



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Fitotecnia

Maestría en Ciencias en Horticultura

Tesis

RESISTENCIA A CUATRO PATÓGENOS EN *Solanum lycopersicum* L., IDENTIFICADAS CON MARCADORES MOLECULARES Y PRUEBAS PATOGÉNICAS

**Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Horticultura**



Presenta:

Karla Giovana Elizalde Gaytán

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México, junio de 2015.



**Resistencia a cuatro patógenos en *Solanum lycopersicum* L., identificadas
con marcadores moleculares y pruebas patogénicas**

Tesis realizada por **Karla Giovana Elizalde Gaytán** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

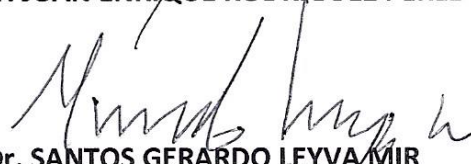
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

CO-DIRECTOR:



Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



Dr. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



Dr. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

ASESOR:



Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

Chapingo, Estado de Mexico, junio de 2015.

DEDICATORIA

A mi pequeño Antonio, por ser mi fuerza, inspiración y alegría, por los momentos faltos de juego, por tu valor y comprensión, por tanto amor, no dudes nunca que eres el amor de mi vida.

A Pedro, por el apoyo incondicional, por llegar en el momento oportuno, por tu paciencia y tu confianza en mí, y sobre todo por el amor hacia nosotros.

A mis padres Guillermo y Hortencia, por su ejemplo de lucha constante e incansable, por los valores que me dieron, por el tiempo y el amor que me han dedicado.

A mis hermanos Evelia, Martha, Guille, Mag (sin duda un ángel), Aurora, Waldo y Guillermo, gracias por su apoyo en todo momento, la felicidad y tristeza compartidas, gracias por su existencia.

A mis niñitos Carlitos, Edgar, Camille, Ximena y el pequeño Alejandro, por la alegría que llegó con cada uno de ustedes.

A Fili y JC mis cuñados, que estuvieron y están, sean recuerdo o momento.

A mi abuela Cele, por la dicha de crecer bajo su mirada complacida.

A Dios, que me permitió vivir este momento, por la familia que me dio, por la valentía y el coraje que me envió cuando más la necesité.

CON TODO MI AMOR

KARLA

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, por dirigir esta investigación, por su entusiasmo, su apoyo, tiempo y paciencia, por los cuantiosos regaños demostrándome su compromiso con mi formación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por el apoyo incondicional brindado, por centrar mis ideas y hacerlas posibles, por su tiempo y dedicación en momentos clave para culminar este proyecto.

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos, por su experiencia y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Oscar Mascorro Gallardo, por las aportaciones brindadas a este trabajo.

A la Dra. Gisela Peña Ortega por su colaboración y apoyo.

A Ricardo Gaspar, un gran maestro en el laboratorio que me compartió todos sus conocimientos, su amistad y sentido del humor en los ratos de espera.

A Yanet y Bety, por sus conocimientos y su apoyo, pero sobre todo por su amistad.

A Isa, Lorena y Diana, por su amistad y los ratos tan agradables.

A Eli, Joaquín, Alberto y Félix, por su valiosa ayuda en el invernadero.

Datos biográficos del autor

Originaria de Huitzuco de los Figueroa, estado de Guerrero. Nació el 25 de mayo de 1988.

En julio de 2006 ingresó al nivel propedéutico en la Universidad Autónoma Chapingo, en 2007 comenzó su formación en el Departamento de Parasitología Agrícola en la misma Universidad. Concluyó sus estudios en el año 2011, se tituló por mérito académico con un promedio general de 91.

Ingresó en enero de 2013 al Instituto de Horticultura en la Universidad Autónoma Chapingo para realizar la Maestría en Ciencias en Horticultura.

**RESISTENCIA A CUATRO PATÓGENOS EN *Solanum lycopersicum* L.
IDENTIFICADAS CON MARCADORES MOLECULARES Y PRUEBAS
PATOGÉNICAS**

**RESISTANCE TO FOUR PATHOGENS IN *Solanum lycopersicum* L.
IDENTIFIED WITH MOLECULAR MARKERS AND PATHOGENIC TESTS**

Junio de 2015

(Bajo la dirección del Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez)

Resumen

La resistencia genética a enfermedades de los cultivos es el mejor método para reducir las pérdidas de rendimiento causadas por fitopatógenos, y el uso de marcadores moleculares acelera la identificación de los genes que producen esta resistencia. En esta investigación se identificaron en 105 líneas homocigóticas de jitomate, genes de resistencia a cuatro patógenos y se corroboró en plántulas su tolerancia. Se detectaron molecularmente 64 líneas resistentes a *Fusarium oxysporum* razas 1 y 0, 104 a *Verticillium dahliae* y 23 a *Meloidogyne* sp. No se detectaron materiales tolerantes al Virus del Mosaico del Tomate. Las pruebas fitopatológicas en plántula detectaron genotipos tolerantes, que no poseen los genes específicos de resistencia buscados; esto sugiere la presencia de diferentes mecanismos de tolerancia a dichas enfermedades. Las líneas 3, 19, 52 y 65 mostraron la mayor tolerancia al considerar los tres patógenos evaluados.

Abstract

The genetic resistance to crop diseases is the best method to reduce loss in yield caused by phytopathogens and the use of molecular markers accelerates the identification of the genes that confer this resistance. In this study genes for resistance to four pathogens were identified in 105 homozygous tomato lines, and their tolerance was corroborated in seedlings. Based on molecular markers, 64 lines resistant to *Fusarium oxysporum* races 1 and 0, 104 to *Verticillium dahliae*, and 23 to *Meloidogyne* sp. were identified. Tolerant genotypes to Tomato Mosaic Virus were not detected. Phytopathological seedling tests detected tolerant genotypes that do not have the specific resistance genes sought by markers; this suggests the presence of different tolerance mechanisms to those diseases. Lines 3, 19, 52 and 65 showed the highest tolerance when the three pathogens were considered.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVO	2
III.	HIPÓTESIS.....	2
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
4.1	Importancia económica del jitomate.....	3
4.2	Importancia de <i>Fusarium oxysporum</i>	3
4.3	Importancia de <i>Verticillium dahliae</i>	5
4.4	Importancia de los nematodos del genero <i>Meloidogyne</i>	7
4.5	Importancia del Virus Mosaico Del Tomate (ToMV).....	9
4.6	Pruebas de patogenicidad <i>in vivo</i>	10
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1	Extracción de ADN.....	13
5.2	Evaluación de la cantidad y calidad del ADN.....	14
5.3	Detección de genes de resistencia a enfermedades de los genotipos evaluados	16
5.4	Pruebas de patogenicidad	21
5.5	Análisis estadístico	24
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1	Resistencias detectadas mediante marcadores genético moleculares.....	25
6.2	Pruebas de patogenicidad	34

VII.	CONCLUSIONES.....	44
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	45
IX.	Anexos	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Imagen 1 A. Gel de calidad de ADN extraído de líneas de jitomate , en agarosa al 1.5 %	52
Imagen 2 A. Escala visual utilizada para la evaluacion de <i>Meloidogyne</i> basada en indice de agallamiento.....	53
Imagen 3 A. Escala de evaluación visual para <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Verticillium dahliae</i>	53
Imagen 4 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Z1063F/Z1063R, para la identificación del gen de resistencia I2 a la raza 1 de <i>Fusarium oxysporum</i>	53
Imagen 5 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores At2F3/At2R3, para la identificación del gen de resistencia I a la raza 0 de <i>Fusarium oxysporum</i>	53
Imagen 6 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Ve1_2072F/Ve1_2651R y Ve2_2720F/Ve2_3040R para la identificación de los genes de resistencia <i>Ve1</i> y <i>Ve2</i> a <i>Verticillium dahliae</i>	53
Imagen 7 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores pmiF3/PmiR3 para la identificación del gen de resistencia <i>Mil-2</i> a <i>Meloidogyne incognita</i>	53
Imagen 8 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores SCN20F/SCN20R para la identificación del gen de resistencia <i>Tm-1</i> al Virus Mosaico del Tomate.	53
Imagen 9 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores TMV-2262F/TMV-2678R para la identificación del gen de resistencia <i>Tm2/Tm2^c</i> al Virus Mosaico del Tomate.....	53
Imagen 10 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Tm2-748F/Tm2-12556R para la identificación del gen de resistencia <i>Tm2/Tm2^c</i> al Virus Mosaico del Tomate.....	53
Imagen 11 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Tm2-748F/Tm2-1256R para identificacion del gen de resistencia <i>Tm2/Tm2^c</i> al Virus Mosaico del Tomate.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores utilizados en ADN de jitomate para detección de genes de resistencia a cuatro patógenos.	18
Cuadro 2. Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares	29
Cuadro 3. Estadística T de la prueba de Friedman (Conover, 1980) de índices de incidencia de tres patógenos inoculados a plántulas de jitomate	34
Cuadro 4. Agrupación de líneas con base en comparación de rangos con respecto a híbridos comerciales de tres fitopatógenos inoculados en plantas de jitomate (Conover, 1980).	37

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los vegetales más ampliamente cultivados en el mundo. Su volumen de producción ha aumentado aproximadamente 10 % desde 1985, causado por el incremento sustancial de su uso en la alimentación (Foolad, 2007).

La principal limitante en este cultivo es el daño por patógenos; así, con el fin de hacer una agricultura sustentable y para obtener productos de alta calidad, el uso de variedades resistentes es la principal herramienta para reducir las pérdidas causadas por estos agentes. Durante los últimos 40 años, el mejoramiento para resistencia a enfermedades ha sido un objetivo importante en la mejora de esta hortaliza; numerosos genes de resistencia, la mayoría procedentes de parientes silvestres, se han identificado e introducido a variedades comerciales (Arens *et al.*, 2009) mediante protocolos tradicionales, que han sido muy eficaces para mejorar la productividad y la calidad de fruto, aunque es un proceso lento, que requiere de 10 a 15 años para generar nuevos híbridos o variedades (Foolad, 2007). Sin embargo, el empleo de herramientas basadas en la identificación de genes de resistencia específicos a partir del ADN, puede acelerar estos procesos al facilitar la selección de cultivares resistentes (Arens *et al.*, 2010).

2. OBJETIVO

Determinar la existencia de genes de resistencia a *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne incognita* y ToMV, mediante el uso de marcadores genético moleculares y pruebas fitopatológicas en plántulas de líneas experimentales de jitomate con fines de empleo en programas de mejoramiento genético.

3. HIPÓTESIS

Las líneas de jitomate evaluadas poseen uno o más genes de resistencia a *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne incognita* y ToMV, por lo que su presencia mostrará correlación con las pruebas fitopatológicas en plántula.

Existe la posibilidad de encontrar fuentes de resistencia distintas a las detectadas con los marcadores moleculares utilizados, debido a la presencia de diferentes mecanismos de tolerancia a patógenos, los cuales son gobernados por diferentes genes.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia económica del jitomate

El jitomate es una de las hortalizas que ha recibido mayor atención por parte de las empresas mejoradoras de variedades e instituciones de investigación, ya que la rentabilidad de este cultivo es una de las mayores en el ámbito agropecuario (Bautista *et al.*, 2008). Según datos del SIAP, durante 2013, el jitomate ocupó en México el sexto lugar en cuanto al valor obtenido por producción en una superficie sembrada de 48234 hectáreas. Los estados con mayor superficie para este cultivo fueron Sinaloa, Michoacán y Zacatecas (SIAP, 2013).

4.2 Importancia de *Fusarium oxysporum*

A nivel comercial la enfermedad fúngica más importante en jitomate es la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), la cual disminuye el rendimiento hasta en un 60 % y afecta en gran medida la calidad del producto (Agrios, 2004).

Los primeros síntomas de la enfermedad son el amarillamiento del follaje, que comienza con la caída de las hojas. Las hojas infectadas posteriormente muestran encrespamiento bajo, se oscurecen y se secan.

La parte superior de la planta se marchita durante el día y se recupera en la noche, síntomas que se incrementan hasta observar un oscurecimiento vascular en tallos

y pecíolos infectados, adicionalmente el sistema radical se atrofia, debido a que el hongo penetra por la raíz y coloniza el sistema vascular del tallo (González *et al.*, 2012).

La colonización, tanto en cultivares resistentes como susceptibles, se restringe a la región de entrada inicial del patógeno, y causa la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas. En los cultivares susceptibles, ocurre una distribución secundaria cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno, lo que causa que el crecimiento de las tilosas sea inhibido. En los cultivares resistentes, flavonoides del tipo de las catequinas y sus productos de oxidación inactivan dichas enzimas, por lo que no ocurre la distribución secundaria (González *et al.*, 2012).

Se han reportado tres razas de Fol, distinguibles por su virulencia a diferenciales de jitomate los cuales son: Bonny Best, sin genes de resistencia; Manapal, resistente sólo a la raza 1; Walter, resistente a las razas 1 y 2; e I3R3, resistente a la raza 3. La raza 1 se describió en 1886 y la 2 se reportó en 1945 en Ohio, EUA. La raza 3 se observó en Australia en 1978 y en California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee, EUA; mientras que en México la raza 3 se reportó en 1996 (Valenzuela–Ureta *et al.*, 1996; Ascencio *et al.*, 2008).

Los propágulos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* son capaces de persistir en restos vegetales y en el suelo durante largos períodos de tiempo. Además las medidas químicas y culturales para el control del marchitamiento por *Fusarium* en jitomate son caras y no son eficaces en la mayoría de las situaciones (Jones y

Woltz,1981). Hasta ahora, la estrategia más eficaz para el control de este patógeno en jitomate ha sido el empleo de cultivares con resistencia genética. Tres principales loci de resistencia se han caracterizado genéticamente en especies de *Lycopersicon* y todos ellos se han incorporado en los cultivares comerciales (Reis *et al.*, 2004).

