



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**SELECCIÓN ASISTIDA MEDIANTE SCARS PARA
TOLERANCIA A PATÓGENOS DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.)**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA **APROBADA**



Presenta:

PLACIDO FACUNDO ANGEL

Bajo la dirección del Dr. Jaime Sahagún Castellanos.



Chapingo, Estado de México, mayo de 2024

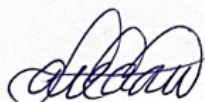


SELECCIÓN ASISTIDA MEDIANTE SCARS PARA TOLERANCIA A
PATÓGENOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Tesis realizada por **PLACIDO FACUNDO ANGEL** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

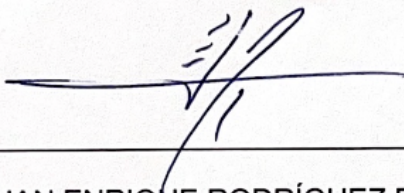
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESIDENTE:



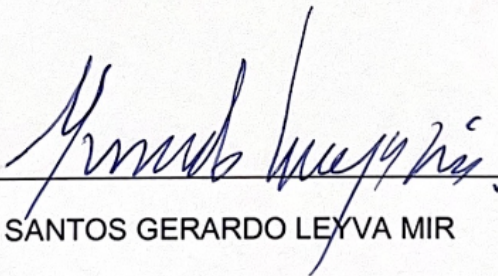
DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



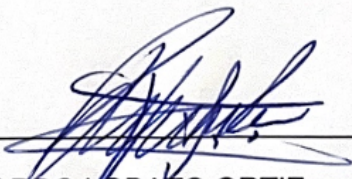
DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

LECTOR EXTERNO:



DR. RICARDO LOBATO ORTIZ

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1 LITERATURA CITADA	6
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
2.1 Importancia del Tomate	8
2.2 Marcadores moleculares.....	8
2.2.1 Regiones Amplificadas Caracterizadas por Secuencia (SCAR)	10
2.3 Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS).....	11
2.4 MAS en el mejoramiento genético del tomate y genes de resistencia	12
2.5 Detección de genes de resistencia: PCR-Multiplex	13
2.6 Literatura citada	15
Enviado a la Revista Chapingo Serie Horticultura	20
CAPÍTULO III. MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA A PATÓGENOS PARA EL MEJORAMIENTO ASISTIDO EN TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	20
RESUMEN.....	20

CHAPTER III. MOLECULAR PATHOGEN-RESISTANCE MARKERS FOR ASSISTED TOMATO BREEDING.....	21
ABSTRACT	21
3.1 INTRODUCCIÓN	22
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.2.1 Material vegetal y sitio de investigación	24
3.2.2 Marcadores Moleculares	25
3.2.3 Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	25
3.2.4 Análisis de Marcadores y Productos de Amplificación.....	26
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.4 CONCLUSIONES	34
3.5 LITERATURA CITADA	35
CAPÍTULO IV. OPTIMIZACIÓN DE PCR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA A TYCLV, TSWV, <i>Fol</i> , <i>Meloydogine</i> Y <i>Phythopthora infestans</i> EN TOMATE	42
RESUMEN.....	42
CHAPTER IV. OPTIMIZATION OF MULTIPLEX-PCR FOR DETECTION OF MOLECULAR RESISTANCE MARKERS TO TYLCV, TSWV, <i>Fol</i> , <i>Meloydogine</i> , AND <i>Phythopthora infestans</i> IN TOMATO	43
ABSTRACT	43
4.1 INTRODUCCIÓN	44
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.2.1 Material vegetal y sitio de investigación	45
4.2.2 Extracción de ADN.....	46
4.2.3 Selección de marcadores moleculares	47
4.2.4 Diseño de tratamientos y análisis estadístico	47

4.2.5 Optimización y condiciones de PCR-Multiplex.....	49
4.2.6 Selectividad y especificidad	50
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.3.1 Optimización de PCR Multiplex para tres marcadores.....	50
4.3.1 Optimización de PCR Multiplex para dos marcadores.....	54
4.4 CONCLUSIONES	58
4.4 LITERATURA CITADA	59
V. CONCLUSIONES GENERALES	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Marcadores moleculares para genes de resistencia a enfermedades considerados como eficientes en la evaluación de la resistencia en líneas de tomate.....	27
Cuadro 2. Grupos de genotipos de acuerdo con el número de genes de resistencia identificados	32
Cuadro 3. Resistencias declaradas de los híbridos comerciales utilizados en este estudio	46
Cuadro 4. Marcadores moleculares asociados a genes de resistencia empleados en el diseño de PCR-Multiplex	47
Cuadro 5. Codificación de variables para el diseño de tratamientos en la optimización de PCR-Multiplex.....	49
Cuadro 6. Análisis de regresión de la intensidad de fluorescencia de los amplicones generados por los marcadores moleculares de resistencia (Sw-5-2, P6-25 y At2) usando DSR-DCC	52
Cuadro 7. Análisis de regresión de la intensidad de fluorescencia de los amplicones generados por los marcadores moleculares de resistencia Mi23 y Ph3 usando DSR-DCC	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a enfermedades. (A y B) marcadores para genes de resistencia a *Meloydogine sp.*; (C) marcador para el TYLCV; (D y E) marcadores para *Fusarium* raza 1 y 2; (F) marcador para el oomiceto *Phytophthora infestans*. ..31
- Figura 2.** Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a enfermedades: (G) marcador para el gen de resistencia al rizado amarillo del tomate; (H) marcador para el gen de resistencia a *Stemphyllium solani*; (I y J) marcadores para el gen de resistencia a virus de la marchitez manchada.....33
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para la PCR Múltiple con los marcadores Sw-5-2, P6-25 y At2. MP: marcador de peso molecular 100 pb, T1-T26: tratamientos evaluados.51
- Figura 4.** Especificidad/selectividad de los marcadores moleculares (Sw-5-2, P6-25 y At2) de resistencia en la optimización de PCR-Muiltiplex para tres genes. MC: Moctezuma, CD: Cid, MS: Mesias, MP: Marcador de Peso Molecular 100 pb.53
- Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para la PCR Múltiple con los marcadores Mi23 y Ph3. MP: marcador de peso molecular 100 pb, T1-T26: tratamientos evaluados.55
- Figura 6.** Especificidad/selectividad de los marcadores moleculares (Mi23 y Ph3) de resistencia en la optimización de PCR-Muiltiplex para dos genes. MC: Moctezuma, CD: Cid, MS: Mesias, MP: Marcador de Peso Molecular 100 pb. .57

DEDICATORIA

A Xóchitl Margarita Palomares Cervantes por amarme, guiarme, motivarme y enseñarme a construir una versión cada día mejor de mi, sobre todo por demostrarme que el amor no tiene fronteras.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado durante esta investigación, a la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por las facilidades otorgadas.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme continuar con mi formación académica y profesional.

A los miembros de mi Comité Asesor; Dr. Jaime Sahagún Castellanos, Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez y Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por la amistad, el apoyo, seguimiento y retroalimentación en la realización de esta investigación.

A Ricardo Gaspar Hernández por su acompañamiento y aportación al trabajo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y a Jorge Luis Sánchez Galicia por su apoyo en el campo experimental.

En especial a mis amigos y compañeros por ser parte de esta historia de vida y formación.



DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Placido Facundo Angel
Fecha de nacimiento	Octubre 05 1987
Lugar de nacimiento	Pajapan, Veracruz, México.
CURP	FAAP871005HVZCNL09
Cédula profesional	12290080

Desarrollo académico

Maestría	Maestría en Ciencias en Horticultura, UACH.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, UACH

RESUMEN GENERAL

SELECCIÓN ASISTIDA MEDIANTE SCARS PARA TOLERANCIA A PATÓGENOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate, ampliamente cultivado a nivel mundial, enfrenta la amenaza de más de 100 patógenos que pueden demeritar su producción. Debido a esto, el desarrollo de las variedades comerciales demanda la identificación e integración de genes de resistencia. En esta tarea, los marcadores moleculares incrementan la eficiencia de la selección. El propósito de este estudio fue validar la eficacia de marcadores moleculares en ensayos individuales y múltiples para identificar genes de resistencia a seis patógenos: *Meloidogyne* sp. (*Mi-1*, *Mi-1.2*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*I-1*, *I-2*), *Stemphyllium* sp. (*Sm*), *Phytophthora infestans* (*Ph3*), virus del rizado amarillo del tomate (*Ty-2* y *Ty-3*) y virus de la marchitez manchada (*Sw5b*). Se adaptaron los protocolos individuales de diez pares de marcadores asociados a los genes de resistencia y dos protocolos de PCR multiplex, con un diseño de superficies de respuesta, (el primero contuvo tres marcadores (*Sw-5-2*, *P6-25*, *At2*) y el segundo con los marcadores *Mi23* y *Ph3*). Estos se probaron en líneas e híbridos de tomate. Se encontró que dos líneas (*L50* y *L76H*) poseen seis genes de resistencia, otras seis poseen cinco genes y siete más presentaron cuatro genes. Los protocolos multiplex identificaron los alelos de resistencia y susceptibilidad para el gen *Sw5* (R574/S465 pb), el susceptible para el gen *Ty-3* (S320 pb) y resistente para el gen *I1* (R130 pb). Dos alelos para los genes *Mi-1.2* (R380/S430 pb) y *Ph3* (R176/S154 pb), respectivamente. Estos resultados fueron consistentes en la mayoría de los tratamientos evaluados. Los marcadores moleculares identificaron líneas con genes de resistencia a seis de las enfermedades más prevalentes en el cultivo del tomate, por lo que son potencialmente útiles para el desarrollo de nuevas variedades, y los protocolos multiplex podrían emplearse para la detección conjunta de genes en un programa de mejoramiento hacia resistencia contra estos patógenos.

Palabras clave: Resistencia genética, Selección temprana, PCR multiplex.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Placido Facundo Angel

Dirección: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

GENERAL ABSTRACT

ASSISTED SELECTION WITH SCARS FOR TOLERANCE TO PATHOGENS IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.)

Tomatoes, widely cultivated worldwide, face the threat of over 100 pathogens that can diminish their fruit production. As a result, the development of commercial varieties demands the identification and integration of resistance genes. In this task, molecular markers increase the efficiency of selection. The purpose of this study was to validate the effectiveness of molecular markers in single and multiplex assays to identify resistance genes to six pathogens: *Meloidogyne* sp. (*Mi-1*, *Mi-1.2*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*I1*, *I2*), *Stemphyllium* sp. (*Sm*), *Phytophthora infestans* (*Ph3*), Tomato yellow leaf curl virus (*Ty-2* and *Ty-3*), and Tomato spotted wilt virus (*Sw5*). Individual protocols of ten pairs of markers associated with resistance genes were adapted, along with two multiplex PCR protocols, using a response surface design (the first containing three markers (*Sw-5-2*, *P6-25*, *At2*) and the second with markers *Mi23* and *Ph3*). These were tested on tomato lines and hybrids. It was found that two lines (*L50* and *L76H*) possess six resistance genes, while six others have five genes and seven more had four genes. The multiplex protocols identified resistance and susceptibility alleles for the *Sw5* gene (R574/S465 bp), susceptibility for the *Ty-3* gene (S320 bp), and resistance for the *I1* gene (R130 bp). Two alleles for the *Mi-1.2* genes (R380/S430 bp) and *Ph3* (R176/S154 bp) respectively. These results were consistent in most evaluated treatments. Molecular markers identified lines with resistance genes to six of the most prevalent diseases in tomato cultivation, making them potentially useful for developing new varieties, and multiplex protocols could be used for joint gene detection in a breeding program for resistance against these pathogens.

Keywords: *Genetic resistance, early selection, multiplex PCR*

Thesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Placido Facundo Angel

Advisor: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate es la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial después de la papa y una de las principales fuentes de fitonutrientes (Mauro et al., 2020). México se ubica entre los diez principales países productores (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022) y es el principal país exportador de jitomate por arriba de los Países Bajos y España (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). En el año 2022, en México, la superficie cosechada fue de 49,196 ha con una producción total de 3.46 millones de toneladas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2022).

Las enfermedades de las plantas, ocasionadas por nematodos, bacterias, hongos, virus y factores nutricionales, suponen un desafío significativo en la producción agrícola, como en el caso del tomate (Olivier et al., 2018). Estos agentes patógenos interfieren con los procesos fisiológicos y metabólicos normales, que causan marchitamiento, retraso del crecimiento, decoloración y necrosis de tejidos (Olivier et al., 2018). Esto conlleva a rendimientos bajos, productos de calidad inferior, menor vida útil y pérdidas económicas, lo que enfatiza la necesidad de mejorar genotipos o variedades resistentes (Olivier et al., 2018).

El mejoramiento genético convencional se basa típicamente en la selección fenotípica de características distintivas en progenies segregantes, resultado de la hibridación, con un tiempo de obtención de nuevos cultivares de ocho a diez años (Alvares-Gil, 2011). Se necesitan tecnologías nuevas que agilicen este proceso (Alvares-Gil, 2011). La selección asistida por marcadores (MAS) ofrece un enfoque innovador que mejora significativamente las estrategias de selección en programas de mejoramiento de cultivos al permitir la determinación temprana de las características genéticas de las plantas, lo que facilita la selección por genotipo en lugar de fenotipo (Alvares-Gil, 2011; Boopathi, 2020). El uso de MAS en el mejoramiento genético de la resistencia del tomate se inició hace más de

tres décadas con el empleo del marcador isoenzimático de fosfatasa ácida (locus Aps-11) como criterio de selección indirecta para mejorar la resistencia a los nematodos (Medina-Filho & Stevens, 1979). Este marcador de isoenzimas aún se utiliza en muchos programas de mejoramiento de tomate, tanto públicos como privados, para seleccionar resistencia a los nematodos (Medina-Filho & Stevens, 1979).

Con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares y mapas genéticos en tomate, la selección asistida por marcadores (MAS) se ha vuelto una práctica común en muchos programas de mejoramiento, especialmente en el sector privado (Foolad & Panthee, 2012). Recientemente, se han identificado y mapeado genes de resistencia a más de 35 patógenos (Foolad & Panthee, 2012). Esta información se emplea habitualmente en la industria de semillas de tomate para seleccionar diversos caracteres cualitativos de resistencia a enfermedades, como marchitamiento por *Fusarium* (razas 1, 2 y 3), tizón tardío (*Ph-3*), marchitamiento por *Verticillium* (raza 1), mancha bacteriana (*Rx3* y *Rx4*), virus del rizado amarillo del tomate (*Ty1*, *Ty2*, *Ty3* y *Ty4*), y el nematodo formador de nódulos en la raíz (*Mi*) (Foolad & Panthee, 2012).

La identificación de genes de resistencia suele realizarse mediante marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR con enzimas de restricción, como el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), secuencia de restricción amplificada y polimórfica (CAPS), polimorfismo de nucleótido único (SNP) y región amplificada caracterizada por secuencia (SCAR) (Oladokun & Mugisa, 2019). La mayoría de los marcadores utilizados para esta tarea son CAPS y SCAR (Lee et al., 2015). La elección de marcadores depende de las necesidades de investigación en los programas de mejoramiento de tomate, aunque los basados en PCR son más atractivos para la selección asistida por marcadores debido a su pequeña cantidad de ADN (Lee et al., 2015).

La combinación de múltiples pruebas de PCR en un ensayo múltiple disminuye los costos de trabajo, hace que la selección asistida por marcadores sea más asequible para los programas de mejoramiento (Chen et al., 2015) y permite amplificar simultáneamente múltiples objetivos de ADN en una sola reacción (Rojas et al., 2011). Sin embargo, este sistema exige una estricta optimización de la reacción debido a las dificultades para optimizar las temperaturas de alineamiento y extensión, así como para evitar la formación de estructuras secundarias y dímeros (Rojas et al., 2011).

