

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b>	Lista de variedades comerciales utilizadas en la investigación.....	42
<b>Tabla 2.2</b>	Lista de variedades silvestres utilizadas en la investigación.....	43
<b>Tabla 2.3</b>	Descripción de las variedades comerciales: Shady lady, Astota, Advantage y Flora Dade.....	44
<b>Tabla 3.1</b>	Cuantificación de ADN de la variedad comercial ASTONA, mediante los diferentes protocolos.....	65
<b>Tabla 3.2</b>	Valores de cuantificación de ADN mediante el marcador High DNA mass ladder y fluorómetro, de las variedades comerciales.....	66
<b>Tabla 3.3.</b>	Valores de cuantificación de ADN mediante el marcador High DNA mass ladder y fluorómetro, de las variedades silvestres.....	66
<b>Tabla 3.4</b>	Programa de la PCR para el marcador molecular SCAR (SCG09 <sub>700</sub> ) en el termociclador.....	74
<b>Tabla 3.5</b>	Condiciones para la preparación del master mix para la detección del marcador molecular SCAR (SCG09 <sub>700</sub> ).....	74
<b>Tabla 3.6</b>	Programa de la PCR para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2 en el termociclador.....	80
<b>Tabla 3.7</b>	Condiciones para la preparación de la master mix para la amplificación por PCR.....	80
<b>Tabla 3.8</b>	Determinación de resistencia para las variedades comerciales ( <i>Solanum lycopersicon</i> ).....	83
<b>Tabla 3.9.</b>	Determinación de resistencia para las variedades silvestres.....	84
<b>Tabla 3.10</b>	Número de variedades comerciales y silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	85
<b>Tabla 3.11</b>	Número de variedades silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	86
<b>Tabla 3.12</b>	Número de variedades comerciales que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	87

<b>Tabla 3.13</b>	Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en este estudio, tanto para la variable SCAR y la variable PCR.....	88
<b>Tabla 3.14</b>	Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable SCAR y la variable PCR.....	89
<b>Tabla 3.15</b>	Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en el estudio de la variable SCAR.....	90
<b>Tabla 3.16</b>	Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable SCAR.....	90
<b>Tabla 3.17</b>	Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en el estudio para la variable PCR.....	92
<b>Tabla 3.18</b>	Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable PCR.....	92
<b>Tabla 3.19</b>	Prueba T para proporciones para la variable SCAR en las variedades silvestres y comerciales.....	93
<b>Tabla 3.20</b>	Prueba T para proporciones para la variable PCR en las variedades silvestres y comerciales.....	93

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b>	Principales países productores de tomate.....	5
<b>Cuadro 1.2</b>	Valores de producción de tomate, desde el año de 1999 hasta el 2005.....	8
<b>Cuadro 1.3</b>	Valores de exportación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Preparados o conservados).....	9
<b>Cuadro 1.4</b>	Valores de exportación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates no procesados (Frescos o refrigerados).....	10
<b>Cuadro 1.5</b>	Valores de importación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Preparado o en conservas).....	10
<b>Cuadro 1.6</b>	Valores de importación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Enteros o en trozos).....	11
<b>Cuadro 1.7</b>	Estimación de la superficie, producción y rendimiento del tomate, por provincia en el Ecuador para el 2005.....	12
<b>Cuadro 1.8</b>	Superficie cultivada de tomate en el Ecuador desde 1995 al 2005.....	13
<b>Cuadro 1.9</b>	Valores de rendimiento en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomate.....	13
<b>Cuadro 1.10</b>	Rango de separación en genes conteniendo distintas concentraciones de agarosa.....	33
<b>Cuadro 2.1</b>	Cantidad de ADN (ng) en cada fragmento del High DNA mass ladder...	52

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Fotografía tomada en un microscopio electrónico de una muestra de raíz contaminada con el virus del mosaico del tomate. La varilla del virus mide 200 nm.....	16
<b>Figura 1.2.</b>	Principales síntomas del virus del mosaico del tomate.....	17
<b>Figura 1.3</b>	Esquema de la etapa de desnaturalización de la PCR.....	26
<b>Figura 1.4</b>	Esquema de la etapa de annealing de la PCR.....	27
<b>Figura 1.5</b>	Esquema de la etapa de extensión de la PCR.....	27
<b>Figura 1.6.</b>	Diagrama de procedimiento para obtener los SCAR.....	39
<b>Figura 2.1</b>	Variedades comerciales sembradas en los invernaderos del laboratorio de Biotecnología, en bandejas con sustrato.....	46
<b>Figura2.2</b>	Programa PRIMER 3 para diseño de primers.....	54
<b>Figura 2.2.1</b>	Programa PRIMER 3 para diseño de primers, ventana de inicio para insertar secuencia completa del gen.....	54
<b>Figura 2.2.2</b>	Programa PRIMER 3 para diseño de primers, ventana para escoger opciones de diseño.....	54
<b>Figura 2.2.3</b>	Programa PRIMER 3, ventana para empezar el diseño del primer (opción pick primer).....	55
<b>Figura 2.3.</b>	Programa FAST PCR para diseño de primers.....	56
<b>Figura 2.3.1</b>	Programa FAST PCR para diseño de primers, ventana principal para insertar secuencia completa del gen.....	56
<b>Figura 2.3.2</b>	Programa FAST PCR para diseño de primers, ventana para escoger las opciones de diseño.....	57
<b>Figura 3.1.</b>	Gel de agarosa al 1% del ADN extraído usando la variedad comercial ASTONA.....	64
<b>Figura 3.2</b>	Gel de agarosa al 1% de ADN de las variedades silvestres (Vs) y comerciales (Vc).....	65
<b>Figura 3.3.</b>	Resultados de las combinaciones de primer adecuados para la secuencia del gen Tm-20 por el programa PRIMER 3.....	67
<b>Figura 3.4.</b>	Resultado de la combinación de primers adecuados para la secuencia del gen Tm-20 por el programa Fast PCR.....	68

<b>Figura 3.5</b>	Gel de agarosa al 2% del marcador SCAR y para la amplificación por PCR, con la secuencia forward(F) y reverse(R) respectivas.....	69
<b>Figura 3.6.</b>	Gel de agarosa al 2 % a diferentes temperaturas de annealing para el primer del marcador SCAR.....	71
<b>Figura 3.7.</b>	Gel de agarosa al 2 % a diferentes concentraciones del primer del marcador SCAR.....	73
<b>Figura 3.8</b>	Gel de agarosa al 2 % de la 8 variedades comerciales probadas con el primer del marcador SCAR.....	75
<b>Figura 3.9.</b>	Gel de agarosa al 2 % de las variedades silvestres probadas con el primer del marcador SCAR.....	76
<b>Figura 3.10</b>	Gel de agarosa al 2 % con diferentes temeperaturas de alineamiento para el primer de amplificación para PCR.....	78
<b>Figura 3.11</b>	Gel de agarosa al 2 % a diferentes concentraciones del primer de amplificación para PCR.....	79
<b>Figura 3.12</b>	Gel de agarosa al 2 % de la 8 variedades comerciales probadas con el primer para amplificación por PCR.....	81
<b>Figura 3.13</b>	Gel de agarosa al 2 % de las variedades silvestres probadas con el primer para la amplificación por PCR.....	82
<b>Figura 3.14</b>	Histograma que representa el número de variedades comerciales y silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	85
<b>Figura 3.15</b>	Histograma que representa el número de variedades silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	86
<b>Figura 3.16</b>	Histograma que representa el número de variedades comerciales que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.....	87

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> Riego semanal de las plantas de tomate sembradas en los invernaderos de los laboratorios de Biotecnología.....	115
<b>ANEXO B.</b> Kit de extracción de ADN (DNeasy mini kit-QIAGEN).....	115
<b>ANEXO C.</b> Intensidad de bandas en el marcador de Peso molecular High DNA mass ladder, para cuantificación de ADN.....	116
<b>ANEXO D.</b> Fluorómetro (Invitrogen-Qubit).....	116
<b>ANEXO E.</b> Secuencia del gen Tm-2 de Solanum lycopersicon de resistencia al ToMV, con un tamaño de secuencia de 2821 pb.....	117
<b>ANEXO F.</b> Homogenización en la centrifuga de todos los reactivos para la Master mix, en la etapa de preparación para de la PCR.....	118
<b>ANEXO G.</b> Termociclador (Techne – TC-512).....	118
<b>ANEXO H.</b> Concentración de DNA extraído en dieferentes especies, especificado en el manual del DNeasy mini kit (QIAGEN) de extracción. ....	119

## INDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	IX
INDICE DE CUADROS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE ANEXOS.....	XIV
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo principal.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Cultivo del tomate.....	4
1.4.1 Botánica de la planta.....	7
1.4.2 Importancia económica del cultivo de tomate.....	8
1.4.3 Estado actual del tomate en el Ecuador.....	11
1.4.4 Principales enfermedades virales que atacan al cultivo del tomate.....	14
1.5 Virus del Mosaico de tomate (ToMV).....	15
1.5.1 Mecanismos de replicación y traducción viral del ToMV.....	18
1.5.2 Mecanismo de transporte del ToMV en la célula.....	19
1.5.3 Mecanismo del ToMV para romper la resistencia del gen Tm-2.....	20
1.5.4 Transmisión y control de la virosis.....	24
1.6 Técnicas moleculares.....	25
1.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	25
1.6.2. Electroforesis.....	31
1.6.3 Fluorimetría.....	35

1.6.4 Marcadores Moleculares.....	36
1.7 Diseño estadístico.....	40
<b>CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
2.1 Material Vegetal.....	42
2.2. Cultivo en invernadero.....	45
2.3 Extracción de ADN.....	46
2.3.1 Protocolo No. 1 de Ferreira y Grattapaglia (1998).....	47
2.3.2 Protocolo No. 2 de Morillo (1999).....	48
2.3.3 Protocolo No. 3 modificado de Fulton (1995).....	48
2.3.4 Protocolo No. 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP).....	49
2.3.5 Protocolo de extracción de ADN, DNeasy Kit (QIAGEN).....	50
2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	51
2.5 Cuantificación de ADN.....	51
2.3.6 Cuantificación de ADN por el marcador High DNA mass ladder.....	51
2.3.7 Cuantificación de ADN mediante el uso del Fluorómetro.....	53
2.6 Diseño de primers para el gen Tm-2.....	53
2.6.1 Sintetizado de primers.....	57
2.6.2 Reconstitución de primers.....	58
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa.....	58
2.7.1 Calculo de la Tm para los primers.....	58
2.7.2 Programa del termociclador.....	59
2.7.3 Condiciones para la PCR.....	59
2.7.4 Revelado de la amplificación por electroforesis.....	60
2.8 Diagrama de la parte experimental de la investigación.....	61
2.9 Diseño estadístico.....	62
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
3.1 Extracción de ADN de tomate ( <i>Solanum lycopersicon</i> ).....	63
3.2 Cuantificación de ADN.....	64

3.3	Diseño de primers.....	67
3.4	Estandarización de la técnica per para la amplificación del marcador SCAR (SCG09 <sub>700</sub> ) para la detección del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate.....	69
3.5	Estandarización de la técnica PCR para la amplificación de un fragmento de 342 pb. del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate.....	77
3.6	Desarrollo del diseño estadístico.....	84
	3.6.1 Representaciones estadísticas.....	84
	3.6.2 Test exacto de Fisher y Chi cuadrado.....	88
	3.6.3 Test T para proporciones.....	92
	<b>CAPITULO 4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
	<b>CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>102</b>
	<b>CAPITULO 6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>105</b>
	<b>CAPITULO 7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>115</b>

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

### 1.1 Antecedentes

El tomate (*Solanum lycopersicon*) es una de las plantas hortícolas más populares y más ampliamente cultivadas en el mundo (Bayer Crop Science, 2005), en nuestro país representa alrededor del 22.15% del total de hortalizas cultivadas. Sin embargo el rendimiento del país es apenas de 88.933 Kg /Ha frente a 252.688 Kg/Ha que constituye la media del Continente Americano, esto debido a causa de las múltiples enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos y virus, las cuales son capaces de causar aproximadamente el 60% de pérdida de la producción final (SICA, 2002).

La falta de programas eficaces en materia de sanidad para este cultivo es uno de los factores que limitan la extensión del mismo. En la actualidad el control de enfermedades en la agricultura se ha basado, casi en su totalidad, en la aplicación de agroquímicos que tienen un efecto sobre el ambiente y la salud humana (Bayer Crop Science, 2005). El mejoramiento genético clásico ha permitido obtener un gran número de nuevos cultivares con características deseables de resistencia, sin embargo, son de larga duración y pueden llegar a ser poco efectivos por la rápida evolución y diseminación de patógenos resistentes.

La biotecnología aplicada tiene el mismo objetivo que la agricultura tradicional, es decir producir alimentos de calidad, con un alto rendimiento al menor costo posible. Es por tal motivo que en las últimas décadas se ha venido trabajando en técnicas modernas que permiten la introducción de genes específicos en las plantas, que han servido para obtener mejores resultados que con los cruces de plantas desarrolladas por métodos tradicionales. La transferencia de un gran número de genes, así como la aplicación de técnicas moleculares ha servido para la búsqueda de genes de resistencia con el fin de obtener cultivares de alta calidad que asegure una buena producción.

## 1.2 Justificación

Para generar productos agrícolas de calidad es necesario iniciar el cultivo con plantas de alta calidad, libres de patógenos que puedan comprometer la producción. Sin embargo no se ha podido desarrollar técnicas adecuadas que garanticen la calidad de los productos, debido a que existen pocos programas nacionales que asesoren de manera eficiente al agricultor para lograr una producción sostenible. El problema no solo radica en lograr cultivos más eficientes que disminuyan el porcentaje de pérdida en la cosecha final, sino además disminuir el riesgo para la salud en el uso de químicos. En varios países en vías de desarrollo, entre ellos el Ecuador, es muy común la práctica de fumigar los tomates con plaguicidas clasificados como extremadamente peligrosos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es por tal motivo que muchas veces estos son rechazados por el alto grado de residuos químicos que poseen, un problema que debe afrontar el agricultor en nuestro país.

La pérdida de las cosechas a causa de enfermedades y plagas producidas por bacterias, hongos, nemátodos y virus representa en la actualidad un grave problema en la cosecha del tomate. Entre las enfermedades víricas más comunes se encuentra el virus del mosaico del tomate que causa principalmente baja productividad y tamaño reducido del fruto (SICA, 2002). Con el fin de disminuir problemas en el cultivo del tomate, se ha venido trabajando a nivel mundial, en la selección de variedades resistentes a enfermedades que aseguren una buena producción. En el presente trabajo de investigación, se tratará con uno de los virus más graves que ataca al tomate, el virus del mosaico del tomate (ToMV). La detección del gen Tm-2 de resistencia a este virus ToMV mediante el uso de marcadores moleculares tipo SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas) en variedades cultivadas y silvestres en el Ecuador asegurando resultados eficientes para lograr cultivos resistentes a este virus.

La investigación a nivel de biotecnología moderna en nuestro país se ha venido desarrollando a pasos muy lentos en los últimos años, los trabajos en torno a mejoramiento vegetal mediante la búsqueda de genes de resistencia a enfermedades en cultivos importantes de nuestro país son muy escasos, existe información relacionada con el mejoramiento genético de fréjol asistido por marcadores moleculares (Murillo *et al.*, 2005), pero concretamente en el caso de tomate (*Solanum lycopersicon*) la

información que se maneja es nula. La presente investigación sería la primera en su campo en nuestro país, además que se propone técnicas innovadoras a nivel biotecnológico, específicamente en el área de biología molecular vegetal que garanticen resultados efectivos y a largo plazo.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo principal**

Detectar el gen de resistencia (Tm-2) al virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), en variedades cultivadas y silvestres de tomate (*Solanum lycopersicon*) en el Ecuador

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Extraer y cuantificar ADN de las variedades de tomate a utilizar.
- Diseñar primers específicos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- Estandarizar y utilizar la técnica molecular de PCR para la detección de un fragmento de 345 bp. del gen de resistencia (Tm-2) al virus de mosaico de tomate.
- Amplificar la secuencia SCAR (SCG09<sub>700</sub>) de 700 pb, para la detección del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate
- Determinar resistencia o susceptibilidad al virus del mosaico del tomate en las variedades tanto comerciales como sembradas en los laboratorios de Biotecnología.

#### **1.4 Cultivo de tomate (*Solanum lycopersicon*)**

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. El origen de este género se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (SICA, 2002). Esta y otras hortalizas se cultivaron en forma continua por las culturas que florecieron en los [Andes](#) desde tiempos preincaicos. Algunas investigaciones asignan el origen del tomate a esta zona, apoyados no solo en la antigüedad de las evidencias arqueológicas registradas en los ceramios prehispánicos hallados en la zona norte de Perú, sino también a la gran cantidad de variedades silvestres que se pueden hallar aún en campos y zonas eriazas de esta parte de Sudamérica (Smith, 1994)

Durante el siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños e incluso rojos y amarillos. En Europa servían de ornamento, pues se creían que eran venenosas, por su relación con otras especies de las solanaceas, como el beleño y la belladona; estas creencias se mantuvieron hasta entrada el siglo XX (Turón y Pérez, 1997). Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, y de allí a otros países asiáticos y de Europa, también se difundió a Estados Unidos y Canadá (Rodríguez *et al.*, 1997).

En Latinoamérica, los principales países productores y exportadores de tomate son Brasil con 3.518.163 ton/año, seguido de México con 2.100.000ton /año, Chile con 1.200.000 ton/año y Argentina con 700.000 ton/año, estos valores aunque sean bastante altos no se comparan muchas veces con los valores de producción de otros países a nivel mundial (Cuadro 1.1).

**Cuadro 1.1** Principales países productores de tomate

<b>PAISES</b>	<b>PRODUCCIÓN TOMATES</b>
	<b>Año 2002 (ton)</b>
China	25.466.211
Estados Unidos	10.250.000
Turquía	9.000.000
India	8.500.000
Italia	7.000.000
Egipto	6.328.720
España	3.600.000
Brasil	3.518.163
Rep. Islámica de Irán	3.000.000
México	2.100.000
Grecia	2.000.000
Federación de Rusia	1.950.000
Chile	1.200.000
Portugal	1.132.000
Ucrania	1.100.000
Uzbekistán	1.000.000
Marruecos	881.000
Nigeria	879.000
Francia	870.000
Túnez	850.000
Argelia	800.000
Japón	797.600
Argentina	700.000

Fuente: FAO, 2002

Actualmente, el cultivo del tomate, ha alcanzado tal difusión que difícilmente puede encontrarse otro producto agrícola que sea consumido en tales cantidades, bien en fresco, o en distintos tipo de jugos o salsas (Rodríguez *et al.*, 1997), esto debido a que

esta hortaliza es conocida como un importante remineralizante, desintoxicante, además de que se encarga de eliminar el ácido úrico y de reducir el colesterol. La sustancia responsable de este resultado es el licopeno, un pigmento que le proporciona su característico color rojo; este se encuentra también en las sandías, las zanahorias y los albaricoques, la diferencia es que en el tomate posee mayor proporción de este pigmento, hasta el punto de que proporciona el 90 por ciento del necesario para el organismo.

El Dr. Edward Giovannucci, de la Facultad de Medicina de Harvard, confirmó en 1999 que el consumo habitual de tomate previene el cáncer de esófago, páncreas, mama, colorrectal, bucal y cervical. Los tomates son ricos en sustancias fitoquímicas con propiedades anticancerígenas, que conducen a la formación de carotenoides como el licopeno, compuestos que protegen a las células de los efectos de la oxidación. Por tal razón, el licopeno tiene la capacidad de prevenir e incluso combatir el cáncer, pues modula las moléculas responsables de la regulación del ciclo celular y causa una regresión de las lesiones cancerosas. El licopeno se libera sobre todo al cocinarse, por ello, gran parte de las investigaciones comprobaron su eficacia en salsa y esta es la fórmula ideal para beneficiarse de sus propiedades anticancerígenas, a ser posible, acompañado de alimentos como [aceite](#) o queso, una combinación que recomienda porque al cocer el tomate se libera más fácilmente el licopeno y gracias a estos alimentos se absorbe mejor por el organismo (Giovannucci, 1999).

Además del licopeno, el tomate es un alimento que contiene una variedad de nutrientes esenciales para el organismo y beneficiosos para la salud, como las [vitaminas C y A](#), dos carotenoides que ayudan a proteger al organismo de los rayos del sol. La vitamina C tiene un importante papel en la formación de colágeno, sustancia que cohesiona las células de los tejidos y la piel. La vitamina A desempeña una función fundamental en el mantenimiento de la piel, la mucosa, la vista y aumenta la resistencia a las infecciones (Rodríguez *et al.*, 1997). Asimismo, el tomate contiene vitaminas de los grupos B, PP y K; algunos minerales como el fósforo, [hierro](#), [calcio](#), magnesio, manganeso, zinc, cobre, potasio y sodio, adicionalmente contiene Glutathione, un antioxidante celular que ayuda a depurar los productos tóxicos e impide la acumulación de materiales pesados, como el plomo (Martínez, 2007).