La resistencia a *Fusarium oxysporum* raza 0 fue introducida desde *S. pimpinellifolium*. El locus 1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 situado en los marcadores RFLP: TG523 y TG7 las secuencias, de ambos fragmentos son utilizadas para diseñar iniciadores y amplificar regiones en variedades resistentes y susceptibles (Ori *et al.*, 1997; Sela- Buurlage *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2004).

El locus I2 también proviene de *S. pimpinellifolium* y confiere resistencia a la raza 1 del hongo *F. oxysporum* (Sela- Buurlage *et al.*, 2001), está ubicado en el brazo largo del cromosoma 11 (Ori *et al.*, 1997). Este locus codifica para una proteína de 1266 aminoácidos y pertenece al grupo de unión del nucleótido (Genbank no. AF118127).

4.3 Importancia de *Verticillium dahliae*

La marchitez por *Verticillium* es una enfermedad micótica que causa pérdidas severas de rendimiento y calidad en muchos cultivos, incluyendo alfalfa, algodón, cucurbitáceas, berenjena, menta, papa, jitomate, fresa y girasol (Kawchuk *et al.*, 2000).

Con frecuencia los síntomas aparecen sólo en la parte inferior de la planta o sobre su superficie. En algunos hospedantes el hongo se desarrolla principalmente en las plántulas, las cuales a menudo mueren poco después de haber sido infectadas, pero son más comunes las infecciones tardías, que ocasionan la epinastia de las hojas superiores, seguida por la aparición de manchas cloróticas irregulares en las hojas que se vuelven necróticas. Las plantas adultas infectadas con *Verticillium* sufren achaparramiento y sus tejidos vasculares muestran una decoloración característica (Agrios, 2004). En el jitomate, la resistencia a la raza 1 de *Verticillium dahliae* y otras especies es conferida por un solo gen dominante *Ve* (Kawchuk *et al.*, 2000).

El gen que confiere resistencia a la raza 0 fue encontrado en *S. lycopersicum* en una línea nativa del Perú (Schaible *et al.*, 1951). El locus *Ve*, localizado en el cromosoma 9, consiste de dos genes estrechamente ligados, los cuales confieren resistencia a *V. alboatrum* en plantas de papa (Kawchuk *et al.*, 2001), la nomenclatura de dichos genes es *Ve-1* y *Ve-2*, y se han desarrollado iniciadores específicos para amplificarlos.

Se ha secuenciado un fragmento de 721 pb del gen *Ve-2* y cuatro segmentos superpuestos del gen *Ve-1*, por lo que los SNPs encontrados entre las secuencias de variedades susceptibles y las variedades resistentes a *V. dahliae* se utilizaron para el desarrollo de cuatro iniciadores ARMS-PCR de tipo codominante (Kawchuk *et al.*, 2001).

4.4 Importancia de los nematodos del genero *Meloidogyne*

A nivel mundial, se señalan a los nematodos del género *Meloidogyne* Göldi como la principal plaga en los vegetales, estos poseen gran impacto sobre los sistemas hortícolas tanto en condiciones protegidas como de campo abierto. Se estima que a nivel mundial las pérdidas provocadas por estos patógenos oscilan entre el 24 y el 33 %. Las especies más comunes en las regiones cálidas son *Meloidogyne incognita* (Kofoed y White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood y *M. javanica* (Treub) Chitwood (González *et al.*, 2010). Estas producen nódulos que debilitan las puntas de la raíz e inducen la formación de hinchamientos en este órgano, los cuales privan a las plantas de sus nutrientes. Las plantas infectadas muestran un desarrollo deficiente y una menor cantidad de hojas pequeñas, de color verde pálido o amarillento. Sin embargo, las plantas normalmente sobreviven a la estación de crecimiento y rara vez son destruidas prematuramente por la enfermedad (Agrios, 2004).

Entre los diferentes métodos para el control de los nematodos, se encuentra el uso de cultivares resistentes. Sin embargo, son poco frecuente los cultivares tolerantes debido fundamentalmente a la alta variabilidad inter e intra específica de las poblaciones de nematodos, que favorece su adaptabilidad y les otorga mayores ventajas selectivas sobre sus hospedantes (González *et al.*, 2010).

El uso de injertos sobre patrones silvestres resistentes, sin comercial ha cobrado auge en la actualidad, ya que se estima que en el 25 % de la superficie destinada a la producción protegida de jitomate se usa esta tecnología; De este modo, se logra que los cultivares susceptibles de interés económico por su alta producción,

obtengan alto rendimiento con el suelo infestado del patógeno (González *et al.*, 2010).

En un inicio el marcador isoenzimático ácido fosfatasa (Locus *Aps-1¹*), fue sugerido como un criterio de selección indirecta para el mejoramiento de resistencia a nemátodos (Medina-Filho y Stevens, 1980); sin embargo, debido al desarrollo de los marcadores moleculares, el uso de isoenzimas en la actualidad ha quedado un tanto obsoleto (Rivera, 1991).

Se han desarrollado diversos marcadores moleculares de ADN basados en PCR (CAPS, RAPD y SCAR) para la identificación y selección de materiales con el gen de resistencia *Mi* (Panthee y Foolad, 2012). Esta resistencia proviene de *Lycopersicon peruvianum* L. Otros genes *Mi* identificados (*Mi1*, *Mi2*, *Mi3*), se localizan en brazo corto y en la región pericentromérica del cromosoma 6 de *Solanum lycopersicum* (Skupinová *et al.*, 2004).

El locus *Mi* contiene 3 regiones ORFs (marcos de lectura abierta) de las cuales dos codifican genes intactos llamados *Mil-1* y *Mil-2* y el tercero es un pseudogen (Milligan *et al.*, 1998); que puede ser resultado de un deshabilitamiento dentro de una región génica anteriormente funcional (Rouchka y Cha, 2009). El gen *Mil-2* por sí sólo es suficiente para conferir resistencia a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Arens *et al.*, 2010).

Las técnicas de marcadores genéticos moleculares deben asociarse a las pruebas de patogenicidad en campo o invernadero con el fin de corroborar o identificar el

material primario con supuesta resistencia genética de acuerdo al análisis de su ADN. Se sabe que mediante ADN se prueba la resistencia de los homocigotos. La detección del gen *Mi* se basa técnicamente en el método de CAPS (Williamson *et al.*, 1994; Yaghoobi *et al.*, 1995). La detección de genes de resistencia y su comercialización acelera del proceso de mejoramiento (Skupinová *et al.*, 2004).

4.5 Importancia del Virus Mosaico del Tomate (ToMV)

Las enfermedades de origen viral son muy importantes en México debido a las pérdidas que causan en la producción, así como al elevado costo que implica su manejo. Se conocen al menos 136 virus que pueden infectar al jitomate (Bautista *et al.*, 2008).

El virus mosaico del jitomate (ToMV) se encuentra de forma muy frecuente en plantas de jitomate cultivadas a cielo abierto o en invernadero (Conti *et al.*, 2000), el cual induce la manifestación de un gran número de síntomas, el más comúnmente observado es un moteado asociado a una ligera distorsión de los folíolos jóvenes.

En jitomate cultivado, las infecciones de ToMV están controladas por la introducción de los genes de resistencia Tm-1, Tm-2 y TM-2² (Pelham, 1966; Hall, 1980). Entre éstos, Tm-2² ha demostrado conferir resistencia duradera, por lo que tiene mayor importancia agronómica (Lanfermeijer *et al.*, 2003). Por otro lado frecuentemente, las cepas de ToMV pueden superar a Tm-1 y TM-2, por lo que estos genes, al no presentar resistencia duradera no tienen importancia práctica (Lanfermeijer *et al.*, 2003).

El gen Tm1, procedente de *S. habrochaites*, confiere resistencia a ToMV cepas 0 y 2. El gen ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 2, pero su secuencia aún no se determina. Sin embargo, Ohmori *et al.* (1996) describen seis marcadores SCAR estrechamente vinculados; la distancia entre estos marcadores y Tm1 no se conoce con precisión, pero no se han encontrado plantas recombinantes para ninguno de estos marcadores, por lo que este conjunto de seis marcadores ha sido probado para su aplicación en una selección de variedades de jitomate junto con los iniciadores Lat1F/Lat2R (Arens *et al.*, 2010).

4.6 Pruebas de patogenicidad *in vivo*

Patogenicidad es la capacidad de ciertos organismos para desarrollar una enfermedad infecciosa. Cuando hay lesiones por una enfermedad, por lo general se asocian a ella varios entes vivos, de los cuales no todos son patógenos. Para discriminar entre ellos se requiere un procedimiento sencillo, capaz de probar de forma clara y contundente la patogenicidad atribuible a un organismo viviente, basados en los postulados de Koch (Rivera, 2007).

Las inoculaciones se realizan para evaluar la patogenicidad de un microorganismo, para determinar la gama de hospedantes de un agente infeccioso y seleccionar hospedantes resistentes. Pueden ser provocadas naturalmente o inducidas en el campo o en macetas. Los patógenos vasculares generalmente infectan a las plantas a través del sistema radicular Para aislar un patógeno, es esencial realizar

previamente los pasos para el diagnóstico, puesto que la metodología de aislamiento de distintos grupos de microorganismos varía mucho y se debe tener un criterio formado de las condiciones necesarias (French y Hebert, 1982).

4.6.1 Aislamiento e inoculación de hongos

En el proceso de aislamiento de hongos fitopatógenos la contaminación bacteriana y de otros hongos secundarios más prolíficos es uno de los principales problemas, por lo cual se utilizan varias técnicas de limpieza, desinfección y antagonismo a los contaminantes (French y Hebert, 1982).

El lavado de tejidos afectados se realiza de acuerdo con el órgano que se trate, las partes subterráneas deben lavarse bajo el agua corriente con ayuda de un cepillo suave y dependiendo del patógeno de interés, se puede o no usar un desinfectante. Para las partes aéreas se realiza una inmersión instantánea en alcohol etílico al 70 % antes de introducir en agua. Los tejidos aparentemente limpios no necesitan lavado, excepto el que se hace en la desinfección (French y Hebert, 1982).

La desinfección del tejido se lleva a cabo usualmente con hipoclorito de sodio (0.5-1 %). Algunas sustancias usadas para inhibir el crecimiento bacteriano son el ácido láctico, estreptomycin, rosa de bengala, etcétera (French y Hebert, 1982).

Al momento de la siembra del hongo se corta un trozo de tejido del margen de las lesiones, ya que en esta zona el hongo está más activo. Por lo general se hacen cuatro siembras equidistantes en una placa. Para inocular a los hospedantes las cepas de los patógenos necesitan multiplicarse, por lo que se pueden utilizar

medios diversos de acuerdo con la finalidad que se persigue, el medio más utilizado es el PDA (papa-dextrosa-agar), que favorece el crecimiento vegetativo. La uniformización de las condiciones de inoculación durante las investigaciones incluye el uso de niveles iguales o lo más similarmente posibles de inóculo de la misma calidad, cultivado bajo condiciones definidas (French y Hebert, 1982).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de semilla se llevó a cabo en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en Texcoco, Estado de México. Durante el ciclo agrícola 2013 se sembraron 109 líneas experimentales de jitomate, a los 30 días se trasplantaron hasta dejar 8 plantas por línea. Se cosecharon frutos maduros y se extrajo la semilla la cual se dejó fermentar por tres días, se lavó para eliminar el mucilago y se dejó secar para almacenarla a 9°C.

El análisis molecular con todas sus fases fue llevado a cabo en el Laboratorio de Semillas del Departamento de Fitotecnia, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo.

5.1 Extracción de ADN

Se sembraron 20 plántulas de cada línea y cada testigo comercial, en charolas de 200 cavidades, cuando cumplieron tres semanas de edad, se procedió a la extracción de ADN. Se utilizó la metodología reportada por Dellaporta *et al.* (1983), para extracción de ADN.

Las plantas se lavaron con etanol al 70 %. Se pesaron 0.3 g de tejido que se colocó en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido. Al cual se le agregó nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino, el cual se transfirió a 700 µl de amortiguador de extracción contenidos en un microtubo de 1.5 ml precalentado a 65 °C en un termoblock marca Thomas Scientific®. El microtubo se agitó hasta homogeneizar; enseguida se calentó nuevamente a 65 °C en el

termoblock durante 10 minutos y se agregaron 200 µl de acetato de potasio 5 M. La muestra se enfrió en hielo por 60 minutos y se colocó en una centrifuga marca Thermo® durante 20 minutos a 12000 Xg.

Se agregaron 600 µl de cloroformo y se centrifugó a 10000 Xg por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo con 600 µl de isopropanol preenfriado y se dejó a -20 °C por 60 minutos para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 6000Xg durante 5 minutos y se decantó. Se agregaron 700 µl de solución para disolver la pastilla de ADN. A la cual se adicionó 4 µl de ARNasa y se incubó a 37 °C durante una hora.

Posteriormente el ADN fue precipitado durante dos horas con 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol frio. Después se centrifugó a 8000Xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con etanol (grado reactivo) al 70 %.Nuevamente se centrifugó a 8000Xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente. Finalmente éste fue disuelto en 50 µl de TE y se almacenó a 4 °C.

5.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

De acuerdo con el método descrito por el CIMMYT (2006) se realizó la cuantificación y determinación de la calidad del ADN obtenido de la manera descrita a continuación.