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar y validar protocolos con marcadores moleculares, mediante PCR, para la identificación eficiente de genes de resistencia a enfermedades de importancia económica en líneas avanzadas de tomate con propósitos de mejoramiento genético asistido. La premisa general fue que los marcadores moleculares permiten la identificación precisa y eficaz de alelos de resistencia a patógenos en etapas tempranas del desarrollo de las plantas y que podrían usarse para el desarrollo de nuevas variedades.

1.1 LITERATURA CITADA

- Alvarez Gil, M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, “Marker-assisted selection”) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(2), 154-171. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362011000200006&script=sci_arttext
- Boopathi, N.M. (2020). Marker-assisted selection (MAS). In N. M. Boopathi (Ed.). *Genetic mapping and marker assisted selection*. (pp 234.288). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2949-8_9
- Chen, H.-M., Lin, C.-Y., Yoshida, M., Hanson, P., & Schafleitn, R. (2015). Multiplex PCR for detection of tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 9(2), 44–56. <https://doi.org/10.3923/ijpbq.2015.44.56>
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93–123. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Mauro, R. P., Rizzo, V., Leonardi, C., Mazzaglia, A., Muratore, G., Distefano, M., Sabatino, M., & Giuffrida, F. (2020). Influence of harvest stage and rootstock genotype on compositional and sensory profile of the elongated tomato cv.“Sir Elyan”. *Agriculture*, 10(3), Article 82. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030082>
- Medina Filho, H. P., & Stevens, M. A. (1979). Tomato breeding for nematode resistance: Survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphates. *Acta Horticulturae* (100), 383-394. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1980.100.41>
- Lee, J. M., Oh, C.-S., & Yeam, I. (2015). Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(4), 308–322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>

- Oladokun, J. O., & Mugisa, I. (2019). Exploring MAS: A reliable molecular tool for development of multiple disease resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through gene pyramiding. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(2), 509–516. <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.2.35>
- Olivier, D., Maina, M., Andrew, O. E., Peter, M. M., & Careen, I. C. (2018). Application of molecular and biotechnological techniques in plant disease management: A review. *African Journal of Biotechnology*, 17(31), 938–948. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16532>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). Datos sobre alimentación y agricultura FAOSTAT. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabeling in meat products from the retail market. *Food Control*, 22(3-4), 523-531. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.039>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). Producción agrícola. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/c>

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza ampliamente cultivada en el mundo y fuente importante de nutrientes para la alimentación humana (Mauro et al., 2020). Los frutos maduros contienen, en promedio por cada 100 g de porción comestible, agua (94.1 %), energía (23 calorías), calcio (1.0 g), magnesio (7.0 mg), vitamina A (1000 UI), ácido ascórbico (22 mg), tiamina (0.09 mg), riboflavina (0.03 mg) y niacina (0.8 mg) (Uddain et al., 2009).

En el mejoramiento genético de plantas, los tomates se presentan como un ejemplo clásico de transferencia génica de especies silvestres a variedades cultivadas para mejorar las características cualitativas (Chandrasekaran et al., 2021).

México es uno de los diez principales países productores de tomate (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). En el año 2022, su superficie cosechada fue de 49,196 ha con una producción total de 3.46 millones de toneladas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2022). Además, se ha convertido en el principal país exportador del mundo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022).

2.2 Marcadores moleculares

Un marcador molecular o de ADN es la diferencia en la secuencia de nucleótidos del ADN entre organismos individuales o especies, que se encuentra en proximidad o estrechamente ligada con un gen objetivo que expresa un carácter (Amiteye, 2021). Por lo general, el gen objetivo, el carácter expresado o la función biológica, y el marcador molecular estrechamente ligado y asociado se heredan juntos (Amiteye, 2021).

La ubicación específica en el genoma del marcador molecular dentro de los cromosomas, conocida como locus o loci, puede ser conocida o no (Reddy et al., 2021). Es esencial destacar que los marcadores moleculares o de ADN no tienen influencia en los caracteres asociados con la expresión o función del gen o genes ligados (Reddy et al., 2021). La estrecha relación de los marcadores moleculares con un carácter o gen de función biológica específica los convierte en señales o indicadores prácticos que señalan un locus génico particular, facilitando la detección o identificación de los caracteres asociados, independientemente de si se conocen o no los genes involucrados y si estos pueden ser detectados o no (Reddy et al., 2021). Los marcadores de ADN son útiles para detectar diferencias genotípicas individuales entre especies iguales o diferentes, siempre y cuando haya diferencias, conocidas como polimorfismos, en las secuencias de nucleótidos del marcador entre individuos o especies (Mandal et al., 2018). Estos polimorfismos en los marcadores moleculares surgen debido a diversos tipos de mutaciones en el ADN que generan diferencias en las secuencias de nucleótidos entre organismos (Mandal et al., 2018). Usualmente, los polimorfismos de los marcadores en los organismos son ocasionados por mutaciones puntuales, originadas por sustituciones de un solo nucleótido, reorganizaciones que incluyen inserciones o eliminaciones, duplicaciones de secciones de ADN, translocaciones e inversiones, así como errores en la replicación del ADN que se repiten en tándem (Selvakumari et al., 2017).

Para que una sección de ADN sea considerada un marcador molecular se requiere disponer de cebadores, enzimas de restricción y reactivos optimizados, junto con un procedimiento detallado para su detección específica (Amiteye, 2021). Sin esta información completa, un polimorfismo de secuencia no puede considerarse un marcador molecular relevante (Amiteye, 2021). De hecho, esta colección completa de información es lo que principalmente define a un marcador molecular (Amiteye, 2021).

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas para evaluar la diversidad genética y para el mejoramiento genético de plantas (Nadeem et al.,

2018). También son de utilidad para la identificación de variedades, el análisis filogenético y la selección de progenitores para producir híbridos destacados (Nadeem et al., 2018). Existen dos categorías de marcadores: los basados en PCR y los basados en hibridación (Nadeem et al., 2018). Estas técnicas varían según la aplicación, los requisitos de rendimiento, la sensibilidad y la precisión (Chukwu et al., 2019).

Los marcadores moleculares ideales tienen características distintivas, como herencia mendeliana, alta tasa de polimorfismo, herencia codominante, neutralidad selectiva, alta reproducibilidad, capacidad de compartir datos entre laboratorios, alta dispersión y frecuencia en el genoma, independencia del entorno, bajo costo, rapidez y facilidad de uso, ausencia de efectos perjudiciales en el fenotipo, y capacidad de ser multiplexados y automatizados (Dhutmal et al., 2018). Sin embargo, ningún marcador molecular posee todas estas propiedades simultáneamente (Dong et al., 2018). Algunos se emplean en investigaciones sobre endogamia debido a su naturaleza codominante, mientras que otros se utilizan en estudios de diversidad genética por su alto polimorfismo (Dong et al., 2018). Por lo tanto, los investigadores eligen el marcador más adecuado según sus objetivos y recursos disponibles (Merritt et al., 2015).

2.2.1 Regiones Amplificadas Caracterizadas por Secuencia (SCAR)

El marcador SCAR, desarrollado por Paran y Michelmore (1993) para estudiar la resistencia al mildiu en la lechuga, es una mejora de los RAPDs. Esta conversión de RAPDs en SCARs, que son más específicos y reproducibles, se logra mediante el diseño de cebadores específicos de 15-30 pares de bases a partir de secuencias de nucleótidos derivadas de RAPDs polimórficos (Boyd et al., 2019; Cheng et al., 2016; Cho et al., 2015; Yang et al., 2014). Aunque los SCARs son más informativos que los RAPDs y requieren poca cantidad de ADN para su análisis, su diseño depende de la disponibilidad previa de información de secuencia de RAPDs, además, la PCR de SCAR, menos sensible a las condiciones de reacción, y el uso de cebadores más largos superan las limitaciones de reproducibilidad de los RAPDs (Boyd et al., 2019; Cheng et al.,

2016; Cho et al., 2015; Yang et al., 2014). Los SCARs son marcadores codominantes que detectan un único locus y se aplican ampliamente en mapeo genético y selección asistida por marcadores (Boyd et al., 2019; Cheng et al., 2016; Cho et al., 2015; Yang et al., 2014).

2.3 Selección Asistida por Marcadores Moleculares (MAS)

El mejoramiento convencional de plantas depende en gran medida de la selección de plantas deseables, la cual está fuertemente influenciada por la interacción entre el genotipo y el medio ambiente (Boopathi, 2020). Seleccionar plantas en una progenie segregante que contenga combinaciones apropiadas de genes es un componente crítico del mejoramiento de plantas (Boopathi, 2020). Por lo general, los mejoradores mejoran los cultivos mediante cruza entre plantas con caracteres deseados, como alto rendimiento o resistencia a enfermedades, y selección de las mejores descendencias a lo largo de múltiples generaciones de pruebas en ensayos en varios ambientes (Boopathi, 2020).

La selección asistida por marcadores implica seleccionar individuos basados en su patrón de marcadores (genotipo) en lugar de sus rasgos observables (fenotipo). El término "selección asistida por marcadores" fue utilizado por primera vez por Beckmann y Soller en 1986. El potencial del MAS como herramienta para mejorar los cultivos ha sido ampliamente explorado en diferentes especies de plantas (Foolad & Panthee, 2012). Sus principales aplicaciones incluyen: a) rastrear alelos favorables e incorporarlos en genotipos deseables, b) eliminar fondos genéticos no deseados o material vegetal no deseable en las primeras generaciones de reproducción e identificar las combinaciones de genes más deseables o individuos en poblaciones segregantes, y c) romper los ligamientos indeseables entre alelos favorables y desfavorables (Foolad & Panthee, 2012). En un programa de retrocruzamiento, el mejoramiento asistido puede optimizar la recuperación del genoma del progenitor recurrente en plantas con los alelos donados deseables, además de incrementar los ciclos de selección por año en comparación con el mejoramiento convencional (Foolad & Panthee, 2012; Boopathi, 2020).

El costo económico de integrar la MAS en programas de mejoramiento de cultivos también es un determinante clave para la aplicación de la genética molecular en programas de mejora genética (Francia et al., 2005). El uso de MAS puede justificarse cuando reemplaza ensayos más costosos o resulta en una mayor precisión en la identificación de los genotipos deseados (Francia et al., 2005).

2.4 MAS en el mejoramiento genético del tomate y genes de resistencia

El uso de la selección asistida por marcadores en el mejoramiento genético del tomate comenzó hace aproximadamente tres décadas con el uso de la fosfatasa ácida del marcador isoenzimático (locus *Aps-11*) como criterio de selección indirecta para el mejoramiento de la resistencia a los nematodos (Medina-Filho & Stevens, 1979).

Recientemente, con el desarrollo de nuevos marcadores moleculares y mapas genéticos en el tomate, la MAS se ha vuelto una práctica común en muchos programas de mejoramiento, particularmente en el ámbito privado (Foolad & Panthee, 2012). Tiene diversos propósitos, entre los que se incluyen la evaluación de la pureza híbrida mediante la selección de lotes de semillas con un panel de marcadores moleculares (SNP, marcadores basados en PCR) (Foolad & Panthee, 2012). Además, se utiliza para la detección rápida de germoplasma resistente a enfermedades o de calidad de fruto en poblaciones segregantes (Foolad & Panthee, 2012). Se ha encontrado que, para muchos rasgos simples de resistencia a enfermedades en el tomate, la MAS puede ser más rápida, económica y efectiva que el mejoramiento convencional (Foolad & Panthee, 2012).

La exploración de las bases genéticas y genómicas de la variación genética resulta útil para identificar nuevos genes de resistencia y comprender como funcionan (Ercolano et al., 2012). Se han logrado avances significativos en la comprensión de los genes R (genes de resistencia) y su función en la defensa del tomate (Ercolano et al., 2012). El desarrollo de nuevas tecnologías genómicas, como la secuenciación de ADN de alto rendimiento y las técnicas de

hibridación comparativa, ha ampliado los datos disponibles para este propósito (Ercolano et al., 2012). Se han descubierto y mapeado genes de resistencia a más de 35 patógenos, comúnmente usados por la industria de semillas para incorporar a las nuevas variedades comerciales de tomate (Foolad & Panthee, 2012). Entre estos se incluyen la resistencia al marchitamiento por *Fusarium* sp. (razas 1, 2 y 3), al Tizón tardío (*Ph-3* y *Ph-2*), al marchitamiento por *Verticillium* sp. (raza 1), a la Mancha bacteriana (*Rx3* y *Rx4*), al Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) (*Ty1*, *Ty2*, *Ty3* y *Ty4*) y al nematodo que produce nódulos en la raíz (*Mi1*) (Foolad & Panthee, 2012). Recientemente, Nevame et al. (2020) evaluaron 36 marcadores moleculares dirigidos a 26 genes de resistencia (genes R) y 14 enfermedades principales en 964 líneas. Solo 20 de estos marcadores resultaron eficientes para asociarse con genes R (Nevame et al., 2020). Estos marcadores podrían utilizarse como base para el diagnóstico de enfermedades del tomate, y las líneas resistentes identificadas podrían conservarse como fuentes de resistencia para nuevas variedades (Nevame et al., 2020).

Los marcadores moleculares disponibles que confieren resistencia contra las principales enfermedades del tomate, incluidos el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), el virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV), el virus del mosaico del tomate (ToMV), el marchitamiento por *Verticillium* y *Fusarium*, tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, moho foliar causado por *Cladosporium fulvum*, nudo de la raíz causado por *Meloidogyne* spp., mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp. y mancha bacteriana causada por *Pseudomonas syringae*, se usan de manera frecuente en los programas de mejoramiento de tomate con selección asistida por marcadores para la resistencia a enfermedades (Lee et al., 2015).

2.5 Detección de genes de resistencia: PCR-Multiplex

La combinación de múltiples pruebas de PCR en un ensayo múltiple disminuye los costos de trabajo y hace que la selección asistida por marcadores sea más asequible para los programas de mejoramiento (Chen et al., 2015). En el sistema

de PCR clásico, se usa un par de cebadores oligonucleotídicos específicos de la especie para amplificar los objetivos de ADN que luego se detectan en gel de agarosa (Ha et al., 2006) y pueden confirmarse aún más mediante la secuenciación de amplicones (Maede, 2006), digestión de restricción y análisis RAPD, en este formato, el ADN molde de una sola especie se amplifica en una sola prueba de PCR y, por lo tanto, se necesitan varias pruebas para detectar varias especies objetivo, lo que genera un costo y tiempo adicionales (Köppel et al., 2013). Por otro lado, una PCR multiplex amplifica simultáneamente múltiples objetivos de ADN en un solo recipiente de reacción (Rojas et al., 2011). El éxito de esta técnica depende de la capacidad de los cebadores para ser reconocidos selectivamente con sus objetivos respectivos en un solo conjunto de condiciones de PCR (volumen de reacción y condiciones de ciclado) (Rojas et al., 2011). Por lo tanto, exige un diseño complicado para múltiples especies y una estricta optimización de la reacción en el que diseño del cebador es el paso más crucial y crítico en el desarrollo de un sistema de PCR multiplex (Rojas et al., 2011). Esto se debe a las dificultades para optimizar las temperaturas de alineamiento y extensión, así como para evitar la formación de estructuras secundarias y dímeros (Rojas et al., 2011). En comparación con los sistemas de PCR convencionales de una sola especie, la PCR multiplex es una técnica esperanzadora para ahorrar costos y tiempo, ya que ofrece detección de múltiples objetivos en un solo ensayo en muy poco tiempo (Tobe & Linacre, 2008). Una modalidad de esta técnica es la PCR multiplex en tiempo real en que además de los cebadores específicos de la especie, se emplean sondas TaqMan y marcadores fluorescentes como SYBR Green que proporcionan un monitoreo directo e independiente de la amplificación de ciclo a ciclo, ofreciendo un resultado cuantitativo basado en la medición de la intensidad de fluorescencia (Ali et al., 2014).

