAGGTGT CGTGATGATT GGAGCTCATA
661    AATGGGTAGC AATGTACAAC ATCCAATAA TGTCCACGGA TCTCTCAGCT GCTAGACGTA
721    TTGCTCAGA

```

### Comparación de secuencias (3'-5') de M82 (arriba) con NC EBR-8 (abajo)

```

1      CAGTCATTATTAACAAATTTTCAGGATCGTGATTACAATCGTGTGAACTACACTCTTGTAT
1      CAGTCATTATTAACAAATTTTCAGGATCGTGATTACAATCGTGTGAACTATACTCTTGTAT

61     CATATGTTATTCATGACAGCACAGGCTGTCTATTTATAGTCCCTTGCATCAAAACTGTCTG
61     CATATGTTATTCATGACAGCACAGGCTGTCTATTTATAGTCCCTTGCATCAAAACTGTCTG

121    TAGCCATGGTTGCTGCAGCCTATGACGCGATAAACCTTGAGCAGCACTCTGGTGCACATC
121    TAGCCATGGTACTGCAGCCTATGACGCGATAAACCTTGAGCAGCACTCTGGTGCACATC

181    CTCGCCTTGGCGTTGTGGATGACATTCTCATTTCATCCATTAGCGCGAGCTTCACTGGATG
181    CTCGCCTTGGCGTTGTGGATGACATTCTCATTTCATCCATTAGCGCGAGCTTCACTCGATG

241    AAGCTTCTTGGCTTGCTAAAAAGATTGCAGCTGATATTGAAACCGGTTTCAAGGTTAGT
241    AAGCTTCTTGGCTTGCTAAAAAGGTTGCAGCTGATATTGAAACCGATTTCAAGGTTAGT

301    AAAAAGTTTGTAACTTTAAATGACTTCTTCTTTTCTATCATGTGATGTGCTGTACTGACTGACT
301    AAA.....AACTTTAAATGACGACTTCTTTTCTATCATGTGATATGATGTACTGACTGACT

```



## SECUENCIAS OBTENIDAS CON P7-43DF1/R1

### M82, i3/i3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926653

```

1      GGTAAGAGA TCGATGATT ATGTGGAGGT GATGTGTGGG TGTACAAGCC ATCGATATGG
61     TGATGCTGTT GCTAGACTTA GGGTTTTCTC GTCTGGTGAA CTGAAATCA CCTGTGAATG
121    TACTCCTGGA TGCACTGAAG GTTTTTTTTT TTAACAAACT TTAGATCAA TGGGGGTTTG
181    CGTCAAATGC ATGTTGTTTC TGGGGTTTAT TCTATCGTCG ACTCTGTGTT TGATTATATG
241    GTAACATTTT ATGTGTATGT AAGTTTGCC T CAGAGAGCAT AGTTTCTGCT TCTGTGGTAG
301    TGTGTGTTCT TTGGTGTGTT GTGTTGAAGT TCTTGATGTT TCTTTGGCAA TTTTGTGCGT
361    CTCTTGTCOA CCTTACCTTG CGTACATTCT ATGTCTCAAG ACTCCACTTT GTGAAATTAC
421    ACGGGATATG TTATTGATAA GCATGTCAAC AAAGGTAGAA ATACATTGTG TGTTCGTTAT
481    GTGATAATGG TTCTTTGAAG GCAGGTTTGT TTGTTAAGA CTCTTGACCT TTGATGCAGA
541    GTTAGAGTTC TGTGTTGTTT TTCTTCAAAG CATCACTTTT GATGGTATCA TCTTATGCTA
601    AACAACTCAT TGGTCTACC ATTTCTACAA CTTGGCCATG ACAACTTTT GAAAACCATC
661    AACTCTTAAT TAATAAATGT TTATCGTGGG GCTTGTGCAG TGTTTTTGGT TGAATATTTA
721    GCTGTGATAT CAAAAGAAAT CTTATACTAT CACTCACCAG ATCTCTCGA CAGCATTTGT
781    TGTCAGAGCA TATTTCTCTT TTTAATCATT CACTATGTAT CCTCCTGGT TCCTCCTTTC
841    TTTATATTTT ACAATCATAA GCCACAAAGA ATCGATTTTG TACTTGATAA AATAACACCC
901    CACAGAAAGA ATTATCTGAT AAAGTAAAT AAGTCCTACC ACTTGACTT GTGCTACTTA
961    ACAAGAGTCT CTTTTTTCAC TGTCTGGAAT GTAGATAGTC AGCTTCTTAG TTGTTAATAC
1021   TTCTTGATG TCAATGGTGA TAAAGTTCTT GTGGTAAAGA C

```

### NC123S, I3/I3 (Secuencia parcial; 3'-5')

CÓDIGO DE ACCESIÓN EN GENBANK: EU926654