La cantidad de ADN ($\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) en las muestras se determinó mediante un Nanodrop Lite marca Thermo Scientific®. A partir de esta cuantificación se realizaron diluciones en todas las muestras para obtener a una concentración de $10\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Para la prueba de calidad del ADN se utilizó agarosa al 1.5 % diluida con amortiguador TAE 1X. Se colocaron 1.5 g de agarosa en un matraz y se agregaron 100 ml de amortiguador TAE 1X. Se calentó en el horno de microondas durante un minuto, se retiró y se agitó hasta disolver completamente. Se dejó enfriar por 20 minutos hasta lograr una temperatura cercana a los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se vació en un portageles en una cámara de electroforesis marca Thermo Scientific®, se dejó gelificar durante 20 o 30 minutos, posteriormente se retiraron los peines. Se agregó el amortiguador TAE 1X hasta cubrir el gel.

Sobre cinta parafilm se colocaron $2\text{ }\mu\text{l}$ de colorante para cada muestra de ADN. Se midieron $10\text{ }\mu\text{l}$ de cada dilución de ADN y se mezclaron con el colorante, la mezcla se colocó en cada orificio del gel hasta terminar las muestras de ADN.

El desarrollo de la electroforesis duró aproximadamente 45 minutos, una vez transcurrido este tiempo se desmontó la cámara y se retiró el gel, el cual se tiñó en bromuro de etidio y se documentó con luz UV en un fotodocumentador marca UVP® (Imagen 1A).

5.3 Detección de genes de resistencia a enfermedades en los genotipos evaluados

En la detección de genes de resistencia a enfermedades en las líneas de jitomate se emplearon los marcadores moleculares que se presentan en el Cuadro 1. En total se usaron nueve pares de iniciadores. Se realizó la amplificación en un termociclador marca Techne®. Como controles se utilizaron las variedades comerciales Cuauhtémoc, Espartaco, Moctezuma, Aquiles, Cedral y Cid.

En todos los casos se usaron geles de agarosa al 1.5 %. Para la correcta identificación de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb ladder de Invitrogen®. Se cargaron 10 µl de cada muestra amplificada, los cuales se mezclaron con 3 µl de azul de bromofenol. El gel se sumergió en amortiguador TAE .25X en una cámara de electroforesis a 220 volts durante dos horas. Posteriormente se realizó la tinción del gel con bromuro de etidio y se procedió a la visualización de los resultados con luz UV y a la documentación del gel.

5.3.1 Condiciones de reacción para la detección de los genes de resistencia a la raza 1 I2 y raza 0 I de *Fusarium oxysporum*

El volumen de cada reacción de PCR fue de 25 µl, el cual contenía 2.2 µl de agua grado biología molecular, 10 µl de dNTP's (200 µM), 2.5 µl de amortiguador, 1.5 µl de MgCl₂ (3 mM) , 0.3 µl de enzima DNA Taq polimerasa (1.5 unidades por reacción), 3 µl de cada iniciador (Z1063F/ Z1063R) (30 ng por reacción) para el gen de resistencia a la raza 1 I2, a una concentración de 10 ng.µl⁻¹ y 2.5 µl de ADN por muestra (25 ng de ADN por reacción). Las temperaturas y ciclos para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 min,

35 ciclos a 94°C por 30 segundos, alineación a 58°C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

Cuadro 1. Secuencias de iniciadores utilizados en ADN de jitomate para detección de genes de resistencia a cuatro patógenos.

Patógeno ó enfermedad	Gen	Iniciador	Forward	Reverse	Banda de resistencia (pb)	Banda de susceptibilidad (pb)	Otra	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	0, 1	At2-F3	CGAATCTGTATATTACATCCGTCGT	GGTGAATACCGATCATAGTCGAG	130		92	Arens <i>et al.</i> , (2010)
	1, 12	At2-R3 Z1063F Z1063R	ATTTGAAAGCGTGGTATTGC	CTTAAACTCACCATTAAATC	940		1380	Arens <i>et al.</i> , (2010)
<i>Verticillium dahliae</i>	Ve1	Ve1_2072F Ve1_2651R	CCTTGATGGGGTTGATCTTTCGT	GTAGGTGAGTTTCTTGGACAGTCGA	476	158	580	Kawchuk <i>et al.</i> , (2001)
	Ve2	Ve2_2720F Ve2_3040R	GGATCTTAGCTCACTTTATGTTTTGAAC	GGTGCTGGTTTCAACTCTGAAGT	242	131	321	Kawchuk <i>et al.</i> , (2001)
ToMV (Virus Mosaico del Tomate)	Tm-1	SCN20F/R	GGT GCT CCG TCG ATG CAA AGT GCA	GGT GCT CCG TAG ACA TAA AAT CTA	1400		92	Arens <i>et al.</i> , (2010)
	Tm-2 /Tm2 ^c	TMV-2262F TMV-2678R	GGG TAT ACT GGG AGT GTC CAA TTC	CCG TGC ACG TTA CTT CAG ACA A	214		417	Arens <i>et al.</i> , (2010)
	Tm-2	SNP2494F SNP2493R	CTCATCAAGCTTACTCTAGCCTACTTTA GT	CTGCCAGTATATAACGGTCTACCG	255			Primer diseñado en base a Lanfermeijer <i>et al.</i> , (2005)
	Tm-2 /Tm2 ^c	TM2-748F TM2-1256R	CGGTCTGGGGAAAACAACTCT	CTAGCGGTATACCTCCACATCTC C	179	382	509	Arens <i>et al.</i> , (2010)
<i>Meloidogyne incognita</i>	Mil-2	PMiF3/R3	GGT ATG AGC ATG CTT AAT CAG AGC TCT C	CCT ACA AGA AAT TAT TGT GCG TGT GAA TG	550	350		Chague <i>et al</i> (1996) Seah <i>et al.</i> , (2007)

Para el gen de resistencia a la raza “0 I” se utilizaron los iniciadores At2-F3/ At2-R3, el volumen utilizado para cada componente de la mezcla de reacción fue exactamente igual al de la reacción anterior. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 58 °C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

5.3.2 Condiciones de reacción para la detección de los genes de resistencia a *Verticillium dahliae* Ve1 y Ve2

Para la detección del gen de resistencia Ve1 se utilizaron los iniciadores Ve1_2072F y Ve1_2651R y los iniciadores Ve2_2720F y Ve2_3040R para detectar el gen de resistencia Ve2, por lo que se realizó un múltiplex. La mezcla de reacción se hizo con los siguientes volúmenes: 2.2 µl de agua grado biología molecular, 10 µl de dNTP's (200 µM), 2.5 µl de amortiguador, 1.5 µl de MgCl₂ (3mM), 0.3 µl de enzima DNA Taq polimerasa (1.5 unidades por reacción), 0.75 µl de cada iniciador (30 ng por reacción) a una concentración de 40 ng·µl⁻¹ y 2.5 µl de ADN por muestra (25 ng de ADN por reacción). Las temperaturas y ciclos para la amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 65 °C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

5.3.3 Condiciones de reacción para la detección del gen *Mil-2* de resistencia a *Meloidogyne incognita*

Se utilizaron los iniciadores PMiF3/PMiR3 para detectar del gen de resistencia *Mil-2*. La mezcla de reacción se hizo con los siguientes volúmenes: 2.2 µl de agua grado biología molecular, 10 µl de dNTP's (200 µM), 2.5 µl de amortiguador, 1.5 µl de MgCl₂ (3 mM), 0.3 µl de enzima DNA Taq polimerasa (1.5 unidades por reacción), 3 µl de cada iniciador (30 ng por reacción) a una concentración de 10 ng.µl⁻¹ y 2.5 µl de ADN por muestra (25 ng de ADN por reacción).

Las temperaturas y ciclos para la amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 63 °C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

5.3.4 Condiciones de reacción para la detección de los genes de resistencia *Tm-1*, *Tm-2/Tm2^c* al Virus Mosaico del Tomate (ToMV)

Se utilizaron los iniciadores SCN20F/SCN20R para identificar al gen de resistencia *Tm-1*. La mezcla de reacción se hizo con los siguientes volúmenes: 2.2 µl de agua grado biología molecular, 10 µl de dNTP's (200 µM), 2.5 µl de amortiguador, 1.5 µl de MgCl₂ (3 mM), 0.3 µl de enzima DNA Taq polimerasa (1.5 unidades por reacción), 3 µl de cada iniciador (30 ng por reacción) a una concentración de 10 ng.µl⁻¹ y 2.5 µl de ADN por muestra (25 ng de ADN por reacción). Las temperaturas y ciclos para la amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 60 °C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

Para identificar el gen de resistencia *Tm-2/Tm2^c* se utilizaron los iniciadores TMV-2262F/ TMV2678R, TM2-748F/TM2-1256R y SNP2494F/SNP2493R. La mezcla de reacción para cada par de iniciadores se hizo con los siguientes volúmenes: 22.2 µl de agua grado biología molecular, 10 µl de dNTP's (200 µM), 2.5 µl de amortiguador, 1.5 µl de MgCl₂ (3 mM), 0.3 µl de enzima DNA Taq polimerasa (1.5 unidades por reacción), 3 µl de cada iniciador (30 ng por reacción) a una concentración de 10 ng.µl⁻¹ y 2.5 µl de ADN por muestra (25 ng de ADN por reacción). Las temperaturas y ciclos para la amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, alineación a 62 °C por 1 minuto y polimerización a 72 °C por 1 minuto. Un último ciclo a 72 °C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

5.4 Pruebas de patogenicidad

Se realizaron cuatro bioensayos a partir del mes de septiembre de 2014 en el invernadero del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, uno para cada enfermedad estudiada (*Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, ToMV, agallas de jitomate provocadas por *Meloidogyne spp* y un testigo).

Los bioensayos incluyeron 65 de las líneas analizadas molecularmente, así como las variedades comerciales utilizadas como testigo (El Cid, Moctezuma, Cuauhtémoc, Espartaco y Aquiles).

Para los cuatro tratamientos: *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne* y el testigo, la unidad experimental se formó con seis plantas, se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones.

La siembra se realizó en charolas de unicel de 128 cavidades. El sustrato usado fue peat moss. Los riegos se hicieron con agua las primeras dos semanas posteriores a la siembra. Después se regó con solución nutritiva de Steinner (1968) al 50 %. A partir de la tercera semana la solución nutritiva fue al 100 %. A los 21 días después de la siembra se procedió a la inoculación. En el caso de *Meloidogyne* la evaluación fue realizada con base en la presencia de nódulos en la raíz, la escala visual de 1 (planta sin nódulos) a 5 (planta con más de 6 nódulos) (Imagen 2A). En el resto de las pruebas se evaluó la incidencia de la enfermedad, con una escala visual de 1 (planta sana) a 5 (planta muerta) (Imagen 3A).

5.4.1 Protocolo de inoculación para *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*

La preparación del inóculo se hizo en el Laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola, las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Verticillium dahliae* fueron proporcionadas por el Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH.

Se usó medio de cultivo PDA (Papa- Dextrosa- Agar) al cual se adicionó: 0.3 g de sulfato de estreptomicina y 0.5 ml de acaricida Agrimec® por cada 500 ml de medio (Sosa-moss *et al.*, 1997). En él se sembraron pequeños trozos con micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* o *Verticillium dahliae*, según el caso,

extraídos de la cepa original en PDA , se dejó crecer durante 20 días (Cruz y Alcala,1996).

Posteriormente se procedió a medir la concentración del inóculo. Para ello a cajas Petri conteniendo el patógeno se les agregó agua destilada estéril para formar una suspensión con los microconidios del hongo. Luego se tomó una muestra de 1 ml con una micropipeta, se depositó en un hematocitómetro y con la ayuda de un microscopio compuesto se determinó el número de microconidios·ml⁻¹. Mediante dilución se ajustó a una concentración de 1x10⁶ microconidios·ml⁻¹ (Rowe, 1980). Una vez cuantificado el inóculo se preparó la solución para inoculación de las plantas conservando la concentración 1x10⁶ microconidios·ml⁻¹, y añadiendo Twin 20® como adherente.

El proceso de inoculación se llevó a cabo de la siguiente manera: se extrajeron las plantas de la charola se lavaron las raíces cuidadosamente con agua corriente, se separaron en vasos plásticos por unidad experimental, se colocaron en un vaso con 30 ml de inóculo, durante 24 horas, posteriormente se volvieron a plantar en la charola (Ramírez y Romero, 1980).

Las plantas se evaluaron 15 días después de la inoculación. Se cuantificó la incidencia y la severidad del daño en las plantas inoculadas y el testigo, utilizando la escala visual antes mencionada. Posteriormente se tomaron plantas enfermas para reaislar el patógeno y comprobar que la infección fue causada por el hongo en cuestión (Rowe, 1980).

5.4.2 Protocolo de inoculación para nematodos del genero *Meloidogyne* sp.

La inoculación se llevó a cabo mediante la obtención de plantas de jitomate afectadas por nematodos, las cuales se obtuvieron del campo experimental “Tlapeaxco”. Las raíces de éstas fueron cortadas en pequeños trozos. Al momento de la siembra en charolas, se colocaron aproximadamente 2 g de raíces infectadas por cavidad mezclado con el peat moss. Los resultados se documentaron 40 días después de la siembra. Se desenterraron las plantas, se lavó la raíz procurando no romperla y se evaluó el agallamiento con base en una escala de daño visual.

5.5 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas consistieron en análisis de frecuencia. Se realizó la prueba no paramétrica de Friedman, para el diseño en bloques completos al azar; así mismo, se obtuvieron totales de rangos y se realizó la comparación estadística de las líneas con respecto a los testigos comerciales (Conover, 1980).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resistencias detectadas mediante marcadores genético moleculares.