### 1.4.1 Botánica de la planta

Botánicamente, el tomate pertenece al orden de las Poleminiales, familia de las solanáceas, la cual posee cerca de 90 géneros y más de 2.600 especies. Las características principales de la familia son las de ser plantas generalmente herbáceas, aunque hay especies arbustivas y arbóreas, generalmente susceptibles a daño por heladas y a daño por enfriamiento. Las hojas son alternadas y las flores pentámeras perfectas, cuyos pétalos forman una corola tubular, al menos en la base, y los estambres se alternan con los cinco lóbulos de la corona. El ovario generalmente es bilocular, aunque también puede ser multilocular, con muchos óvulos en placentas axilares, y con un estilo terminal. Los frutos pueden ser bayas o cápsulas. En varias especies existe una reconocida producción de alcaloides o compuestos nitrogenados aromáticos (ej.: atropina, nicotina, solanina, tomatina, etc.) los que, en algunos casos, se usan como drogas medicinales o estimulantes pero fácilmente pueden llegar a ser tóxicos para los animales y el hombre (Rueda, 2002).

Existen variedades de crecimiento determinado y otras de crecimiento indeterminado. Los tipos determinados producen flores en casi cada internodo hasta que se formen las flores finales. El crecimiento de la planta cesa en este instante. Los tomates determinados tienen habitualmente una apariencia arbustiva y, por tanto, a menudo se les refiere como ‘tomates de arbusto’. Los tipos indeterminados continúan creciendo casi indefinidamente y necesitan apoyo con estacas y poda. Producen flores cada tercer internodo. La producción de frutos es regular y puede escalonarse sobre un período, siendo general elevada. Generalmente necesitan un soporte (caña o palo) para poder realizar fácilmente las labores y mantener los frutos por encima del suelo (Rodríguez *et al.*, 1997).

La planta de tomate presenta un sistema radicular con una raíz principal que crece aproximadamente a 60 cm de profundidad, aunque puede alcanzar hasta 1.5 m, el tallo es erguido durante los primeros estadios de desarrollo, pero pronto se tuerce a consecuencia del peso. Las hojas se insertan sobre los diversos nudos en forma alterna. En el caso de las flores se presentan formando inflorescencias pudiendo llegar a tener hasta 50 flores por inflorescencia. El fruto es una baya de color amarillo, rosado o rojo, su forma es redondeada, achatada o en forma de pera y su superficie lisa o asurcada,

siendo el tamaño muy variable según las variedades. Las semillas son grisáceas de forma oval, aplastadas de 3 a 5 mm de diámetro, en cuya superficie está cubierta de pequeñas vellosidades, escamas y restos de tegumento, esta conserva su poder germinativo durante 4 o más años si se le mantiene en las condiciones apropiadas, siendo las temperaturas máximas y mínimas para la germinación de 35°C y 10°C (Rodríguez *et al.*, 1997).

### 1.4.2. Importancia económica del cultivo del tomate

El tomate es una de las plantas hortícolas más populares y más ampliamente cultivadas en el mundo, tanto para su consumo en fresco como para conservas. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. En América Latina, por ejemplo, el tomate es generalmente una de las principales plantas hortícolas que se cultivan para la venta. (Comisión Europea sobre medio ambiente en los países en desarrollo, 2005).

En el caso concreto de nuestro país, según datos obtenidos del III Censo Nacional Agropecuario realizado en el 2006 por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el tomate es la tercera hortaliza más cultivada solo después del maíz suave choclo y de la cebolla colorada, con una producción total desde el año de 1999 hasta el año 2005 de 646.554 ton (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2** Valores de producción de tomate, desde el año de 1995 hasta el 2005.

	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
<b>Tomate</b>	64.035	64.767	44.709	64.551	43.006	61.426	40.421
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>	<b>Promedio</b>	
<b>Tomate</b>	68.441	52.504	70.395	72.300	645.554	58.778	

Valores en ton<sup>2</sup>

Fuente: MAG, 2006

Este es uno de los cultivos que representa una de las principales fuentes de ingreso para el pequeño agricultor ubicado en algunas ciudades del Ecuador como: Portoviejo, península de Santa Elena, Balzar, Santa Isabel, Arenillas, Santa Rosa, Salcedo, Ambato, Pelileo, Guayllabamba, Ibarra, Pimampiro (SICA, 2002). Algunos de estos lugares son poco asistidos por el gobierno, y el costo que muchas veces deben afrontar para llevar su cosecha a la venta es muy alto y el margen de ganancia es relativamente bajo; pese a esto existe un crecimiento del volumen de producción (645.554 ton) en los últimos 10 años, sin embargo, los valores de exportación proporcionados por el Banco Central del Ecuador (BCE) en el 2006, reflejan que existe reducción en la cantidad de tomates procesados desde 1995, con un volumen de exportación de 475 ton<sup>2</sup>, hasta el 2005 con una dramática reducción a 2 ton<sup>2</sup> por año (Cuadro 1.3). En cuanto a la cantidad de tomates no procesados exportados, existe un crecimiento paulatino desde 1995 con 0 ton<sup>2</sup> al 2000 con 1557 ton<sup>2</sup> (mayor valor de exportación), de ahí hasta el año 2005 con un valor de exportación de 358,4 ton<sup>2</sup> (Cuadro 1.4).

**Cuadro 1.3** Valores de exportación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Preparados o conservados).

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<b>Tomate preparados</b>	475	147	242	7	-	-	-
<b>o conservados</b>							
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>		
<b>Tomate preparados</b>	7	40	38	2	950		
<b>o conservados</b>							

Valores en ton<sup>2</sup>

Fuente: BCE, 2006

**Cuadro 1.4** Valores de exportación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates no procesados (Frescos o refrigerados).

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<b>Tomate frescos o refrigerados</b>	0	40	-	9	159.3	1557.4	2.4
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>		
<b>Tomate frescos o refrigerados</b>	0.2	0.3	135.9	358.4	2262.8		

Valores en ton<sup>2</sup>

Fuente: BCE, 2006

Con respecto a los valores de importación, según el Banco Central del Ecuador (BCE), nuestro país importa únicamente tomates procesados. Los datos muestran que en 1995 se exportó como conserva de tomate un total de 1242,7 ton<sup>2</sup>, hasta el 2005 con 2658.9 ton<sup>2</sup> (Cuadro 1.5), y como tomates enteros se importó en 1995 con 12,1 ton<sup>2</sup> al 2005 con 63 ton<sup>2</sup> (Cuadro 1.6). Estos datos revelan que la producción interna de tomate en el Ecuador, logra cubrir la demanda nacional de esta hortaliza como tomate entero fresco, más no como tomate en conservas o procesado, por lo que es necesario su importación.

**Cuadro 1.5** Valores de importación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Preparado o en conservas).

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<b>Tomate preparados o conservados</b>	1242.7	1843.7	2746.9	2716	1990.7	2627.0	2627.0
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>		
<b>Tomate preparados o conservados</b>	3154.6	3310.7	3013.1	2658.9	29002.3		

Valores en ton<sup>2</sup>

Fuente: BCE, 2006

**Cuadro 1.6** Valores de importación en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomates procesados (Enteros o en trozos).

	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
<b>Tomate enteros o en trozos</b>	12.1	43.6	31.9	88.1	39.1	53.3	61.6
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>		
<b>Tomate enteros o en trozos</b>	88.8	88.1	93	63	662.3		

Valores en ton<sup>2</sup>

Fuente: BCE, 2006

### 1.4.3 Estado actual del tomate en el Ecuador

Según datos del tercer censo Nacional Agropecuario siendo, la provincia del Guayas con el mayor índice de producción con 37,225 ton (Cuadro 1.7); con lo cual lograron abarcar gran parte de la demanda interna del país (MAG, 2005), además existen ciudades que dirigen su producción total al mercado de exportación logrando para el 2005 un total de 2262,8 ton, (MAG, 2005). La superficie cultivada de tomate en el Ecuador para el 2005 fue de 4088 ha (Cuadro 1.8), con un volumen de producción total de 72300 ton.

**Cuadro 1.7** Estimación de la superficie, producción y rendimiento del tomate, por provincia en el Ecuador para el 2005.

Dirección de información geográfica y agropecuaria			
Estimación de la superficie, cosechada, producción y rendimiento			
Agrícola del Ecuador, año 2005			
	Tomate riñon		
	Superficie cosechada	Producción T.M	Rendimiento
	Ha		Kg/ha
Total República	4.088	72.300	17.686
Sierra	1.963	26.902	13.705
Carchi	405	7.200	18.000
Imbabura	153	1.795	11.732
Pichincha	200	2.200	11.000
Cotopaxi	52	820	15.769
Tungurahua	115	1.560	13.565
Chimborazo	223	3.315	14.865
Bolívar			
Cañar	185	1.833	9.908
Azuay	210	2.897	13.795
Loja	420	5.192	12.362
Costa	2.093	45.262	21.625
Esmeraldas	32	291	9.094
Manabí	371	6.196	16.700
Los Ríos	55	1.208	21.964
Guayas	1.635	37.225	22.768
El Oro	38	342	9.000
Oriente	9	26	2.889
Sucumbios	4	11	2.750
Napo	5	15	3.000
Orellana			
Pastaza			
Morona Santiago			
Zamora	17	55	3.235
Chinchipe			
	23	110	4.783
Galápagos			

Fuente: Direcciones Provinciales – Agencias de servicio agropecuario, 2005  
Elaborado: Consejo Consultivo de Hortalizas.

**Cuadro 1.8** Superficie cultivada de tomate en el Ecuador desde 1995 al 2005

	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
<b>Tomate</b>	6090	5691	4590	3971	4124	2989	4225
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>		
<b>Tomate</b>	4262	3581	4250	4088	47861		

Valores en Ha

**Fuente:** MAG, 2005

La tasa de rendimiento por hectárea de producción en los últimos diez años ha tenido un promedio de 13,95 ton (Cuadro 1.9), siendo la provincia del Guayas con la mayor tasa de rendimiento; estos valores pueden ser considerados bajos, pues no alcanzan a cubrir la demanda internacional, a este problema se le puede agregar el incremento de costos de producción que conjuntamente han incidido definitivamente para que la industria nacional no pueda competir con precios internacionales, que en el año 2000 se han situado entre USD 760 a USD 830 por tonelada (SICA, 2002). Hace aproximadamente cinco años se producía un volumen considerable de tomate para la industria con lo que se lograba cubrir el 50% al 60% de las necesidades de este sector. Actualmente se importa la totalidad de los requerimientos industriales, siendo Chile el principal exportador (MAG, 2005).

**Cuadro 1.9** Valores de rendimiento en el Ecuador desde 1995 al 2005, de tomate.

	<b>1995</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
<b>Tomate</b>	10.51	11.38	9.74	16.26	10.43	20.55	9.57
	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Promedio</b>		
<b>Tomate</b>	16.06	14.66	16.56	17.69	13.95		

Valores en ton<sup>2</sup>

**Fuente:** MAG, 2005

Hasta el año de 1993 (excepto en 1992) los mercados más representativos para el tomate ecuatoriano fueron Alemania (93.5% en 1991 y 42.8% en 1993), Estados

Unidos (84.7% en 1990) y Canadá (45.2% en 1993). Los datos más recientes obtenidos para el año 2004, colocan como principales países de destino a Colombia con el 86.3% de la producción, a las antillas Holandesas con 12.8% y a los Estados Unidos con el 0.9% (BCE, 2004).

#### **1.4.4 Principales enfermedades virales que atacan al cultivo del tomate**

Las enfermedades que causan mayores pérdidas en el cultivo de tomate son las causadas por los virus. Estos, solo pueden multiplicarse en el interior de las células vivas hospedantes utilizando sus mecanismos de replicación, transcripción y traducción a proteínas (Pecaut, 1965). Por este motivo no es posible utilizar métodos directos por medios químicos, pues los productos que interfieren en la replicación del virus también lo hacen con la célula huésped. Tampoco se dispone de agentes que permitan bloquear la adsorción y penetración del virus dentro de la célula vegetal. Esta diferencia frente a enfermedades causadas por hongos, bacterias, o plagas, en las que se pueden emplear productos químicos más o menos efectivos, explica la importancia de las enfermedades víricas en tomate (Rodríguez *et al.*, 1997).

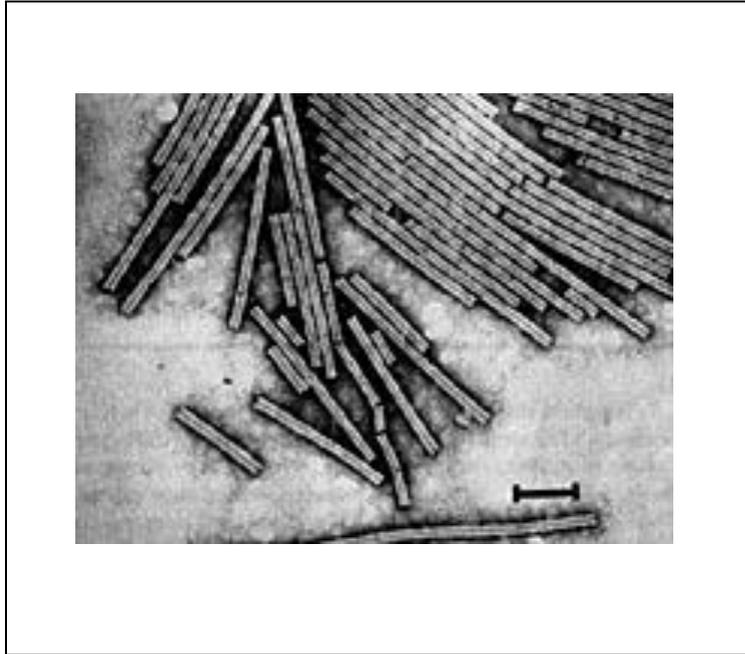
En el tomate, la producción o la calidad del fruto se ve mermada en el ámbito mundial por varios virus como el Y de la patata (PVY, potato virus Y), virus que puede ser bastante agresivo en tomates cultivados bajo invernadero. Los principales síntomas que se presentan en las hojas son la presencia de necrosis en las nerviaciones, torciones y curvatura en los pecíolos, aparenta una marchitez temprana, estrías púrpuras que pueden aparecer en el tallo (Rodríguez *et al.*, 1997). Este virus puede ser transmitido por medios mecánicos, aunque su transmisión más frecuente en el campo la realizan los áfidos (Infoagro, 2003). Otro virus que ataca al tomate es el mosaico del pepino (CMV, cucumber mosaic virus), es uno de los virus que más plantas huéspedes posee, se han señalado más de 25 familias, entre las cuales se encuentran las solanáceas y las musáceas, el virus del pepino es fácilmente identificable porque da un síntoma conocido como “cordones de zapatos” (Shoestring), o enfermedad de las hojas filiformes, por la tendencia de las plantas infectadas a producir hojas cada vez más estrechas y filiformes (Rodríguez *et al.*, 1997). Adicionalmente, el CMV produce un mosaico fuerte, aborto de flores y crecimiento reducido (Valiente, 2003). Otro virus importante

es el virus bronceado del tomate (TSWV, tomato spotted wilt virus), cuyo principal vector es la Trips occidental (*Frankliniella. occidentalis*). Entre sus principales síntomas encontramos el apareamiento de puntos o manchas necróticas que a veces afectan a los peciolos y tallos, reducción de crecimiento de la planta, los frutos maduros presentan áreas redondeadas de color amarillo que contrasta con el fondo rojo (Rodríguez *et al.*, 1997). Finalmente, el Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV Tomato Yellow Leaf Curl Virus), el cual es transmitido por la mosca blanca (*Hemisia tabaci*) y por la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Bayer, 2005). Los síntomas más comunes del TYLCV es el tamaño reducido de los folíolos, a veces con amarillamiento intenso, reducción de crecimiento y curvatura de los folíolos hacia arriba.

Los controles comunes para evitar estos tipos de virosis principalmente se ha enfocado en la reducción y eliminación de las fuentes principales del virus como lo es limitando la propagación de los insectos. Además es conocido que el virus puede vivir en las partes secas de la planta por casi 50 años, en consecuencia requiere de eliminación de las plantas huéspedes, destrucción de las plantas atacadas, control de áfidos y desinfección de útiles de trabajo (Pfleger *et al.*, 1991; Jacques, 2002), pese a esto no se ha logrado un control eficiente para evitar pérdidas en los cultivos, por lo que se recomienda como control efectivo de estas enfermedades, el uso de variedades resistentes certificadas que aseguren un alto rendimiento en la producción final (Rodríguez *et al.*, 1997).

### **1.5 Virus del Mosaico de tomate (ToMV)**

El virus del mosaico del tomate ToMV (Tomato mosaic virus) (Fig 1.1) es morfológicamente similar al Virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus- TMV) por lo que se le ha considerado durante mucho tiempo una cepa del TMV denominándolo TMV cepa tomate (Valiente, 2003). Pertenece a la familia de los *Tobamovirus*, su estructura genómica posee una sola cadena de RNA de sentido positivo, empaquetados por proteínas de cápside (CP), (Lanfermeijer *et al.* 2003).



**Figura 1.1** Fotografía tomada en un microscopio electrónico de una muestra de raíz contaminada con el virus del mosaico del tomate. La varilla del virus mide 200 nm. Pflieger, 1991

El virus del mosaico del tomate presenta como síntomas (Fig 1.2): un mosaico verde oscuro o amarillento de las hojas superiores. Las deformaciones con mosaico suelen ser de rozamiento, curvatura, o acampanado de las hojas (Fernández, 1969). Frutos con manchas blancas, que no siempre están presentes. Reducción del fruto y distorsión (Pflieger *et al.*, 1991). Deformaciones de las hojas sin mosaico, “hoja de helecho”. Necrosis interna de los frutos, en ciertas condiciones especiales (Rodríguez, *et al.* 1996; Dax *et al.*, 1998).



**Figura 1.2.** Principales síntomas del virus del mosaico del tomate. Green y Wang, g2001.

Los tobamovirus pueden penetrar pasivamente a la planta a través de células dañadas por heridas causadas por daños físicos debidos al medio ambiente o por la acción de vectores como insectos, ácaros, nemátodos y ciertos hongos habitantes del suelo. En el citoplasma, el virus RNA se desensambla, replica, traduce sus mensajeros a proteínas y se moviliza local y sistémicamente. Para cumplir con estos procesos, el virus utiliza energía y proteínas de la célula hospedera. Es importante nombrar la gran variación genética del virus debida a mutaciones, recombinaciones y a la adquisición de genomas adicionales. Estas características les otorga la capacidad de modificar los genes *avr* para evadir las barreras de defensa de las plantas hospederas (Stange, 2006). La interacción de los genes *avr* se puede explicar por la teoría del gen-a-gen, que predice que para cada uno de los genes de avirulencia (*Avr*) de un patógeno dado debe existir en su hospedador un gen de resistencia (*R*) complementario responsable del reconocimiento del elícitor (producto del gen *Avr*), y por consiguiente, de la inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR) en la planta hospedadora (Stange, 2006).

Cada etapa del ciclo viral se generan distintas interacciones entre la planta hospedera y el virus. Si la planta desconoce la partícula viral, se establece una interacción compatible entre la planta hospedera y el virus, siendo estas interacciones favorables para el virus, en la cual el patógeno logra infectar y enfermar a una planta;

esto puede ocurrir por varias razones tales como: condiciones ambientales favorables, defensas preformadas de la planta inadecuadas, falla al detectar el patógeno, e incluso si las respuestas de defensa activadas son inefectivas. Por el contrario si la planta reconoce la partícula viral, se establece una interacción incompatible, desfavorable para el virus, en este caso no existe enfermedad porque se da un fenómeno de resistencia de la planta. Estos mecanismos de resistencia pueden ocurrir por una resistencia de tipo “no hospedante”, donde la especie vegetal atacada no le brinda al patógeno las condiciones necesarias para completar su ciclo de vida, o posee barreras estructurales preformadas, o sintetiza compuestos tóxicos. Otro mecanismo de defensa de la planta es el de mantener la infección confinada, desencadenando respuestas de defensa que pueden limitar el ataque únicamente al sitio inicial de la infección (Green y Wang, 2001), y finalmente puede ocurrir que las condiciones medioambientales inestables que provocan la muerte del patógeno antes de poder “acomodarse” al nuevo medio (Hammond y Jones, 2000).