2.6 Literatura citada

- Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), Article e08093. <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2021.e08093>
- Ali, M. E., Razzak, M. A., & Abd Hamid, S. B. (2014). Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review. *Food Analytical Methods*, 7(10), 1933-1949. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9844-4>
- Beckmann, J. S., & Soller, M. (1986). Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 3, 196-250. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19871661301>
- Boyd, M., Panoyan, M. A., Michael, P., & Nkongolo, K. K. (2019). Development and characterization of species-diagnostic ISSR and SCAR DNA markers for differentiating red maple (*Acer rubrum*) and silver maple (*A. saccharinum*). *Genome*, 62(8), 527-535. <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0037>
- Boopathi, N.M. (2020). Marker-assisted selection (MAS). In N. M. Boopathi (Ed.). *Genetic mapping and marker assisted selection*. (pp 234.288). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2949-8_9
- Chandrasekaran, M., Boopathi, T., & Manivannan, P. (2021). Comprehensive assessment of ameliorative effects of AMF in alleviating abiotic stress in tomato plants. *Journal of Fungi*, 7(4), 303. <https://doi.org/10.3390/jof7040303>
- Cheng, J. L., Li, J., Qiu, Y. M., Wei, C. L., Yang, L. Q., & Fu, J. J. (2016). Development of novel SCAR markers for genetic characterization of *Lonicera japonica* from high GC-RAMP-PCR and DNA cloning. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-12. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027737>

- Chen, H.-M., Lin, C.-Y., Yoshida, M., Hanson, P., & Schafleitn, R. (2015). Multiplex PCR for detection of tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 9(2), 44–56. <https://doi.org/10.3923/ijpbq.2015.44.56>
- Cho, K. H., Noh, J. H., Park, S. J., Kim, S. H., Kim, D. H., & Chun, J. A. (2015). Development of sequence-characterized amplified region markers for the identification of grapevine cultivars. *HortScience*, 50(12), 1744-1750. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.12.1744>
- Chukwu, S. C., Rafii, M. Y., Ramlee, S. I., Ismail, S. I., Oladosu, Y., Okporie, E., Onyishi, G., Utobo, E., Ekwu, L., Swaray, S., & Jalloh, M. (2019). Marker-assisted selection and gene pyramiding for resistance to bacterial leaf blight disease of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 440-455. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1584054>
- Dong, M., Wang, Z., He, Q., Zhao, J., Fan, Z., & Zhang, J. (2018). Development of EST-SSR markers in *Larix principis-rupprechtii* Mayr and evaluation of their polymorphism and cross-species amplification. *Trees*, 32, 1559-1571. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1733-9>
- Dhutmal, R. R., Mundhe, A. G., & More, A. W. (2018). Molecular marker techniques: A Review. *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*, (6), 816-825. <https://www.ijcmas.com/special/6/R.%20R.%20Dhutmal,%20et%20al.pdf>
- Ercolano, M. R., Sanseverino, W., Carli, P., Ferriello, F., & Frusciante, L. (2012). Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: Retrospects and prospects. *Plant Cell Reports*, 31(6), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1234-z>

- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-Assisted Selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93–123. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Valè, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 317-342. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-2387-z>
- Ha, J. C., Jung, W. T., Nam, Y. S., & Moon, T. W. (2006). PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *Journal of food protection*, 69(9), 2241-2247. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2241>
- Köppel, R., Daniels, M., Felderer, N., & Brünen-Nieweler, C. (2013). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork. *European Food Research and Technology*, 236(6), 1093-1098. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1973-2>
- Mandal, L., Verma, S. K., Sasmal, S., & Katara, J. (2018). Potential applications of molecular markers in plant. *Current Trends in Biomedical Engineering Biosciences*, 12(4), 85-87. <http://dx.doi.org/10.19080/CTBEB.2018.12.555844>
- Maede, D. (2006). A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences. *European Food Research and Technology*, 224(2), 209-217. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0320-2>
- Mauro, R. P., Rizzo, V., Leonardi, C., Mazzaglia, A., Muratore, G., Distefano, M., Sabatino, M., & Giuffrida, F. (2020). Influence of harvest stage and rootstock genotype on compositional and sensory profile of the elongated tomato cv.“Sir Elyan”. *Agriculture*, 10(3), Article 82. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030082>

- Medina Filho, H. P., & Stevens, M. A. (1979). Tomato breeding for nematode resistance: Survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of acid phosphates. *Acta Horticulturae* , (100), 383-394. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1980.100.41>
- Merritt, B. J., Culley, T. M., Avanesyan, A., Stokes, R., & Brzyski, J. (2015). An empirical review: characteristics of plant microsatellite markers that confer higher levels of genetic variation. *Applications in Plant Sciences*, 3(8), 1500025. <https://doi.org/10.3732/apps.1500025>
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nevame, A. Y. M., Xia, L., Wenting, Z., G. Nchongboh, C., Wenhui, L., M. Hasan, M., Alam, Md. A., & Longting, S. (2020). Validation of some disease-resistance molecular markers associated with multiple diseases in tomato for marker-assisted selection program. *ScienceAsia*, 46(1), 19. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2020.006>
- Lee, J. M., Oh, C.-S., & Yeam, I. (2015). Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(4), 308–322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). Datos sobre alimentación y agricultura FAOSTAT. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 985-993. <https://doi.org/10.1007/BF00215038>

- Reddy, B. V., Reddy, C. C. M., Sekhar, A. C., Reddy, P. C. O., Rajasekhar, P., & Srinivasulu, K. (2021). Role of molecular based markers methods and their applications in crop improvement. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(23-24), 38-54. <http://asian.go4publish.com/id/eprint/3389>
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabeling in meat products from the retail market. *Food Control*, 22(3-4), 523-531. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.039>
- Selvakumari, E., Jenifer, J., Priyadharshini, S., & Vinodhini, R. (2017). Application of DNA fingerprinting for plant identification. *Journal of Academia and Industrial Research*, 5(10), 149-151. <http://jairjp.com/MARCH%202017/02%20SELVAKUMARI%20REVIEW.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). Producción agrícola. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/c>
- Tobe, S. S., & Linacre, A. M. (2008). A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis*, 29(2), 340-347. <https://doi.org/10.1002/elps.200700706>
- Uddain, J., Hossain, K. A., Mostafa, M. G., & Rahman, M. J. (2009). Effect of different plant growth regulators on growth and yield of tomato. *International Journal of Sustainable Agriculture*, 1(3), 58-63. https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Effect+of+different+plant+growth+regulators+on+growth+and+yield+of+tomato.+&btnG=
- Yang, L., Khan, M. A., Mei, Z., Yang, M., Zhang, T., Wei, C., ... & Fu, J. (2014). Development of RAPD-SCAR markers for *Lonicera japonica* (Caprifolicaceae) variety authentication by improved RAPD and DNA cloning. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1649-1657. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v62n4/a30v62n4.pdf>

**CAPÍTULO III. MARCADORES MOLECULARES DE
RESISTENCIA A PATÓGENOS PARA EL MEJORAMIENTO
ASISTIDO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

RESUMEN

El tomate, la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial, enfrenta la amenaza de más de 100 patógenos con impacto económico significativo en su producción. Debido a esto, el desarrollo de las variedades comerciales demanda la integración de genes de resistencia. En esta tarea, los marcadores moleculares incrementan la eficiencia de la selección. El propósito de este estudio fue validar la eficacia de marcadores moleculares para identificar genes de resistencia a 6 patógenos: *Meloidogyne* sp. (*Mi-1*, *Mi-1.2*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*I-1*, *I-2*), *Stemphyllium* sp. (*Sm*), *Phytophthora infestans* (*Ph3*), virus del rizado amarillo del tomate (*Ty-2* y *Ty-3*) y virus de la marchitez manchada (*Sw5*). Se adaptaron los protocolos de nueve pares de marcadores asociados a los genes de resistencia y se probaron en 20 genotipos. Se encontró que dos líneas (L50 y L76H) poseen seis genes de resistencia, otras seis poseen cinco genes y siete más presentaron cuatro genes. Los híbridos comerciales Moctezuma, Cid y Mesías mostraron ocho, siete y seis genes, respectivamente. Los marcadores moleculares identificaron líneas con genes de resistencia a seis de las enfermedades más prevalentes en el cultivo del tomate, por lo que son potencialmente útiles para el desarrollo de nuevas variedades.

Palabras clave: *Resistencia genética, selección temprana.*

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Placido Facundo Angel

Dirección: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

CHAPTER III. MOLECULAR PATHOGEN-RESISTANCE MARKERS FOR ASSISTED TOMATO BREEDING.¹

ABSTRACT

Tomato, being the second most cultivated vegetable worldwide, faces the threat of over 100 pathogens with significant economic impact on its production, thus commercial varieties demand the integration of resistance genes. In this task, molecular markers enhance selection efficiency. The purpose of this study was to validate the efficacy of molecular markers in identifying resistance genes for 6 pathogens: *Meloidogyne* sp. (Mi-1, Mi-1.2), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (I-1, I-2), *Stemphyllium* sp. (Sm), *Phytophthora infestans* (Ph3), Tomato yellow leaf curl virus (Ty-2 and Ty-3), and Spotted wilt virus (Sw5). Protocols of nine marker pairs associated with resistance genes were adapted and tested on 20 genotypes. It was found that two lines (L50 and L76H) possess six resistance genes, six others possess five genes, and seven more presented four genes. Commercial hybrids Moctezuma, Cid, and Mesías showed eight, seven, and six genes, respectively. Molecular markers distinguished lines with resistance genes for six of the most prevalent diseases in tomato cultivation, hence are potentially useful for developing new varieties.

Keywords: *Genetic resistance, early selection.*

Thesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Placido Facundo Angel

Advisor: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

3.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo del tomate se enfrenta a más de 100 enfermedades que impactan económicamente su producción, entre las que se encuentran bacterias, hongos, oomicetos, virus y nematodos. Entre las más extendidas y agresivas en México se encuentran el Damping off (*Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp.), marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (TO_I1, TO_I2), *Verticillium dahliae* (TO_VE), *V. Alboatrum* (TO_VE)), moho gris (*Botryotinia fuckeliana*), tizón tardío (TO_PH3) (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria tomatophila*, *Alternaria alternata*), cenicilla polvorienta (TO_LV) (*Leveillula taurica*), moho de las hojas (TO_CF9) (*Cladosporium fulvum*), cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), peca y mancha bacteriana (TO_PTO) (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Alvarado, 2011).

Los síntomas de estas enfermedades van desde marchitamiento y retraso del crecimiento hasta la decoloración amarillenta y muerte de tejidos y órganos. Estos efectos se traducen en rendimientos bajos, calidad inferior de fruto y menor vida de anaquel (Olivier et al., 2018). Las pérdidas en el rendimiento y valor comercializable de tomate causadas por virus (TYLCV, TSWV) van desde el 40 hasta el 100% cuando el daño en las plantas es severo (Hanson et al., 2016). Las causadas por hongos como *Fusarium* (*FoI*) pueden alcanzar el 45–55% y extenderse hasta el 70% en caso de condiciones ambientales favorables (27–30 °C) (Panno et al., 2021). El impacto de la incidencia de enfermedades en el rendimiento puede ser del 1-5% en áreas con un inicio leve y más del 30% en áreas con un inicio severo (Liu & Wang, 2020). Esta realidad obliga a dirigir el mejoramiento genético hacia la obtención de variedades capaces de resistir enfermedades de alto impacto económico mediante la incorporación de varios genes y/o promover la diversidad en las variedades, para reducir la capacidad de los patógenos para superar las resistencias genéticas (Bailey-Serres et al., 2019). En la mayoría de las variedades comerciales de tomate, la resistencia a las enfermedades está determinada por genes individuales de efectos mayores,

cada uno confiere resistencia a un patógeno específico, raza, cepa o filotipo (Scott, 2005).

Se han descubierto y mapeado genes de resistencia a más de 35 patógenos, comúnmente usados por la industria de semillas para incorporar a las nuevas variedades comerciales de tomate. Entre estos se incluyen la resistencia al marchitamiento por *Fusarium sp.* (razas 1, 2 y 3), al Tizón tardío (*Ph-3* y *Ph-2*), al marchitamiento por *Verticillium sp.* (raza 1), a la Mancha bacteriana (*Rx3* y *Rx4*), al Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) (*Ty1*, *Ty2*, *Ty3* y *Ty4*) y al nematodo que produce nódulos en la raíz (*Mi1*) (Foolad & Panthee, 2012). La mayoría de los marcadores empleados para identificar estos genes de resistencia corresponden a los tipos CAPS (Amplificación Polimórfica Basada en Secuencias de Restricción) y SCAR (Región Amplificada Caracterizada por Secuencia), los cuales se basan en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lee et al., 2015; Oladokun & Mugisa, 2019). Los marcadores SCAR permiten la eliminación del uso de enzimas de restricción, lo que elimina un paso adicional después de la reacción de PCR; por lo tanto, son más eficientes y confiables que los marcadores CAPS en la detección basada en geles (Zhang & Panthee, 2021). Son altamente reproducibles, requerimiento técnico medio y requiere baja calidad del ADN objetivo (Agarwal et al., 2008). Las técnicas basadas en PCR requieren menos ADN, menos tiempo y son menos costosas que las técnicas basadas en hibridación. Además, pueden ser altamente reproducibles, fáciles de usar y susceptibles de automatización (Jiang, 2013).

En el mejoramiento genético tradicional se seleccionan caracteres fenotípicos distintivos durante la segregación y se requiere de ocho a diez años para generar una nueva variedad. La selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés Marker-Assisted Selection) es un enfoque innovador que mejora el desempeño de la selección al identificar en forma temprana caracteres fenotípicos a través del genotipo, substituyendo a algunas evaluaciones fenotípicas (Alvares-Gil, 2011), debido a que los ensayos *in vivo* pueden ser influenciados por factores ambientales (Abewoy, 2017; Arens et al., 2010). La

MAS, al eliminar la interacción ambiental, incrementa la precisión y eficiencia de la selección, reduce costos y acorta los ciclos de selección. Además, es invaluable cuando las pruebas patogénicas son complejas o poco confiables, o existe riesgo de introducción de patógenos exóticos (Foolad et al., 2008).

El mejoramiento del tomate ha recurrido a la introducción de numerosos genes de resistencia a enfermedades, caracteres agronómicos y calidad de fruto provenientes de diversas especies nativas emparentadas (Alvares-Gil, 2011). Estos caracteres que han adquirido un papel crucial en las pruebas de distinción, uniformidad y estabilidad para aplicaciones de derechos de obtentor (Alvares-Gil, 2011).

El objetivo de este estudio fue evaluar y validar la eficacia de marcadores moleculares basados en PCR, para la identificación de genes de resistencia a seis enfermedades de importancia económica en líneas avanzadas de tomate, con el objetivo específico de su uso en programas de mejoramiento genético.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal y sitio de investigación

Se utilizaron 16 líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) provenientes del Proyecto de Mejoramiento Genético de la Universidad Autónoma Chapingo, la variedad comercial Mermaid y tres híbridos comerciales de la empresa HM.CLAUS®. Estos últimos fueron utilizados como controles para identificar los genes de resistencia.

La investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. Las semillas se establecieron en invernadero, en charolas de 200 cavidades con turba como sustrato. Quince días después de la emergencia de plantas, se cosechó tejido fresco sano, sin daño físico aparente, que posteriormente se procesó en laboratorio.