Con el fin de detectar la presencia de siete genes de resistencia a fitopatógenos en líneas de jitomate se probaron nueve iniciadores. Se encontraron resistencias con frecuencias heterogéneas, los cuales se muestran en el Cuadro 2.

En el caso de *Fusarium oxysporum* se consideraron los genes I e I2, que confieren resistencia a las razas 0 y 1, respectivamente, mediante los marcadores At2-F3/At2-R3 para la primera y Z1063F/Z1063R para la segunda raza (Imagen 4A y 5A).

De las 109 líneas experimentales estudiadas, 93.5 % presentó el gen I. Para éste se reporta una banda de resistencia de 130 pb (Arens *et al.*, 2010). En tanto que 53.2 % de las líneas presentó el gen I2 para el cual Arens *et al.* (2010), reportan una banda de 940 pb asociada a la resistencia.

El marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* es una de las enfermedades más frecuentes y dañinas en los cultivos comerciales de jitomate (Agrios, 2004). Debido a su gran variabilidad genética y su amplia distribución, el manejo de esta enfermedad resulta difícil (González *et al.*, 2012), por lo que el uso de variedades de jitomate resistentes al hongo es el método más práctico para controlar la enfermedad en el campo (Agrios, 2004).

En el caso de los genes *Ve-1* y *Ve-2* que confieren resistencia a *Verticillium dahliae* se encontró que, a excepción de un material, todas las líneas tienen los genes de resistencia antes mencionados. Arens *et al.* (2010) reportan una banda de 476 pb asociada al locus de resistencia del gen *Ve-1* para el cual se utilizaron los iniciadores *Ve1_2072F/Ve1_2651R*; así mismo para el gen *Ve-2* reporta una banda de resistencia ligada a este gen de 242 pb, por lo que para ambos genes se obtuvo una frecuencia de 99 % (Imagen 6A).

Generalmente los daños iniciales de marchitez por *Verticillium* en una zona de cultivo son moderados. Con el tiempo la severidad de la enfermedad aumenta debido a una mayor concentración del inóculo en el área de cultivo y a la aparición de cepas más virulentas del hongo. Por lo que los daños serán cada vez más severos a menos que las plantas sean sustituidas por variedades resistentes (Agrios, 2004).

En el caso de la resistencia a *Meloidogyne incognita* se identifican dos bandas de diferente peso molecular, una de 550 pb que corresponde a la reportada como resistencia y otra de 350 pb que indica susceptibilidad. De las 109 líneas analizadas, el 31.1 % mostró resistencia ya que presentó la banda de resistencia o ambas bandas. De acuerdo con lo reportado por Arens *et al.* (2010) la presencia de ambas bandas indica que el material es heterocigoto para el gen *Mil-2* (Imagen 7A).

Los nematodos producen numerosos daños a la planta; los más importantes son la disminución en la absorción de agua y nutrientes, y el hecho de que proporcionen

un área de entrada a otros patógenos que penetran por las raíces (Agrios, 2004). El control en cultivos hortícolas está basado en aplicaciones de nematicidas y el bromuro de metilo, pero debido al impacto ambiental negativo y a las restricciones legislativas para su uso, se están buscando mejores estrategias de control; las plantas resistentes pueden jugar un papel muy importante en el manejo de *Meloidogyne* ya que inhiben la reproducción del nematodo y como son tolerantes al mismo pueden desarrollarse en campos infestados sin que haya una reducción significativa de la producción (Sorribas y Verdejo, 1999).

En el caso del análisis para detección de los genes *Tm-1* y *Tm-2/Tm2^c* que confieren resistencia al Virus Mosaico del Tomate, se utilizaron los iniciadores SCN20F/ SCN20R para detección del primero y los iniciadores TMV-2262F/TMV2678R, TM2-748F/TM2-1256 y SNP2494F/ SNP2493R, los cuales según la literatura producen bandas ligadas a la resistencia de 214 pb, 179 pb y 255 pb, respectivamente (Arens *et al.*, 2010).

De acuerdo con Ohmori *et al.* (1996) la banda del gen de resistencia *Tm-1* tiene una longitud de 1400 pb. Esta banda no se obtuvo para ninguno de los materiales evaluados (imagen 8A).

Para el gen de resistencia *Tm-2/Tm2^c* el análisis con los iniciadores SNP2494F/ SNP2493R permitió detectar que 23.8 % de las líneas presentaron la banda de resistencia reportada. Los iniciadores restantes para la detección de este gen no produjeron amplificación de resultados (Imagen 9A, 10A y 11A).

Una medida de control que se ha empleado en campos es el infectar plantas jóvenes de jitomate con una cepa atenuada de TMV, lo cual aumenta la producción hasta en 15 %. Aun así, las medidas sanitarias y el uso de variedades resistentes son los dos principales métodos de control de ToMV en jitomate (Agrios, 2004).

Cuadro 2. Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares

PATÓGENO	<i>Fusarium oxysporum</i>						<i>M. incognita</i>						ToMV			
GEN	1	RESISTENCIA	I2	RESISTENCIA	Ve1	RESISTENCIA	Ve2	RESISTENCIA	Mil-2	RESISTENCIA	Tm-1	RESISTENCIA	TMV-2262F	Tm-2 /Tm2 ^c	TM2-748F	RESISTENCIA
INICIADOR	At2-F3 / At2-R3		Z1063F / Z1063R		Ve1_2072F / Ve1_2651R		Ve2_2720F / Ve2_3040R		Pmif3 / Pmir3		SCN20F / SCN20R		TMV-2678R	/ SNP 2494F / SNP2493R	/ TM2-1256R	
Genotipo																
1A	0	S	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
1R	0	S	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
2	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
3	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
3A	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
4	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
5	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
6	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
7A	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
7R1	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
7R2	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
7R3	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
8	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
9A	0	S	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
10	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
11	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
11R	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
12R	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
13A	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
14	0	S	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
15	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S

Cuadro 2 (continuación). Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares

16	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
17	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
17H	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
18	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
19	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
20	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
21	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
22	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
23	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
24	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
25	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
26	1	R	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
27	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
28	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
29	1	R	0	S	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
30	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
31	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	1	0	R
31A	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
32	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
32B	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
33	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
34	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
35	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
36	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
36A	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
37	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S

Cuadro 2 (continuación). Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares

38	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
39	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
41	0	S	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
42	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
43	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
43H	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
44	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
45	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
46	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
47	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
47AB	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
48	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
49	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
50	1	R	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
51	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
51H	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
52	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
53	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
54	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
55	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	1	0	R
57	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
58	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
59	1	R	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
60	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
61	1	R	0	S	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
62	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R

Cuadro 2 (continuación). Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares

63	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
64	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
65	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
66A	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
66R	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
67	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	1	0	R
68	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
68A	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
69	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
70	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
71	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
72	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
73	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
74	1	R	1	R	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
75	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	1	0	R
76	0	S	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	1	0	R
76H	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
77H1	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
77H2	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
77A	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
77R	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R
79	1	R	0	S	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
80	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
84	1	R	0	S	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
85	1	R	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	0	0	S
86	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	1	0	R

Cuadro 2 (continuación). Resultados de la detección de siete genes de resistencia a patógenos en ADN de 109 líneas y seis variedades comerciales de jitomate mediante marcadores moleculares

87A	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
88B	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
88	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
88A	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
88R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	S	0	S	0	1	0	R
89	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
90	1	R	1	R	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
91	1	R	0	S	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
92	1	R	0	S	1	R	1	R	0	S	0	S	0	0	0	S
92D	1	R	0	S	1	R	1	R	2	R	0	S	0	0	0	S
FRECUENCIAS %			93.6		53.2		99.1		99.1		31.2		0			24
Cuauhtémoc	1		1	R	1	R	1	R	2	R	0		0	0	0	S
Espartaco	1		1	R	1	R	1	R	1	R	0		0	0	0	S
Moctezuma	0		1	R	1	R	1	R	2	R	0		0	0	0	S
Aquiles	1		1	R	0	S	0	S	1	R	0		0	0	0	S
Mermaid	1		1	R	1	R	1	R	2	R	0		0	0	0	S
El Cid	1		1	R	1	R	1	R	0	S	0		0	0	0	S

R-resistente, S-susceptible, 1- resistente, 0- susceptible, 2- bandas de resistencia y susceptibilidad presentes.

6.2 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas para estudiar los niveles de incidencia y severidad sobre plántulas de jitomate de 21 días de edad.

Con el fin de corroborar que alguna anomalía en el desarrollo de las plantas que no estuviera asociado con los patógenos estudiados, en el experimento se incluyó una repetición de testigo, el cual no se inoculó. Una vez verificado el crecimiento normal del testigo, se procedió a evaluar solo las plantas inoculadas.

La prueba no paramétrica de Friedman realizada en las tres pruebas fitopatológicas, detectó diferencias estadísticas en todas ellas, las cuales fueron basadas en los valores obtenidos por los testigos comerciales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Estadística T de la prueba de Friedman (Conover, 1980) de índices de incidencia de tres patógenos inoculados a plántulas de jitomate

Factor	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>
Genotipos	1.73**	1.92**	1.48*
Media incidencia	55.7 %,	47.66 %	44.6 %
**significancia $\alpha \leq 0.01$		*significancia $\alpha \leq 0.05$	

Dichas pruebas detectaron diferencias estadísticas ($\alpha < 0.05$) en el grado de tolerancia de los genotipos bajo estudio. La enfermedad que causó mayor daño en plántula fue *Fusarium oxysporum* al manifestar mayor promedio de incidencia (Cuadro 3).

Ramírez (1991) reporta que *Fusarium oxysporum* es capaz de destruir el cultivo de jitomate en cualquier etapa de desarrollo. Probablemente el hongo se presentó con mayor intensidad en este estudio por la edad de las plantas utilizadas, ya que era tejido herbáceo, el cual presentó menos resistencia a la entrada del patógeno.

Para los ensayos realizados con los hongos *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* las condiciones ambientales durante el experimento fueron favorables para su desarrollo debido a que a pesar de realizar la evaluación en invernadero, se presentó alta humedad relativa causada por la mayor precipitación mensual en septiembre del año 2014 (CONAGUA, 2014). Lo anterior coincidió con lo encontrado por Grajales y Brindis (2011) quienes reportan que la alta humedad relativa incrementa en gran medida el riesgo de enfermedades fungosas como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*, consideración que también puede ser aplicada a *Verticillium* (Romero,1988).

La concentración de inóculo utilizada probablemente fue otro de los factores decisivos que influyeron en los resultados obtenidos, ya que los patógenos ejercieron alta presión sobre su hospedante. Es necesario considerar que en condiciones comerciales las plantas son sometidas al estrés de la enfermedad aproximadamente 60 días posteriores al trasplante, puesto que previo a esto, se hacen tratamientos preventivos a semilla y plántula. La cantidad de inóculo usado en el presente trabajo se diseñó para asegurar la penetración del patógeno, a pesar de que es más alta que la reportada por Leslie y Summerell (2006), que indican que la concentración de *Fusarium* es de 50 a 2000 propágulos·ml⁻¹ de suelo, ésta permitió obtener diferencias claras y concisas en cuanto a la incidencia en las líneas

evaluadas, no obstante, produjo daños aun en los testigos comerciales, los cuales son reportados como resistentes a los patógenos inoculados, pero en el experimento tuvieron altas incidencias.

En condiciones comerciales, el desarrollo de la planta generalmente es aséptico ya que al momento del trasplante generalmente se aplican fungicidas o nematicidas, los cuales retardan la infección, situación que permite a la planta de jitomate empezar a enfrentarse a los patógenos hasta una edad de 75 días aproximadamente, donde los tejidos más lignificados ofrecen mayor resistencia a la penetración del patógeno, situación contraria a la prueba realizada en este estudio donde se utilizó una alta concentración de inóculo y plantas de 21 días de edad (Jaramillo *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Agrupación de líneas con base en comparación de rangos con respecto a híbridos comerciales de tres fitopatógenos inoculados en plantas de jitomate (Conover, 1980).