### **1.5.1 Mecanismos de replicación y traducción viral del ToMV**

Los virus RNA de hebra simple y positiva, como es el caso del TMV, poseen su propia RNA polimerasa y RNA dependiente (*RpRd*). Sin embargo, requieren de factores del hospedero para establecer el complejo de replicación. Este proceso comienza con la copia de la hebra (+) en una hebra (-) y complementaria. La hebra (+) es utilizada para la traducción, replicación y la síntesis de nuevas hebras (+) que formarán parte de los nuevos viriones. La traducción y replicación del mismo molde (*template*) es un proceso en el cual los ribosomas y la actividad de la *RpRd* deben ser regulados y controlados (Barry y Millar, 2002). De esa manera se pueden tener acceso a la maquinaria de traducción del hospedero, reubicar la *RpRd* y traducir eficientemente sus proteínas (Stange, 2006).

Producto de la traducción se obtienen las proteínas estructurales como la proteína de la cápside, replicasa, proteínas de movimiento y otras proteínas virales específicas. Durante la replicación se producen múltiples copias del mismo genoma viral para lograr infectar sistémicamente la planta hospedera. Durante una reacción

compatible, la capacidad que tiene el virus de invadir la planta radica en la formación de heterocomplejos entre proteínas virales y del hospedero. (Stange, 2006).

### **1.5.2 Mecanismo de transporte del ToMV en la célula**

El movimiento célula a célula es un evento temprano en el proceso infeccioso, ocurre en 4 y 5 horas (Fannin y Shaw, 1987; Derrick *et al.*, 1992). En una primera etapa, las proteínas de movimiento se unen al genoma viral y lo transportan de célula a célula. Esto ocurre a través de los plasmodesmos, desde células epidermales a células del mesófilo, hasta llegar a los haces vasculares. Los factores del hospedero asociados al ciclo infeccioso de los virus se han identificado por mutagénesis. Estos actúan preferentemente sobre el movimiento célula a célula y el movimiento sistémico (Stange, 2006).

Por otro lado, existen evidencias que involucran el citoesqueleto y sus componentes en el movimiento viral, facilitando el transporte de los virus a través de los plasmodesmos. Muchas proteínas de movimiento viral son destinadas a los plasmodesmos a donde llegan vía retículo endoplásmico. Posteriormente se asocia con este en estadios tempranos de la infección. Los filamentos de actina/miosina regularían el flujo de las proteínas virales por el retículo endoplasmático (RE) según lo evidencia Boevink y Oparka (2005).

Además, los virus pueden aumentar diez veces el límite de exclusión (diámetro) de los plasmodesmos, lo cual facilita el paso y diseminación de los virus (Hammond y Jones, 2000). Adicionalmente es imposible detectar las proteínas de movimiento (PM) del TMV a seis células de distancia del sitio de infección, lo que indica que las proteínas de movimiento en la región central de los plasmodesmos se encuentran inactivas. Se ha demostrado que la fosforilación de la PM afectaría su actividad, siendo esta fosforilada por una quinasa putativa de los plasmodesmos que se encuentra asociada a la pared celular (Stange, 2006)

El virus llega al sistema vascular desde las células acompañantes teniendo acceso directo al floema. Análisis de mutantes de TMV y *Tobacco etch virus* (TEV)

sugieren que la proteína de la cápside (PC) es esencial para atravesar los elementos cribosos y desarrollar una infección sistemática (Stange, 2006) La proteína de la cápside de los virus TMV se acumula en el cloroplasto y se asocia con la membrana de los tilacoides produciendo malformaciones en la ultraestructura del cloroplasto. Además, se ha descrito que los virus TMV se asocian con proteínas del fotosistema II, lo cual causa la degradación de los pigmentos con la concomitante aparición de síntomas cloróticos en las hojas infectadas, según lo descrito por Dawson (1998) y Lehto (2003).

Se han realizado varios estudios para tratar de encontrar mecanismos de defensa de las plantas al virus como lo es el silenciamiento del RNA viral identificando el duplex del RNA formado entre el RNA viral hebra positiva (sentido) y negativa (antisentido) (Hamilton y Baulcombe, 1999; Stange, 2006). Según Li y Ding (2001), este mecanismo ha sido utilizado como estrategia para combatir las infecciones virales en las plantas. Sin embargo, los virus han podido coevolucionar al poseer proteínas supresoras del silenciamiento de las plantas.

### **1.5.3 Mecanismo del ToMV para romper la resistencia del gen *tm-2***

#### **1.5.3.1 Genes de resistencia al virus del mosaico del tomate**

Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa que se basa en la teoría del gen por gen descrita por Flor (1971). Este modelo se define por la expresión de un gen de resistencia (*R*) en la planta, el cual puede unir directa o indirectamente al producto del gen de avirulencia (*avr*) del patógeno. En este contexto, las proteínas *R* actúan como receptor y las proteínas elicitoras AVR como ligando (Stange, 2006).

Staskawicz (1995) y Heath (2000) mencionan en sus investigaciones que existe una reacción incompatible en la formación del complejo receptor-ligando que se inicia con una cascada de señales de transducción, las que finalmente desencadenan la respuesta de hipersensibilidad (HR). La respuesta de hipersensibilidades es una reacción local y se caracteriza por una muerte celular programada en el sitio de la infección. Durante el desarrollo de la reacción de la respuesta hipersensitiva, se logra producir especies químicas oxidantes, se sintetiza callosa y lignina, aumentan los niveles de

ácido salicílico y las proteínas relacionadas con patogénesis son producidas. De este modo la planta limita el movimiento del patógeno. (Stange, 2006)

La infección causada por el virus del mosaico del tomate es controlada por tres genes de resistencia: Tm-1, Tm-2 y su alelo Tm2<sup>2</sup> (Ohmori *et al.*, 1998; Meshi *et al.*, 1989). La resistencia de estos tres genes (Tm-1, Tm-2, Tm2<sup>2</sup>) ha sido identificada en cruzamientos de líneas de tomate silvestres y cultivadas, los cuales han sido utilizados para prevenir el ataque del virus y prevenir las pérdidas a causa de este (Pelham, 1966). Estos tres genes pueden inhibir la síntesis del RNA viral en los protoplastos aislados así como en plantas intactas, posiblemente mediante la intervención de la ADN replicasa (Motoyoshi y Oshima, 1977; Watanabe *et al.*, 1987; Meshi *et al.*, 1988). La ausencia o presencia de los genes de resistencia puede deberse a defectos en las señales de transmisión en el mecanismo de traducción (Landfermeijer *et al.*, 2003). Toda la resistencia de las variedades de tomates actuales ha sido heredada de:

- Una tolerancia debida a *Lycopersicum hirsutum*, una especie silvestre de *Lycopersicon esculentum*, y controlada por el gen Tm-1 (Holmes, 1957). Las plantas tolerantes no son afectadas por las razas más comunes del virus, aunque sí son contaminadas y se multiplican en ella, pero lentamente en relación a las sensibles (Krush *et al.*, 1964; Pelham *et al.*, 1966; Schoroeder *et al.*, 1967; Hall *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1992).
  
- Una hipersensibilidad debida a *Lycopersicon peruvianum* y controlada por dos clases de genes el Tm-2 y Tm-2<sup>2</sup>, los cuales son alélicos (Ohmori *et al.*, 1995). Las plantas hipersensibles permanecen libres del virus después de inoculadas y sólo muestran pequeñas lesiones necróticas en el punto de inoculación. (Krush *et al.*, 1964; Pelham *et al.*, 1966; Schoroeder *et al.*, 1967; Hall *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1992; Ohmori *et al.*, 1995)

El gen Tm-1 está ubicado en el brazo corto del cromosoma 2 (Tanksley *et al.*, 1992), la sustitución de dos bases y la posibilidad de cambios en los aminoácidos, causaría una exitosa multiplicación de las cadenas del virus TMV en tomates que contienen el gen Tm-1 (Meshi *et al.*, 1988). Según lo citado por Fraser (1980) en el caso

del gen Tm-1, la inhibición de la multiplicación del virus es más efectiva en líneas homocigotas (Tm-1/Tm-1) que en las líneas heterocigotas (Tm-1/+).

### 1.5.3.2 Gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate

El gen Tm-2 y sus alelos confieren resistencia al virus del mosaico de tomate (Sobir *et al.*, 2000) y se han observado que tienen respuesta de hipersensibilidad a la infección con ToMV (Hall, 1980). El tamaño del gen es de 2821 pb, es alelico, poseen alelos dominantes, localizado en una región heterocromática cercana al centromero en el brazo largo del cromosoma 9. (Landfermeijer *et al.*, 2003; Krush *et al.*, 1964; Pelham *et al.*, 1966; Schoroeder *et al.*, 1967; Hall *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1992; Ohmori *et al.*, 1995; Pecaute 1965)

Los fenotipos de resistencia a ToMV se expresan por los genes Tm-2 y Tm-2<sup>2</sup> que son similares pero que pueden ser distinguidos por diferentes respuestas a las cadenas del virus ToMV (Pelham 1972). Esto sugiere que la resistencia es expresada como resultado de la inhibición en la codificación del virus al pasar de una célula a otra (Nishiguchi y Motoyoshi 1987; Meshi *et al.*, 1988). Por otro lado las plantas que llevan los genes Tm-2 o Tm-2<sup>2</sup> muestran cierta respuesta de hipersensibilidad a la infección al ToMV, especialmente en plantas de tomate heterocigotas (Tm-2/+ y Tm-2<sup>2</sup>/+), o cuando las plantas infectadas son guardadas a elevadas temperaturas (Hall, 1980; Pelham, 1966). Esto hace que cualquiera de las dos inhibiciones que exista en el momento que el virus pasa de una célula a otra y la inducción a la respuesta de hipersensibilidad en una infección del ToMV este controlada por estos genes o por otros que están ligados al locus Tm-2 que controla estas funciones (Rodríguez *et al.*, 1996).

Sin embargo existen pocos reportes donde los aislados del ToMV hayan vencido la resistencia del Tm-2 y Tm-2<sup>2</sup> (Rast, 1975); y la ruptura de estos genes resulta en un severo atrofiamiento y distorsión de las plantas afectadas, las cuales pueden ser fácilmente detectadas en las poblaciones de tomate tempranamente, por lo que las plantas afectadas pueden ser removidas antes que causen daño al resto de la población. Estos factores asociados con la resistencia al ToMV puede ser una de las razones del porque estos genes son altamente efectivos en cultivos bajo invernadero (Weber *et al.*,

1993). Es conocido que la resistencia dada por el gen Tm-2 puede ser rota mediante una preinoculación con la ayuda de un virus extra, como es el caso del Potato virus Y (PVY), que complementa al virus ToMV en el movimiento célula célula (Meshi et al., 1989). Los casos en los que se puede vencer la resistencia del gen Tm-2, resulta de una mutación de los aminoácidos codificados en la proteína en 30 –Kd del virus ToMV; por lo que se presume que los productos del gen Tm-2 interactúa directa o indirectamente con el movimiento de las proteínas (Meshi *et al.*, 1989).

Para explicar mecanismo de resistencia del Tm-2 existen dos posibilidades; una de ellas es la resistencia putativa que puede ser una forma alterada de un factor del hospedero, el cual es normalmente requerido por el virus para el movimiento de célula a célula. La interacción molecular entre este factor del hospedero y la proteína en 30 Kd, puede ser alterada, resultando en la un defecto en el movimiento célula a célula. Una interacción productiva puede ser restaurada mediante una mutación en la proteína en 30 Kd. La otra posibilidad es que el factor de resistencia puede no estar relacionado con el transporte normal y puede ser únicamente sintetizado para inhibir la función de tipo silvestre de la proteína en 30 Kd. (Meshi *et al.*, 1989)

Cirulli (1977) explica que la expresión de la resistencia en los genes Tm-2 y el gen N (gen de resistencia) en las plantas es dependiente de las condiciones de temperatura. Usualmente las temperaturas más altas que las normales, hacen que el virus se extienda sistemáticamente sin tomar en cuenta la presencia del gen Tm-2 y el gen N, incluso algunas veces causa necrosis sistemática en respuesta a la infección. Pero las plantas que manifiestan cierto tipo de necrosis, probablemente se deba a que el virus venció el impedimento del movimiento entre célula a célula o lo rompió parcialmente, pues puede existir bajos niveles de multiplicación del virus como resultado de un efecto secundario de la necrogénesis, así como es el caso del gen N en el tabaco (Moser *et al.*, 1988). Cabe recalcar que los estudios realizados con respecto a este gen, muestra que la resistencia conferida es expresada únicamente en plantas enteras o en discos de hojas, más no en protoplastos aislados (Meshi *et al.*, 1989).

La habilidad del virus del mosaico del tomate para romper la resistencia del gen Tm-2, radica en la sustitución de dos aminoácidos en la proteína 30Kd (Cys 68 -

Phe y Glu 133- Lys) (Meshi *et al.*, 1988). Algunos estudios hechos previamente por Saito (1988), revelan que existen dos regiones bien conservadas en las cadenas del virus TMV, en medio de la porción de proteínas 30 Kd, lo cual es de gran importancia en la función de movimiento de célula a célula. Tal es el caso de la mutación causada por la sensibilidad a la temperatura que ha sido encontrada en una de estas dos regiones que se encuentran bien conservadas, según lo citado por Ohno (1983).

#### **1.5.4 Transmisión y control de la virosis**

El ToMV es fácilmente transmitido por inoculación mecánica en el manejo agrícola. Se conserva exteriormente en la semilla, o bajo los tegumentos y las plantas jóvenes pueden ser contaminadas al nacer y entrar en contacto con los tegumentos. Igualmente este virus se puede conservar en restos vegetales y en el suelo, y mantenerse viable muchos meses en ropas, útiles de labranza, y en la infraestructura de los invernaderos, desde donde contaminan fácilmente a las plantas (Rodríguez *et al.*, 1996). Este virus puede ser transmitido, también por algunos insectos, pequeños mamíferos y pájaros. El ToMV puede permanecer en la planta bajo condiciones adversas y suelos secos por casi dos años, en las raíces por casi veinte y dos meses y permanecer en las estructuras de los invernaderos por largos periodos (AVRDC, 2004).

Una medida efectiva de control radica en desinfectar los instrumentos de trabajo, especialmente los que se utiliza en las plantaciones, se aconseja colocarlos en agua hirviendo por cinco minutos y posteriormente lavarlos con jabón y una solución de detergente (Pfleger *et al.*, 1991; Jacques, 2002). Otro método utilizado para la desinfección es el uso de fosfato trisódico disuelto en agua, aproximadamente 3 Kg en 100 litros. El uso de blanqueadores desinfectantes en los invernaderos no son efectivos en la desinfección (Jacques, 2002).

Con respecto a las semillas, se deben descartar las que posean ciertas distorsiones en las características normales de una semilla común, al igual las plantas que han sido removidas deben ser quitadas y al igual que en los casos anteriores, los trabajadores que las manipulan deben desinfectar sus manos después de la labor (Pfleger

*et al.*, 1991). Las semillas también pueden ser desinfectadas con fosfato trisódico disuelto en agua, aproximadamente 90 g en un litro o al 15% por 20 minutos, uno o dos días antes de sembrarlas (Jacques, 2002; AVRDC, 2004).

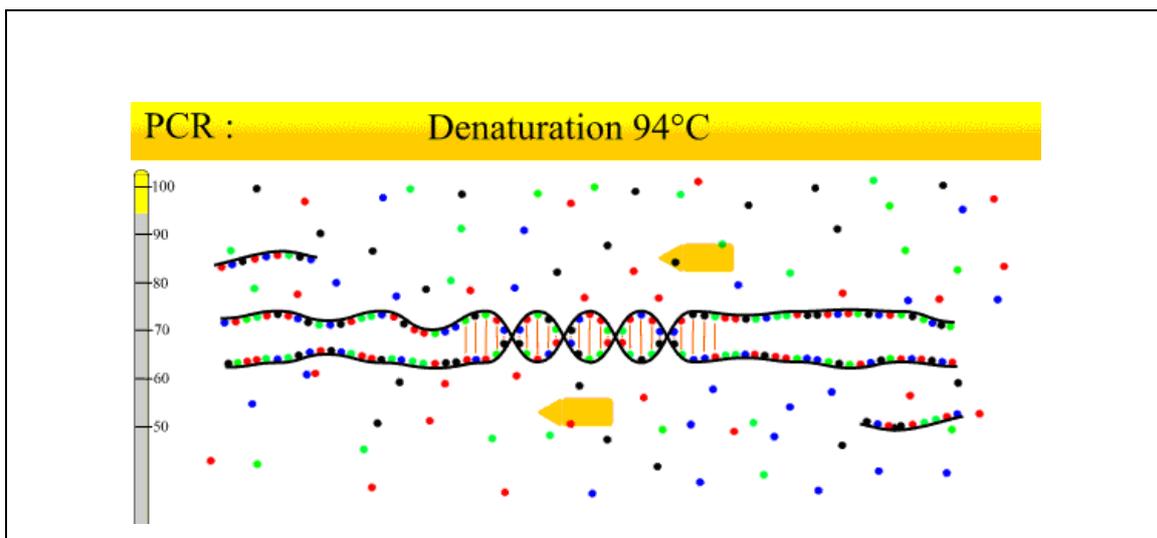
Para el caso del control en las plantaciones, es importante que se inspeccione con periodicidad el estado global de esta. Cuando se remueve una planta contaminada, también es necesario remover la planta de a lado, la razón para esto es que casi en las mayoría de veces al remover una planta enferma, es imposible no contaminar las que están a su alrededor. Otro aspecto importante para evitar la propagación del virus, es evitar sembrar otras plantas en los lugares donde fueron quitadas las anteriores plantas contaminadas, las raíces de estas pueden dejar residuos del virus en el suelo en que fueron cultivadas; para lo cual es necesario que se esterilice el suelo con vapor caliente, antes de volver a sembrar. Este procedimiento requiere que previamente se tome grandes cantidades de materia orgánica del suelo, la que será calentada a una temperatura de 200°F por 40 minutos en un lugar cerrado. A estas temperaturas se pueden eliminar incluso, hongos, insectos y nematodos (Pfleger *et al.*, 1991). Se recomienda hacer un mínimo de dos años de rotación con otras solanáceas, como el pimiento, papa, tabaco (AVRDC, 2004).

## **1.6 Técnicas Moleculares**

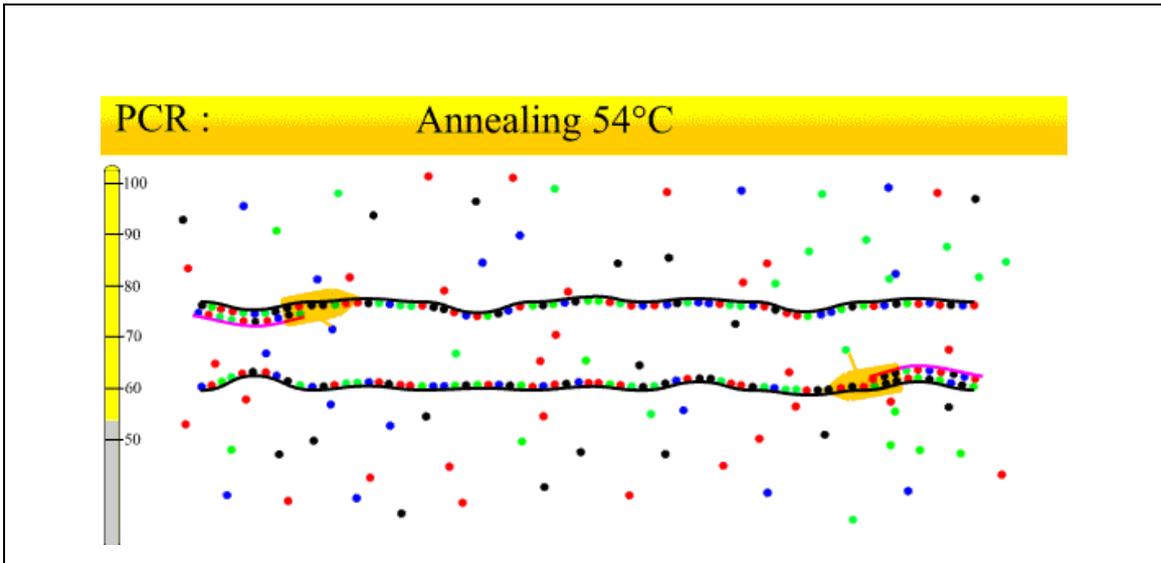
### **1.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR que es utilizada para la [síntesis](#) "in Vitro" de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de [ADN](#) ya no es un problema en los [procedimientos](#) de Biología Molecular ni en los [procedimientos](#) de [diagnóstico](#) basados en el estudio de ADN (Mas *et al.*, 2001). Esta técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la [síntesis](#) de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena.