3.2.2 Marcadores Moleculares

Los marcadores SCARS utilizados se eligieron de un conjunto de reportes científicos previamente publicados (Cuadro 1). Estos marcadores están ligados a nueve genes de resistencia a seis enfermedades del tomate. Algunos de estos marcadores están ligados con el gen, mientras que otros identifican directamente al gen de resistencia (Cuadro 1). Las enfermedades del tomate asociadas a los marcadores estudiados fueron *Meloidogyne* spp. (TO_MI1, TO_MI23) (*Mi-1*, *Mi-1.2*), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (TO_I1 y I2) (*I-1*, *I-2*), *Stemphyllium* sp. (TO_SM) (*Sm*), *Phytophthora infestans* (TO_PH3) (*Ph3*), el virus del rizado amarillo del tomate (TO_Y2, TO_Y3) (*Ty-2* y *Ty-3*), y el virus de la marchitez manchada (TO_SWS) (*Sw5*) (Cuadro 1).

3.2.3 Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se extrajo ADN total de 0.6 g de hojas frescas de plántulas de 15 días de edad de las líneas consideradas mediante el método de extracción CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) (Doyle & Doyle, 1987). El ADN extraído se ajustó a una concentración de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Se utilizó una mezcla de reacción de 25 μl que incluyó 4.7 μl de H_2O , 10 μl de dNTPS (200 μM), 2.5 μl de amortiguador (1x), 3 μl de MgCl_2 (3 mM), 1 μl de cada iniciador (Forward y Reverse) ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), 0.3 μl de Taq Polimerasa ($1.5 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y 2.5 μl de ADN ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 93 °C durante 1 min; seguido de 40 ciclos, cada uno con 20 s a 93 °C, 1 min a la temperatura de alineación de los iniciadores y 20 s a 72 °C, y una extensión final a 72 °C durante 6 min. Tras enfriarse a 10 °C, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1x y se tiñeron con bromuro de etidio. La visualización se realizó bajo luz UV con un fotodocumentador (Marca UVP, Modelo DigiDoc-It®). Las temperaturas de alineamiento utilizadas para los iniciadores fueron las siguientes: a) 60 °C para los marcadores Pmi3, Mi23, Ph3, TG0302, P6-25; b) 64 °C para Sw5b, At2 y D5; y c) 55 °C para Sw-5-2 y Z1063.

3.2.4 Análisis de Marcadores y Productos de Amplificación

Se consideraron como marcadores útiles aquellos que produjeron bandas claras y productos de PCR de locus específicos (Figura 1 y 2). Aquellos que mostraron productos PCR anómalos fueron descartados y no incluidos en el análisis final. El tamaño del amplicón y otras características de los marcadores se obtuvieron de trabajos de investigación publicados previamente por otros autores (Cuadro 1). La detección de la presencia de los alelos de resistencia se realizó utilizando como controles a híbridos comerciales (Moctezuma, El Cid y Mesias) de la empresa HM. Clause® México, dado que presentan alelos de resistencia declarada a patógenos como *Fusarium* (raza 1, 2 y 3), TYLCV, TSWV y *Meloidogyne* sp.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Marcadores Moleculares para Nematodos de la raíz (*Meloidogyne* spp.)

Mediante los iniciadores PmiF/R3 (El Mehrach et al., 2005), para el gen *Mi-1*, se identificaron distintos genotipos: 6 homocigotos susceptibles (mi/mi) con una banda de 350 pb, 8 homocigotos resistentes (Mi/Mi) con una banda de 550 pb (incluyendo el híbrido comercial Moctezuma) y un genotipo heterocigoto (Mi/mi) con ambas bandas (Cid). El estudio de El Mehrach (2005) también examinó el uso de marcadores como Pmi3, identificando genotipos heterocigotos y homocigotos resistentes y susceptibles a *Meloidogyne*.

Cuadro 1. Marcadores moleculares para genes de resistencia a enfermedades considerados como eficientes en la evaluación de la resistencia en líneas de tomate.

Enfermedad	Gen R (Cromosoma)	Marcador SCAR/Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
<i>Meloidogyne</i> <i>sp.</i>	<i>Mi-1</i> (C6)	Pmi 3 (basado en el gen)	R: 550	El Mehrach et al., 2005
		F: GGTATGAGCATGCTTAATCAGAGCTCTC R: CCTACAAGAAATTATTGTGCGTGTGAATG	S: 350	
<i>Meloidogyne</i> <i>sp.</i>	<i>Mi-1.2</i> (C6)	M i23 (basado en el gen)	R: 380	Seah et al., 2004
		F: TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG R: GCATACTATATGGCTTGTTTACCC	S: 430	
TSWV	<i>Sw5</i> (C9)	Sw5b (basado en el gen)	R: 541	Shi et al., 2011
		F: CGGAACCTGTAACCTGACTG R: GAGCTCTCATCCATTTCCG	S: NPB	
TSWV	<i>Sw5</i> (C9)	Sw-5-2 (basado en el gen)	R: 574	Dianese et al., 2010
		F: AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT R: TTCCGCATCAGCCAATAGTGT	S: 510, 464	
<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	<i>Ph3</i> (C9)	Ph3 (basado en el gen)	R: 176	Jung et al., 2015
		F: CTACTCGTGCAAGAAGGTAC R: TCCACATCACCTGCCAGTTG	S:154	
TYLCV	<i>Ty2</i> (C11)	TG0302 (ligado al gen)	R: 940	Yang et al., 2014
		F: TGGCTCATCTGAAGCTGATAGCGC R: TCCACATCACCTGCCAGTTG	S: 800	
TYLCV	<i>Ty3</i> (C6)	P6-25 (ligado al gen)	R: 630	Ji et al., 2007
		F: GGTAGTGGAATGATGCTGCTC R: GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC	S: 320	
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> raza 1	<i>I1</i> (C11)	At2 (ligado al gen)	R: 130	Arens et al., 2010 ; Ori et al.,1997; Scott et al., 2004
		F: CGAATCTGTATATTACATCCGTCGT R: GGTGAATACCGATCATAGTCGAG	S: 90	
<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> raza 2	<i>I2</i> (C11)	Z1063 (ligado al gen)	R: 940	Arens et al., 2010
		F: ATTTGAAAGCGTGGTATTGC R: CTAAACTCACCATTAAATC	S: 1380	
<i>Stemphyllium</i> <i>solani</i>	<i>Sm</i> (C11)	D5 (basado en el gen)	R: 876	Yang et al., 2017
		F: CCCGTGGCACTACAACTCTT R: TCTGCTTTCGCTCTGCTTGA	S: 820	

TYLCV, virus del rizado amarillo del tomate; TSWV, virus de la marchitez manchada; NPB, susceptibles no presentan banda para este marcador

El par de iniciadores Mi23F/R (Seah et al., 2004) se utilizó para detectar la presencia del gen *Mi-1.2*. Se identificaron 8 genotipos homocigóticos resistentes (Mi/Mi) caracterizados por una banda de 380 pb asociada a este alelo, siendo

potenciales candidatos para la transferencia de resistencia. Asimismo, se hallaron ocho genotipos homocigóticos susceptibles (mi/mi) con una banda de 430 pb y tres genotipos heterocigóticos (Mi/mi) con ambas bandas, incluyendo tres híbridos comerciales (Cuadro 3). El estudio de Seah et al. (2004) evaluó el par de marcadores Mi23, estrechamente relacionados con el gen Mi-1.2, lo que permitió discriminar líneas resistentes y susceptibles a *Meloidogyne* en estados heterocigóticos y homocigóticos.

Las bandas de los marcadores Mi23F/R y PMiF/R3, vinculados a los genes *Mi-1* y *Mi1-2*, respectivamente, mostraron patrones de identificación diferentes en tres genotipos. Estos genotipos exhibieron una única banda de resistencia de 550 pb con los marcadores PMiF/R3, mientras que los marcadores Mi23F/R los identificaron como heterocigóticos, lo que podría indicar que estos genes, aunque homólogos, no son idénticos (El Mehrach et al., 2005). Los genes codifican para proteínas que consisten en un sitio de unión a nucleótidos y una región rica en leucina (CC-NBS-LRR) que proporcionan protección efectiva contra las especies de *Meloidogyne* (Devran et al., 2023; Milligan et al., 1998). Se determinó que el gen de resistencia *Mi-1* a *Meloidogyne* está ligado con varios genes, incluidos *Cf-2* y *Cf-5*. *Mi-1* también se encuentra ligado en fase de repulsión con el gen homocigótico *Ty-1*, el cual, a su vez, está vinculado a genes no deseables (Carbonell et al., 2018).

Marcadores Moleculares para Virus

a) Virus de la marchitez manchada (TSWV)

De los ocho genes identificados para resistencia al TSWV, se evaluó la presencia de *Sw-5*, reconocido como el gen más efectivo debido a que no es específico a una sola variante (Scott, 2004; Saidi & Warade, 2008; Zacardelli et al., 2008; Foolad et al., 2012). El gen *Sw-5* se identificó mediante los iniciadores Sw5bF/R2 (Shi et al., 2011), que producen una banda de 541 pb en genotipos resistentes. Los 20 individuos evaluados, en este trabajo, presentaron la banda de resistencia. En un estudio realizado por Shi et al. (2011) se evaluaron marcadores

específicos para el gen Sw-5b en 26 líneas. Con el marcador Sw5b, identificaron la presencia del locus Sw5 relacionado con la resistencia al virus (Shi et al., 2011). Además, se empleó un segundo marcador, Sw-5-2F/R, para identificar el gen Sw-5b, el cual es codominante (Dianese et al., 2010; Shi et al., 2011), que genera una banda de resistencia de 574 pb y bandas de susceptibilidad de 510 y 464 pb (Cuadro 2). De los genotipos evaluados, catorce resultaron homocigotos recesivos, uno homocigoto dominante y dos heterocigotos (Moctezuma y Mesias).

b) Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV)

Se han identificado seis genes de tolerancia al TYLCV, el cual es un patógeno de gran importancia económica (Verlaan et al., 2013; Wang et al., 2018). La identificación del gen *Ty-2*, en este estudio, se realizó mediante los marcadores TG0302R/F (Hanson et al., 2016), que generan dos bandas: una de 900 pb para genotipos resistentes y otra de 800 pb que indica susceptibilidad (Cuadro 2; Figura 2). En ningún caso se identificaron líneas con la banda de resistencia (*Ty-2*), 18 genotipos mostraron la banda de susceptibilidad. Varios autores han utilizado los marcadores TG0302R/F para identificar líneas con el gen de resistencia a *Ty-2* (Lee et al., 2015).

El gen *Ty-3* se identificó con los marcadores P6-25P/F (Ji et al., 2007), que generan cuatro bandas: una de 320 pb para susceptibilidad, una de 450 pb para resistencia al locus *Ty-3b*, una de 630 pb para el locus *Ty-3a* y una de 660 pb para el locus *Ty-3*. Solo el híbrido comercial Moctezuma presentó resistencia heterocigótica (*Ty-3/ty-3*), 17 líneas resultaron ser susceptibles (*ty-3*) (Figura 1). Nevame et al. (2018) desarrollaron un nuevo marcador para identificar genes de resistencia a *Ty-3*, mediante el marcador P6-25 ligado. Este marcador es eficiente para identificar a *Ty-3*, *Ty-3a* y *Ty-3b*. Los genes de resistencia a *Ty* confieren resistencia parcial o tolerancia al virus TYLCV. El gen *Ty-1* ha sido destacado como el más eficaz en estado homocigoto para resistencia a TYLCV; mientras que el gen *Ty-3* muestra mayor resistencia a los virus monopartitarios

como bipartitarios (Carbonell et al., 2018). El gen *Ty-3*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 6, está ligado al gen *Ty-1* con una distancia de 7 cM (Ji et al., 2007; Milo et al., 2001). La presencia de alelos homocigotos para la resistencia a *Ty-1* ha demostrado disminuir el rendimiento de frutos (Carbonell et al., 2018) y otros caracteres agronómicos como; número de inflorescencias por planta, número de inflorescencias con fruto por planta, número de frutos por planta, peso de frutos, rendimiento comercial y acidez titulable, excepto el contenido de sólidos solubles. Su efecto fue particularmente significativo en los rendimientos total y comercial, que disminuyeron en un 50% (Rubio et al., 2016).

La introducción del gen *Ty-1* también llevó consigo otros genes ligados con efectos negativos en la producción de compuestos volátiles y otros metabolitos. Esto sugiere que es la presencia de fragmentos de ADN asociados con el gen *Ty-1* lo que es responsable de los cambios en las características aromáticas de las variedades de tomate y no se han detectado recombinaciones que permitan separarlos (Carbonell et al., 2018). Se recomienda mantenerlo en estado heterocigótico para contrarrestar los efectos de los genes no deseados. Para obtener líneas con mayor resistencia a TYLCV, se necesita la presencia de más de un gen *Ty*. Algunos híbridos comerciales presentan *Ty-2* y *Ty-3* en estado heterocigótico, lo que les confiere mayor resistencia que aquellos con solo uno de ellos (Hanson et al., 2016; Mejia et al., 2005).

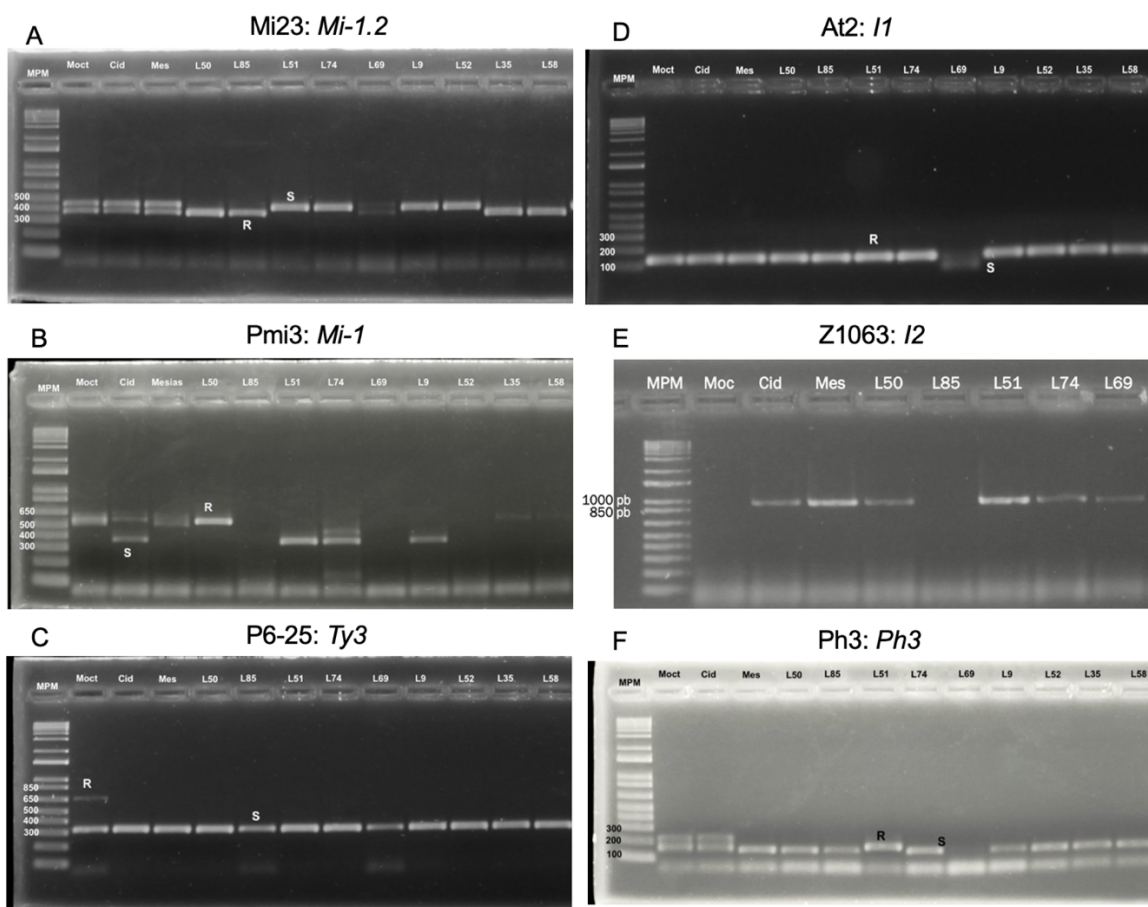


Figura 1. Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a enfermedades. (A y B) marcadores para genes de resistencia a *Meloydogine* sp.; (C) marcador para el TYLCV; (D y E) marcadores para *Fusarium* raza 1 y 2; (F) marcador para el oomiceto *Phytophthora infestans*.