Línea	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Verticillium dahliae</i>			<i>Meloidogyne spp.</i>		
	T. rango*	Agrupación ¹	Inc**	T. rango *	Agrupación ²	Inc**	T. rango*	Agrupación ³	Inc**
3	80.5	A	30	189.5	A B C	66.7	85.5	A	32.5
5	175	B C D	54.2	164	A B	56.7	57	A	32.5
6	195	D	60.8	115.5	A	39.2	140	A B	44.2
7A	192	C D	65.0	82.5	A	35.8	148.5	A B	46.7
7R1	110	A B C	36.7	94	A	38.3	111.5	A	38.3
7R2	94	A B C	30.8	164	A B	50.8	92.5	A	35.0
8	139	A B C	40.8	60	A	29.2	140.5	A B	45.0
9A	127	A B C	36.7	69.5	A	28.3	102.5	A	38.3
10	169	A B C D	57.5	114.5	A	45.8	142	A B	42.5
11	118.5	A B C	39.2	85.5	A	31.7	123.5	A	41.7
13A	95.5	A B C	40.0	122	A B	44.2	211	B C	55.0
14	161	A B C D	50.8	180	A B C	50.0	172	A B	48.3
16	108	A B C	42.5	143.5	A B	50.0	72	A	35.8
17	83.5	A	25.8	232.5	C	62.5	224	B C	54.2
19	81.5	A	26.7	92.5	A	40.8	155.5	A B	45.0
20	155.5	A B C D	46.7	267	C	75.8	173	A B C	48.3
22	225.5	D	69.2	183.5	A B C	48.3	131.5	A B	43.3
23	188	B C D	55.0	163	A B	51.7	138.5	A B	42.5
25	149	A B C	45.0	117.5	A B	38.3	119	A	40.0
28	113.5	A B C	37.5	83.5	A	37.5	274	C	72.5
29	123	A B C	38.3	160	A B	52.5	147.5	A B	45.0
30	205	D	69.2	134.5	A B	45.0	73	A	35.8
31	160	A B C D	49.2	134	A B	50.0	217.5	B C	55.0
32	115	A B C	35.0	218	B C	58.3	94.5	A	38.3
34	191.5	C D	61.7	113.5	A	40.8	108	A	40.8
35	213	D	65.0	143	A B	48.3	107.5	A	39.2
36	226.5	D	70.8	118.5	A B	46.7	224	B C	55.8
37	127.5	A B C	43.3	124	A B	44.2	90.5	A	38.3
39	169	A B C D	57.5	78.5	A	39.2	104	A	38.3
43	142	A B C	45.8	235	C	64.2	155.5	A B	45.8
44	213.5	D	64.2	193.5	A B C	50.8	235	B C	60.8
45	179.5	B C D	52.5	202	B C	56.7	150.5	A B	43.3
47	121	A B C	41.7	93.5	A	41.7	117.5	A	40.8
51	145.5	A B C	46.7	88	A	39.2	202	B C	55.0
52	80	A	25.8	77.5	A	33.3	179	A B C	51.7
57	224	D	68.3	201	B C	59.2	163	A B	45.8
59	99	A B C	35.0	124.5	A B	47.5	112.5	A	40.8
60	191.5	C D	56.7	172	A B C	51.7	57.5	A	35.0
61	130.5	A B C	38.3	147	A B	41.7	89.5	A	35.8
62	209.5	D	65.8	189.5	A B C	52.5	202	B C	50.8
64	100	A B C	33.3	213	B C	59.2	203.5	B C	56.7
65	77.5	A	26.7	49.5	A	30.0	145.5	A B	50.8

Cuadro 4 (continuación). Agrupación de líneas con base en comparación de rangos con respecto a híbridos comerciales de tres fitopatógenos inoculados en plantas de jitomate (Conover, 1980).

66A	68	A		28.3	174.5	A	B	C	62.5	138.5	A	B	43.3				
66R	176		B	C	D	58.3	151	A	B		A		36.7				
68	121	A	B	C		37.5	150	A	B		A		35.8				
69	179.5		B	C	D	58.3	82	A				B	C	54.2			
70	193			C	D	57.5	187	A	B	C	52.5	119.5	A		40.0		
71	138	A	B	C		45.0	84	A			35.0	133.5	A	B	44.2		
72	94	A	B	C		35.8	160.5	A	B		52.5	117.5	A		40.8		
73	139	A	B	C		39.2	119.5	A	B		44.2	167	A	B	45.0		
74	93.5	A	B	C		30.8	199		B	C	53.3	114	A		40.8		
75	114	A	B	C		35.8	124	A	B		42.5	182.5	A	B	C	50.0	
76	64	A				26.7	148	A	B		43.3	165.5	A	B		46.7	
77	133.5	A	B	C		43.3	69	A			34.2	96	A			38.3	
77R	129	A	B	C		42.5	117.5	A	B		35.0	205		B	C	52.5	
79	61.5	A				22.5	106	A			42.5	191	A	B	C	48.3	
80	154	A	B	C	D	45.0	86.5	A			43.3	175	A	B	C	45.8	
84	257.5				E	84.2	137.5	A	B		55.0	176.5	A	B	C	50.8	
86	254.5				D	E	85.0	238.5			C	63.3	176.5	A	B	C	50.0
87A	99.5	A	B	C		37.5	83	A			36.7	133.5	A	B		44.2	
88R	137	A	B	C		47.5	178	A	B	C	55.0	170.5	A	B		47.5	
89	114.5	A	B	C		39.2	217.5		B	C	60.0	157.5	A	B		47.5	
90	161	A	B	C	D	50.0	199.5		B	C	56.7	172.5	A	B	C	50.0	
91	182.5		B	C	D	55.8	209.5		B	C	62.5	122.5	A			41.7	
92	153.5	A	B	C	D	46.7	107.5	A			45.0	114.5	A			37.5	
Cuauhtémoc	68.5	A				24.2	168	A	B	C	51.7	140.5	A	B		39.2	
Espartaco	241				D	E	75.8	170	A	B	C	52.5	211.5		B	C	52.5
Moctezuma	164	A	B	C	D	53.3	93.5	A			37.5	85	A			35.8	
Aquiles	90	A	B	C		35.8	196	A	B	C	55.8	172	A	B	C	45.8	
Mermaid	84.5	A	B			29.2	116.5	A	B		42.5	91.5	A			37.5	
El Cid	153	A	B	C	D	45.8	216.5		B	C	64.2	127.5	A	B		42.5	

Medias con la misma letra en columnas son estadísticamente iguales ($\alpha \leq 0.05$) de acuerdo a:

¹ A- Cuauhtémoc, B- Mermaid, C- Aquiles, D- El Cid, E- Espartaco; la variedad Moctezuma es estadísticamente igual a El Cid.

² A- Moctezuma, B-Mermaid, C-Cuauhtémoc; las variedades Espartaco, Aquiles y El Cid son estadísticamente iguales a Cuauhtémoc.

³ A- Moctezuma, B- El Cid, C- Aquiles; las variedades Moctezuma y Mermaid, El Cid y Cuauhtémoc, Aquiles y Espartaco, son estadísticamente iguales.

*Total de rango

**Incidencia

Entre los resultados de las pruebas *in vivo*, y los obtenidos por marcadores moleculares, se pueden detectar discrepancias para muchos genotipos, ya que a pesar de que la presencia de las bandas indican la presencia del gen de resistencia, estos materiales tuvieron altos índices de incidencia. Esto puede atribuirse a que el gen de resistencia detectado, sólo se exprese en planta en estado adulto, lo cual coincidiría con lo reportado por Espino *et al.* (2010) en genes de resistencia a roya (*Puccinia triticina* Ericks.) presentes en trigo.

Por otra parte, la ausencia de la banda correspondiente al gen de resistencia en líneas con tolerancia *in vivo*, indicaría la posibilidad de que dicha tolerancia haya sido conferida por un gen o sistema genético diferente al buscado. Mosquera *et al.* (2008) reportan que existen dos tipos de resistencia: cualitativa y cuantitativa, la cuantitativa es controlada por varios genes, que actúan conjuntamente en defensa de la planta; no es específica a un patógeno y puede ser afectada por cambios en el ambiente.

De acuerdo con Guimarães *et al.* (2007), las pruebas de diagnóstico de varias resistencias son difíciles de utilizar debido a que a menudo no pueden desarrollarse por la difícil producción del inóculo y su mantenimiento. Además, cuando los síntomas son detectables sólo en plantas adultas y/o frutos, las pruebas de diagnóstico pueden ser particularmente caras y difíciles de realizar, por lo que sería recomendable evaluar nuevamente las líneas utilizadas, en una etapa fenológica posterior a la evaluada en el presente trabajo, para tener mayor certeza de la resistencia o susceptibilidad encontrada.

En relación a los materiales con resultados de resistencia satisfactorios, la recomendación sería evaluar su comportamiento agronómico, ya si éstas tienen características comerciales, podrían ser llevados directamente a producción. De no ser el caso, se podrían emplear en la formación de híbridos con el fin de conferir la resistencia encontrada en el presente estudio a otros materiales con mejores caracteres agronómicos y comerciales.

6.2.1 Pruebas con *Fusarium oxysporum*

Al comparar las líneas con los testigos, se obtuvo un total de cinco grupos. El mejor testigo fue la variedad Cuauhtémoc, seguida de Mermaid, Aquiles, El Cid, Moctezuma y Espartaco, esto basado en la evaluación del cuadro 4 (Conover, 1980).

Las líneas 79, 76, 66A, 65, 52, 3, 19 y 17 estadísticamente son iguales ($\alpha=0.05$) a la variedad Cuauhtémoc, por lo que presentaron la menor incidencia de la enfermedad. Aunque hay 46 líneas más que se presentan dentro de la misma agrupación.

Tomando en cuenta la evaluación visual realizada y los cálculos mediante los cuales se obtuvo el valor de incidencia, se consideró que las líneas resistentes deberían tener un valor de incidencia de entre 20 y 25 %, sin embargo, solo la línea 79 se encuentra en este rango. Las líneas con mayor tolerancia observada fueron las arriba mencionadas, aunque todas presentan una incidencia entre 25 y 30 %. Como tolerantes se consideran las que presentaron una incidencia menor al 40 %,

en este caso fueron las líneas: 7R2, 74, 64, 32, 59, 75, 72, 7R1, 9A, 28, 68, 87A, 61, 29, 11, 73, 89 y 13A. Aunque estuvieron agrupadas con las líneas consideradas como tolerantes, la incidencia se elevó hasta 10 %. Las líneas restantes fueron consideradas como susceptibles ya que el grado de infección en el estado de plántula fue muy elevado para poder mantener una planta en producción.

Al relacionar estos resultados con los obtenidos en el análisis molecular, se observó que de los 26 materiales considerados resistentes y/o tolerantes, las líneas 76, 65, 52, 19, 17, 7R2, 74, 64, 32, 59, 75, 72, 7R1, 9A, 28, 68, 11 y 73 tuvieron baja incidencia y presentaron la banda asociada con la resistencia a *Fusarium oxysporum*, mientras que las líneas 79, 66A, 3, 87A, 61, 29, 89 y 13A, resultaron ser resistentes y/o tolerantes *in vivo* pero no presentaron la banda antes mencionada. Esto puede deberse a que hay numerosos genes que no han sido reportados, los cuales pueden conferir resistencia. Esta situación podría indicar que las líneas evaluadas poseen un sistema de resistencia genética diferente a la buscada con el marcador molecular usado.

6.2.2 Pruebas con *Verticillium dahliae*

Se obtuvieron tres agrupaciones con base en los testigos Moctezuma, Mermaid y Cuauhtémoc. Espartaco, Aquiles y El Cid, no presentaron diferencias significativas; 16 líneas fueron estadísticamente ($\alpha=0.05$) iguales al testigo Moctezuma pero con valores de resistencia menores en la comparación de rangos. Éstas fueron: 65, 8, 77, 9A, 52, 39, 69, 7A, 87A, 28, 71, 11, 80, 51, 19 y 47. Se presentaron 41 líneas con valores menores que el testigo aunque estadísticamente iguales a éste.

En cuanto a los niveles de incidencia obtenidos ningún material presentó un valor menor del 25 %, solo las líneas 65, 8 y 9A, tuvieron valores menores al 30 %, por lo cual son las que se consideran tolerantes en términos prácticos. Las líneas 11, 69, 52, 77, 71, 77R, 7A, 87 A, 28, 7R1, 25, 6, 39, 51, 19 y 34, presentaron niveles de incidencia que fueron del 31 al 40 % por lo que se consideraron como materiales con baja tolerancia. Las líneas restantes sobrepasaron el 40 % de incidencia por lo cual no son aptas para incluirlas como fuentes de resistencia en un programa de mejoramiento.

Respecto al análisis molecular, sólo dos materiales no presentaron la banda asociada a la resistencia; el 88R y la variedad Aquiles, a pesar de que esta última, según datos de la empresa productora, sí tiene resistencia genética al patógeno en cuestión.

6.2.3 Pruebas para *Meloidogyne incognita*

Se obtuvieron 3 agrupaciones basadas en los testigos Moctezuma, El Cid y Aquiles. Las líneas 5, 60, 16, 30, 66R y 68 tuvieron mayor tolerancia que el mejor testigo, aunque compartieron agrupación estadística con 52 materiales más.

En cuanto al nivel de incidencia, ningún material presentó valores inferiores al 25 %. Las líneas con incidencia menor al 40 % fueron 3, 5, 7R2, 60, 16, 61, 68, 30, 66R, 92, 9A, 37, 39, 77, 7R1, 32, 35, 70 y 25. Los materiales restantes fueron susceptibles.

De las mejores sólo la 5, 39 y 35 presentaron en el análisis molecular la banda de resistencia; por su parte las líneas 61 y 9A, presentaron ambas bandas la de resistencia y la de susceptibilidad; mientras que las líneas restantes presentan la banda asociada a la susceptibilidad.

De acuerdo con Cook y Evans (1987), la resistencia es un término utilizado para describir un aspecto de la interacción entre la planta y el nematodo: la reproducción. Por esto Cook y Starr (2006), definen que un cultivo es resistente cuando no permite ninguna o muy poca reproducción del nematodo, mientras que es susceptible cuando permite la libre reproducción de los nematodos en sus tejidos.

Navarro *et al.* (2009), concluyen que el índice de agallamiento no debe ser utilizado como único elemento para determinar la resistencia de los genotipos, pues la reproducción o no del nematodo es el criterio que establece su grado de resistencia/susceptibilidad. Por lo que se sugiere realizar una segunda prueba para evaluar la resistencia considerando también el nivel de reproducción de los nematodos en la raíz.

Adicionalmente se recomienda evaluar nuevamente las líneas sobresalientes pero en etapa adulta, con el fin de verificar si continúa manifestándose la resistencia observada en plántula.

7. CONCLUSIONES

El uso de marcadores moleculares permitió determinar la presencia de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia y susceptibilidad en los materiales evaluados. El marcador PMif3/PMir3 permitió encontrar materiales heterocigotos para el gen de resistencia a *Meloidogyne incognita*. Con el uso del marcador SNP2494/SNP 2493 para detección del *Tm-2/Tm2^c* que confiere resistencia a ToMV se encontraron 31 líneas con posible resistencia.