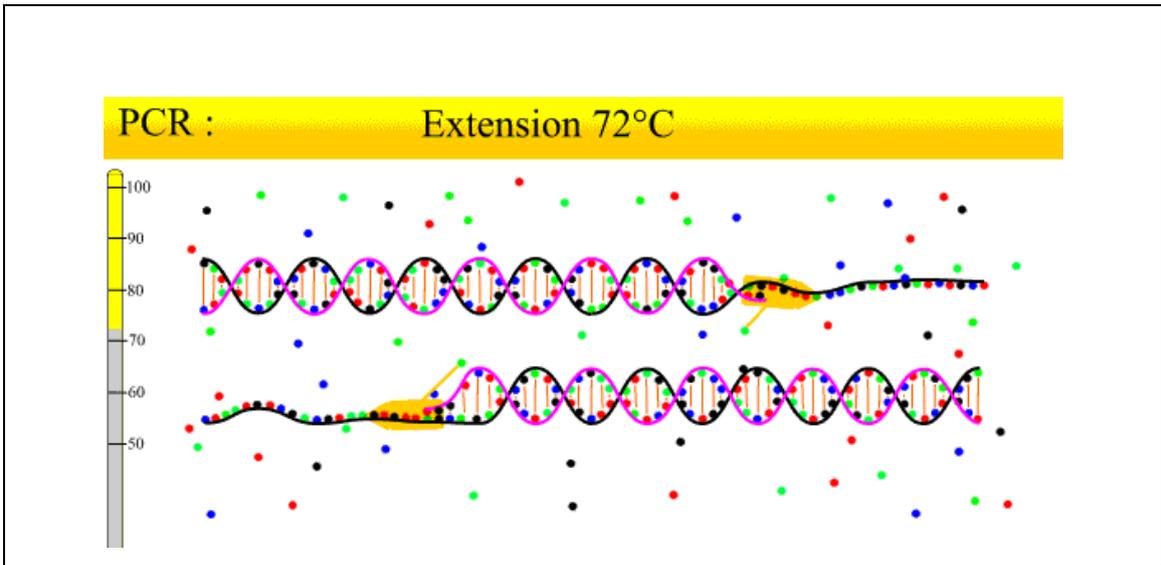
La reacción en Cadena de la Polimerasa está basada en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: el primero consta de la desnaturalización del ADN doble cadena (Figura 1.3), seguido por la hibridación de los iniciadores (Figura 1.4) a la zona 3' específica de cada una de las hebras y finalmente con la extensión del cebador (Figura 1.5) por actuación de la ADN polimerasa (Ferreira y Grattapaglia, 1995). En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la [temperatura](#) (50-65° C). Y finalmente en la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la [dirección](#) 5'→ 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Ferreira y Grattapaglia, 1995).



**Figura 1.3** Esquema de la etapa de desnaturación de la PCR. Vierstraete (1999).



**Figura 1.4** Esquema de la etapa de annealing de la PCR. Vierstraete (1999).



**Figura 1.5** Esquema de la etapa de extensión de la PCR. Vierstraete (1999).

El número de ciclos de amplificación necesario para producir una banda visible en un gel de agarosa depende del número de copias de DNA templado presente al inicio de la reacción y la eficiencia de la extensión y amplificación de los primers. La reacción llega a un punto limitante, en donde los productos amplificados específicos suelen ser máximos. Este es el caso generalmente después de los 30 ciclos en PCR que contiene  $10^5$  copias de secuencia blanco y Taq DNA polimerasa con una eficiencia del 70% (Sambrook y Ruseell, 2001).

Para la amplificación de un fragmento de ADN específico, se usan los denominados iniciadores o primers. Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar. La ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN desde 3' en cada primer (Surzycki, 1999). Adicionalmente se utilizan los trifosfatos deoxynucleotidos (dNTPs), a partir de los cuales la ADN polimerasa puede construir el nuevo ADN, la solución tampón la cual es óptima para la actividad y estabilidad de la ADN polimerasa, un catión divalente como los iones magnesio o manganesio, que evitan errores durante la síntesis del ADN (Pavlov *et al.*, 2004).

#### **a) DNA polimerasa**

Es la enzima que cataliza la síntesis del DNA, aislada de dos clases de organismos: termófilas e hipertermófilas de los reinos *Eubacteria*, *Archeobacteria* y termófilas del dominio *Archea*. La enzima más utilizada y exitosa es la Taq Polimerasa obtenida del *Thermus aquaticus*, un organismo de la familia termófila *Archea* (Surzycki, 1999).

La Taq polimerasa tiene una actividad específica de aproximadamente 800000 unidades/mg de proteína, con una eficiencia de extensión de alrededor de 70% (Sambrook y Ruseell, 2001) y una vida media de 30 min a 95°C (Yap *et al.*, 1991). La cantidad recomendada de enzima para una reacción es de 1 a 5 unidades. La concentración más usada es de 2 unidades en 100 ul de reacción.

#### **b) Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)**

En la PCR se requiere de cantidades equimolares de dATP, dCTP, dTTP y dGTP. Para una concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , se recomienda concentraciones de

200 a 250  $\mu\text{M}$  de cada dNTP que permite la síntesis de 6 a 6.5  $\mu\text{g}$  de DNA en una reacción de 50  $\mu\text{l}$ . Concentraciones mayores a estas condiciones pueden ser inhibitorias, debido a que atrapan a los iones Magnesio, La mínima cantidad de cada dNTP es de 20  $\mu\text{M}$  (Sambrook y Ruseell, 2001).

### **c) $\text{MgCl}_2$**

El ión magnesio es requerido como cofactor para la DNA polimerasa. La concentración de esta puede afectar el alineamiento del primer, la especificidad del producto, formación de primer-dimer. La concentración más recomendada para la PCR va desde 1.5 mM a 2.5 mM (Surzycki, 1999).

### **d) Solución Tampón**

La solución tampón utilizada para la PCR contiene un rango de concentración que va desde los 10 a 50 mM de Tris-HCl. El Ph optimos está entre 8 y 9. La sales mas usadas son las de potasio y sodio, estas facilitan el correcto alineamiento del primer, pues ayudan al óptimo funcionamiento de la Taq polimerasa (Surzycki, 1999).

### **e) Primers**

Los primers o cebadores son pequeños oligonucleótidos, químicamente sintetizados de una de las cadenas del ADN, usualmente no poseen más de 50 pares de bases (pb) y por lo general van desde 18 a 25 pb. Poseen nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de ambos extremos del fragmento de ADN amplificado. Esta complementariedad, facilita el alineamiento de los primers al templado del ADN, para lo cual la ADN polimerasa puede unir y comenzar con la síntesis de la cadena de ADN que es complementaria al ADN del templado.

El diseño óptimo de un primer debe contener:

- De 15 a 40 nucleótidos
- Un porcentaje de guaninas y citocinas del 40 al 60%
- Temperatura de annealing de 50°C a 74°C
- Los nucleótidos del extremo 3' del primer no debe contener más de 3 a 4 bases que sean complementarias a alguna región de si mismo o a la de algún primer usado en la reacción. Pues de ser este el caso, se puede

solapar la secuencia del primer y esto reduciría la incidencia de formación de “primer-dimer”, que afectaría la eficiencia de la amplificación.

- Es preferible que en el extremo 3' del primer se tenga una guanina (G) o una citosina(C) o GC-CG, esto ayudará a una elongación eficiente en la PCR, pues asegurará que el extremo 3' hibride correctamente debido a los tres puentes de hidrógeno que sirven de enlace entre estos residuos.

### **f) Temperatura de fusión de los primers(T<sub>m</sub>)**

La longitud de los primers y su temperatura de melting (T<sub>m</sub>) depende de varias consideraciones; la temperatura de meeting (T<sub>m</sub>) de los primers es la temperatura a la cual la mitad de los primers se han unido a los sitios del ADN del templado. En el caso del diseño de los primer de pocas pares de bases pueden resultar en una amplificación no específica; en cambio cuando se utiliza los primer de mas de 40 pb, requieren de un temperatura superior a los 80°C, la cual puede afectar la función de la Taq polimerasa, pues esta se degrada con temperaturas superiores a los 70°C (Surzycki, 1999).

Cada primer debe tener una temperatura de melting similar uno del otro, en caso contrario la amplificación será menos eficiente o incluso puede no funcionar debido a que el primer con la temperatura de meeting más alta hibridará inespecíficamente a bajas temperaturas mientras que el oligonucleótido con la temperatura de melting más baja puede que no funcione a temperaturas altas.

Para el cálculo de la temperatura de melting se utiliza la siguiente fórmula conocida como fórmula de Wallace.

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ C$$

Dónde G = es el número de nucleótidos de guanina

C = número de nucleótidos de citosina

A = número de nucleótidos de adenina

$T$  = número de nucleótidos de timina.

Las temperaturas calculadas de esta forma son inexactas en los valores extremos, la temperatura de meeting debe ser lo suficientemente baja ( $< 70^{\circ}\text{C}$ ) para asegurar que esté totalmente desnaturalizada a  $94^{\circ}\text{C}$ . En general, productos entre 100 – 600 pares de bases se amplifican eficientemente en muchas reacciones (Krawetz *et al.*, 1989).

La degradación de los reactivos, su agotamiento, la inhibición del producto final (formación de pirofosfato), la competencia de productos no específicos por los reactivos y la competencia por la unión de los primers de productos concentrados ( $> 10 \text{ nM}$ ) re-hibridados pueden ser la causa del llamado “efecto meseta”, que es la atenuación en grado exponencial de la acumulación de producto en las últimas fases de la PCR cuando el producto alcanza  $0.3\text{-}1.0 \text{ nM}^{15}$  (Sambrook y Ruseell, 2001).

### **1.6.2. Electroforesis**

La electroforesis es un método de laboratorio que utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular (Sambrook y Ruseell, 2001).

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, éstas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (polo positivo) (Pennington, 1996).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone; por otro lado, las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominado difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión. La suma de todas estas fuerzas provoca

que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzaran a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo. Para reducir la anchura de este frente se puede reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga mas resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel, el cual se encuentra constituido de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será mas lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también (Berkelman *et al.*, 1998).

### **1.6.2.1 Parámetros para una electroforesis**

#### **a) Tipo de gel**

La electroforesis puede llevarse a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida, dependiendo del tamaño del fragmento que vaya a ser separado. Los geles de poliacrilamida son efectivos para separar fragmentos pequeños de ADN (5-500 bp) pues su poder de resolución es alto. En el caso de los geles de agarosa, el cual es un polisacárido originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea; posee un poder de resolución menor al del gel de poliacrilamida, pero su rango de separación es grande. Generalmente las concentraciones de agarosa que se utiliza en los geles son típicamente de 0.5 a 2 %, poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 °C y formar un gel, semisólido al enfriarse (Sambrook y Ruseell, 2001). Los geles de agarosa están constituidos por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se utiliza usualmente para separar moléculas grandes de 50 a 20.000 bp (Berkelman *et al.*, 1998).

#### **b) Tamaño de la molécula de ADN**

El ADN migra a través de la matriz del gel a una tasa inversamente proporcional al  $\log_{10}$  del número de pares de bases, la velocidad también será proporcional a la fuerza

del campo eléctrico aplicado, mientras el tamaño del ADN no exceda el valor máximo determinado por la concentración del gel (Helling *et al.*, 1974). La concentración de agarosa determina la longitud de migración del fragmento de ADN. Existe una relación lineal entre el  $\log_{10}$  de la movilidad electroforética del ADN ( $\mu$ ) y la concentración del gel ( $\tau$ ), representada en la siguiente ecuación:

$$\text{Log } \mu = \log \mu_0 - K\tau$$

Donde:  $\mu_0$  = es la movilidad electroforética libre del DNA

$K$  = es el coeficiente de retardo, una constante que esta relacionada con las propiedades del gel y con el tamaño y forma de las moléculas (Sambrook y Ruseell., 2001).

Utilizando geles de agarosa de distintas concentraciones, es posible resolver un amplio rango de moléculas de ADN (Cuadro 1.10). El comportamiento del ADN en los geles de agarosa no se ve afectado en forma significativa por la composición del ADN ni por la temperatura a la que se corre el gel la cual es en general a la temperatura ambiente (Acquaah., 1992).

**Cuadro 1.10** Rango de separación en gel con distintas concentraciones de agarosa.

Agarosa (% p/v)	Rango de separación (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

**Fuente:** Sambrook, 2001.

### **c) Presencia de bromuro de etidio**

La presencia de bromuro de etidio en el gel puede interferir en la posterior visualización de las bandas, pues la intercalación del bromuro causa un decrecimiento en la carga negativa de la doble cadena de ADN y un incremento en su rigidez y tamaño (Sambrook y Ruseell., 2001).

### **d) Buffer de electroforesis**

La composición y cantidad del buffer de migración puede afectar a la movilidad del ADN, poca cantidad de buffer hace que la conductancia eléctrica sea mínima y el ADN migre lentamente, en el caso que la concentración del buffer es alta (10X), la conductancia eléctrica genera mucho calor, en el peor de los casos, el gel puede fundirse y el ADN se desnaturaliza (Sambrook y Ruseell, 2001). Los buffers más usados en electroforesis son el TBE (Tris-borato y EDTA), el TAE (Tris –acetato y EDTA) y el TPE (Tris –fosfato); estos suelen prepararse con soluciones concentradas y se almacenan a temperatura ambiente, cualquiera de estos tres buffers funciona bien. El buffer TBE posee una capacidad amortiguadora más elevada a la del buffer TAE (Tris –acetato y EDTA), por lo que no se aconseja utilizar TAE si la electroforesis requiere un tiempo prolongado de migración, además proporciona una migración 10% más rápida que el buffer TBE y su poder de resolución es mayor. En su mayoría, el buffer TAE ha sido empleado para electroforesis hechas con ADN de mamíferos (Sambrook y Ruseell., 2001).

### **e) Voltaje**

El voltaje es proporcional a la migración del ADN, es decir, mientras más alto sea este, es mayor la velocidad de migración del ADN, para geles de agarosa se recomienda que sea de 5 a 8 V/cm. (Sambrook y Ruseell., 2001).

Finalmente es recomendable utilizar para la visualización en gel de agarosa, un marcador de peso molecular y el buffer de carga, estos actúan como “frente” que corre más rápidamente que el mismo ADN. Cuando este ha corrido alrededor de 2/3 de la longitud del gel de agarosa se detiene la corriente eléctrica y posteriormente se lo puede visualizar en un transiluminador donde una lámpara de luz UV permite observar las bandas de ADN.

### 1.6.3 Fluorometría

Los fluorómetros ofrecen la ventaja de bajo costo y conveniencia para determinaciones cuantitativas rutinarias, como la medición de concentración de proteínas o ADN. En los fluorómetros las longitudes de onda de excitación y de emisión son dadas por los filtros de absorción o de interferencia. El tamaño pequeño de los filtros, comparado con el de los monocromadores, da lugar a un instrumento compacto (Skoog, 1995). Un fluorómetro generalmente consta de una lámpara de mercurio como fuente de excitación, un filtro primario para transmitir la longitud de onda excitacional deseada y la cubeta portamuestras. El tubo fotomultiplicador mide la emisión fluorescente. El filtro secundario, entre la muestra y el fotodetector, se elige para transmitir la fluorescencia y para absorber la radiación de excitación dispersada. Si celdas de flujo se incorporan en el compartimiento de la muestra, pueden formar parte de un sistema de instrumentación de flujo continuo, tal como en los sistemas de detección de la cromatografía líquida de alta resolución (Willar *et al.*, 1995).

Este tipo de filtros usan un arreglo de un solo rayo con un control de intensidad de la fuente para disminuir los efectos de las fluctuaciones. Una parte de la radiación de la lámpara pasa a través del sistema óptico primario y se atenúa mediante un disco de apertura de referencia y la señal de la muestra que proviene del fotodetector se aplica en un divisor electrónico de estado sólido, que se encarga de calcular el cociente muestra/referencia de señales. La lectura del medidor o el cuadrante es proporcional a la concentración. Las mediciones pueden extenderse a concentraciones extremadamente pequeñas, aumentando la sensibilidad del fotodetector o la intensidad de la fuente de radiación (Willar *et al.*, 1995).

Las mediciones de fluorescencia se hacen usualmente con referencia a algún estándar elegido arbitrariamente. El estándar se coloca en el instrumento y el circuito se balancea con la escala de lectura a algún valor previamente escogido. Sin volver a ajustar ninguno de los componentes del circuito, el estándar se reemplaza por soluciones conocidas y se registra la fluorescencia de cada una de ellas. Finalmente se mide la fluorescencia del solvente y de la celda juntos para establecer la lectura real de concentración igual a cero. Algunos fluorómetros están equipados con un circuito de ajuste a cero. Una gráfica de las lecturas de fluorescencia contra la concentración de las soluciones de referencia da lugar a una curva de calibración. Algunos estándares de

fluorescencia comúnmente utilizados son la rodamina B en etilenglicol, el sulfato ácido de quinina en sulfúrico 0.1N el triptófano en agua y el antraceno en ciclohexano o en etanol (Willar *et al.*, 1995).

#### **1.6.4 Marcadores Moleculares**

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyen significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. La revolución en este tema se produjo con el descubrimiento de los marcadores isoenzimáticos. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de la técnica se expandió a todas las especies de plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, y dispersión de especies (Díaz, 2003).

Con la llegada de las técnicas modernas de la biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos a nivel de ADN, los llamados marcadores moleculares, que en general, pueden acelerar los programas de mejoramiento genético. Por lo que se define a un marcador molecular como biomoléculas que se pueden relacionar con cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1995; Villaman, 2000).

Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades. La mayoría de los marcadores moleculares se incorporan en alguna de estas 3 categorías de técnicas que usan la hibridación o están

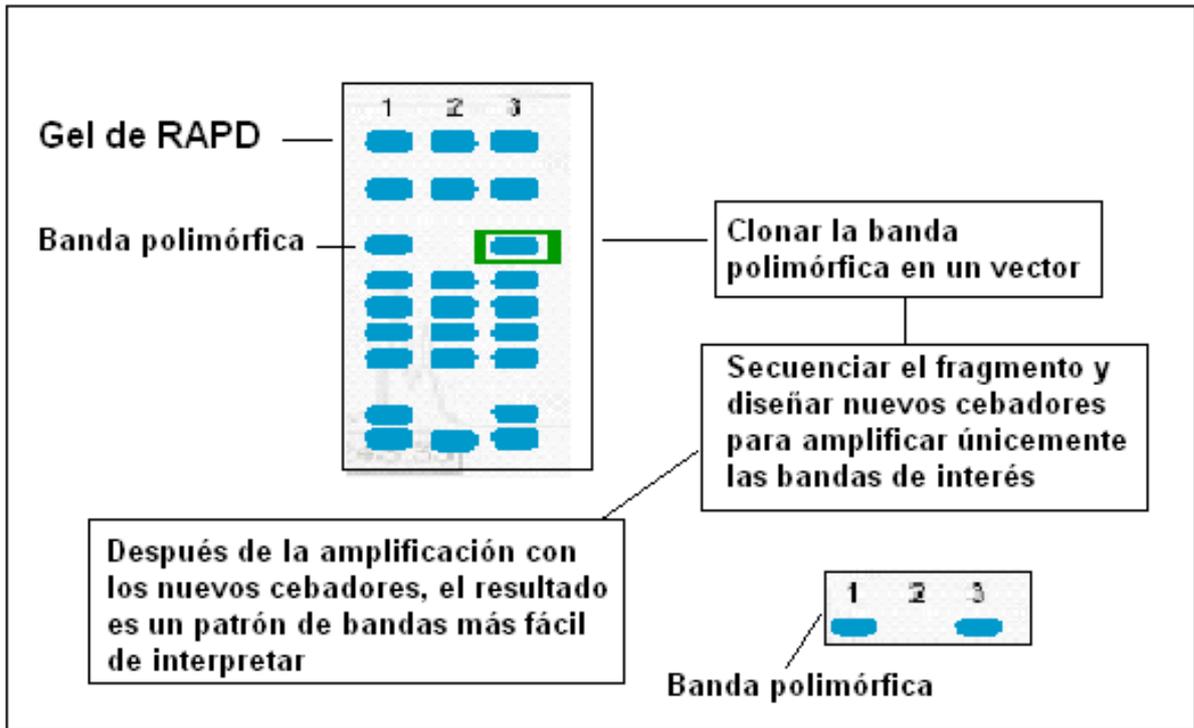
basados en la PCR (Caetano *et al.*, 1997). La primera técnica está basada en la hibridación e incluye principalmente a los RFLPs (*Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción*). Desarrollada a finales de los 70, se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que deleciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En cambio, para moléculas de ADN de mayor tamaño, como el ADN cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de ADN para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan ADN preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP (Caetano *et al.*, 1997; Díaz, 2003). La segunda técnica está basada en PCR que usan iniciadores arbitrarios o amplifican multi-locus o también conocidos como MAAP (*Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación*), término genérico acuñado en 1994 con el que se designan las técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios para generar huellas dactilares complejas. Entre estas técnicas caben destacar: los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), AP-PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios), AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados), STS (Sitios etiquetados por la secuencia) o SSLP (Polimorfismo de longitud en las secuencias discretas), SSR (Repetición de secuencias discretas) (Caetano *et al.*, 1997; Díaz, 2003). Y la última técnica, basada en PCR de secuencia específica, en las cuales un requisito necesario es el conocimiento de la secuencia de las zonas flanqueantes para la obtención de iniciadores. Dentro de esta categoría cabe mencionar los CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada), SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas) (Caetano *et al.*, 1997; Díaz, 2003).