Marcadores Moleculares para Hongos

a) Marchitez vascular del tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*).

Para el gen de resistencia a *Fusarium oxysporum* raza 1, se utilizaron los marcadores At2F/R (Arens et al., 2010; Ori et al., 1997; Scott et al., 2004). Se encontraron 16 líneas con resistencia, evidenciada por la banda de 130 pb, y una línea que mostró ambas bandas (Figura 1). Por su parte, los genes de resistencia a *Fusarium oxysporum* raza 2 se detectaron mediante los marcadores Z1063F/R (Arens et al., 2010; Simons et al., 1998). Se identificaron 11 líneas con resistencia, caracterizadas por la banda de 940 pb. Además, 6 líneas no generaron ninguna banda. Arens et al. (2010) evaluaron 16 pares de iniciadores

para el gen *I1*, detectaron una delección de 7 nucleótidos en genotipos susceptibles. Esto llevó al desarrollo de los marcadores At2, validados en distintos laboratorios para identificar el gen *I1*. Por otro lado, el marcador Z1063 solo identifica el gen introducido de *S. pimpinellifolium*. Neha et al. (2016) evaluaron 18 líneas con los marcadores At2 para *I1* y Z1063 para *I2*, identificando 14 líneas con el gen *I1* y solo una línea con el gen *I2*.

Cuadro 2. Grupos de genotipos de acuerdo con el número de genes de resistencia identificados

Número de genes	Genotipos evaluados	Grupo
3	L9, Marmaid	I
4	L85, L74, L69, L52, L51H, L53-3, L80	II
5	L51, L35, L58, L47S8, L4B1, LMH1	III
6	Mesias, L50, L76H	IV
7	Cid	V
8	Moctezuma	VI

La marchitez vascular del tomate, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tiene amplia distribución y provoca grandes pérdidas en el cultivo. Por tanto, resulta crucial detectar la presencia de genes de resistencia o tolerancia en las variedades comerciales. Se han reconocido las razas 1, 2 y 3 como las más perjudiciales para el rendimiento (Sela-Buurlage et al., 2001).

b) Mancha gris del tomate (*Stemphyllium* sp.). Para identificar el gen *Sm*, se emplearon los iniciadores tipo SCAR D5F/R (Yang et al., 2017). En quince líneas se evidenció la banda de 876 pb, indicativa de la resistencia del gen *Sm*, mientras que no se encontraron líneas susceptibles con la banda de 820 pb (Figura 2). Dos líneas no produjeron amplificación. Yang et al. (2017) evaluaron la expresión de los genes de resistencia *Sm* en segregantes F2, lo que llevó a la identificación de este marcador (D5) segregando junto al locus resistente. Esto posibilita la distinción entre líneas resistentes y susceptibles.

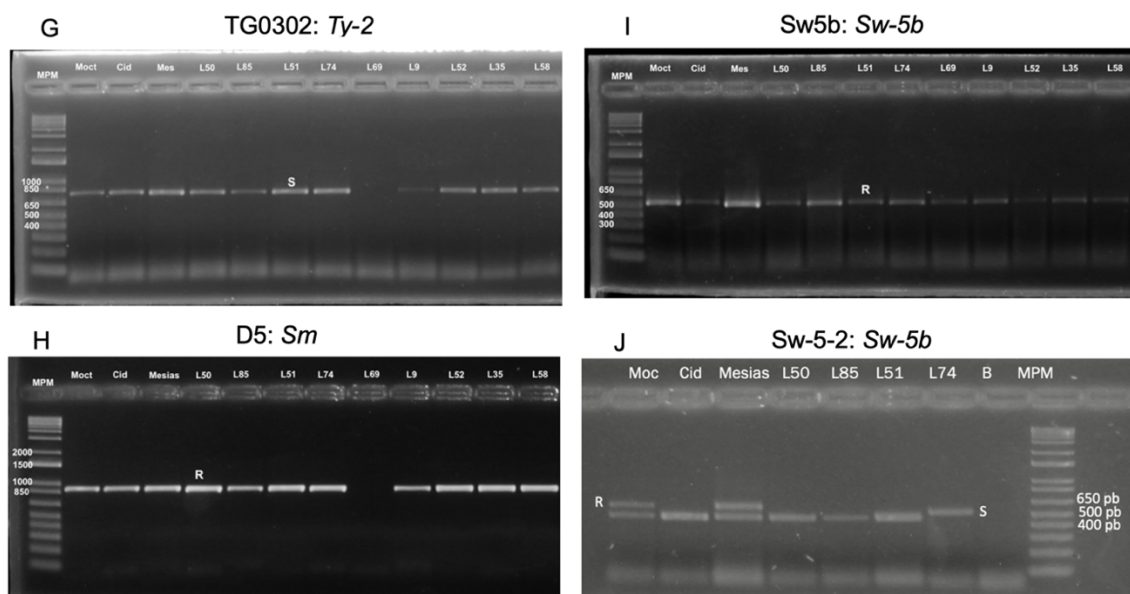


Figura 2. Productos de amplificación de la prueba de marcadores para genes de resistencia a enfermedades: (G) marcador para el gen de resistencia al rizado amarillo del tomate; (H) marcador para el gen de resistencia a *Stemphyllium solani*; (I y J) marcadores para el gen de resistencia a virus de la marchitez manchada.

La mancha gris del tomate, una enfermedad foliar común en climas cálidos es causada por *Stemphyllium lycopersici* y la resistencia a este patógeno se atribuye a un solo gen dominante incompleto (*Sm*) (Su et al., 2019). Otorga tolerancia a cuatro especies de *Stemphyllium* sp. (Su et al., 2019).

Marcadores Moleculares para Oomicetos

Tizón tardío (*Phytophthora infestans*). La identificación del gen *Ph3* se realizó con los marcadores Ph3F/R (Jung et al., 2015). Se detectaron 15 líneas resistentes con la banda de 176 pb, pero no se encontraron líneas susceptibles con la banda de 154 pb (Figura 1). La presencia de múltiples genes de resistencia o tolerancia a *P. infestans* mejora el rendimiento de la planta frente a la enfermedad, aunque su valor puede ser limitado debido a la falta de durabilidad de la resistencia (Scott, 2005) ante la aparición de nuevas variantes genéticas del patógeno. Por ello, se recomienda el uso de combinaciones de estos genes. Dada la devastación y la rápida dispersión de esta enfermedad, la tolerancia genética a *P. infestans* es de gran interés en los programas de mejoramiento,

además, se debe considerar que el gen *Ph3* confiere resistencia dominante incompleta (Foolad et al., 2012; Robbins et al., 2010).

3.4 CONCLUSIONES

Se validaron marcadores moleculares para nueve genes relacionados con la resistencia a enfermedades que impactan el cultivo de tomate. Estos marcadores permitieron la identificación de genes presentes en los materiales evaluados, lo que posibilitó la descripción de la resistencia a enfermedades en 17 líneas avanzadas de tomate. Específicamente, los marcadores asociados a *Meloidogyne* sp. posibilitan la identificación de líneas tanto heterocigóticas como homocigóticas.

Las líneas avanzadas (L50 y L76H) identificadas con el mayor número de genes de resistencia podrían emplearse como progenitores para generar híbridos de cruce simple resistentes en el programa de mejoramiento genético que se desarrolla en la UACH.

Los marcadores moleculares tipo SCAR evaluados en este trabajo pueden ser empleados para la selección asistida en la introgresión de genes mediante retrocruzamiento en líneas sobresalientes en rendimiento y calidad que carecen de los alelos de resistencia a estos seis patógenos.

El empleo de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia, como los validados en este trabajo, pueden agilizar los procesos de selección de genotipos resistentes al permitir la identificación temprana de los alelos de resistencia.

3.5 LITERATURA CITADA

- Abewoy Fentik, D. (2017). Review on Genetics and Breeding of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Advances in Crop Science and Technology*, 05(05). <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000306>
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports*, 27, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>
- Alvarado, G. R., García, J., Patricia, S., Pavía, F., & Morelia-zinapecuario, C. (2011). Enfermedades del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) Cultivado en Invernadero en la Zona Centro de Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1), 50–59.
- Alvarez Gil, M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS “Marker-assisted selection”) en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(2), 154-171.
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., van der 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(3), 655–664. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1183-2>
- Bailey-Serres, J., Parker, J.E., Ainsworth, E.A., D. Oldroyd, G.E., & Schoedrer, J.I. (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* **575**, 109–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1679-0>
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J., García-Martínez, S., & Ruiz, J. (2018). Twenty Years of Tomato Breeding at EPSO-UMH: Transfer Resistance from Wild Types to Local Landraces—From the First Molecular Markers to Genotyping by Sequencing (GBS). *Diversity*, 10(1), 12. <https://doi.org/10.3390/d10010012>

- El Mehrach, K., Gharsallah Chouchane, S., Mejía, L., Williamson, V. M., Vidavski, F., Hatimi, A., Salus, M. S., Martin, C.T. & Maxwell, D.P. (2005). PCR-based methods for tagging the mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant Tomato Germplasm. *Acta Horticulturae*, 695, 263–270.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.29>
- Devran, Z., Özalp, T., Studholme, D. J., & Tör, M. (2023). Mapping of the gene in tomato conferring resistance to root-knot nematodes at high soil temperature. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1267399.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1267399>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin. Focus* 1990, 12, 39–40.
- Dianese, É.C., de Noronha Fonseca, M.E., Goldbach, R. *et al.* (2010). Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Mol Breeding* 25, 143.
<https://doi.org/10.1007/s11032-009-9329-0>
- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93–123.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Foolad, M. R., Merk, H. L., & Ashrafi, H. (2008). Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(2), 75–107.
<https://doi.org/10.1080/07352680802147353>
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., ... Yang, R. Y. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 201, 346–354.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>

- Ji, Y., Schuster, Æ. D. J., & Scott, Æ. J. W. (2007). Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>
- Jiang, G.-L. (2013). Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, <https://doi.org/10.5772/52583>
- Jung, J., Kim, H. J., Lee, J. M., Oh, C. S., Lee, H. J., & Yeam, I. (2015). Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against Tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt. *Euphytica*, 205(2), 599–613. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1442-z>
- Lee, J. M., Oh, C.-S., & Yeam, I. (2015). Molecular Markers for Selecting Diverse Disease Resistances in Tomato Breeding Programs. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(4), 308–322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>
- Liu, J., & Wang, X. (2020). Tomato diseases and pests detection based on improved Yolo V3 convolutional neural network. *Frontiers in plant science*, 11, 521544. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00898>
- Mejía, L., Teni, R. E., Vidavski, F., Czosnek, H., Lapidot, M., Nakhla, M. K., & Maxwell, D. P. (2005). Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. *Acta Horticulturae*, 695, 251–255. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.27>
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., & Williamson, V. M. (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(8), 1307-1319. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1307>

- Milo, J. (2001). The PCR-based marker REX-1, linked to the gene Mi, can be used as a marker to TYLCV tolerance. *Tomato Breeders Roundtable* www.oardc.ohiostate.edu/tomato/TBRT, 202001.
- Neha, P., Solankey, S. S., Vati, L., & Chattopadhyay, T. (2016). Molecular screening of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes for resistance alleles against important biotic stresses. 9411.
- Nevame, A. Y. M., Xia, L., Nchongboh, C. G., Hasan, M. M., Alam, M. A., Yongbo, L., ... Longting, S. (2018). Development of a new molecular marker for the resistance to tomato yellow leaf curl virus. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8120281>
- Oladokun, J. O., & Mugisa, I. (2019). Exploring MAS: A Reliable Molecular tool for Development of Multiple Disease Resistance in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through Gene Pyramiding. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(2), 509–516. <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.2.35>
- Olivier, D., Maina, M., Andrew, O. E., Peter, M. M., & Careen, I. C. (2018). Application of molecular and biotechnological techniques in plant disease management: A review. *African Journal of Biotechnology*, 17(31), 938–948. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16532>
- Ori N, Eshed Y, Paran I, Presting G, Aviv D, Tanksley S, Zamir D, Fluhr R. (1997). The I2Cfamily from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *PlantCell*9: 521–532.
- Panno, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., ... & Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188.
- Robbins, M. D., Masud, M. A. T., Panthee, D. R., Gardner, R. G., Francis, D. M., & Stevens, M. R. (2010). Marker-assisted selection for coupling phase

- resistance to Tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato. *HortScience*, 45(10), 1424–1428. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.10.1424>
- Rubio, F., Alonso, A., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2016). Introgression of virus-resistance genes into traditional Spanish tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.): Effects on yield and quality. *Scientia horticulturae*, 198, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.025>
- Saidi, M., & Warade, S. D. (2008). Tomato breeding for resistance to tomato spotted wilt virus (tswv): An overview of conventional and molecular approaches. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44(3), 83–92. <https://doi.org/10.17221/47/2008-cjgpb>
- Seah, S., Yaghoobi, J., Rossi, M., Gleason, C. A., & Williamson, V. M. (2004). The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1635–1642. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1594-z>
- 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. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(6), 1104–1111. <https://doi.org/10.1007/s004380100509>
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Lee, T. Van Der., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. & Vos, P. (1998). Dissection of the *Fusarium* /2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. 10(June), 1055–1068.
- Su, X., Zhu, G., Huang, Z., Wang, X., Guo, Y., Li, B., ... Gao, J. (2019). Fine mapping and molecular marker development of the Sm gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. *Theoretical and*

Applied Genetics, 132(4), 871–882. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3242-z>

Scott, J. W. (2005). Perspectives on tomato disease resistance breeding: Past, present, and future. *Acta Horticulturae*, 695, 217–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.24>

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. <https://doi.org/10.21273/jashs.129.3.0394>

Shi, A., & Vierling, R. (2011). Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. *American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*, Vol. 1, pp. 8–16. <https://doi.org/10.5251/ajbms.2011.1.1.8.16>

Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., ... Bai, Y. (2013). The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA – Dependent RNA Polymerases. 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>.

Wang, Y., Zhang, Y., Gao, Z., & Yang, W. (2018). Breeding for Resistance to Tomato Bacterial Diseases in China: Challenges and Prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>.