Los resultados obtenidos en las pruebas fitopatológicas discreparon en parte con los obtenidos en el análisis molecular. Esto pudo deberse a la edad de la planta al momento de la inoculación, a la concentración del patógeno en el inóculo utilizado y a la existencia de genes de resistencia distintos que no se detectaron con los marcadores utilizados. La línea 3 resultó resistente a *Fusarium* y *Meloidogyne*, mientras que las líneas 19, 52 y 65 lo fueron a *Fusarium* y *Verticillium*, por lo que éstas podrían ser incorporadas a un programa de mejoramiento para obtención de variedades o ser llevadas directamente a producción.

Las líneas 17, 52, 19, 65, 76 y 66A presentaron niveles de incidencia menores al 30 % al ser inoculadas con *Fusarium oxysporum* y en el análisis genético presentaron la banda asociada a la resistencia, por lo que podrían considerarse como una fuente para la obtención de variedades resistentes a través de la hibridación.

8. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. (2004). Fitopatología. Departamento de Fitopatología. Universidad de Massachusetts. USA. 821 p.

Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., Schoot H., Calvache D., Ponz F., Collonnier C., Mathis R., Smilde D., Caranta C., & Vosman B. (2010). Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and Applied Genetics*. 120:655–664.

Ascencio, A. A, López B. A., Borrego E. F., Rodríguez H. S. A., Flores O. A., Jiménez D. F., & Gámez V. A. J. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: II. Herencia de la Resistencia a la Raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Tres Especies del Género *Lycopersicon*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26 (2):180-183.

Bautista M.N, Chavarin P.C, Valenzuela E.F. (2008). Jitomate. Tecnología para su producción en invernadero. Colegio de Postgraduados. Segunda edición. pp. 213

Barone, A. (2004). Molecular marker- assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Department of soil, plant and environmental science, University of Naples “Federico II” via università. 81:111-117.

CIMMYT. (2006). Protocolos de laboratorio. Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. pp. 11-12.

Conti, M., Gallitelli, D., Lisa, V., Lovisolo, O., Martelli, G.P., Ragozzino, A., Rana, G.L., Vovlas, C. (2000). Principales virus de las plantas hortícolas. Bayer S. A. de C. V. – Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 206 p.

Conover, W.J. (1980). Practical nonparametrics statistics. Segunda edición. Nueva York: Wiley. 493 p.

Cook, R., Evans, K. (1987). Resistance and tolerance. In: Brown RH and Kerry B (editors). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press., pp. 179-232.

Cook, R., Starr, J.L. (2006). Resistant Cultivars. In: Perry RN, Moens M (editors). Plant Nematology. CABI. UK, pp. 370-391.

Dellaporta, S. J., Wood, J, Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: versión II. Plant Molecular Biology. Rep. 1:19-21.

Echandi, E. (1967). Manual de laboratorio para fitopatología general. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 51 p.

Finlay, K.W. (1953) Inheritance of spotted wilt resistance in tomatoes, five gene controlling spotted wilt resistance in four tomatoes. Australian Journal of Biological Sciences 6:153–163.

Foolad, M.R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. International Journal of Plant Genomics. 2007:52.

French, R.E., Hebert, T. T. (1982). Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. Costa Rica. Primera edición. pp.158-186.

González, F.M., Gómez, L., Rodríguez, M. G., Piñón, M., Casanova, A., Gómez, O., & Rodríguez, Y. (2009). Respuesta de genotipos de solanáceas frente a *Meloidogyne incognita* (kofoid y white) chitwood raza 2 y *m. arenaria* (neal) chitwood. Revista de Protección Vegetal 24(3):137-145.

Gonzalez, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*- tomate. Revista de protección vegetal 27 (1):1-7.

Hall, T.J. (1980). Resistance at the *Tm-2* locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica* 29: 189–197.

Huerta Espino, H.J., Ravi S.P., Villaseñor M. H. E., Espitia, R.E., & Leyva M. S. G. (2003) Postulación de Genes de Resistencia a la Roya de la Hoja (*Puccinia triticina* Ericks.) en plántula y planta adulta en genotipos élite de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.)Revista Mexicana de Fitopatología, 21(3): 239-247.

jaramillo, N.J., Rodriguez, V.P., Guzman, A.M., Zapata, C.M.,& Regifo, M. T. (2007). Manual Técnico. Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO. Primera edición. Antioquia, Colombia.

Jones, J.P., & Woltz, S.S. (1981). *Fusarium*-incited diseases of tomato and potato and their control. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, pp.157-168.

Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D. R., Kulcsar, F., Rooijen, G., Doug R., Waterer, D. R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., Howard, R. J., Fischer, R., & Prüfer D. (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. PNAS 98 (11): 6511-6515.

Lanfermeijer, F.C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J. G., De Haan, P., & Hille, J. (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-22* from *Lycopersicon esculentum*. Plant Molecular Biology 52:1037–1049.

Leslie, J.F., & Summerell, B.A.(2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. 369 p.

María, G. F., Gómez, L., Rodríguez, M. G., Piñón, M., Casanova, A., Gómez, O., & Rodríguez Y. (2010). Respuesta de genotipos de solanáceas frente A *Meloidogyne incognita* (kofoid y white) chitwood raza 2 y *M. arenaria* (Neal) Chitwood.. Revista protección vegetal 25 (1):51-57.

Medina-Filho H., & Stevens, M. (1980). Tomato breeding for nematode resistance: survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphatase. Acta Horticulturae 100: 383-391.

Mehrch, E. K., Mejía, L., Gharsallah-Couchane, S., Salus, M. S., Martin, C. T., Hatimi, A., Vidavski, F., Williamson, V., & Maxwell D. P. (2005). PCR-based methods for tagging the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germoplasm. Acta Horticulturae 695:263–270.

Milligan, S., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., & Williamson, V. (1998). The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. The plant cell 10: 1307-1319.

Mosquera, T., Fernández, C., Martínez, L., Acuña, A., & Cuéllar, D. (2008). Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. Estado de arte. Agronomía colombiana 26(1):7-15.

Navarro, B. L., Gómez, L., Enrique, R., González, F.M., & Rodríguez, M.G. (2009). Comportamiento de genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) frente a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. Revista Protección Vegetal 24 (1): 54-56.

Ohmori, T., Murata, M., & Motoyoshi, F. (1996). Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. Theoretical and Applied Genetics 92:151–156.

- Ori, N., Eshed, Y., Paran I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D., & Fluhr R. (1997). The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* 9(4):521–532.
- Panthee, D. R., & Foolad, M. R. (2012). A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato. *Euphytica* 184:165–179.
- Pelham, J. (1966). Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica* 15: 258–267.
- Ramírez, V.J., & Romero, C.S. (1980). Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia* 39: 9-18.
- Rivera C.G. 2004. Conceptos Introductorios a la Fitopatología. EUNED. San José, Costa Rica. 336 p.
- Ramírez, V.J. (1991). Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. México. 107 p.
- Reis, A., Giordano, L.B., Lopes, C.A., & Boiteux L.S. 2004. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germoplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:495-502.
- Rivera, C.G. 2004. Conceptos introductorios a la fitopatología. EUNED. San José, Costa Rica. 336 p.
- Romero, C.S. (1988). Hongos fitopatógenos. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.
- Rouchka, E.E., & Cha, I.E. (2009). Current Trends in Pseudogene Detection and Characterization. *Current Bioinformatics* 4 (2): 112-119.

- Rowe, R. C. (1980). Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-crown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathology* 70(12):1143-1148.
- Schaible, L., Cannon, Os., & Waddoups, V. (1951). Inheritance of resistance to Verticillium wilt in a tomato cross. *Phytopathology* 41: 986–990.
- Scott, J. W., Agrama, H. A., & Jones, J. P. (2004). RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to Fusarium wilt races 1, 2 and 3 in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(3):394–400.
- Sela-Buurlage, M. B., Budai-Hadrian, O., Pan Q., Carmel-Goren, L., Vunsch, R., Zamir, D., & Fluhr, R. (2001). Genome-wide dissection of Fusarium resistance in tomato reveals multiple complex loci. *Mol Genet Genomics* 265:1104–1111.
- Skupinová, S., Vejl, P., Sedlák, P., Bardová, M., Srbek, L., Klápště, P., Zouhar, M., & Tesařová, B. (2004). Using DNA markers for characterisation of tomato resistance against root nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Soil Environmental*. 50(2): 59–64.
- Sorribas, F.J., & Verdejo, L. S. (1999). Capacidad parasitaria de *Meloidogyne spp.* En cultivares de tomate resistente. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal* 14 (1):237-245.
- Sosa-Moss, C., Perdomo, R. F., Brathwaite, W. D. C., & Salazar, C.J.J. (1997). Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). Segunda edición. pp.139-141.
- Stevens, M. R., Scott, S. J., & Gergerich, R.C. (1992) Inheritance of gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59 (1):9–17.

Valenzuela-Ureta, J.G., Lawn, D.A., Heisey, R.F. & Zamudionaloa, V. (1996). First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. Plant Disease 26(2):114-120.

Veremis, J. C., & Roberts, P. A. (1996). Relationships between Meloidogyne incognita resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. Theoretical and Applied Genetics 93(5-6):950-959.

Williamson, V., Ho, J., Wu, F., Miller, N., & Kaloshian, I. (1994). A PCR based marker tightly linked to the nematode resistance gene Mi in tomato. Theoretical and Applied Genetics. 87(7): 757-763.

Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Wen, Y., Williamson, V. (1995). Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. Theoretical and Applied Genetics 91(3): 457–464.

9. ANEXOS

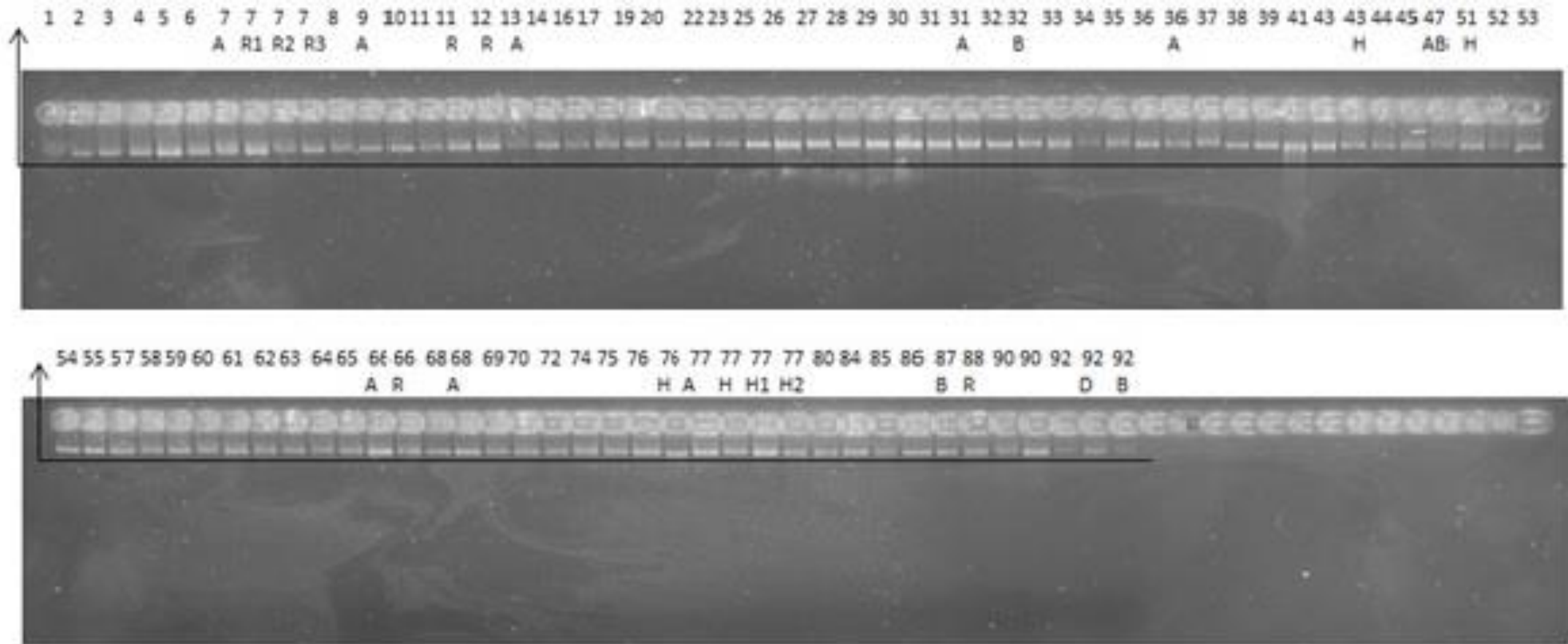


Imagen 1 A. Gel de calidad de ADN extraído de líneas de jitomate , en agarosa al 1.5 %



Imagen 2 A. Escala visual utilizada para la evaluacion de *Meloidogyne* basada en indice de agallamiento.