#### 1.6.4.1 Marcadores tipo SCAR

Los SCAR (Sequence Characterized amplified region) conocidos en español como Regiones amplificadas caracterizadas por secuencia; descrita en 1993 por Paran y Michelmore, es una técnica que aprovecha los fragmentos de ADN altamente repetitivos que proporcionan las secuencias RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), para lo cual se crea primers arbitrarios que son desarrollados para identificar regiones que son polimórficas en especies de interés (Shaw *et al.*, 2004). A estos fragmentos de RAPD se clonan y secuencian para elaborar oligonucleótidos específicos. Aunque permite el desarrollo rápido de marcadores moleculares, el grado de polimorfismo obtenido es bastante bajo.

Los SCAR son considerados como fragmentos de ADN genómico localizado en un locus genéticamente definido identificado por amplificación vía PCR, con la utilización de primers específicos (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Estos marcadores aprovechan una banda que ha sido generada en un experimento de RAPD. Usan cebadores de 15 a 24 pb, diseñados a partir de los extremos de marcadores RAPD clonados. Esta técnica transforma una banda propensa a dificultades de interpretación o de reproducibilidad un marcador muy confiable (Paran y Michelmore, 1993). Pueden ser utilizados tanto como puntos físicos de referencia en el genoma, como marcadores genéticos que pueden tener secuencias repetitivas a diferencia de otros marcadores como los STS que contienen solo ADN de copia única (Paran y Michelmore, 1993).

Es necesario identificar en un gel de RAPD una banda que despierta un interés potencial, esta banda se corta y se retira del gel. El fragmento de ADN se clona en un vector y se obtiene su secuencia a partir de este se diseñan cebadores específicos (15 a 24 pb de longitud) para ese fragmento de ADN. La reamplificación del ADN patrón con los nuevos cebadores presentará un patrón de PCR nuevo y más sencillo (IPGRI, 2003). Generalmente las secuencias de los primers para amplificación de SCAR tienen un tamaño de 20 a 24 nucleótidos, en los que la mayoría de casos los 9 a 10 primeros nucleótidos son tomados de la secuencia del RAPD del que se deriva; los nueve a diez nucleótidos siguientes a las bases del RAPD son tomadas de la secuencia original (Scheef *et al.*, 2003)



**Figura 1.6.** Diagrama de procedimiento para obtener los SCAR. IPRGRI, 2003.

Los patrones en los marcadores tipo SCAR son más sencillos que el de los marcadores RAPD. Requiere de ensayos sólidos gracias al uso de cebadores largos específicos. Dentro de los marcadores tipo SCAR se presenta la herencia mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1995). La conversión de marcadores RAPD en regiones caracterizadas por su secuencia o SCAR, mediante el diseño de cebadores más largos y específicos basados en la secuencia del marcador RAPD, aumenta significamente la reproducibilidad y simplicidad de la técnica PCR preparándola para la automatización e incrementando por tanto su utilidad en mejora genética (Hernández *et al.*, 1999).

Los marcadores tipo SCAR pueden ser utilizados para una rápida amplificación en el diagnóstico de hierbas, material medicinal (Shaw *et al.*, 2004), identificación del sexo en las plantas desde etapas tempranas (Manoj *et al.*, 2000) y otras aplicaciones. Son fáciles de realizarse pues no necesitan de altas concentraciones de ADN (Kasai *et*

*al.*, 2000). Los marcadores SCAR pueden dar resultados más acertados que otros marcadores basados en PCR, además que no necesitan una subsecuente digestión con enzimas como en el caso de los AFLP (Kasai *et al.*, 2000), además resultan ser altamente estables y fácilmente reproducibles y manipulables en diferentes laboratorios a las mismas condiciones (Mingliang *et al.*, 2001; Yiping *et al.*, 2001).

En estudios previos a este trabajo realizados por Ohmori (1995), fueron reportados 13 fragmentos RAPD (random amplified polymorphic DNA) que se unieron al locus del Tm-2 y otro locus ubicado sobre los 5 cM. De los 13 marcadores RAPD, 10 se acoplaron al gen Tm-2 y los tres restantes se unieron al gen Tm-2<sup>2</sup>. Algunos de estos marcadores fueron caracterizados y algunos clonados, secuenciados y convertidos en SCAR (sequence characterized amplified region) por Motoyoshi en 1996, de los diez marcadores seleccionados solo seis fueron compatibles con el locus Tm-2.

Los marcadores RAPD o SCAR, están presentes en varias líneas de tomate, llevando uno de los alelos de Tm-2, por lo que pueden ser considerados como los marcadores más cercanos al locus Tm-2 (Ohmori *et al.*, 1995).

## **1.7 Diseño estadístico**

Esta investigación propone variables de tipo cualitativo por lo que se utilizarán dos pruebas no paramétricas debido a que el número de muestras a utilizar es pequeño y estos no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos, además se requiere convertir datos cualitativos a información útil para establecer relaciones entre las variables. Este tipo de pruebas son fáciles de usar, ya que eliminan suposiciones restrictivas sobre la constitución de los datos de la población a utilizar.

Estas pruebas nos llevarán a rechazar o aceptar la hipótesis nula de independencia entre los dos tipos de variables (amplificación del marcador molecular SCAR y amplificación por PCR del gen Tm-2) al probarlos con las 18 especies de tomate silvestres y comerciales incluidas en esta investigación. Adicionalmente se

estudiará cual es la proporción de las variedades silvestres y comerciales que amplificaron tanto con el primer para PCR como las que amplifican con el marcador SCAR y finalmente se verificará si existe algún tipo de vínculo entre la variedad y el resultado con la amplificación de los primers.

Con la ayuda de Microsoft Excel se realizarán las representaciones estadísticas en histogramas para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en esta investigación. El programa que se va a utilizar para calcular los datos estadístico, del Test de fisher y prueba de chi-cuadrado, en la presente investigación es el Statistical Package Social Sciences (SPSS), creado en el año de 1968 por Norman Nie, C. Hadlai Hull y Dale H. Bent, de la [Universidad de Chicago](#) por medio de su National Opinion Research Center.

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 Material vegetal

En el presente trabajo de investigación se utilizaran un total de 18 variedades, de las cuales 8 corresponden a variedades cultivadas (Tabla 2.1). Las 10 variedades restantes corresponden a especies silvestres (Tabla 2.2), que fueron obtenidas del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Loja.

**Tabla 2.1.** Lista de variedades comerciales utilizadas en la investigación

Nº	Nombre
1c	Shaddy Lady
2c	Astota
3c	Advantage
4c	Flora Dade
5c	BHN C4599 100 CM 150103
6c	BHN C5499 100 CM 150103
7c	Tomate don Jose F1 lote# A94253
8c	Tomate Syta F1 lote# B14109

De las variedades comerciales antes mencionadas, las cuatro primeras poseen una descripción detallada de las características en su cultivo (Tabla 2.3) y las cuatro restantes son variedades por código de la casa comercial ALASKA, de las cuales no se conoce mayor información.

**Tabla 2.2** Lista de variedades silvestres utilizadas en la investigación

Nº	Código	Especie	Procedencia
1s	31-1	<i>Solanum lycopersicon</i>	Ecuador - Napo
2s	58-10	<i>Solanum lycopersicon var. ceraciforme</i>	Ecuador- Tungurahua
3s	63-6	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí
4s	75-5	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí
5s	75-1	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí
6s	76-1	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí
7s	77-5	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Machalilla
8s	93-7	<i>Solanum lycopersicon var. ceraciforme</i>	Perú
9s	94-2	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Loja
Control +		<i>Solanum Peruvianum</i>	Ecuador

**Tabla 2.3** Descripción de las variedades comerciales: Shady lady, Astota, Advantage y Flora Dade (Casa comercial ALASKA)

<b>Variedades</b>	<b>Descripción</b>
Shady lady	Híbrido determinado alto, precoz que se adapta bien a campo abierto o invernadero, produce frutos redondos achatados de 230 a 250 g. Presenta resistencia a fusarium, verticilium, alternaria y stemphilium.
Astota	Híbrido indeterminado larga vida de mostrador, es una variedad muy productiva que se adapta bien en cultivos bajo invernadero como a campo abierto, produce racimos uniformes, frutos bien formados de 200 – 220 g. Resistente a verticilium raza1, fusarium y TMV, recomendado para la exportación.
Advantage	Posee una alta viscosidad, por lo que se la utiliza en pastas y conservas. Fruto grande, sólido y firme. Es resistente a verticilium marchito, fusarium marchito (raza1) y a la alternaria(gangrena de los tallos)
Floradade	Adaptada a climas húmedos. Su fruto de tamaño grande tiene forma aglobada y color rojo. Es un tomate de cultivo temprano, mediano a tardío, garantizado para la siembra. Resistencia a Alternaria, cladosporium. Mancha gris de la hoja, verticiloum, fusarium.

## **2.2 Cultivo en invernadero**

Una vez obtenidas las semillas de las variedades comerciales, se procedió a sembrarlas en bandejas de 162 posillos (9\*18), en dos sustratos de siembra, el primero es un sustrato de siembra y germinación (PROMIX “PGX”) a base de turba de plántulas en bandejas, cultivadas bajo condiciones de alta densidad, lo que significa que el desarrollo de las raíces es limitado por las dimensiones de las paredes de cada celda. Sus principales componentes son turba (65%-75% vol), vermiculita fina, macro nutrientes y micro nutrientes, cal y agentes humectantes. El segundo sustrato de siembra es una mezcla de compost más humus de lombriz, libre de malezas y enfermedades, enriquecido con materia orgánica y equilibrada en su composición que proporciona un crecimiento rápido y vigoroso de las plantas, se recomienda su uso en los semilleros, macetas, jardines, huertos, invernaderos.

Las plantas fueron divididas por variedades en las bandejas (Fig 2.1), con un riego de agua hecho tres veces a la semana (ANEXO A). El invernadero en el cual se adaptó las plantas tiene una altura de 1,80 m., de ancho 3 m. y de profundidad 1.25 m., dispuesto en la parte derecha del segundo piso de los laboratorios de biotecnología. Las plantas crecieron aproximadamente dos meses, tiempo al que se pudo ver el brote de cuatro a seis hojas jóvenes, material suficiente para el proceso de extracción de ADN.



**Figura 2.1** Variedades comerciales sembradas en los invernaderos del laboratorio de Biotecnología, en bandejas con sustrato.

### **2.3 Extracción de ADN**

En la primera etapa de este proceso, únicamente se extrajo ADN de una sola muestra de tomate (Variedad 2 ASTONA – variedad comercial) con los cinco protocolos propuestos, para verificar en cual de ellos se obtiene ADN de mejor calidad. Es importante mencionar que las variedades silvestres no fueron cultivadas en los invernaderos de los laboratorios de biotecnología, estas fueron donadas por la Universidad de Loja, en forma de fruto seco al que directamente se extrajo ADN.

Se realizó cuatro protocolos diferentes para la extracción de ADN; el protocolo 1 de Ferreira y Grattapaglia (1998), el protocolo 2 de Morillo (1999), el protocolo 3 modificado de Fulton (1995), protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP) y un último propuesto en el Kit de extracción DNeasy mini kit de QIAGEN (ANEXO B).

Las muestras fueron tomadas aproximadamente a los dos meses de crecimiento de la planta, cuando estas tenían entre 4 y 6 hojas jóvenes. El ADN se extrajo únicamente de hojas jóvenes sin nervio central, para facilitar el proceso de maceración de las muestras y evitar un mayor porcentaje de impurezas en el proceso de extracción.

### **2.3.1 Protocolo No. 1 de Ferreira y Grattapaglia(1998)**

El material vegetal (100 mg de tejido) se lo trituró en morteros pre-enfriados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se transfirió a un tubo eppendorf colocando 700 µl de tampón CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20mM, Tris HCL 100mM, PVP 1%) precalentado a 60°C y 2 µl de mercaptoetanol, se los mezcló bien. A continuación se dejó incubar las muestras en baño maría a 65°C, se agitó suavemente y se agregó 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en cada tubo, se centrifugó las muestras durante 5 min a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

Posteriormente se descartó el cloroformo/alcohol isoamílico remanente en contenedores adecuados. Se agregó 50 µl de CTAB al 10% (en NaCl 0.7M) y se lo agitó suavemente hasta obtener una mezcla uniforme. Se repitió los dos anteriores pasos, a continuación se colocó igual volumen de isopropanol frío (400-500 µl) a cada tubo, se invirtió los tubos varias veces y fueron dejados en refrigeración por 15 min a -20°C. Se procedió a centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 20 min, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante para no perder el precipitado de ADN y se dejó que el precipitado se seque, invirtiendo los tubos abiertos por 2 min.

Se lavó el precipitado de ADN en 1 ml de etanol al 70% por 3 min, se centrifugó las muestras a 14000 rpm durante 30 min, se procedió a eliminar con cuidado el etanol y agregar 1 ml de etanol 90%, se centrifugó las muestras a 14000 rpm durante 30 min y se eliminó el etanol y se dejó los tubos eppendorf abiertos en una centrifuga por 15 min para que el precipitado se seque.

Finalmente se disolvió el precipitado de ADN en 150 µl de TE (Tris HCL 10mM, EDTA 1mM) o agua destilada estéril, se agregó 2 µl de RNasa, se los agitó e incubo a 37° C por 1 h. y se los almacenó -20°C.

### **2.3.2 Protocolo No. 2 de Morillo (1999)**

El material vegetal (100 mg de tejido) se lo trituró en morteros pre-enfriados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se los colocó en un tubo eppendorf, a continuación se agregó nitrógeno líquido y se trituró con el pistilo.

Se procedió a añadir 500 µl. del buffer de extracción (Sorbitol 0.35M, Tris HCL 0.1M, EDTA 5mM) precalentado a 65°C, se lo agitó e incubó durante 60 min a 65°C y con agitación cada 10 min. Se adicionó 500 µl. de cloroformo, se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Se adicionó 0.8 volúmenes de isopropanol y se lo agitó, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. A continuación se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar el pellet con 500 µl. con etanol al 70%, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm y se secó el pellet dejando los tubos eppendorf abiertos en una centrifuga por 15 min y finalmente se disolvió en 100 µl de agua estéril.

### **2.3.3 Protocolo No. 3 modificado de Fulton (1995)**

El material vegetal (100 mg de tejido) se lo trituró en morteros pre-enfriados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se precalentó 18 ml de tampón CTAB (CTAB 10g, NaCl 40.1g, PVP 5 gr, EDTA 0.5M, Tris HCL 1M) a 60°C, a continuación se añadió a la muestra congelada de hoja 40 µl de mercaptoetanol, agitando suavemente.

Se procedió a incubar a 60°C durante 30 min, agitando ocasionalmente (cada 5 minutos). Se añadió 18 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24/1), se mezcló los tubos durante 30 segundos, se separó las fases centrifugando 15 minutos a 4000 rpm, se colocó el sobrenadante a un tubo estéril y se añadió 2/3 de volumen de isopropanol frío.

Cuando el pellet de ADN se hizo visible se procedió a extraerlo con una pipeta Pasteur con el extremo en forma de gancho, el pellet se pasó a un tubo nuevo con 10 a 20 ml de tampón de lavado y se dejó 20 a 30 minutos en el tampón.

A continuación se eliminó el tampón con cuidado para que no caiga el pellet y se lo secó colocando en la centrifuga con las tapas abiertas por 15 min a 8000 rpm. Se resuspendió en 1ml. de tampón TE (Tris HCL 10mM, EDTA 1mM) y se añadió 10 µl de RNasa para posteriormente incubarlo a 37° C durante 30 min, se volvió a precipitar añadiendo 500 µl de buffer de lavado (Etanol 70%, Acetato amónico 10mM) una vez que estuvo precipitado se extrajo el pellet con una pipeta pasteur y se lo dejó secar. Finalmente se resuspendió en 100 µl de buffer TE (Si no existe un buen rendimiento solo en 50 µl de buffer TE)

#### **2.3.4 Protocolo No. 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP)**

El material vegetal (100 mg de tejido) se lo trituró en morteros pre-enfriados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se tomó la muestra con 1 ml. del buffer de extracción (Sorbitol 140 mM, Tris HCL 220 mM, EDTA 22 mM, NaCl 800mM, CTAB 0.8%, Sarkosyl 1%), se añadió 0,5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24/1) y se lo trituró bien, luego se vertió el contenido del mortero en un tubo eppendorf (2ml), se lo aforó hasta un volumen de 1,5 ml con el buffer de extracción y se lo mezcló bien, a continuación se lo incubó a 55°C por 30 min se lo agitó en intervalos de 10 min. Después de este lapso se lo dejó enfriar por 5 min a temperatura ambiente, se lo centrifugó por 10 min a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante, sin tocar la interfase, a un nuevo tubo eppendorf (aprox. 800 µl.). Se añadió 1 volumen de isopropanol y se lo mezcló vigorosamente.

Se dejó en hielo por 20 min y se lo centrifugó por 3 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante. Si el pellet se encuentra de un color café o verde oscuro, se debe diluirlo con 300 µl. de agua destilada estéril y volver al paso en el que se incubó a 55°C pero solo se debe dejarlo por 10 min, y se procede a realizar los pasos siguientes de manera normal.

Se secó el pellet del DNA por 20 min en la centrifugadora, se procedió a disolver en 250 µl de buffer RTE (Trizma base 10mM, EDTA 0.1 mM), se agitó se dejó 30 min hasta que el pellet se disuelva totalmente. Finalmente se agregó 2 µl de RNAasa (10mg/ml) y se lo dejó actuar por 30 min. Se lo congeló a – 80°C.

### **2.3.5 Protocolo de extracción de ADN, DNeasy Kit (QIAGEN)**

Se molió aproximadamente 100 mg de tejido vegetal fresco en morteros preenfriados utilizando nitrógeno líquido, para el caso de las variedades comerciales sembradas en el laboratorio. Para las muestras de las variedades silvestres se procedió primeramente a moler 200 mg de fruto seco y a continuación se pesó nuevamente en tubos eppendorf preenfriados para tomar una muestra del material molido final de 100 mg.

Se añadió 400 µl del buffer AP1 y 4 µl de RNAase, se los mezcló vigorosamente en el vortex, se incubó por 10 min a 65°C en baño maría, en este paso se mezcló 3 veces en este lapso de tiempo.

Se añadió 130 µl del buffer AP2 (Acido acético), se lo agitó y se lo dejó 5 min en hielo, a continuación se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se tomó el sobrenadante del paso anterior con la micropipeta y se lo colocó en el tubo Q1 Ashredder mini spin column. Se volvió a centrifugar a 14000 rpm por 2 min. Se extrajo el sobrenadante del paso anterior mediante el uso de una micropipeta, se midió el volumen exacto extraído. Una vez hecho esto se agregó 1.5 volúmenes del buffer AP3 (hidrocloruro de guanidina) en relación a lo obtenido en el paso anterior (por ejemplo, si se obtuvo 280 µl, se debe agregar 420 µl del buffer AP3). A continuación se tomó 650 µl de la solución que se obtuvo en el paso anterior y se la colocó con la ayuda de una micropipeta en el tubo DNeasy mini spin y se centrifuga por 1 minuto a 8000 rpm.

Se descartó el líquido y se pasó la columna del DNeasy mini spin a un nuevo tubo colector de 2 ml y se colocó 500 µl del buffer AW, se centrifugó por 2 min a 14000 rpm. Se descartó el líquido y se pasó la columna del DNeasy mini spin a un

nuevo tubo eppendorf, se colocó 100 µl del buffer AE y se esperó 5 min a temperatura ambiente y una vez transcurrido ese tiempo se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Finalmente se guardó la extracción obtenida a -80°C.

## **2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

El ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X (Tris base 0.45M, Ácido bórico 0.45 M, EDTA 10mM), se hidrató la agarosa durante 10 min, se agregó 5 ul de bromuro de etidio para 100 ml de buffer TBE 1X, se dejó en agitación hasta que se disuelva bien. Finalmente se colocó la agarosa en la bandeja de electroforesis dejándola solidificar. La cámara de electroforesis se llenó con buffer TBE 1 X.

Para cargar las muestras de la extracción de ADN, se tomó 2 µl de loading buffer de carga (Sucrosa 60%, Tris Hcl 10mM, EDTA 10 mM, 0.3% Bromofenol azul) con 10 µl del ADN, se homogenizó totalmente y se lo cargo en cada uno de los posillos del gel. Al final se colocó 5 µl del marcador de 1Kb más 5 µl del High DNA mass ladder. Se cierra la cámara y conecta a la fuente de poder que debe estar programada a 120 voltios (V) y se lo dejó correr por aproximadamente 2 horas.