Yang, X., Caro, M., Hutton, S.F. *et al.* (2014). Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene Ty-2 on chromosome 11 of tomato. *Mol Breeding* **34**, 749–760. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0072-9>

Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Chen, X., Zhang, H., Liu, G., ... Li, J. (2017). Transcriptome analysis of the Sm-mediated hypersensitive response to *Stemphylium lycopersici* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01257>

- Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Wang, S., Wang, A., Li, J., & Xu, X. (2017). Mapping and screening of the tomato *Stemphylium lycopersici* resistance gene, Sm, based on bulked segregant analysis in combination with genome resequencing. *BMC Plant Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1215-z>
- Zaccardelli, M., Perrone, D., Del Galdo, A., Campanile, F., Parrella, G., & Giordano, I. (2008). Tomato genotypes resistant to tomato spotted wilt virus evaluated in open field crops in Southern Italy. *Acta Horticulturae*, 789(December 2015), 147–150. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.789.20>
- Zhang, J., & Panthee, D. R. (2021). Development of codominant SCAR markers to detect the Pto, Tm22, I3 and Sw5 genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Breeding*, 140(2), 342-348. <https://doi.org/10.1111/pbr.12902>

CAPÍTULO IV. OPTIMIZACIÓN DE PCR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA A TYCLV, TSWV, *Fol*, *Meloydogine* Y *Phythophthora infestans* EN TOMATE

RESUMEN

La detección de genes asociados a resistencia a patógenos en tomate mediante marcadores moleculares permite acelerar el proceso de obtención de nuevas variedades al realizar la detección temprana y precisa de los alelos de interés. Sin embargo, la detección individual implica más tiempo y recursos. Es necesario el diseño y optimización de técnicas para la identificación conjunta de genes en una sola reacción de PCR. El objetivo de este estudio fue generar y optimizar protocolos, mediante ensayos de PCR múltiple, para la detección conjunta de marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a patógenos de importancia económica en plantas de tomate. Se utilizó una metodología de superficies de respuesta con un diseño central compuesto rotatable para cuatro factores (Ta, MgCl₂, ADN, Primer) que generó 26 tratamientos. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de las bandas generadas por cada marcador y determinó su especificidad en híbridos comerciales con resistencias declaradas. Se evaluaron dos protocolos multiplex; el primero contenía tres marcadores (Sw-5-2, P6-25, At2) asociados a los genes de resistencia *Sw5* (TSWV), *Ty-3* (TYLCV) y *I1* (*Fol 1*), el segundo con dos marcadores (Mi23 y Ph3) asociados a los genes *Mi1.2* (*Meloydigine* sp) y *Ph3* (*Phythophthora infestans*). El protocolo uno identificó los alelos de resistencia y susceptibilidad para el gen *Sw5* (574/465 pb), solo el susceptible para el gen *Ty-3* (320 pb) y solo de resistencia para el gen *I1* (130 pb). En el protocolo dos se observaron los dos alelos para el gen *Mi-1.2* (380/430 pb) y el gen *Ph3* (176/154 pb). Estos resultados fueron consistentes en la mayoría de los tratamientos evaluados y solo se encontró efecto lineal de regresión en un parámetro con el marcador P6-25, dos para At2 en el protocolo uno. En el protocolo dos se encontraron cinco parámetros para el marcador Mi23 y uno para el marcador Ph3. Estos protocolos podrían emplearse para la detección conjunta de genes en un programa de mejoramiento hacia resistencia contra estos patógenos.

Palabras clave: *Resistencia genética, PCR multiplex.*

Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Placido Facundo Angel

Dirección: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

CHAPTER IV. OPTIMIZATION OF MULTIPLEX-PCR FOR DETECTION OF MOLECULAR RESISTANCE MARKERS TO TYLCV, TSWV, *Fol*, *Meloydogine*, AND *Phytophthora infestans* IN TOMATO

ABSTRACT

The detection of genes associated with pathogen resistance in tomato using molecular markers allows for speeding up the process of obtaining new varieties by early and accurate detection of the alleles of interest. However, individual detection involves more time and resources. The design and optimization of techniques for the joint identification of genes in a single PCR reaction are necessary. The aim of this study was to generate and optimize protocols, through multiplex PCR assays, for the joint detection of molecular markers associated with resistance genes to economically important pathogens in tomato plants. A response surface methodology with a rotatable central composite design for four factors (Ta, MgCl₂, DNA, Primer) was used, generating 26 treatments. The fluorescence intensity of the bands generated by each marker was quantified, and their specificity in commercial hybrids with declared resistances was determined. Two multiplex protocols were evaluated; the first contained three markers (Sw-5-2, P6-25, At2) associated with the resistance genes *Sw5* (TSWV), *Ty-3* (TYLCV), and *I1* (Fol 1), the second with two markers (Mi23 and Ph3) associated with the genes *Mi1.2* (*Meloidogyne* sp.) and *Ph3* (*Phytophthora infestans*). Protocol one identified the resistance and susceptibility alleles for the *Sw5* gene (574/465 bp), only the susceptible for the *Ty-3* gene (320 bp), and only resistance for the *I1* gene (130 bp). In protocol two, both alleles for the *Mi-1.2* gene (380/430 bp) and the *Ph3* gene (176/154 bp) were observed. These results were consistent in most of the evaluated treatments, and only a linear regression effect was found in one parameter with marker P6-25, two for At2 in protocol one. In protocol two, five parameters for marker Mi23 and one for marker Ph3 were found. These protocols could be used for the joint detection of genes in a breeding program towards resistance to these pathogens.

Key words: *Genetic resistance, Multiplex PCR.*

Thesis of PhD of Sciences in Horticultural, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Placido Facundo Angel

Advisor: Dr. Jaime Sahagún Castellanos

4.1 INTRODUCCIÓN

El tomate es un cultivo de importancia mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). México es uno de los principales países productores y exportadores con una producción total de 3.46 millones de toneladas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2022). Sin embargo, diversos patógenos como TSWV, TYLCV, *Fusarium oxysporum*, *Meloydogine* sp. y *Phytophthora infestans*, son una limitante para la producción ya que reducen el rendimiento, demeritan la calidad de los frutos y la vida poscosecha (Olivier et al., 2018; Alvarado, 2011). Sin cultivares resistentes, los agricultores usan pesticidas como método de control, lo que amenaza la salud y el medio ambiente (Hanson et al., 2016). Además, aumenta los costos de producción y los riesgos financieros, trasladando estos costos a los consumidores (Hanson et al., 2016; Wilson & Tisdell, 2001). Los cultivares resistentes son una opción económica, simple y ambientalmente segura para controlar enfermedades (Hanson et al., 2016).

La selección efectiva para la resistencia a enfermedades en poblaciones segregantes requiere métodos de evaluación precisos y económicos que permitan probar rápidamente miles de plantas (Hanson et al., 2016). Muchos genes de resistencia a enfermedades han sido mapeados en el tomate, y hay marcadores moleculares vinculados a estos genes para la selección asistida por marcadores (MAS) disponibles (Foolad et al., 2008). La MAS, al eliminar la interacción ambiental, incrementa la precisión y eficiencia de la selección, reduce costos y acorta los ciclos de selección (Foolad et al., 2008). Además, es invaluable cuando las pruebas patogénicas son complejas o poco confiables, o existe riesgo de introducción de patógenos exóticos (Foolad et al., 2008).

La mayoría de los marcadores empleados para identificar los genes de resistencia se basan en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lee et al., 2015; Oladokun & Mugisa, 2019). Los marcadores SCAR, son uno de

los más empleados, éstos permiten la eliminación del uso de enzimas de restricción, lo que elimina un paso adicional después de la reacción de PCR; por lo tanto, son más eficientes y confiables que los marcadores CAPS en la detección basada en geles (Zhang & Panthee, 2021).

En el sistema de PCR clásico, se usa un par de cebadores oligonucleotídicos específicos de la especie para amplificar los objetivos de ADN que luego se detectan en gel de agarosa (Ha et al., 2006) y pueden confirmarse aún más mediante la secuenciación de amplicones (Maede, 2006), en este formato, el ADN molde de una sola especie se amplifica en una sola prueba de PCR y, por lo tanto, se necesitan varias pruebas para detectar varias especies objetivo, lo que genera un costo y tiempo adicionales (Köppel et al., 2013). Por otro lado, una PCR multiplex amplifica simultáneamente múltiples objetivos de ADN en un solo recipiente de reacción (Rojas et al., 2011). El éxito de esta técnica depende de la capacidad de los cebadores para ser reconocidos selectivamente con sus objetivos respectivos en un solo conjunto de condiciones de PCR (volumen de reacción y condiciones de ciclado) (Rojas et al., 2011). Esto se debe a las dificultades para optimizar las temperaturas de alineamiento y extensión, así como para evitar la formación de estructuras secundarias y dímeros (Rojas et al., 2011).

El objetivo de este estudio fue generar y optimizar protocolos para la detección conjunta de marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a patógenos de importancia económica en plantas de tomate, con el objetivo específico de su uso en programas de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades resistentes.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal y sitio de investigación

Se utilizaron tres híbridos comerciales de tomate de la empresa HM-Clause® con resistencia declarada a patógenos como TYLCV, TSWV y las razas 1, 2 y 3 de

Fol. Las semillas se establecieron en invernadero, en charolas de 200 cavidades con turba como sustrato. Quince días después de la emergencia de plantas, se cosechó tejido fresco sano, sin daño físico aparente, que posteriormente se procesó en laboratorio para la extracción de ADN genómico. La investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.

4.2.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN total de 0.6 g de hojas frescas de plántulas, de 15 días de edad, de los híbridos comerciales mediante el método de extracción CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) (Doyle & Doyle, 1987). El ADN extraído se ajustó a una concentración de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. La integridad del ADN genómico se evaluó mediante la corrida de un gel de agarosa al 2 % en tris-acetato-EDTA (TAE 1x), luego teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV con un fotodocumentador (Marca UVP, Modelo DigiDoc-It®). La concentración y pureza del ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite de Thermo Scientific, considerando relaciones 260/280 nm alrededor de 1.6 hasta 1.8 como ADN aceptable, y relaciones menores a este valor como contaminación por presencia de compuestos aromáticos, sales, carbohidratos y fenoles.

Cuadro 3. Resistencias declaradas de los híbridos comerciales utilizados en este estudio

HR/IR	Abreviación	Patógeno	Variedad Resistente
HR	Vd:1 (Euro: 0)	<i>Verticillium dahliae</i>	MC/MS/CD
HR	Va:1 (Euro: 0)	<i>Verticillium albo-atrum</i>	MC/MS/CD
HR	Fol:1,2,3 (EU: 0,1,2)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raza 1,2,3	MC/MS/CD
HR	ToMV	<i>Virus del mosaico del tomate</i>	MC/MS/CD
HR	Cf(A,B,C,D,E)	<i>Cladosporium fulvum</i> (A,B,C,D,E)	MC
IR	TSWV:T0	<i>Virus de la marchitez manchada</i>	MC/MS
IR	TYLCV	<i>Virus de las hojas amarillas en cuchara del tomate</i>	MC/MS
IR	Ma, Mi, Mj	<i>Meloidogyne arenaria</i> , <i>M. incognita</i> & <i>M. javanica</i>	MC/MS/CD

HR: alta resistencia, RI: resistencia intermedia, MC: Moctezuma, MS: Mesias, CD: Cid

4.2.3 Selección de marcadores moleculares

Se utilizaron cinco marcadores de Región Amplificada Caracterizada por Secuencia (SCAR) como candidatos para el ensayo de PCR multiplex, asociados a dos virus de tomate, un locus de resistencia a hongos, un locus de resistencia a nematodos y uno para oomicetos (Cuadro 4). Para el ensayo multiplex, los marcadores basados en PCR se eligieron con base en su capacidad diagnóstica, patrones de bandas simples, diferencias de tamaño claras entre las bandas (evitando amplicones de tamaño similar para un protocolo de PCR dado), y su capacidad para indicar alelos de susceptibilidad y resistencia.

Cuadro 4. Marcadores moleculares asociados a genes de resistencia empleados en el diseño de PCR-Multiplex

Gen	Marcador (SCAR)	Secuencia del iniciador (5'-3')	Amplicones (pb)	Referencia
Sw-5	Sw-5-2	F: CGGAACCTGTAACCTGACTG	R 574	Shi & Vierling, 2011
		R: GAGCTCTCATCCATTTTCCG	S 510/474	
Ty3	P6-25	F: GGTAGTGGAATGATGCTGCTC	R 630	Ji et al. 2007
		R: GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC	S 320	
I1	At2	F: CGAATCTGTATATTACATCCGTCGT	R 130	Ori et al., 1997; Scott et al., 2004; Arens et al., 2010
		R: GGTGAATACCGATCATAGTCGAG		
Mi-1.2	Mi23	F: TGGAAAAATGTTGAATTCTTTTG	R 380	Seah et al., 2004
		R: GCATACTATATGGCTTGTTTACCC	S 430	
Ph3	Ph3	F: CTA CTCTGCAAGAAGGTAC	R 176	Jung et al., 2015
		R: TCCACATCACCTGCCAGTTG	S 154	

R: resistencia, S: susceptible, Pb: pares de bases

4.2.4 Diseño de tratamientos y análisis estadístico

Se consideró un experimento con cuatro factores (Cuadro 5), lo que generó un factorial incompleto de 26 tratamientos. Para estudiar el efecto de regresores sobre la variable respuesta de interés (intensidad de fluorescencia entre los amplicones medida en pixeles con el programa ImageJ de acceso libre), se consideró un Diseño de Superficie de Respuesta (DSR) de segundo orden que incluyó los cuatro factores. Se usó un Diseño Central Compuesto (DCC) rotatable para los cuatro factores que incluyó dos puntos axiales y un punto central.

Mediante tal diseño se buscó, en el área explorada, puntos que maximizaran la respuesta estudiada. Para ello se realizó un análisis canónico que consideró regresores y variables respuesta expresados en unidades codificadas; el análisis se realizó mediante el procedimiento RSREG del sistema SAS Software (SAS, 9.4). De acuerdo con lo anterior se consideró un modelo de regresión lineal múltiple asociado a los efectos lineales, bilineales y cuadráticos correspondientes a las combinaciones entre pares de factores estudiados. El modelo fue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{24}X_2X_4 + \beta_{34}X_3X_4 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{44}X_4^2 + \varepsilon$$

donde β_j representa el coeficiente asociado al efecto lineal del regresor j , $j = 1, 2, 3, 4$; β_{jh} es el efecto bilineal correspondiente a los regresores X_j y X_h , $j < h$, $j, h \in \{1, 2, 3, 4\}$, mientras que β_{jj} es el coeficiente de regresión lineal asociado al efecto cuadrático puro del regresor X_j , $j = 1, 2, 3, 4$.

Por su parte ε es una variable aleatoria con una distribución normal con media cero y varianza σ^2 . Se considera que los regresores son vectores columna linealmente independientes, es decir no correlacionados, de forma tal que el rango de la matriz diseño asociada al modelo es de rango completo. La variable respuesta Y correspondió a la intensidad de banda, cuantificada en píxeles con el programa ImageJ®, de los marcadores Sw-5-2, P6-25, At2, Mi23 y Ph3 (Cuadro 4).

Por el criterio de rotabilidad, la varianza de cualquier predicción de la respuesta Y es constante en el espacio explorado. Para probar si existió efecto de regresión significativo sobre el regresor de interés, se consideró la prueba de hipótesis

$$H_0: \beta_j = 0 \text{ vs } H_a: \beta_j \neq 0. \text{ Se usó el estadístico de prueba } T_j \text{ definido como } T_j = \frac{\hat{\beta}_j}{\hat{\sigma}_{\hat{\beta}_j}}$$

Donde $\hat{\beta}_j$ es la estimación de cuadrados mínimos de β_j y $\hat{\sigma}_{\hat{\beta}_j}$ representa el error estándar estimado del estimador $\hat{\beta}_j$, $j = 1, \dots, k$, siendo k el número de regresores considerados en el modelo, 16 en este caso.

Para decidir si existe efecto de regresión o no, sobre el término en cuestión, se considera el nivel de significancia estimado ($p - value$, o $p - valor$). Se rechaza H_0 : con nivel α , $0 < \alpha < 1$, si se cumple que $p - valor < \alpha$, con $\alpha \leq 0.05$.