Imagen 3 A. Escala de evaluación visual para *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae*

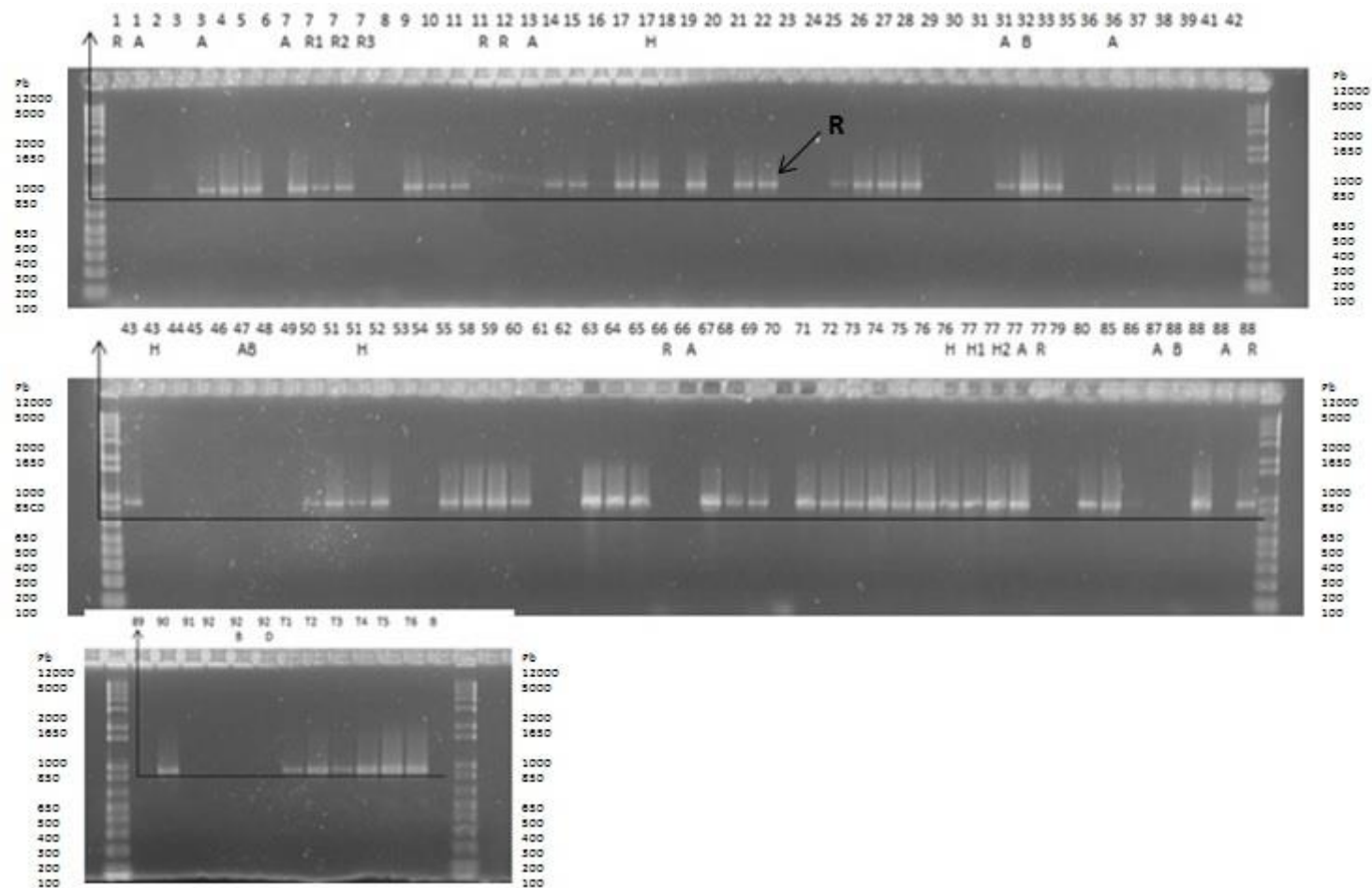


Imagen 4 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Z1063F/Z1063R, para la identificación del gen de resistencia I2 a la raza 1 de *Fusarium oxysporum*.

R=banda de resistencia de 940 pb .

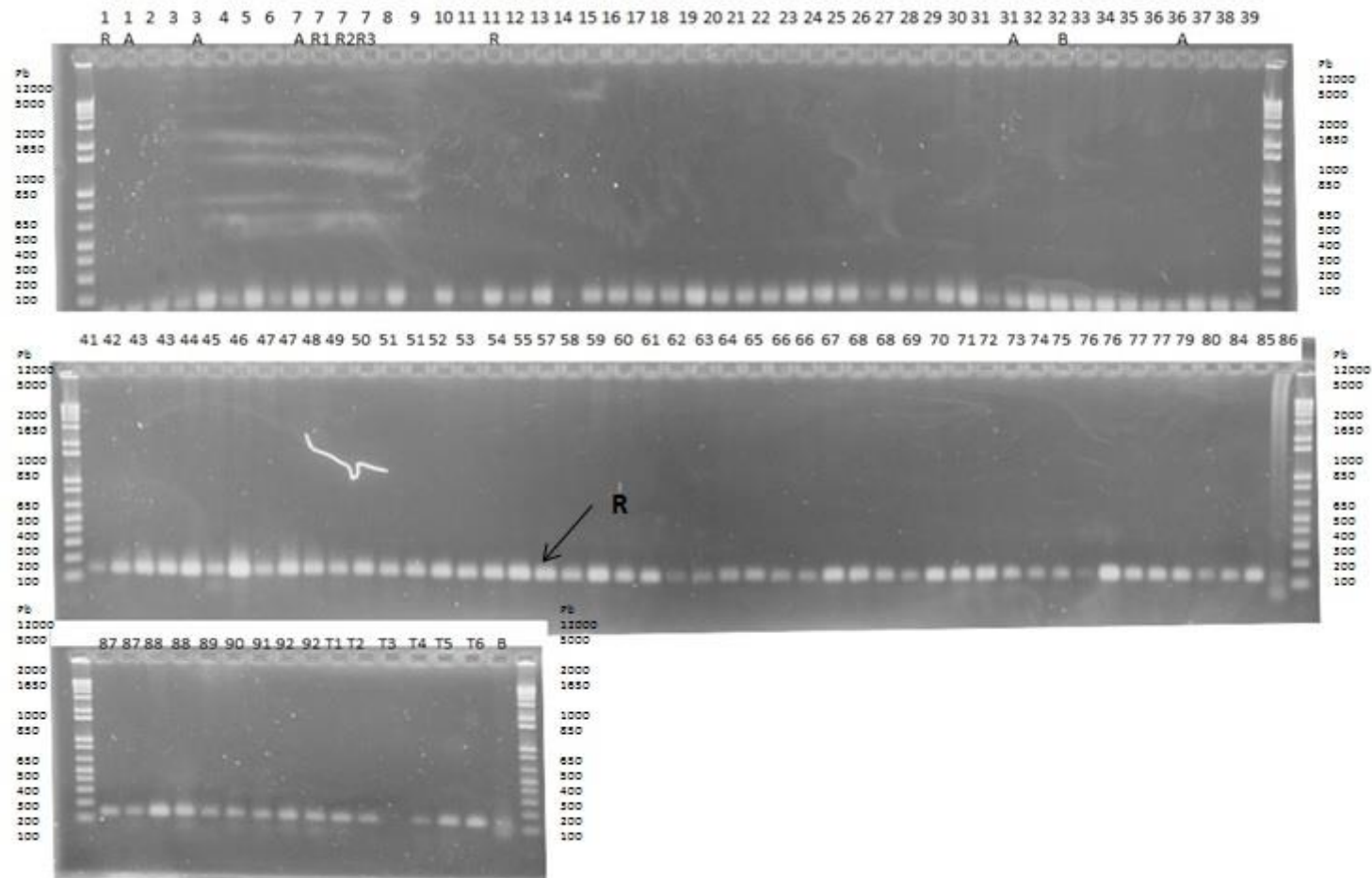


Imagen 5 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores At2F3/At2R3, para la identificación del gen de resistencia I a la raza 0 de *Fusarium oxysporum*.

R= banda de resistencia de 130 pb.

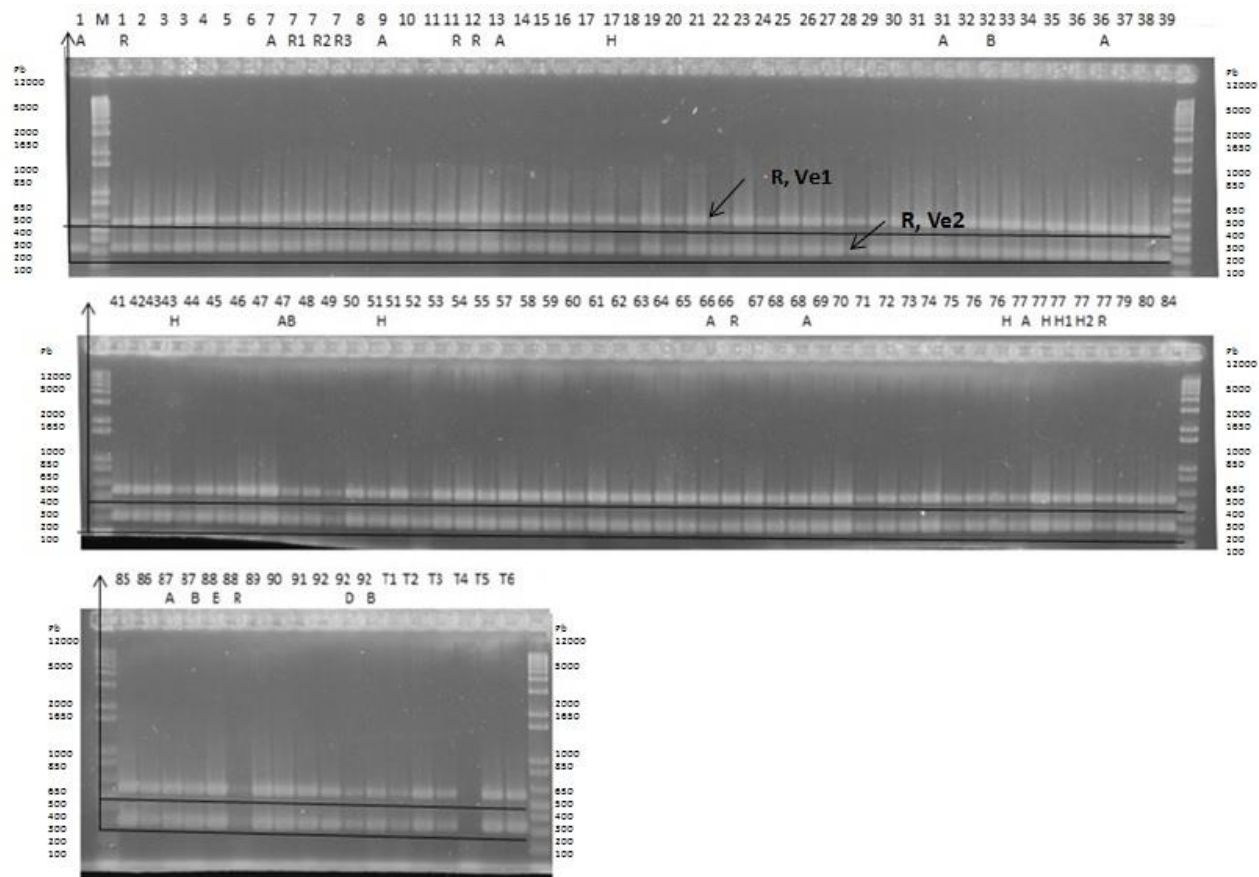


Imagen 6 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Ve1_2072F/Ve1_2651R y Ve2_2720F/Ve2_3040R para la identificación de los genes de resistencia Ve1 y Ve2 a *Verticillium dahliae*.

R, Ve1= banda de resistencia de 476 pb generada por el iniciador Ve1_2072F/Ve1_2651R.

R, Ve2= banda de resistencia de 242 pb generada por el iniciador Ve2_2720F/Ve2_3040R.

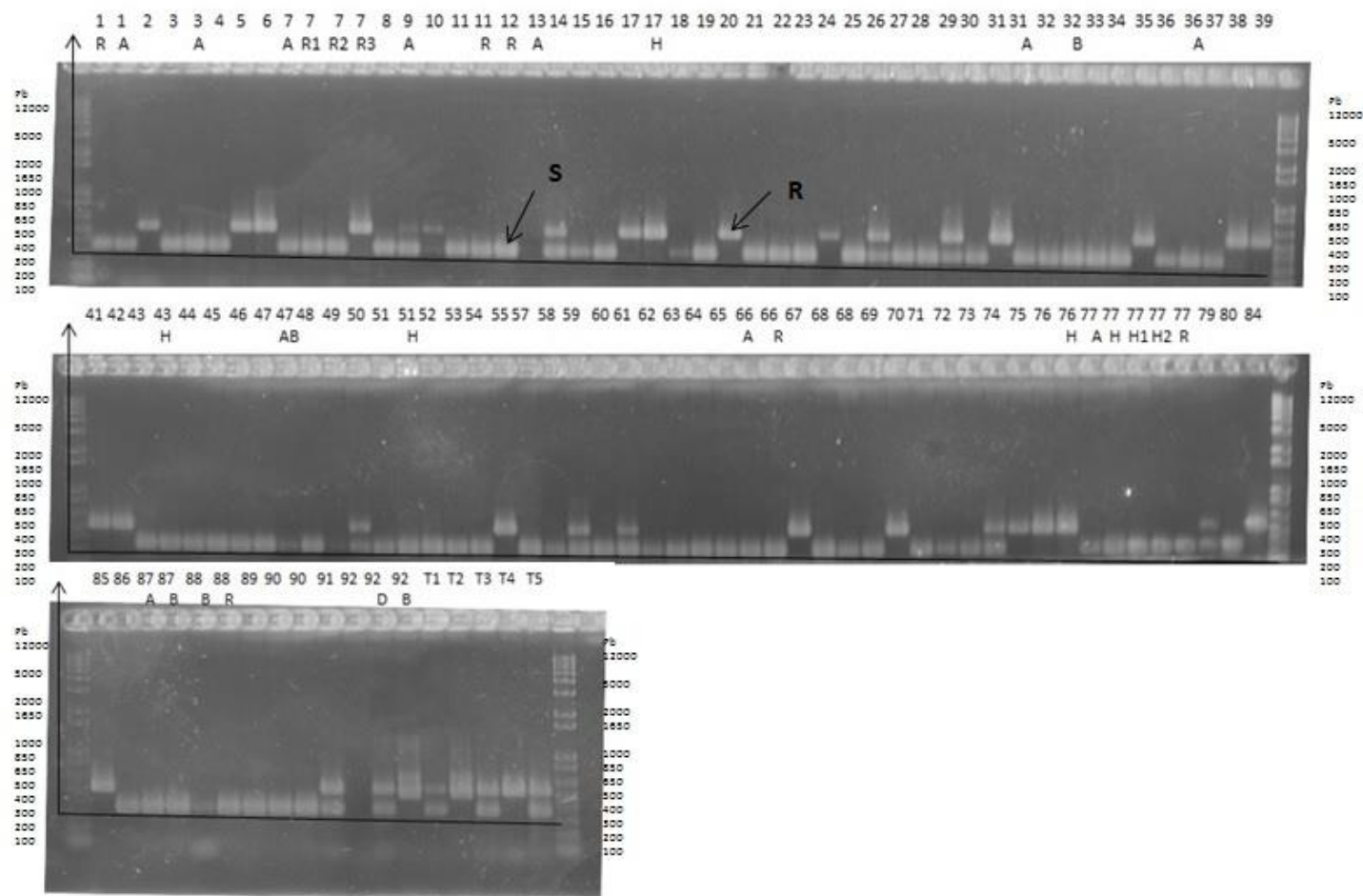


Imagen 7 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores pmiF3/PmiR3 para la identificación del gen de resistencia *Mil-2* a *Meloidogyne incognita*.