## **2.5 Cuantificación de ADN**

Se propuso dos métodos por los cuales se cuantificó el ADN extraído. El primero es mediante el uso de un marcador High DNA mass ladder (INVITROGEN) y el segundo por la lectura en un fluorómetro (INVITROGEN-Qubit).

### **2.5.1 Cuantificación de ADN por el marcador High DNA mass ladder**

El marcador High DNA mass ladder está compuesto por una mezcla equimolar de 6 fragmentos de ADN de 10000, 6000, 4000, 3000, 2000 y 1000 bp. Una

electroforesis de 4  $\mu$ l de High DNA mass ladder resulta en bandas que contienen 200, 120, 80, 60, 40 y 20 ng de DNA, repectivamente.

Este método de cuantificación se basa en la comparación de la intensidad de banda del producto extraído con las bandas propuestas en el marcador High DNA mass ladder de Invitrogen (ANEXO C), cada una de estas bandas posee una intensidad distinta que ayuda al proceso de comparación. Es importante determinar los  $\mu$ l de ADN que se colocan en el gel para posteriormente verificar la concentración final de la muestra de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (Cuadro 2.1), se visualizaron los valores en ng correspondientes a la intensidad de banda propuestos en el marcador High DNA Mass Ladder, para una cantidad definida en  $\mu$ l de ADN.

**Cuadro 2.1** Cantidad de ADN (ng) en cada fragmento del High DNA mass ladder.

Fragmento	2 $\mu$ l de ADN (ng)	4 $\mu$ l de ADN (ng)	8 $\mu$ l de ADN (ng)
10000 bp	100	200	400
6000 bp	60	120	240
4000 bp	40	80	160
3000 bp	30	60	120
2000 bp	20	40	80
1000 bp	10	20	40

Para la cuantificación del ADN se tomó de 5 a 6  $\mu$ l. de las muestras obtenidas en el proceso de extracción de ADN mezcladas con 2  $\mu$ l de loading buffer 10X, adicionalmente se tomó 4  $\mu$ l del high DNA mass ladder mezclados con 1  $\mu$ l de loading buffer y finalmente se las cargo en los posillos del gel de agarosa al 1 % con un volumen final de 5  $\mu$ l por posillo, en una cámara de electroforesis con buffer TBE (1X) que ayudará a la visualización.

## 2.5.2 Cuantificación de ADN mediante el uso del Fluorómetro

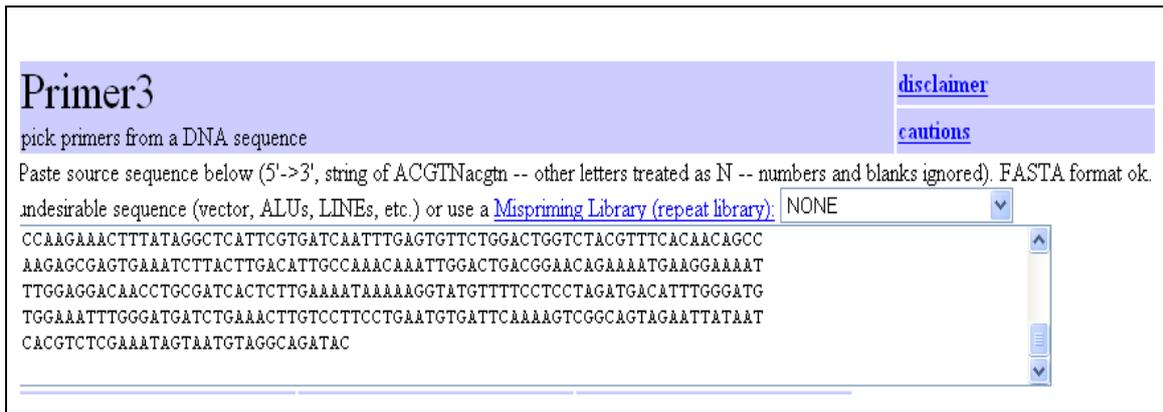
Para la cuantificación por este método es importante realizar varios procedimientos previos a la lectura, primero se debe tener una proporción entre los fluorocromos (component A ds DNA HS reagent) y el HS buffer (component B ds DNA HS buffer) de 1:199 respectivamente por muestra a cuantificar. Es decir que se necesita cuantificar 5 muestras se debe multiplicar cada uno de estos valores por 5 y quedará una proporción de 5:995.

De esta manera, se colocó los 5  $\mu$ l de los fluorocromos más los 995  $\mu$ l del HS buffer en un tubo eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se puso 195  $\mu$ l de esta solución con 5  $\mu$ l del ADN a cuantificar en tubos eppendorf de 500  $\mu$ l., se los mezcló vigorosamente en un vortex y se dejó a temperatura ambiente por 4 min. Finalmente se realizó la lectura en el fluorómetro (ANEXO D).

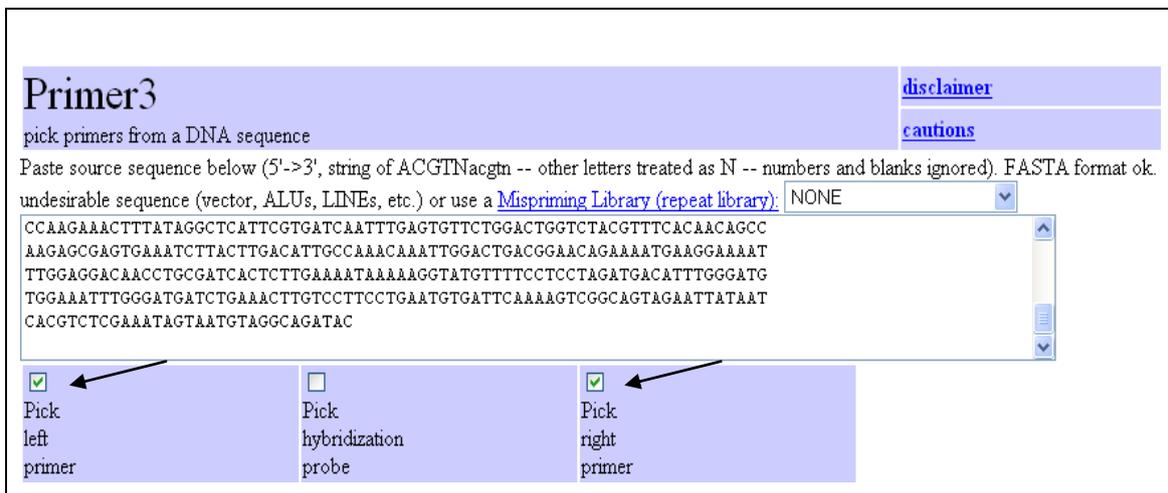
## 2.6 Diseño de primers para el gen Tm-2.

Se diseñó primers específicos para la detección del gen Tm-2 de resistencia al ToMV, en *Solanum lycopersicon* cuya secuencia consta de 2819 pb. (ANEXO E), utilizando dos programas PRIMER 3 (versión 2006) y el FAST-PCR (versión 2007).

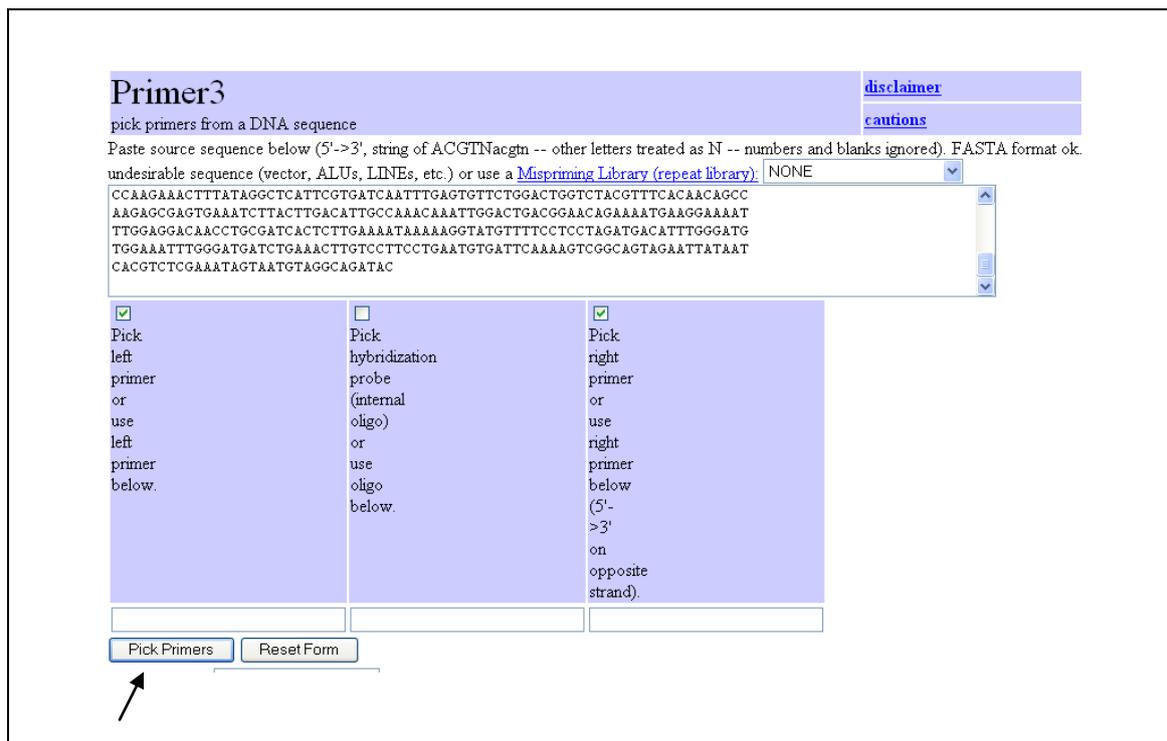
El programa PRIMER 3, creado por [Steve Rozen](#) y Helen Skaletsky del Instituto para la investigación biomédica de Whitehead, presentó en la página principal una descripción breve del programa y su funcionamiento, algunas opciones para el diseño y una ventana vacía, en la cual se colocó la secuencia completa del gen Tm-2 en formato FASTA, es decir, sin especificar el número de nucleótidos ni el sentido de la secuencia (5'  $\rightarrow$  3') (Fig. 2.2.1), a continuación se procedió a escoger en las opciones de diseño del programa los puntos pertenecientes a **Pick Left primer** y **Pick right primer** (Fig. 2.2.2) y finalmente se escogió la opción **Pick primer**, ubicada al final de la ventana, en la cual se ordena al programa que comience el diseño de los primers (Fig. 2.2.3).



**Figura 2.2.1** Programa PRIMER 3 para diseño de primers, ventana de inicio para insertar secuencia completa del gen.

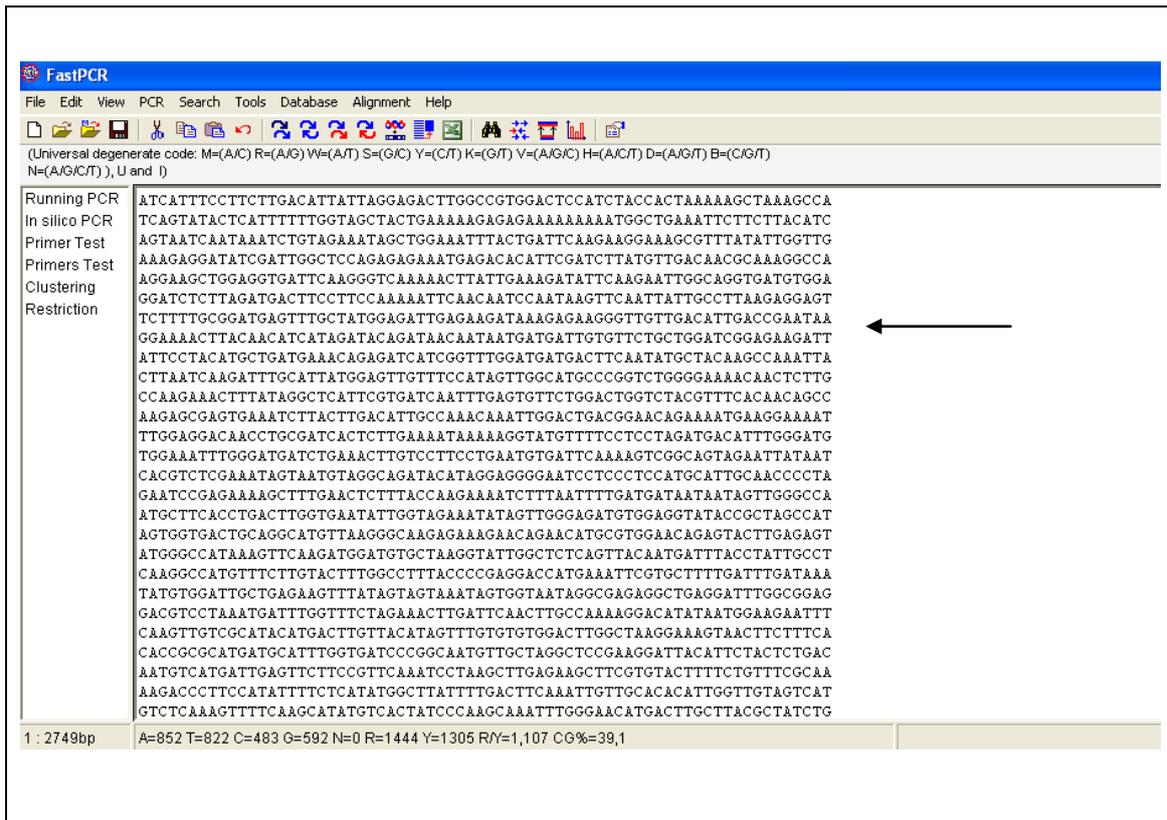


**Figura 2.2.2** Programa PRIMER 3 para diseño de primers, ventana para escoger opciones de diseño.

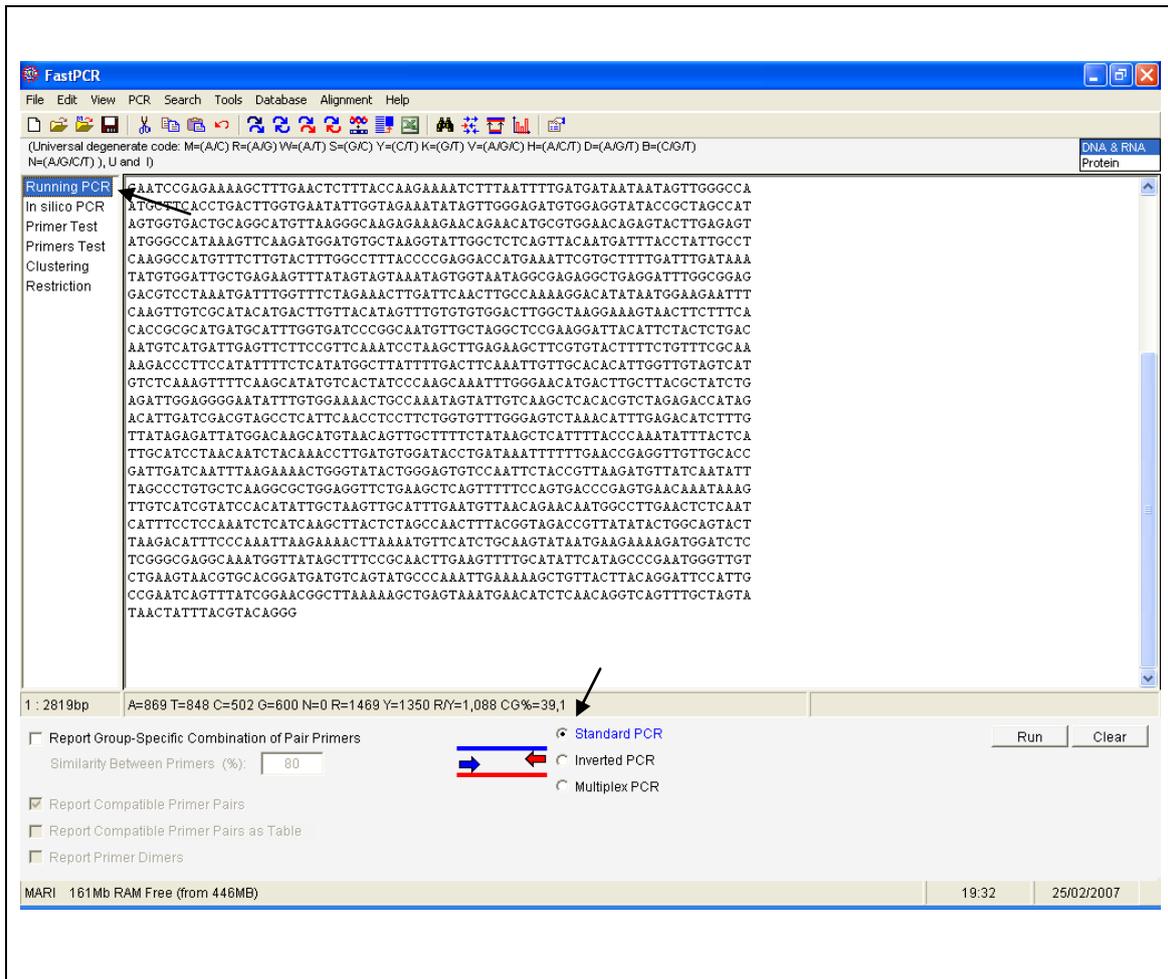


**Figura 2.2.3** Programa PRIMER 3, ventana para empezar el diseño del primer (opción pick primer).

Otro programa utilizado para el diseño de primers fue el FAST-PCR, el cual presentó un mayor número de opciones de diseño a comparación con el programa PRIMER 3, en este se incluyen varios iconos adicionales que ayudaron a verificar con más claridad la eficiencia del primer diseñado y el lugar donde este se pegó dentro de la secuencia del gen Tm-2. En la ventana principal de este programa se insertó la secuencia del gen Tm-2 en formato FASTA es decir, sin especificar el número de nucleótidos ni el sentido de la secuencia ( $5' \rightarrow 3'$ ) (Fig 2.3.1), a continuación se señaló las opciones de diseño correspondientes a los requerimientos necesarios para esta investigación, es decir, una **Standard PCR** (para diseño de primer de una PCR normal) y **Running PCR** (que especifica al programa la creación de primers para la secuencia introducida), y finalmente se escogió la opción **RUN**, ubicada al final de la ventana, en la cual se ordena al programa que comience con el diseño de los primers (Fig 2.3.2).



**Figura 2.3.1** Programa FAST PCR para diseño de primers, ventana principal para insertar secuencia completa del gen.



**Figura 2.3.2** Programa FAST PCR para diseño de primers, ventana para escoger las opciones de diseño.

### 2.6.1 Sintetizado de primers

Una vez diseñado y establecido la secuencia óptima de los primers para el gen Tm-2, se procedió a realizar el pedido para el sintetizado de los mismos, al proveedor autorizado en el Ecuador INVITROGEN. Se realizaron un total de cuatro pedidos para sintetizado de los primers.

## 2.6.2 Reconstitución de primers

Una vez sintetizado los primers, se realizó los cálculos para llegar a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , para lo cual se tomó como la cantidad en nM que se encuentran especificados en el tubo original del primer. A continuación se colocó los  $\mu\text{l}$  calculados de agua grado PCR en el tubo del primer, se dejó durante 24 horas en la refrigeradora a una temperatura de 4°C. Se realizó una corrida electroforética para comprobar la calidad del primer, en gel de agarosa al 2% durante 15 minutos. Finalmente se alícuotó la reconstitución del primer en tubos eppendorf para PCR y se los guardó a -20°C.

## 2.7 Reacción en cadena de la polimerasa

Para estas pruebas se tomó el ADN de las 8 variedades comerciales y de las 10 variedades silvestres, con los primers (2.2) del marcador SCAR (SCG09<sub>700</sub>) y el primer (2.1) de PCR.

### 2.7.1. Cálculo de la Tm para los primers

Los primers del marcador SCAR fueron diseñados en base a la investigación del artículo científico de Sobir (2000), en el cual se especifica las secuencias de los primers del marcador SCAR (SCG09<sub>700</sub>). Los primers para la amplificación por PCR fueron diseñados en el programa Fast PCR y Primer 3.

Para el cálculo de la temperatura de melting (TM) se utilizó la siguiente fórmula:

$$TM = 4 (\text{número de G} + \text{número de C}) + 2(\text{número de A} + \text{número de T})$$

Dónde: G = guanina

C = citosina

A = adenina

T = timina

### **2.7.2 Programa del termociclador**

Para establecer el programación en el termociclador se escogió las opciones de pre-calentado de tapa (heated lid) en 105°, con una temperatura inicial de denaturación de 94°C durante 5 min, 40 ciclos que constan de 45 segundos a 92°, seguido de una temperatura de annealing a variar, una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto y un paso de extensión final de 5 min a 72°C.