```

1      GGTAAGAGA TCGATGATT ATGTGGAGGT GATGTGTGGG TGTACAAGCC ATCGATATGG
61     TGATGCTGTT GCTAGACTTA GGGTTTTCTC GTCTGGTGAA CTGAAATCA CCTGTGAATG
121    TACTCCTGGA TGCACTGAAG GTTTTCTTTT TTTAACAAC TTAGATCAA ATGGGGGTTT
181    CCGTCAAATG CATGTTGTTT GTGGGTTTTA TTCTATCGTC GACTCTGTGT TTGATTATG
241    TGTAACATTT TATGTGTATG TAAGTTTGCC TCAGAGAGCA TAGTTTCTGC TTCTGTGGTA
301    CTGTGTGTTT TTTGGTGTG TGTGTTGAAG GTCTTGATGT TTCTATGGCA ATTTTGTGCG
361    TCTCTTGTC ACCTTACCTT GCGTACATTC TATCATCTCC AGACTCCACT TGTGAGATTA
421    CACGGGATAT GTTGTGATA AGCATGTCAA ACAAGGTAG AAATACATT TGTGATAATG
481    GTTCTTTGAA GGCAGGTTA GTTGTTTAAG ACTCTGCTT GACCTTTGAT GCAGAGTTAG
541    AGTTCTGTTT GATTTTTCTT CAAAGCATCA CTTTTGATGG TATCAACTTA TGCTAAACAA
601    CTCATTGGTT CTACCATTT TACAACCTTG CCATGGCAAC TTTTGTAAAA CTATCAACTC
661    TTAATTAATT AATGTTTATC GTGGGGCTTG TGCAGTGTTT TTGGTTGAAT ATTTAGCTGT
721    GATATCAAAA GAAATCTTAT ACTATCACTC ACCAGATTCT CTCGACAGCA TTTGTTGTC
781    GAGCATATTT CTCTTTTAA TCATTCACTA TGTATCCTCT TGGTTTCCTC CTTTCTTTAT
841    ATTTTACAAT CATAAGCCAC AAAGAATCGA TTTTGTACTT TGATAAATA ACACCCACA
901    GAAAAAATTA TCGATAAAG TAAATTAAGT CCTACCACTT GTACTTGTGC TACTTAACAA
961    GAGTCTCTTT TTTCTCTGTC TGGAAATGTAG ATAGTCAGCT TCTTAGTTGT AAATACTTCT
1021   TGTATGTGCT GTAAAAATGA GTGGAGAGTT AATGGAACGT GTTATGTGA ATCTGATGCT
1081   ATATTTCTCT CTCTTTTACA TTATTTTATA GTCTTGTGTT GCATTGTGAT CCTATTAAGA
1141   GTTTTGTGTT TTGTGAACAG ACAAGCTTAC TCCGTCTGCA TTTGAGAAGC ATTCTGGGAG
1201   AGAAACTGCT AGGAAATGGA AAAATAATGT ATGGATCATT GTCAATGGTG ATAAAGTTCC
1261   TGTGTTAAAG AC

```

### Comparación de secuencias (3'-5') de M82 (arriba) con NC EBR-8 (abajo)

```

M82_P7-43DF1      GGTAAGAGATGCGATGATTATGTGGAGGTGATGTGTGGGTGTACAAGCCATCGA      60
CB5_P7-43DF1      GGTAAGAGATGCGATGATTATGTGGAGGTGATGTGTGGGTGTACAAGCCATCGA

M82_P7-43DF1      TATGGTGATGCTGTTGCTAGACTTAGGGTTTTCTCGTCTGGTGAACCTTGAAATCACCTGT      120
CB5_P7-43DF1      TATGGTGATGCTGTTGCTAGACTTAGGGTTTTCTCGTCTGGTGAACCTTGAAATCACCTGT