R= banda de resistencia de 550 pb.

S= banda de susceptibilidad de 350 pb.

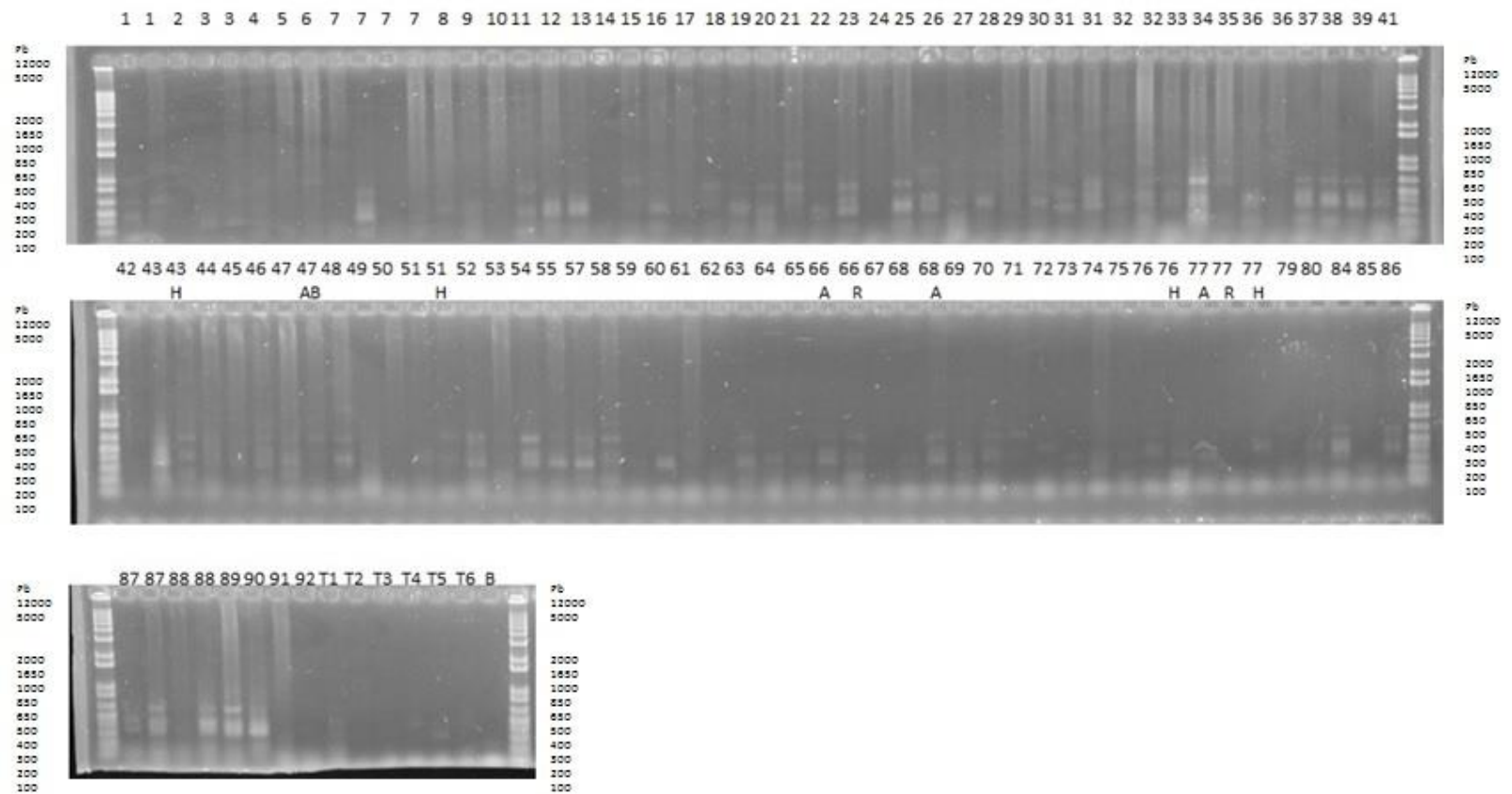


Imagen 8 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores SCN20F/SCN20R para la identificación del gen de resistencia *Tm-1* al Virus Mosaico del Tomate.

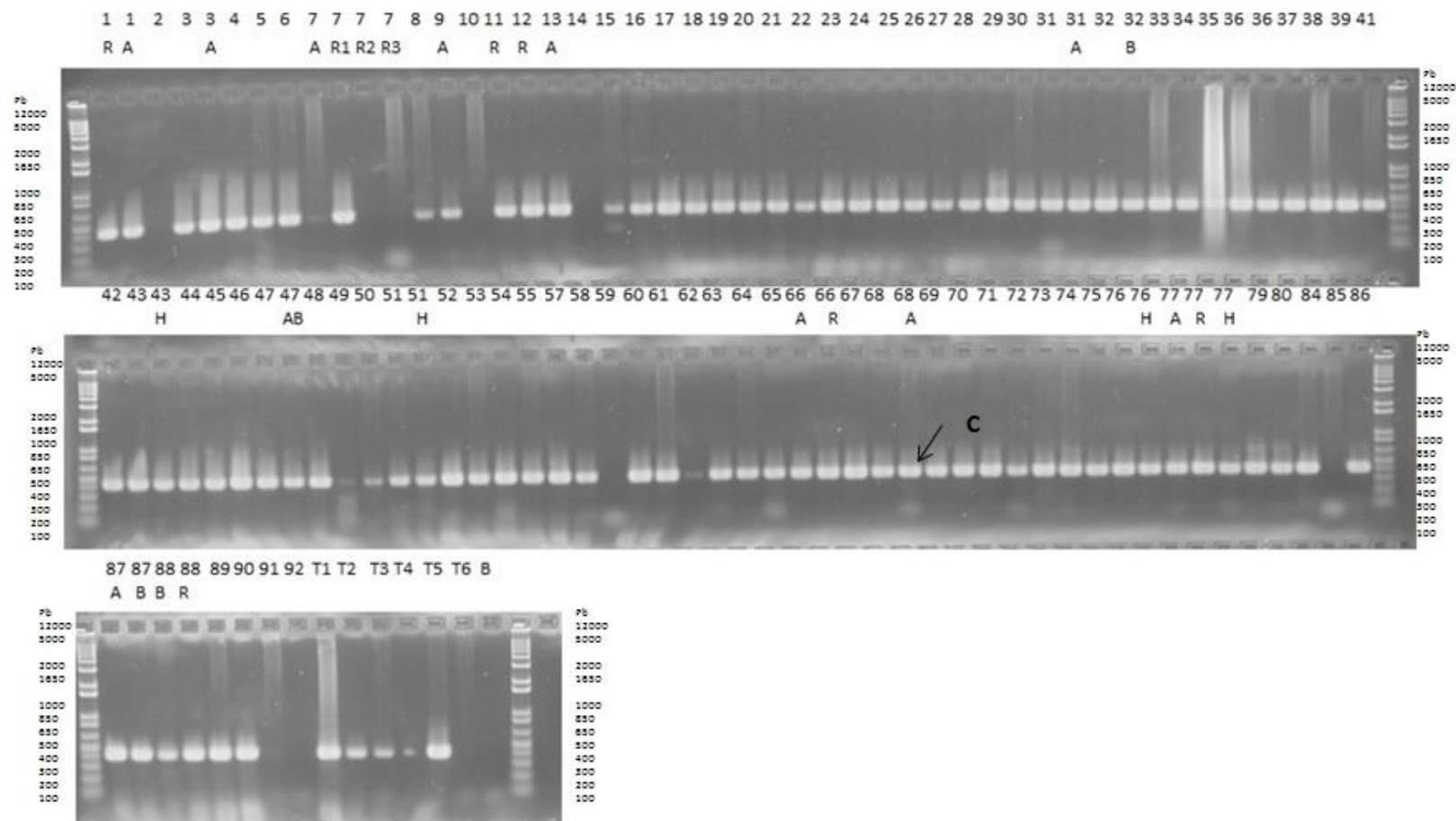


Imagen 9 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores TMV-2262F/TMV-2678R para la identificación del gen de resistencia Tm2/Tm2^c al Virus Mosaico del Tomate.

C=control de iniciador de 417 pb

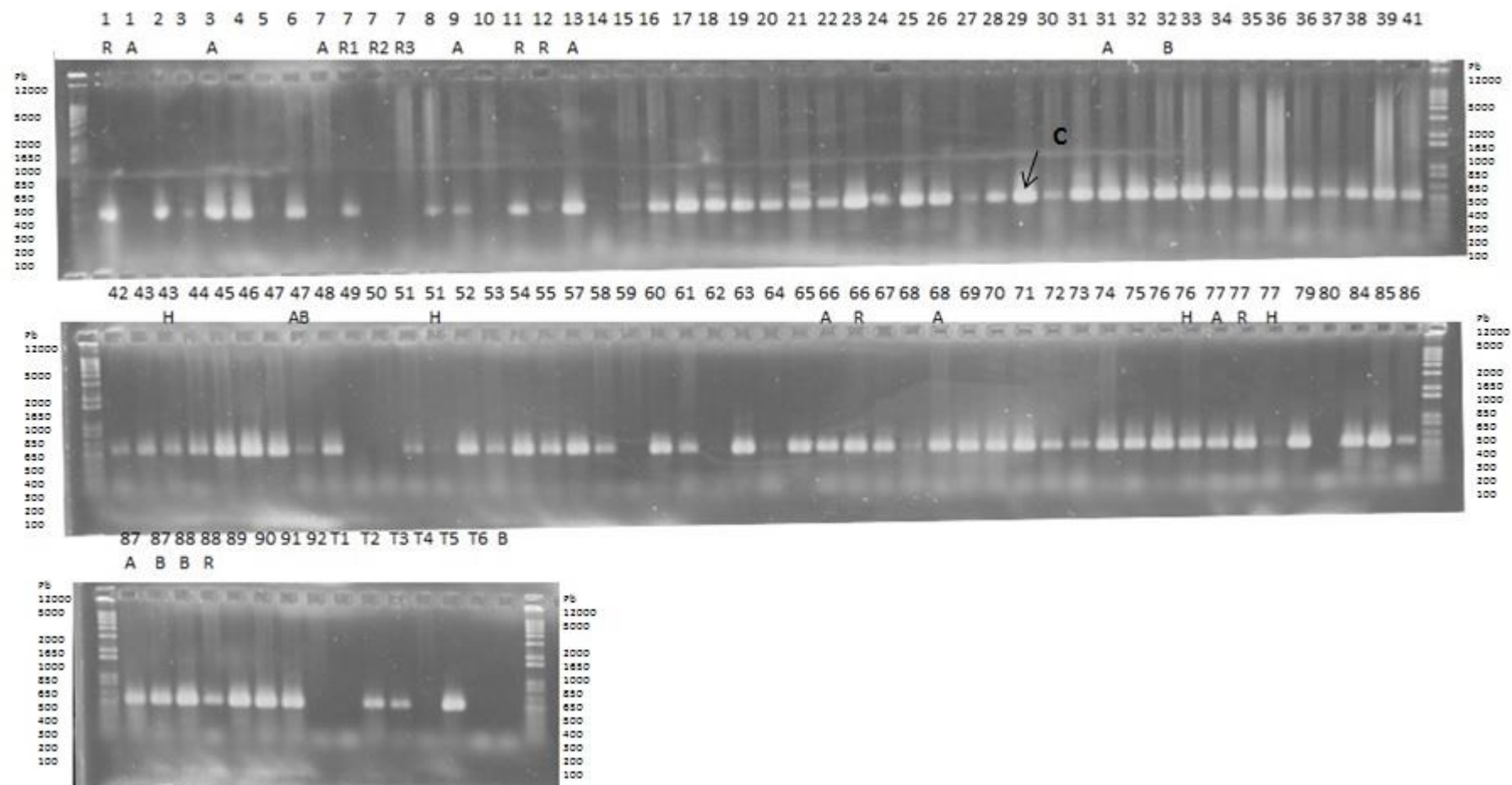


Imagen 10 A. Patrón de bandeo generado por el análisis de ADN de jitomate con los iniciadores Tm2-748F/Tm2-12556R para la identificación del gen de resistencia Tm2/Tm2^c al Virus Mosaico del Tomate.

C= control del iniciador de 509 pb