### **2.7.3 Condiciones para la PCR**

Se trabajó con una concentración final de 1X de buffer de reacción, una concentración de 1.5 mM en cloruro de magnesio (MgCl), como lo especifica la casa fabricante (INVITROGEN), los dNTPs con una concentración de 100 uM y 1 U/μl de Taq polimerasa.

El master mix que se preparó estaba constituida de buffer de reacción, cloruro de magnesio (MgCl), dNTPs, taq polimerasa y primers, este fue ensamblado en tubos eppendorf de 1.5 μl en frío, centrifugado para lograr total homogenización de todos los reactivos (ANEXO F). Posteriormente en los tubos individuales eppendorf para PCR, se colocó el master mix, 2.5 μl de ADN y agua hasta aforar a un volumen final de 25 μl, nuevamente se mezcló en el vortex y se centrifugó cada tubo de PCR colocándolos en posillos individuales del termociclador (Techne – TC-512) (ANEXO G), se seleccionó el programa diseñado en el apartado 2.7.2 y se dejó correr la PCR.

Las temperaturas de annealing calculadas para los primers del marcador molecular SCAR fueron de 70°C en el primer forward y 68°C para el primer reverse, se vario las temperaturas de annealing en un rango por debajo de los 70°C, es decir de 60°C, 62°C, 64°C, 66°C y 68°C.

Para el primer de amplificación por PCR, se varió las temperaturas de annealing, en: 54°C, 55°C, 56°C, 57°C , 58°C, 59°C.

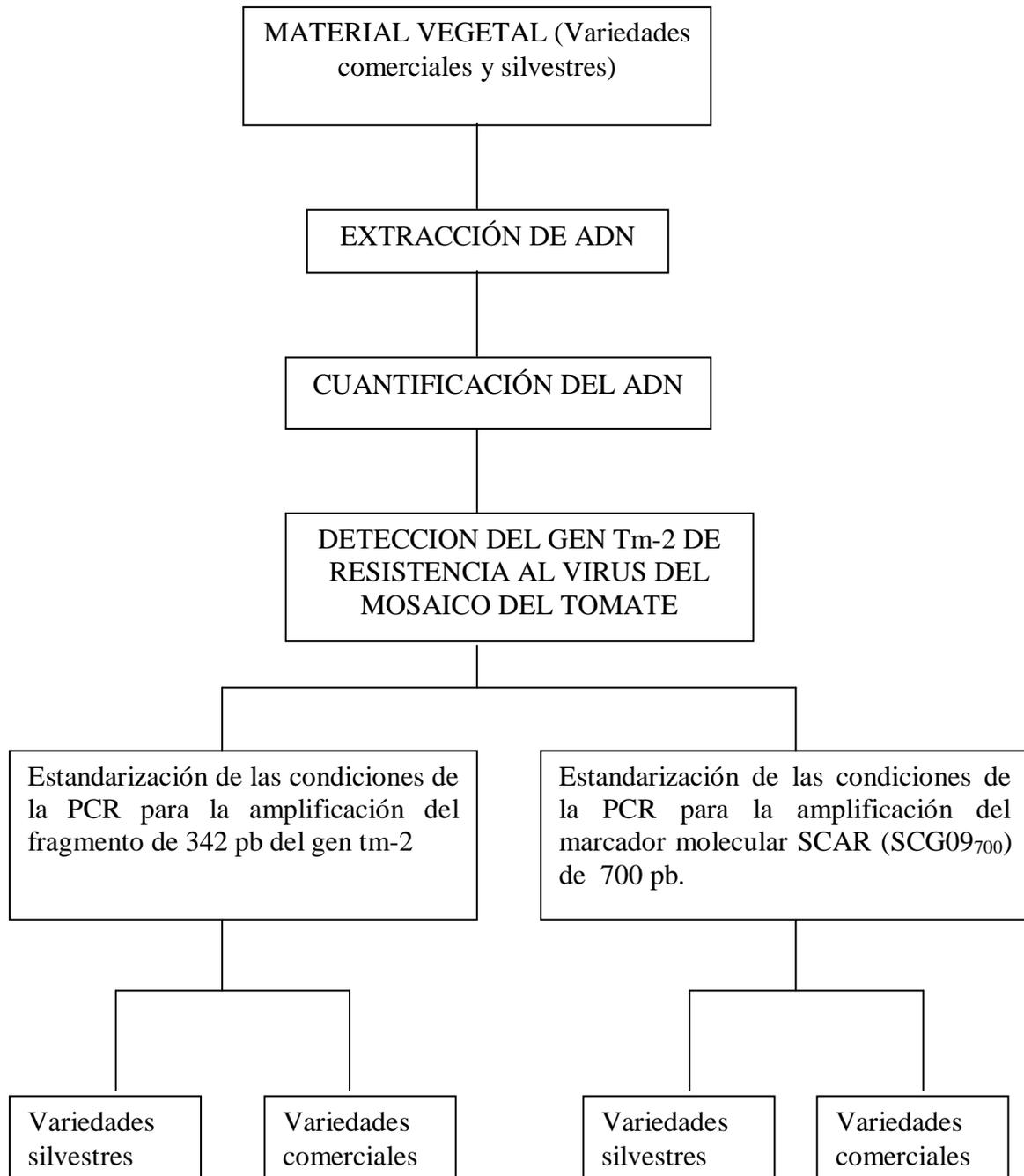
Además se varió la concentración de los primers, tanto para el caso del marcador molecular SCAR como para la amplificación por PCR, en 5 pM, 10 pM, 20 pM y 30 pM.

#### **2.7.4. Revelado de la amplificación por electroforesis**

La preparación del gel se lo hizo al 2% de agarosa con buffer TBE 1X, se hidrató la agarosa durante 5 minutos y se la calentó hasta que se disuelva totalmente, se dejó enfriar por 5 minutos y se agregó 5 µl de bromuro de etidio para 100 µl de buffer, se dejó nuevamente en agitación hasta que se disolvió bien. Finalmente se colocó en la bandeja de electroforesis la cual estuvo previamente llena con el buffer TBE 1 X.

Para cargar las muestras del amplificado, se tomó 2 µl de loading buffer de carga y se homogenizó con la muestra en el tubo de la PCR, una vez bien homogenizado, se tomó con la ayuda de una micropipeta, 10 µl y se lo cargó en cada uno de los posillos del gel. Al final se colocó 5 µl del marcador de 100 bp. Se cerró la cámara y se la conectó a la fuente de poder a 120 voltios (V) y se lo dejó correr por aproximadamente 90 minutos para el caso de los productos de la amplificación para el marcador molecular SCAR, cuyo fragmento es de 700 bp, y para el caso de los productos de la amplificación por PCR del fragmento de 342 bp. del gen Tm-2, se requirió de 1 hora.

## 2.8 Diagrama de la parte experimental de la investigación



## 2.9 Diseño estadístico

Para el diseño estadístico de la presente investigación, hay que tomar en cuenta que el número de muestras es pequeño y estos no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de los datos de los que fueron obtenidos, por estas razones es necesario aplicar pruebas no paramétricas, pues se requiere convertir datos cualitativos a información útil para establecer relaciones entre las variables. Este tipo de pruebas son fáciles de usar, ya que eliminan suposiciones restrictivas sobre la constitución de los datos de la población a utilizar.

Se propone realizar dos pruebas en concreto, una de Chi-cuadrado y un test exacto de Fisher, las cuales permiten analizar si las dos variables dicotómicas (SCAR y PCR) están asociadas cuando la muestra a analizar es pequeña. Estas pruebas permitirán evaluar las probabilidades que se obtienen bajo la hipótesis nula de independencia de las dos variables que se están analizando (SCAR y PCR).

El test exacto de Fisher posee condiciones que exigen que los valores esperados de al menos el 80% de las celdas en una tabla de contingencia sean mayores a 5. Así, en una tabla 2x2 será necesario que todas las celdas verifiquen esta condición, si bien en la práctica puede permitirse que una de ellas muestre frecuencias esperadas ligeramente por debajo de este valor. Este test se basa en evaluar la probabilidad asociada a cada una de las tablas 2x2 que se pueden formar manteniendo los mismos totales de filas y columnas. Cada una de estas probabilidades se obtiene bajo la hipótesis nula de independencia de las dos variables que se están considerando.

En la prueba del Chi-cuadrado, para el caso de la presente investigación, se la aplica para probar la independencia de las dos variables (SCAR y PCR) entre sí, mediante la presentación de los datos en [tablas de contingencia](#). Adicionalmente se realizará una prueba t para proporciones con el objetivo de analizar la relación entre la variedad (silvestre o comercial) y los resultados de la amplificación por SCAR y PCR

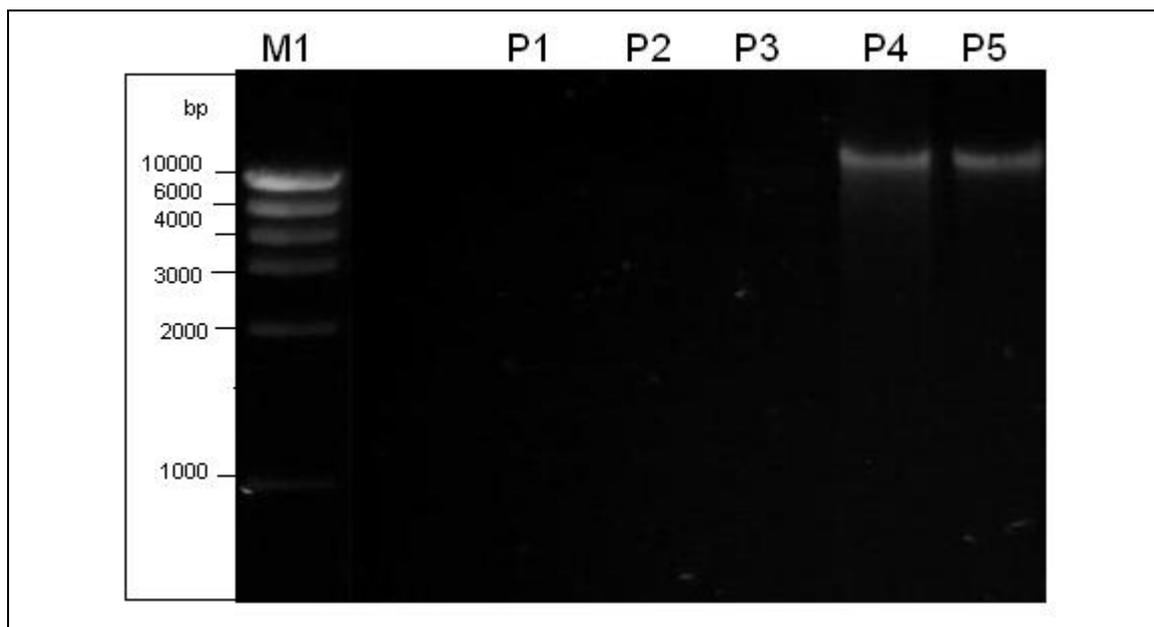
## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Extracción de ADN de tomate (*Solanum lycopersicon*)

Se realizó la estandarización de una técnica adecuada para la extracción de ADN en tomate, para lo cual se probaron varios protocolos de diferentes autores, relacionados con extracciones hechas previamente en solanaceas. Se tomó únicamente a la variedad comercial ASTONA para probar la eficiencia de cada uno de los protocolos utilizados, además la variedad ASTONA fue el control positivo, de la cual se tiene información certificada de su resistencia al virus del mosaico del tomate.

Una vez que se extrajo el ADN, se pudo observar la calidad de este en gel de agarosa al 1% (Fig. 3.1). Como se puede observar en la siguiente figura, el protocolo 1 de Ferreira y Grattapaglia (1998) (P1), protocolo 2 de Morillo (1999) (P2), protocolo 3 modificado de Fulton (1995) (P3) no muestran banda, mientras que al realizar la extracción con el protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP) (P4) y el protocolo 5 del DNeasy mini Kit(QIAGEN) (P5) se presenta una banda de aproximadamente 10000 pb bastante clara.



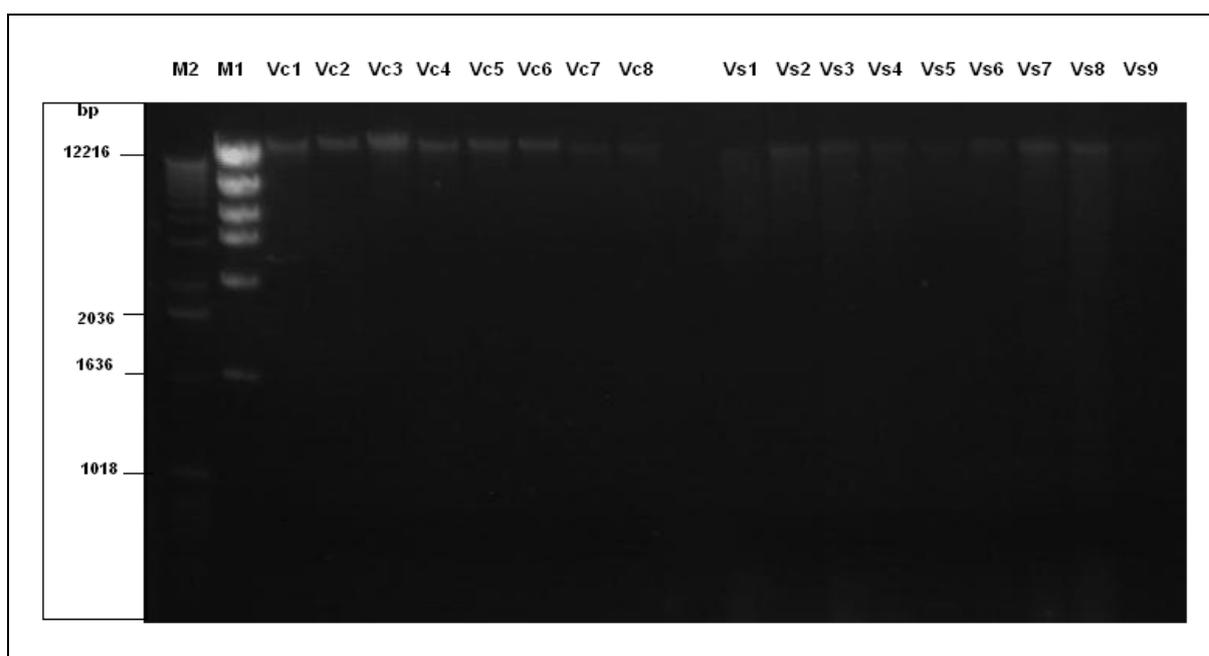
**Figura 3.1.** Gel de agarosa al 1% del ADN extraído usando la variedad comercial ASTONA. M1, High DNA mass ladder; P1, protocolo 1 de Ferreira y Grattapaglia(1998); P2, protocolo 2 de Morillo (1999); P3, protocolo 3 modificado de Fulton (1995); P4, protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP) y P5, protocolo 5 del DNeasy mini Kit(QIAGEN)

### 3.2 Cuantificación de ADN

En primer lugar, se realizó la cuantificación del ADN extraído de la variedad comercial ASTONA por los 5 protocolos propuestos, mediante el uso del fluorómetro (Tabla 3.1). En base a estos datos, se puede constatar con números lo obtenido anteriormente en la visualización del gel (Fig 3.1), siendo la concentración de la extracción hecha con el DNeasy mini Kit (QIAGEN) la más alta, por lo que se tomó a este como el método más idóneo para realizar las siguientes extracciones de las variedades silvestres y comerciales, cuyo resultado se visualiza en gel de agarosa al 1% (Fig 3.2).

**Tabla 3.1.** Cuantificación de ADN de la variedad comercial ASTONA, mediante los diferentes protocolos

Protocolo	[ ] ng/ul
1	0.0252
2	0.1368
3	2.78
4	14.36
Kit	16.68



**Figura 3.2** Gel de agarosa al 1% de ADN de las variedades silvestres (Vs) y comerciales (Vc). M2, el marcador de 1Kb; M1, High DNA mass ladder; Vc1, Vc2, Vc3, Vc4, Vc5, Vc6, Vc7, Vc8, variedades comerciales; Vs1, Vs2, Vs3, Vs4, Vs5, Vs6, Vs7, Vs8, Vs9, variedades silvestres.

A continuación se presentan los valores de la cuantificación del ADN (Tabla 3.2) de todas las variedades comerciales y silvestres empleadas en este estudio, hechas mediante el uso del High DNA mass ladder y del fluorómetro.

**Tabla 3.2** Valores de cuantificación de ADN mediante el marcador High DNA mass ladder y fluorómetro, de las variedades comerciales.

Variedad	Marcador molecular [ ] ng/ ul	Fluorómetro [ ] ng/ ul
Vc1	15 ng/ul	12.48 ng/ul
Vc2	15 ng/ul	12.44 ng/ul
Vc3	25 ng/ul	18.8 ng/ul
Vc4	15 ng/ul	16.84 ng/ul
Vc5	15 ng/ul	17.34 ng/ul
Vc6	15 ng/ul	17.08 ng/ul
Vc7	12.5 ng/ul	9.88 ng/ul
Vc8	12.5 ng/ul	9.68 ng/ul

**Tabla 3.3.** Valores de cuantificación de ADN mediante el marcador High DNA mass ladder y fluorómetro, de las variedades silvestres.

Variedad	Marcador molecular [ ] ng/ ul	Fluorómetro [ ] ng/ ul
Vs1	12.5 ng/ul	9.6 ng/ul
Vs2	15 ng/ul	14.88 ng/ul
Vs3	15 ng/ul	16.68 ng/ul
Vs4	15 ng/ul	14.32 ng/ul
Vs5	12.5 ng/ul	11.36 ng/ul
Vs6	15 ng/ul	16.6 ng/ul
Vs7	15 ng/ul	17.24 ng/ul
Vs8	15 ng/ul	17.08 ng/ul
Vs9	12.5 ng/ul	8.4 ng/ ul

### 3.3 Diseño de primer

Los primers específicos para la amplificación del marcador SCAR (SCG09<sub>700</sub>) fueron tomados de Sobir (2000) con un fragmento de amplificación de aproximadamente 700 pb. Las secuencias de nucleótidos de cada primer se representan a continuación:

SCAR Forward → 5' ctgacgtcaccttgttggtcttta 3' (24 nucleótidos)

SCAR Reverse → 5' ctgacgtcacttagctttgtaaac 3' (24 nucleótidos)

Tras el análisis de la secuencia completa del gen Tm-2, se estudiaron todas las posibles combinaciones para el diseño de los primers específicos para la amplificación por PCR de este gen. Los resultados obtenidos en el programa PRIMER 3 arrojaron como primers adecuados para la secuencia del gen, una combinación de 4 posibles pares de oligonucleotidos presentados en la figura 3.3.

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3' seg</u>	
1 LEFT PRIMER	286	20	60.00	50.00	6.00	2.00	ggatatcgattggctccaga
RIGHT PRIMER	505	20	59.81	50.00	2.00	1.00	ctcatccgcaaagaactcc
PRODUCT SIZE: 220, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00							
2 LEFT PRIMER	286	20	60.00	50.00	6.00	2.00	ggatatcgattggctccaga
RIGHT PRIMER	503	20	59.81	50.00	3.00	1.00	catccgcaaagaactcctc
PRODUCT SIZE: 218, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00							
3 LEFT PRIMER	286	20	60.00	50.00	6.00	2.00	ggatatcgattggctccaga
RIGHT PRIMER	504	20	59.81	45.00	3.00	3.00	tcatccgcaaagaactcct
PRODUCT SIZE: 219, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00							
4 LEFT PRIMER	868	20	60.09	40.00	5.00	2.00	tgccaacaattggactga
RIGHT PRIMER	1101	20	60.11	55.00	7.00	3.00	agggaggattcccctctat
PRODUCT SIZE: 234, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00							

**Figura 3.3.** Resultados de las combinaciones de primer adecuados para la secuencia del gen Tm-20 por el programa PRIMER 3.

Como resultado del programa Fast PCR, se obtuvieron 266 oligonucleotidos para primers forward y 227 oligonucleotidos para primers reverse con un total de 50 posibles combinaciones entre ellos, de los cuales se escogió los pares de primers que coincidían con las secuencias arrojadas por el programa PRIMER 3, además de verificar cual de los oligonucleotidos presentaba mayor calificación.