M82_P7-43DF1      GAATGTACTCCTGGATGCACTGAAGGTTTT.TTTTTTTAACAACCTTTAGATCAAATGGG      180
CB5_P7-43DF1      GAATGTACTCCTGGATGCACTGAAGGTTTTCTTTTTTTAACAACCTTTAGATCAAATGGG

```

M82_P7-43DF1	GGTTTGGCGTCAAATGCATGTTGTTTCGTGGGTTTTATTCTATCGTTCGACTCTGTGTTTGAT	240
CB5_P7-43DF1	GGTTTGGCGTCAAATGCATGTTGTTTCGTGGGTTTTATTCTATCGTTCGACTCTGTGTTTGAT	
M82_P7-43DF1	TTATGTGTAACATTTTATGTGTATGTAAGTTTGCCTCAGAGAGCATAGTTTCTGCTTCTG	300
CB5_P7-43DF1	TTATGTGTAACATTTTATGTGTATGTAAGTTTGCCTCAGAGAGCATAGTTTCTGCTTCTG	
M82_P7-43DF1	TGGTAGTGTGTGTTCTTTGGTGTGTGTGTGAAGTTCCTTGATGTTTCTTTGGCAATTTT	360
CB5_P7-43DF1	TGGTACTGTGTGTTCTTTGGTGTGTGTGTGAAGTTCCTTGATGTTTCTATGGCAATTTT	
M82_P7-43DF1	GTGCGTCTCTTGTCAACCTTACCTTGCCTACATTTCTATGTCTCAAGACTCCACTTTGTGA	420
CB5_P7-43DF1	GTGCGTCTCTTGTCAACCTTACCTTGCCTACATTTCTATCATCTCCAGACTCCACTTTGTGA	
M82_P7-43DF1	AATTACACGGGATATGTTATTGATAAGCATGTC.AACAAAGGTAGAAATACATTGTGTGT	480
CB5_P7-43DF1	GATTACACGGGATATGTTGTTGATAAGCATGTCA.AACAAAGGTAGAAATACATTGTGTGT.	
M82_P7-43DF1	TCGTTATGTGATAATGGTTCCTTTGAAGGCAGGTTTAGTTGTTTAAAGACT....CTTGACC	540
CB5_P7-43DF1	.....ATAATGGTTCCTTTGAAGGCAGGTTTAGTTGTTTAAAGACTCTTGCTTGACC	
M82_P7-43DF1	TTTGATGCAGAGTTAGAGTTCTGTTTGATTTTTCTTCAAAGCATCACTTTTGATGGTATC	600
CB5_P7-43DF1	TTTGATGCAGAGTTAGAGTTCTGTTTGATTTTTCTTCAAAGCATCACTTTTGATGGTATC	
M82_P7-43DF1	ATCTTATGCTAAACAACCTCATTTGGTTCACATTTCTACAACCTGGCCATGCAACTTTT	660
CB5_P7-43DF1	AACCTTATGCTAAACAACCTCATTTGGTTCACATTTCTACAACCTGGCCATGGCAACTTTT	
M82_P7-43DF1	TGAAAACCATCAACTCTTAATTAATAAATGTTTATCGTGGGGCTTGTGCAGTGTTTTGG	720
CB5_P7-43DF1	TGAAAACCATCAACTCTTAATTAATAAATGTTTATCGTGGGGCTTGTGCAGTGTTTTGG	
M82_P7-43DF1	TTGAATATTTAGCTGTGATATCAAAAGAAATCTTATACTATCACTCACCAGATTCTCTCG	780
CB5_P7-43DF1	TTGAATATTTAGCTGTGATATCAAAAGAAATCTTATACTATCACTCACCAGATTCTCTCG	
M82_P7-43DF1	ACAGCATTGTGTGTCAGAGCATATTTCTCTTTTAAATCATTCACTATGTATCCTCTCGGT	840
CB5_P7-43DF1	ACAGCATTGTGTGTCAGAGCATATTTCTCTTTTAAATCATTCACTATGTATCCTCTCGGT	
M82_P7-43DF1	TTCTCTCTTTCTTTATATTTTACAATCATAAGCCACAAAGAATCGATTTTGTAC.TTGAT	900
CB5_P7-43DF1	TTCTCTCTTTCTTTATATTTTACAATCATAAGCCACAAAGAATCGATTTTGTACTTTGAT	
M82_P7-43DF1	AAAATAACACCCACAGAAAGAATTATCTGATAAAGTAAATTAAGTCTTACCCTTGATAC	960
CB5_P7-43DF1	AAAATAACACCCACAGAAAGAATTATCTGATAAAGTAAATTAAGTCTTACCCTTGATAC	
M82_P7-43DF1	TTGTGCTACTTAACAAGAGTCTCTTTTTCACCTGTCTGGAATGTAGATAGTCAGCTTCTT	1020
CB5_P7-43DF1	TTGTGCTACTTAACAAGAGTCTCTTTTTCACCTGTCTGGAATGTAGATAGTCAGCTTCTT	
M82_P7-43DF1	AGTTGTTAATACTTCTTGTATGT.....	1080
CB5_P7-43DF1	AGTTGTTAATACTTCTTGTATGTGCTGTAAAAATGAGTGGAGGTTAATGGAACGTTTA	
M82_P7-43DF1	.....	1140
CB5_P7-43DF1	TGTTGAATCTGATGCTATATTTTCTCTCTTTTACATTATTTTCATAGTCTTGTGTGCAT	
M82_P7-43DF1	.....	1200
CB5_P7-43DF1	TGTGATCCTATTAAGAGTTTGTGTTTGTGAACAGACAAGCTTACTCCGCTGCATTTG	
M82_P7-43DF1	.....CA	1260
CB5_P7-43DF1	AGAAGCATTCTGGGAGAGAACTGCTAGGAAATGGAAAAATAATGTATGGATCATTGTCA	
M82_P7-43DF1	ATGGTGATAAAGTTCCTGTGGTAAAGAC	1288
CB5_P7-43DF1	ATGGTGATAAAGTTCCTGTGGTAAAGAC	