Cuadro 5. Codificación de variables para el diseño de tratamientos en la optimización de PCR-Multiplex

Variables	Axial (-2)	Factorial (-1)	Central (0)	Factorial (1)	Axial (2)
Ta (°C)	52	54	56	58	60
MgCl ₂ (mM)	1.5	2	2.5	3	3.5
ADN (ng)	30	40	50	60	70
Iniciador (μM)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7

Ta; temperatura de alineamiento

4.2.5 Optimización y condiciones de PCR-Multiplex

Se optimizaron dos protocolos para PCR-Multiplex punto final; en el primero se consideraron los marcadores Sw-5-2, P6-25 y At2 y el segundo incluyó los marcadores Mi23 y Ph3. El ADN molde para los protocolos fueron los híbridos comerciales antes mencionados. Los niveles de Ta se definieron utilizando una condición central para las temperaturas de alineamiento indicados en estudios anteriores dónde estos marcadores ya se han utilizado. Las cantidades de ADN, MgCl₂ y concentraciones de los puntos centrales y axiales se calcularon en función de las concentraciones utilizadas de rutina en el laboratorio de marcadores moleculares del Departamento de Fitotecnia que han mostrado buenos resultados (25 ng de ADN, 2.5 mM de MgCl₂ y 5 μM de Primer). Las reacciones de PCR-Multiplex se realizaron en un termociclador marca Verity® de Applied Biosystems. Se utilizó una mezcla de reacción de 50 μl que incluyó 13.7 μl de H₂O, 10 μl de dNTPS (200 μM), 5 μl de amortiguador (1x), 5 μl de MgCl₂ (3 mM), 0.5 μl de cada iniciador (Forward y Reverse) (10 pmol·μl⁻¹), 0.3 μl de Taq Polimerasa (1.5 u·μl⁻¹) y μl de ADN de acuerdo con los tratamientos (10 ng·μl⁻¹).

A partir de esta mezcla de reacción base se calcularon las mezclas de reacción para cada uno de los 26 tratamientos. La optimización se realizó mediante el Diseño de Superficie de Respuesta anteriormente descrito.

Para la amplificación de todos los marcadores, se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización, un min a 93 °C; 40 ciclos consistentes en 20 s a 93 °C, 60 s a la Ta (Cuadro 5) y 20 s a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Se utilizó una mezcla de reacción de 50 µl que incluyó 13.7 µl de H₂O, 10 µl de dNTPS (200 µM), 5 µl de amortiguador (1x), 5 µl de MgCl₂ (3 mM), 0.5 µl de cada iniciador (Forward y Reverse) (10 pmol·µl), 0.3 µl de Taq Polimerasa (1.5 u·µl) y 3 µl de ADN (10 ng·µl). A partir de esta mezcla de reacción base se calcularon las mezclas de reacción para cada uno de los 26 tratamientos.

4.2.6 Selectividad y especificidad

Para evaluar la especificidad/selectividad, la detección de las secuencias de los marcadores moleculares se realizó utilizando ADN genómico de las variedades comerciales de tomate (Cuadro 3) mediante los protocolos de PCR multiplex optimizados.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Optimización de PCR Multiplex para tres marcadores

Las reacciones de PCR múltiple con los marcadores Sw-5-2, P6-25 y At2 pudieron identificar la región específica con la expresión de resistencia o susceptibilidad sin competencia o inhibición entre los iniciadores en la mayoría de los tratamientos. Para el marcador At2 asociado al gen *I* de resistencia a *Fusarium*, se observó el alelo resistente de 130 pb (Figura 3). En el caso del marcador P6-25 del gen *Ty3*, se observó el alelo de susceptibilidad de 320 pb en la mayoría de las reacciones múltiples. Por otro lado, con el marcador Sw-5-2 del gen *Sw5* se detectó el alelo heterocigoto resistente de 574/465 pb.

En el análisis estadístico de los factores evaluados, no se encontró significancia estadística para el marcador Sw-5-2. En el caso del marcador P6-25 para el gen

Ty3, se encontró significancia para el regresor cuadrático del factor $MgCl_2$. Por su parte, con el marcador At2 mostró que la concentración de ADN y la interacción del Primer con la Temperatura de alineamiento fueron significativas indicando efectos sobre la intensidad de fluorescencia de las bandas amplificadas.

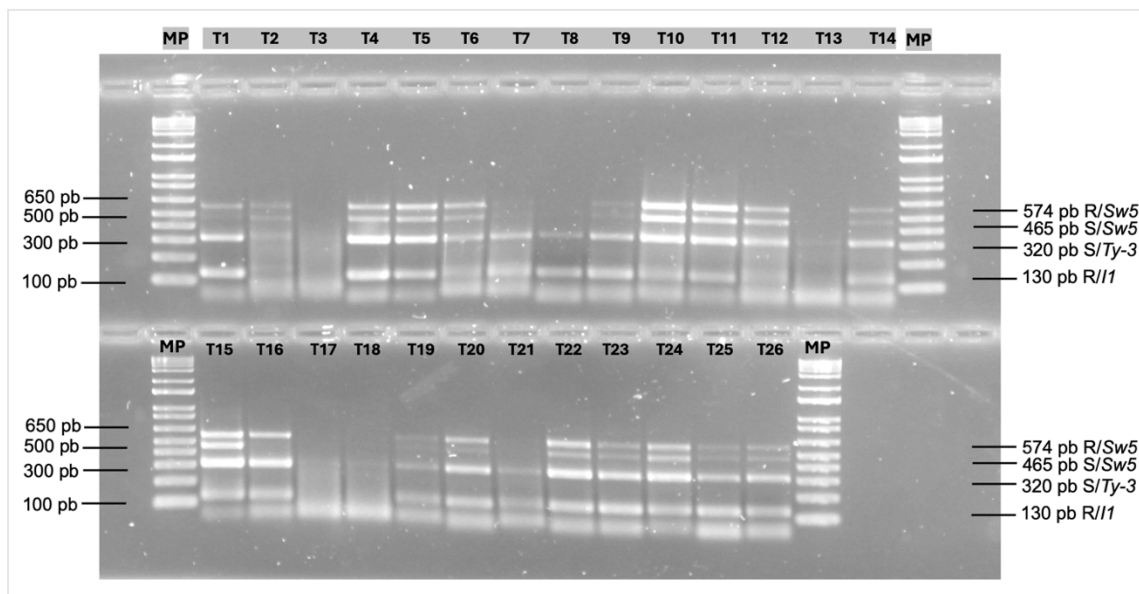


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para la PCR Múltiple con los marcadores Sw-5-2, P6-25 y At2. MP: marcador de peso molecular 100 pb, T1-T26: tratamientos evaluados.

En el análisis de regresión con los marcadores no encontraron puntos que maximizaran la variable respuesta (intensidad de las bandas).

Cuadro 6. Análisis de regresión de la intensidad de fluorescencia de los amplicones generados por los marcadores moleculares de resistencia (Sw-5-2, P6-25 y At2) usando DSR-DCC

Parámetro	GL	Estimación				Pr > t			
		Sw-5-2 R	Sw-5-2 S	P6-25 S	At2 R	Sw-5-2 R	Sw-5-2 S	P6-25 S	At2 R
Intercept	1	-387.01979	-1986.8764	-1542.6692	-2738.9258	0.8132	0.2317	0.4322	0.0758
Ta	1	0.557822	60.419424	39.664223	89.05087	0.9918	0.2713	0.5413	0.081
DNA	1	8.667665	8.268654	12.092408	13.104561	0.1568	0.1802	0.0997	0.0231*
MgCl ₂	1	190.648643	73.232815	204.946609	117.46839	0.1201	0.5506	0.1617	0.3006
Primer	1	-710.89529	-249.53407	-819.58891	-986.81613	0.2443	0.6839	0.2618	0.0843
Ta-Ta	1	0.093265	-0.470222	-0.315151	-0.76795	0.8452	0.3308	0.5818	0.0876
DNA-Ta	1	-0.143683	-0.136626	-0.156754	-0.171346	0.1532	0.1777	0.1922	0.0685
DNA-DNA	1	0.017634	0.020914	-0.009051	-0.025702	0.3576	0.28	0.6923	0.1515
MgCl ₂ -Ta	1	-2.417681	0.042566	-1.239946	-1.272693	0.2284	0.9831	0.6039	0.4937
MgCl ₂ -DNA	1	-0.574391	-0.666975	-0.448744	-0.028271	0.1534	0.1012	0.349	0.9393
MgCl ₂ -MgCl ₂	1	-5.558523	-10.747875	-20.926549	-14.949862	0.4679	0.1664	0.0249*	0.0387
Primer-Ta	1	12.747467	3.663529	21.52001	21.379989	0.2043	0.716	0.0751	0.024*
Primer-DNA	1	-1.836646	-2.009491	-2.05658	-1.522584	0.359	0.32	0.3904	0.4133
Primer-MgCl ₂	1	-1.099688	29.176443	-21.633901	51.500864	0.978	0.4695	0.6508	0.1686
Primer-Primer	1	75.152357	42.322915	-245.12709	-255.55843	0.6942	0.8262	0.2857	0.1538

*Indica significancia estadística con $\alpha \leq 0.05$, GL: grados de libertad

Para la PCR-Multiplex con tres marcadores, en todos los híbridos comerciales considerados como resistentes a *Fol 1* se observó la amplificación del alelo resistente de 130 pb (Figura 4). En un ensayo multiplex, para optimizar dos protocolos de PCR-Multiplex, Lafrance et al. (2023) lograron amplificar el mismo fragmento de resistencia en la mayoría de las reacciones utilizando al híbrido SVTE8444 como plantilla. Los cebadores del marcador At-2 fueron diseñados para amplificar únicamente una banda de 130 pb en genotipos resistentes, ya que el cebador inverso coincide con 7 pb adicionales presentes solo en

variedades resistentes y el cebador directo coincide con una región común en variedades resistentes y susceptibles (Arens et al., 2010).

Los híbridos Moctezuma y Mesías mostraron los alelos de resistencia y susceptibilidad (heterocigoto resistente) para el marcador Sw-5-2 asociado al gen Sw5 de resistencia a TSWV. En el híbrido Cid, tal como se esperaba, solo mostró el alelo de susceptibilidad de 465 pb. Por otro lado, con el marcador P6-25 asociado al gen Ty3 en los híbridos solo se detectó el alelo de susceptibilidad de 320 pb, se esperaba que los híbridos MC y MS mostraran el alelo de resistencia de 650 pb, dado que están declarados como resistentes por la empresa proveedora. En el caso del híbrido CD si coincidió ya que es declarado como susceptible al virus TYLCV (Cuadro 3).

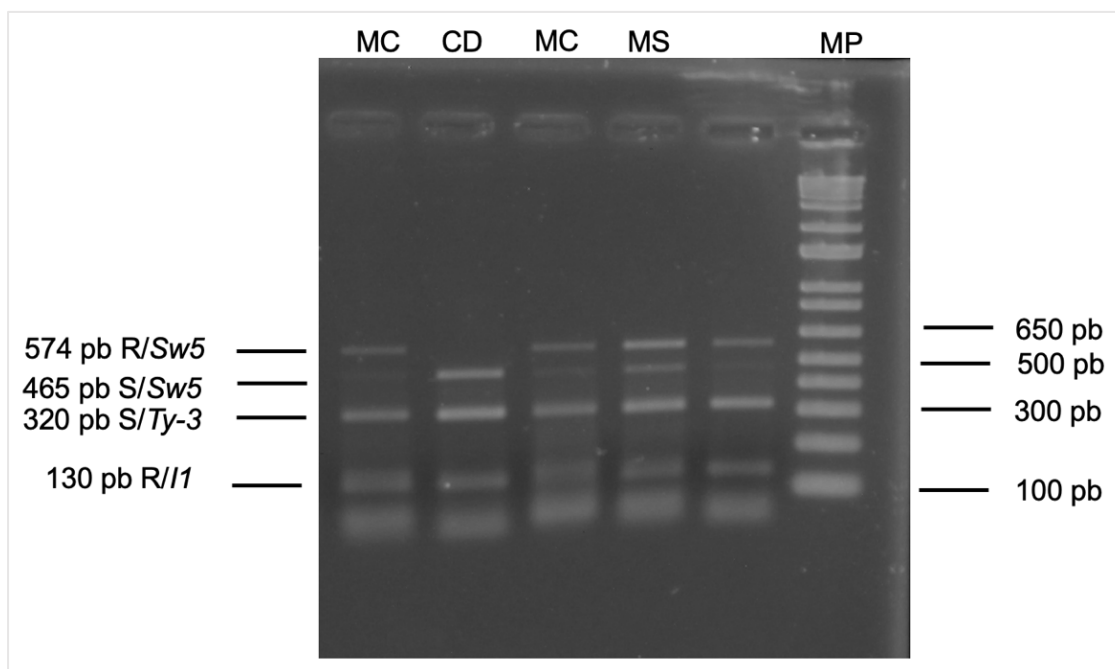


Figura 4. Especificidad/selectividad de los marcadores moleculares (Sw-5-2, P6-25 y At2) de resistencia en la optimización de PCR-Multiplex para tres genes. MC: Moctezuma, CD: Cid, MS: Mesías, MP: Marcador de Peso Molecular 100 pb.

Los pares de marcadores tipo SCAR At2, Sw-5 y P6-25 han sido empleados con éxito en el desarrollo de protocolos de PCR multiplex (Lafrance et al., 2023), en este trabajo se obtuvo un resultado similar los encontrado por estos autores, la diferencia radica en que en este protocolo desarrollado se utilizó otro marcador

asociado al gen *Sw5*, el *Sw-5-2* (con fragmentos amplificados de diferente peso molecular), que se comporta como un marcador codominante (Shi & Vierling, 2011) y una mezcla de reacción mayor (50 μ l). Se sabe que las variantes alélicas de este marcador codominante SCAR (*SW5*) asociado con la resistencia o susceptibilidad al TSWV tienen tamaños específicos (Kabaş et al., 2021)

Híbridos comerciales de tomate resistentes al TYLCV han sido analizados con el marcador P6-25. Estos presentaron dos alelos (660/320 pb) para genotipos heterocigotos resistentes (Lafrance et al., 2021). El marcador ha sido utilizado para seleccionar líneas de tomate resistentes, lo que sugiere que la región objetivo está altamente conservada y asociada con la resistencia mediada por Ty-3 (Mahfouze & Mahfouze, 2019). En este trabajo solo se detectó el alelo de susceptibilidad de 320 pb (que resultó bastante específico), a pesar de la resistencia declarada de los híbridos comerciales utilizados, pequeños cambios en las condiciones experimentales podrían causar que el patrón de bandas no sea preciso (Nevame et al., 2020). Además, la especificidad/selectividad de los marcadores moleculares depende en gran medida de la diversidad genética de las variedades analizadas (Lafrance et al., 2023)

4.3.1 Optimización de PCR Multiplex para dos marcadores

Las reacciones de PCR múltiple con los marcadores *Mi23* y *Ph3* pudieron identificar la región específica con la expresión de resistencia o susceptibilidad sin competencia o inhibición entre los iniciadores en la mayoría de los tratamientos. Para el marcador *Mi23* del gen *Mi1.2* se observó el alelo heterocigoto resistente de 380/430 pb en el 50 % de los tratamientos evaluados (Figura 4). En el caso del marcador *Ph3* del gen *Ph3*, se observó el alelo de resistencia de 176 pb, en todos los tratamientos evaluados.

En el análisis de regresión de los factores evaluados en el ensayo multiplex con dos marcadores se encontró significancia estadística para el marcador *Mi23* en la *Ta*, el $MgCl_2$, el regresor cuadrático de la *Ta*, la interacción $MgCl_2 \cdot Ta$ y el factor cuadrático del $MgCl_2$ indicando efectos sobre la intensidad de fluorescencia de los amplicones generados por el marcador.

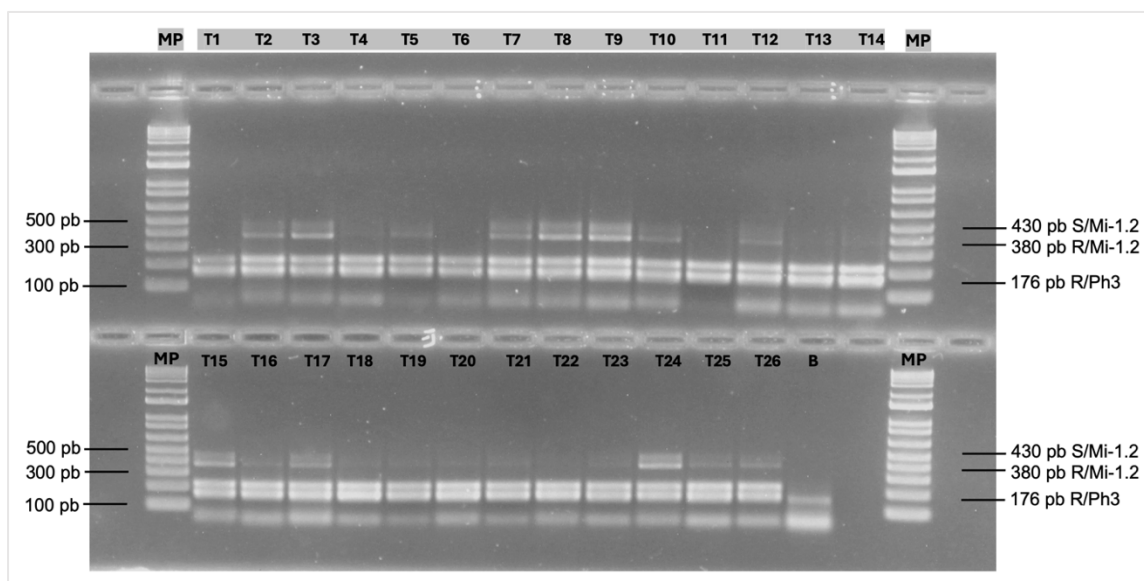


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % para la PCR Múltiple con los marcadores Mi23 y Ph3. MP: marcador de peso molecular 100 pb, T1-T26: tratamientos evaluados.

En el caso del marcador Ph3 para el gen *Ph3* de resistencia a *Phytophthora infestans* solo se encontró significancia para la interacción Primer*DNA. Sin embargo, tampoco se encontró puntos en la superficie de respuesta que maximice la variable respuesta.

Cuadro 7. Análisis de regresión de la intensidad de fluorescencia de los amplicones generados por los marcadores moleculares de resistencia Mi23 y Ph3 usando DSR-DCC

Parámetro	GL	Estimación			Pr > t		
		Mi23 R	Mi23 S	Ph3 R	Mi23 R	Mi23 S	Ph3 R
Intercept	1	1523.45843	1755.46294	-988.33413	0.0546	0.0287	0.3743
Ta	1	-58.975072	-66.774587	39.614676	0.0253*	0.0124*	0.2826
DNA	1	0.112426	2.804695	-4.729365	0.969	0.3385	0.2527
MgCl ₂	1	201.082461	169.940481	76.264634	0.0009*	0.0048*	0.3555
Primer	1	-253.10472	-453.44888	-166.02071	0.3836	0.1239	0.6866
Ta·Ta	1	0.589958	0.666295	-0.417203	0.0116*	0.0049*	0.2
DNA·Ta	1	-0.013735	-0.080997	0.113011	0.7729	0.0949	0.098
DNA·DNA	1	0.000998	0.010492	-0.009576	0.9128	0.2557	0.4602
MgCl ₂ ·Ta	1	-4.377372	-3.753851	-1.231	<.0001*	0.0002*	0.3639
MgCl ₂ ·DNA	1	0.349578	0.293614	0.337222	0.0698	0.1294	0.2149
MgCl ₂ ·MgCl ₂	1	9.526395	7.631679	-8.513774	0.0109*	0.0411*	0.1036
Primer·Ta	1	3.216606	5.842361	7.694312	0.4997	0.2259	0.2572
Primer·DNA	1	-0.585952	-0.090054	-3.016407	0.5386	0.9252	0.0285*
Primer·MgCl ₂	1	-5.584332	12.667685	32.471906	0.7693	0.5098	0.2322
Primer·Primer	1	117.098149	109.384739	-147.80137	0.2016	0.2363	0.2557

*Indica significancia estadística con $\alpha \leq 0.05$, GL: grados de libertad

En el ensayo Multiplex con dos marcadores, los híbridos comerciales mostraron el alelo de resistencia y susceptibilidad del marcador Mi23 asociado al gen *Mi-1.2*, es decir, son heterocigotos resistentes para *Meloydogine* sp. tal como se esperaba de acuerdo con las resistencias declaradas por el proveedor. Este marcador SCAR ha destacado, sobre otros marcadores, para seleccionar genotipos que contengan el gen *Mi1.2*, debido al estrecho ligamiento con el gen (Reddy et al., 2018).

En el caso del marcador Ph3 asociado al gen *Ph3*, los híbridos Moctezuma y Cid mostraron el alelo de resistencia (176 pb) y el híbrido Mesias el alelo de

susceptibilidad de 154 pb. La resistencia a *Phytophthora infestans* no se encuentra declarada en las variedades comerciales que se utilizaron en este estudio, sin embargo, se utilizó información reportada por otros autores sobre el tamaño de los amplicones de resistencia y susceptibilidad amplificadas por el marcador Ph3 como referencia para el diseño y optimización del ensayo multiplex (Cuadro 4).

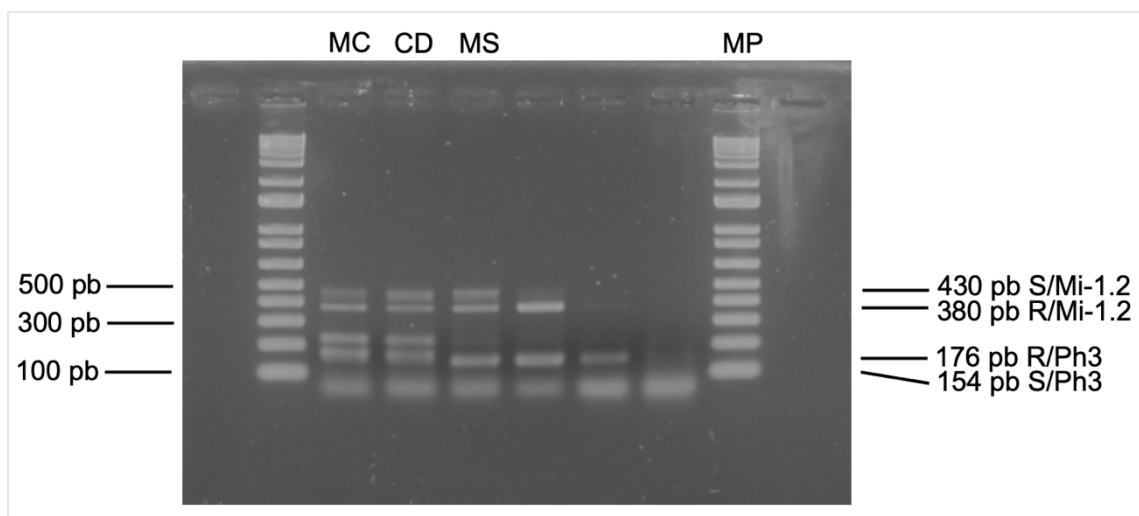


Figura 6. Especificidad/selectividad de los marcadores moleculares (Mi23 y Ph3) de resistencia en la optimización de PCR-Multiplex para dos genes. MC: Moctezuma, CD: Cid, MS: Mesias, MP: Marcador de Peso Molecular 100 pb.

Optimizar una PCR sin recurrir a métodos estadísticos, a menudo requiere probar un gran número de condiciones de reacción (Chamberlain & Chamberlain, 1994; Lafrance et al., 2023). En un ensayo de PCR multiplex, se necesita aún más esfuerzo y un mayor número de reacciones para establecer las condiciones adecuadas que permitan la amplificación de múltiples marcadores moleculares mediante mezclas de iniciadores (Chamberlain & Chamberlain, 1994). En estas reacciones, los cebadores deben conducir a la amplificación de regiones específicas de ADN, ya sea en pares individuales o en combinaciones de varios iniciadores, bajo un conjunto único de condiciones de reacción (Chamberlain & Chamberlain, 1994). Aunque no hay un límite teórico claro para el número de

secuencias que pueden amplificarse simultáneamente, las restricciones para establecer condiciones de reacción específicas e interpretables a menudo limitan el número útil de secuencias objetivo (Chamberlain & Chamberlain, 1994). En este contexto, los protocolos podrían ser utilizados en la selección de plantas resistentes en programas de mejoramiento de tomate debido a que muestran buen rendimiento y especificidad.

4.4 CONCLUSIONES

Se detectaron cinco marcadores moleculares (Sw-5-2, P6-25, At2, Mi23 y Ph3) ligados con genes de resistencia a cinco enfermedades de importancia económica y que pueden ser usados en reacciones de PCR-Multiplex para selección de genotipos mediante mejoramiento asistido.

Los protocolos para ensayos multiplex con dos y tres marcadores, podrían ser utilizados en programas de mejoramiento para identificar genotipos resistentes mediante mejoramiento asistido con marcadores para el desarrollo de nuevas variedades de tomate resistentes.

4.4 LITERATURA CITADA

- Alvarado, G. R., García, J., Patricia, S., Pavía, F., & Morelia-zinapecuaro, C. (2011). Enfermedades del jitomate (*Solanum lycopersicum*) cultivado en invernadero en la zona centro de Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(1), 50–59. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092011000100005&script=sci_arttext
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., van der 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(3), 655–664. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1183-2>
- Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of multiplex PCRs. In: Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (eds). *The polymerase chain reaction*, (pp. 38-46). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8_3
- Chamberlain, J. S., & Chamberlain, J. R. (1994). Optimization of multiplex PCRs. In K. B. Mullis, F. Ferré, & R.A. Gibbs (Eds). *The polymerase chain reaction* (pp. 38-46). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0257-8_3
- Doyle, J. J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin. Focus* 1990, 12, 39–40. <https://worldveg.tind.io/record/33886/>
- Foolad, M. R., Merk, H. L., & Ashrafi, H. (2008). Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(2), 75–107. <https://doi.org/10.1080/07352680802147353>

- Foolad, M. R., & Panthee, D. R. (2012). Marker-Assisted Selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(2), 93–123. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616057>
- Ha, J. C., Jung, W. T., Nam, Y. S., & Moon, T. W. (2006). PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. *Journal of food protection*, 69(9), 2241-2247. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2241>
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., ... Yang, R. Y. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, 201, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
- Ji, Y., Schuster, A. E. D. J., & Scott, A. E. J. W. (2007). Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20, 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>
- Jung, J., Kim, H. J., Lee, J. M., Oh, C. S., Lee, H. J., & Yeam, I. (2015). Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt. *Euphytica*, 205(2), 599–613. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1442-z>
- Kabaş, A., Fidan, H., & Demirelli, M. B. (2021). Identification of new sources of resistance to resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 3094-3099. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.053>
- Köppel, R., Daniels, M., Felderer, N., & Brünen-Nieweler, C. (2013). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork. *European Food Research and*

Technology, 236(6), 1093-1098. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1973-2>

Lafrance, R., Valdez-Torres, J. B., Villicaña, C., García-Estrada, R. S., Esparza-Araiza, M. J., & León-Félix, J. (2023). Response surface methodology for optimization of multiplex-PCR protocols for detection of TYLCV, TSWV and Fol molecular markers: analytical performance evaluation. *Genes*, 14(2), 337. <https://doi.org/10.3390/genes14020337>

Lafrance, R., Villicaña, C., Valdéz-Torres, J. B., Martínez-Montoya, H., Castillo-Ruiz, O., Alemán-Castillo, S. E., Esparza-Araiza, M. J., & León-Félix, J. (2021). Optimization of PCR-based TYLCV molecular markers by response surface methodology. *Gene*, 785, 145606. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145606>

Lee, J. M., Oh, C.-S., & Yeam, I. (2015). Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(4), 308–322. <https://doi.org/10.9787/PBB.2015.3.4.308>

Mahfouze, S. A., & Mahfouze, H. A. (2019). A comparison between CAPS and SCAR markers in the detection of resistance genes in some tomato genotypes against Tomato yellow leaf curl virus and whitefly. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(2), 123-133. <https://jjbs.hu.edu.jo/files/vol12/n2/Paper%20number%201.pdf>

Maede, D. (2006). A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences. *European Food Research and Technology*, 224(2), 209-217. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0320-2>

Nevame, A. Y. M., Xiaa, L., Wentinga, Z., Nchongboh, C. G., Wenhua, L., Hasand, M. M., ... & Longtinga, S. (2020). Validation of some disease-resistance molecular markers associated with multiple diseases in tomato for marker-assisted selection program. *Scienceasia*, 46(2020), 19-29. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2020.006>

- Oladokun, J. O., & Mugisa, I. (2019). Exploring MAS: A reliable molecular tool for development of multiple disease resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) through gene pyramiding. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(2), 509–516. <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.2.35>
- Olivier, D., Maina, M., Andrew, O. E., Peter, M. M., & Careen, I. C. (2018). Application of molecular and biotechnological techniques in plant disease management: A review. *African Journal of Biotechnology*, 17(31), 938–948. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16532>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). Datos sobre alimentación y agricultura FAOSTAT. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <https://www.fao.org/faostat/es/#home>
- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.521>
- Reddy, Y. S., Sellaperumal, C., Prasanna, H. C., Yadav, A., Kashyap, S. P., Singh, S., ... & Singh, B. (2018). Screening of tomato genotypes against root-knot nematode and validation of Mi 1 gene linked markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88, 65-72. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0731-1>
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. Á., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control*, 22(3-4), 523-531. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.039>

- Seah, S., Yaghoobi, J., Rossi, M., Gleason, C. A., & Williamson, V. M. (2004). The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8), 1635–1642. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1594-z>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). Producción agrícola. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/c>
- Shi, A., & Vierling, R. (2011). Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. *American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*, 1, 8–16. <https://doi.org/10.5251/ajbms.2011.1.1.8.16>
- Scott, J. W. (2004). Perspectives on tomato disease resistance breeding: Past, present, and future. *Acta Horticulturae*, 695, 217–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.24>
- Wilson, C., & Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological economics*, 39(3), 449-462. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5)
- Zhang, J., & Panthee, D. R. (2021). Development of codominant SCAR markers to detect the *Pto*, *Tm22*, *I3* and *Sw5* genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Breeding*, 140(2), 342-348. <https://doi.org/10.1111/pbr.12902>

V. CONCLUSIONES GENERALES

El empleo de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia pueden agilizar los procesos de selección de genotipos resistentes al permitir la identificación temprana de los alelos resistencia. Marcadores tipo SCAR asociados a nueve genes de resistencia a seis patógenos en tomate permitieron la descripción de la resistencia en 17 líneas avanzadas, de las cuales, la L50 y L76H podrían emplearse como progenitores para generar híbridos de cruce simple resistentes debido a su mayor número de alelos de resistencia identificadas.

Cinco marcadores moleculares (Sw-5-2, P6-25, At2, Mi23 y Ph3) ligados con genes de resistencia a *TSWV*, *TYLCV*, *Meloydogine sp.* y *Phytophthora infestans* pueden ser usados en reacciones de PCR-Multiplex para selección de genotipos mediante mejoramiento asistido y podrían reducir los costos al permitir la detección conjunta de marcadores en una sola reacción.