Al comparar las secuencias arrojadas por el programa FAST PCR, con las obtenidas en el programa PRIMER 3, se obtuvo como mejor combinación de primers para este gen, las secuencias que se muestran en la figura 3.4, con una amplificación de 342 pb, correspondiente al gen Tm-2.

```

|           PCR Primer Selection Results
> -lfp=ggatatcgattggctccaga -rfp=cttctccgatccagcagaac

-----
Selected Left Primers (Forward) for Regular PCR: (1)
-----
>F1(6->25) Tm=54,6°C Tm(10)=39,0°C CG%=50,0 MW=6157,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=97
5'-ggatatcgattggctccaga

-----
Selected Right Primers (Forward) for Regular PCR: (1)
-----
>R1(328<=347) Tm=56,1°C Tm(10)=35,9°C CG%=55,0 MW=6022,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=95
5'-cttctccgatccagcagaac

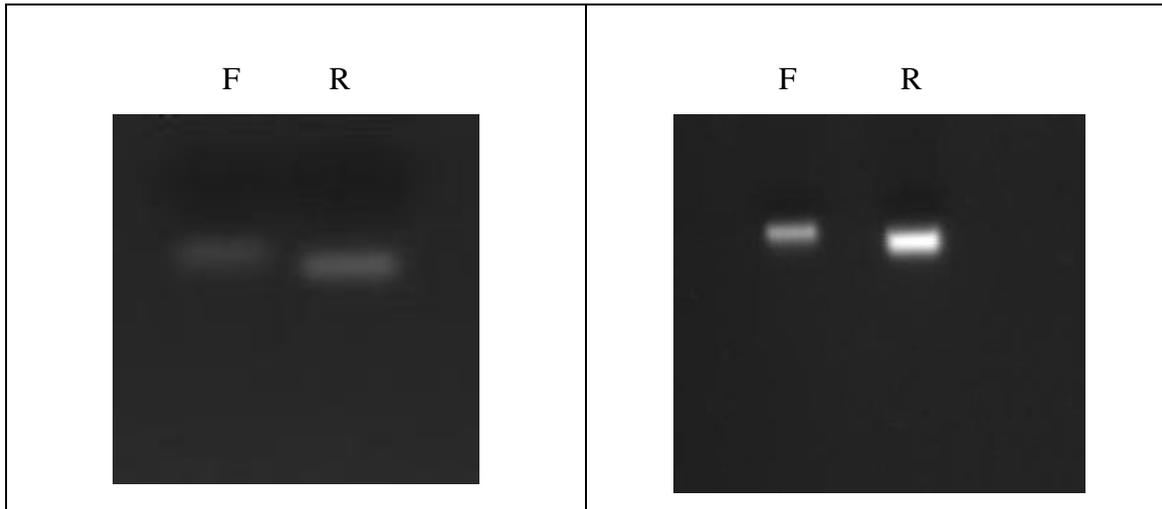
-----
Compatible combination of pair primers = 1
>F1(6->25) 5'-ggatatcgattggctccaga
Tm=54,6°C Tm(10)=39,0°C CG%=50,0 MW=6157,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=97
>R1(328<=347) 5'-cttctccgatccagcagaac
Tm=56,1°C Tm(10)=35,9°C CG%=55,0 MW=6022,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=95

Length of PCR Product= 342
The Optimal Annealing Temperature of PCR = 55.3°C

```

**Figura 3.4.** Resultado de la combinación de primers adecuados para la secuencia del gen Tm-20 por el programa Fast PCR.

Una vez obtenida las secuencias de los primers para la amplificación por PCR y la del marcador molecular SCAR, se verificó su calidad en gel de agarosa al 2% (Fig. 3.5)



**Figura 3.5** Gel de agarosa al 2% del marcador SCAR (izquierda) y para la amplificación por PCR (derecha), con la secuencia forward(F) y reverse(R) respectivas.

### **3.4 Estandarización de la técnica PCR para la amplificación del marcador SCAR (SCG09<sub>700</sub>) para la detección del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate.**

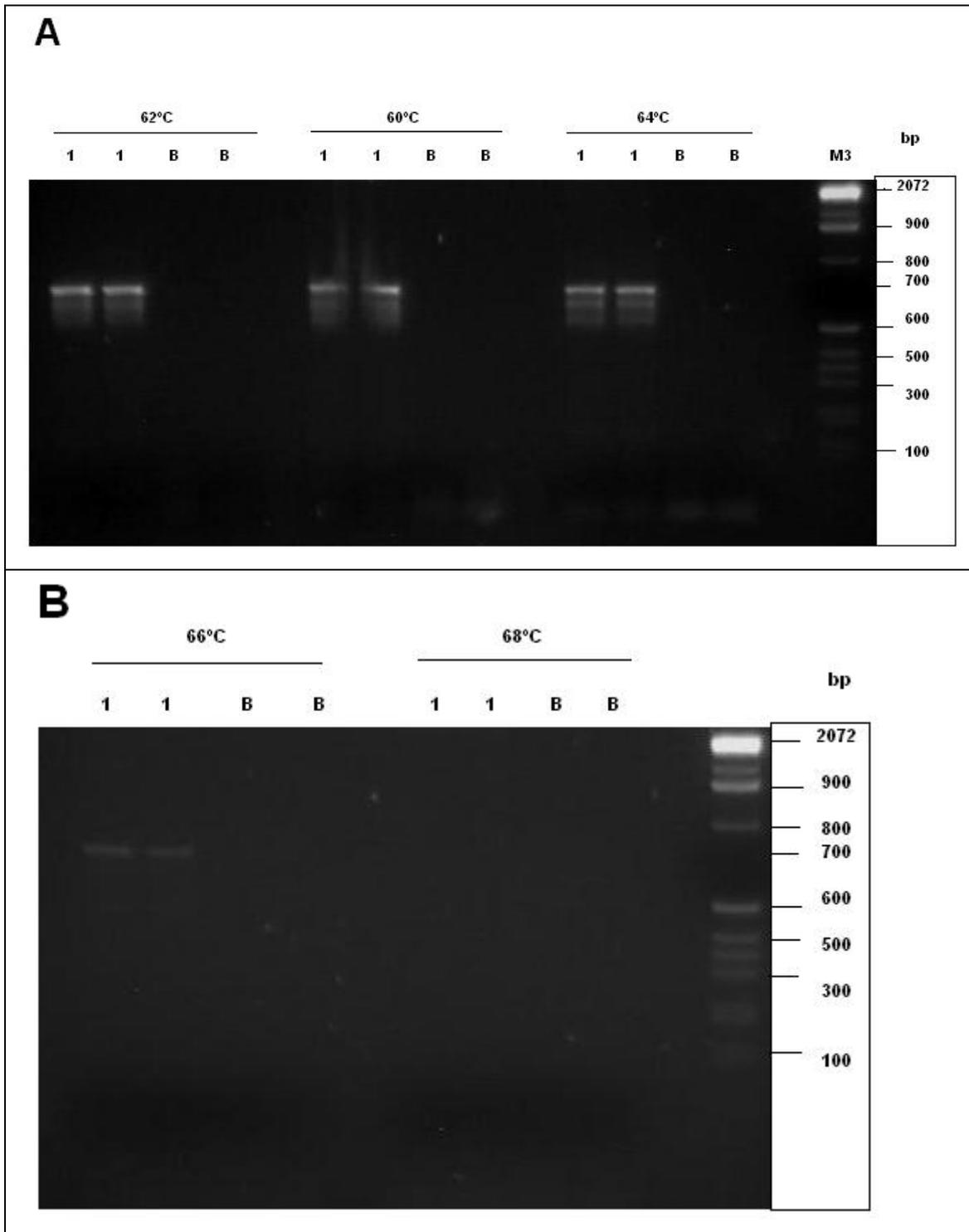
Una vez obtenidos los primers específicos para el marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), se probó diferentes temperaturas de annealing para en primer lugar estandarizar la técnica y posteriormente aplicarla al resto de variedades utilizadas en esta investigación, tomando como control positivo a la variedad comercial ASTONA (Vc2),

Las temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) calculadas para este primer fue:

SCAR Forward → 5'ctgacgtcaccttgggtcttta3' (24 nucleótidos) con una T<sub>m</sub> (temperatura de melting) de 70°C.

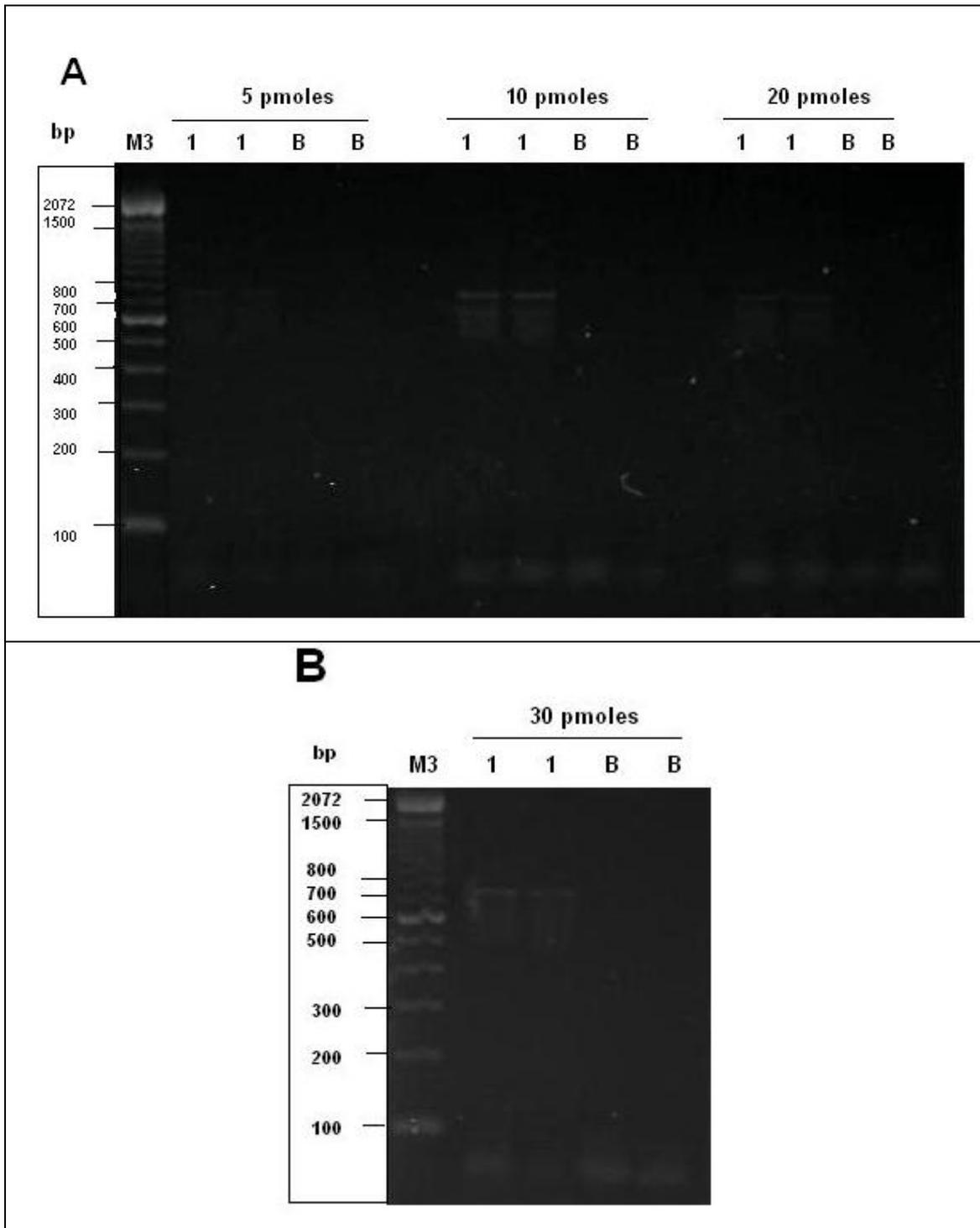
SCAR Reverse → 5'ctgacgtcacttagctttgtaaac3' (24 nucleótidos) con una T<sub>m</sub> (temperatura de melting) de 68°C.

A partir de estos resultados se varió en un rango de  $-10^{\circ}\text{C}$  bajo los  $70^{\circ}\text{C}$ , es decir,  $68^{\circ}\text{C}$ ,  $66^{\circ}\text{C}$ ,  $64^{\circ}\text{C}$ ,  $62^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y se obtuvo bandas claras a los  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $62^{\circ}\text{C}$  y  $64^{\circ}\text{C}$ , mientras que a los  $66^{\circ}\text{C}$  se refleja una leve banda y a los  $68^{\circ}\text{C}$  no se visualiza ninguna. Se puede constatar que existe una banda más clara a la temperatura de  $62^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3.6), por lo que se tomó a esta como la temperatura de alineamiento final para este primer.



**Figura 3.6.** Gel de agarosa al 2 % a diferentes temperaturas de annealing para el primer del marcador SCAR. M3, el marcador de 100 bp; 1, variedades ASTONA; B, control blanco sin ADN. A) 60°C, 62°C y 64°C. B) 66°C y 68°C.

A continuación se varió la concentración de primer en 5, 10, 20 y 30 pM, utilizando el ADN de la variedad comercial ASTONA, y se observó una banda más clara a la concentración de 10 pM en comparación con las otras bandas (Fig. 3.7).



**Figura 3.7.** Gel de agarosa al 2 % a diferentes concentraciones del primer del marcador SCAR. M3, el marcador de 100 bp; 1, variedades ASTONA; B, control blanco sin ADN. A) 5 pM, 10 pM y 20 pM. B) 30 pM.

Los parámetros del programa de la PCR están especificados en la tabla 3.4 para un total de 40 ciclos. Es importante tener en cuenta que el programa debe tener la opción de heated lid a 105° y el termociclador debe ser encendido de 30 minutos a 1 hora antes de empezar con la PCR.

**Tabla 3.4** Programa de la PCR para el marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>) en el termociclador.

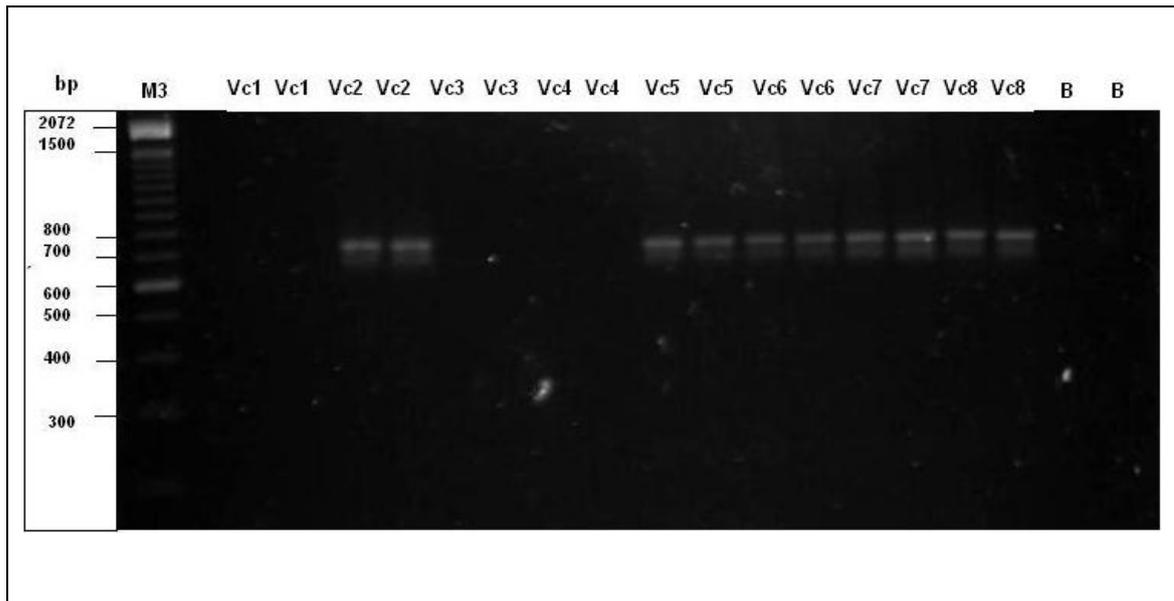
Etapa	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	5 min
Denaturación	92°C	45 seg
Annealing	62°C	30 seg
Extensión	72°C	1 min
Extensión final	72°C	5 min

La preparación del master mix se llevó a cabo siguiendo las condiciones especificadas en la tabla 3.5, que se presenta a continuación.

**Tabla 3.5** Condiciones para la preparación del master mix para la detección del marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>).

MASTER MIX				
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	ul por reacción	En 19 reacciones (ul)
Buffer	10 X	1X	2.5	47.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75	14.25
dNTP's	10 mM	100 uM	0.25	4.75
Taq polimerasa	5U/ul	1U/ul	0.2	3.8
Primer 2.2 F	100 um	10 pm	0.1	1.9
Primer 2.2 R	100 um	10 pm	0.1	1.9
			3.9	74.1

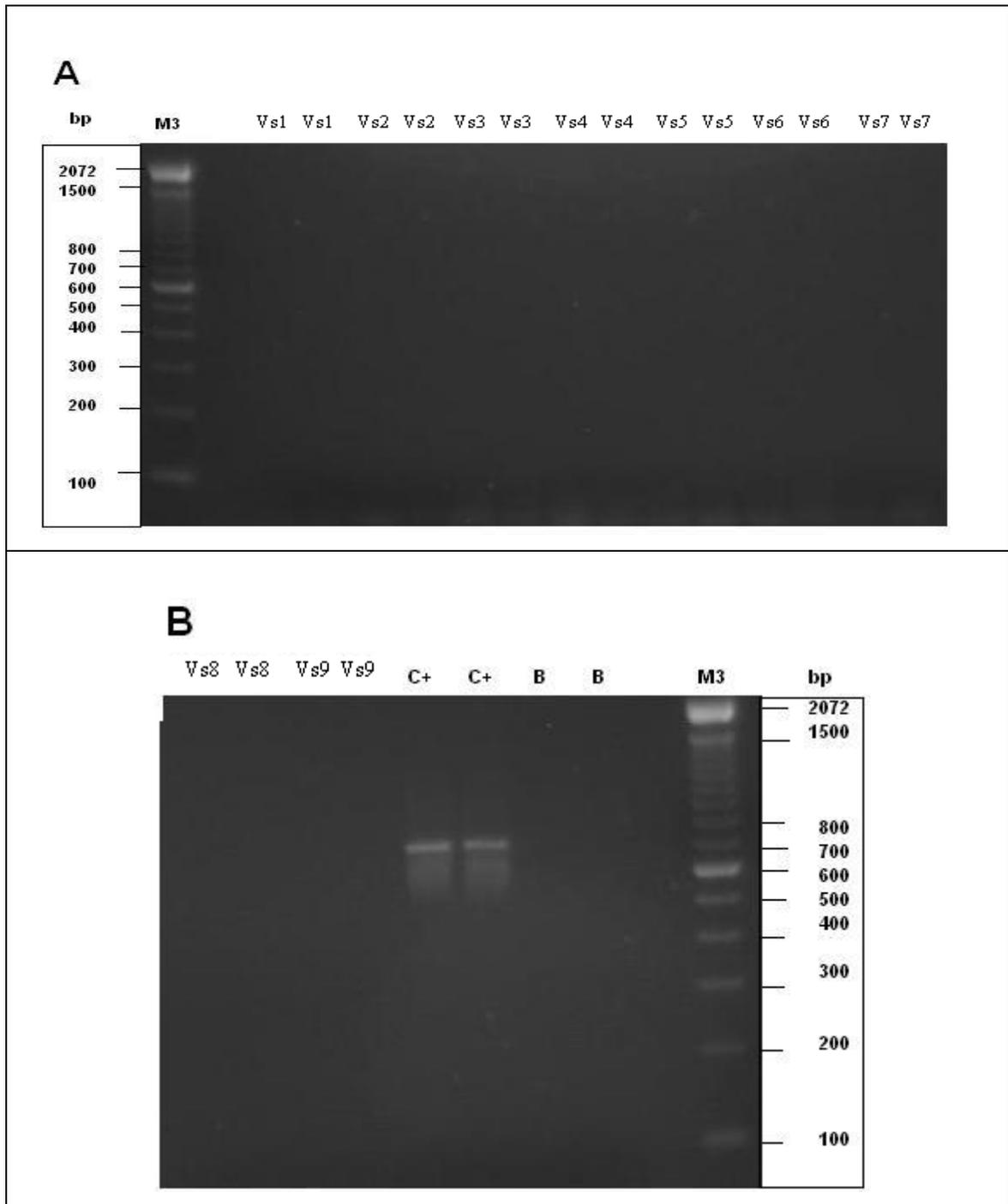
Luego de establecer todos los parámetros necesarios para estandarizar la técnica de detección del marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), con el ADN de la variedad ASTONA (Vc2), se procedió a probar las mismas condiciones de la técnica con el ADN de las otras variedades silvestres y comerciales. La siguiente figura muestra los resultados finales para la amplificación de una secuencia de 700 pb correspondiente al marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), de las variedades comerciales.



**Figura 3.8** Gel de agarosa al 2 % de la 8 variedades comerciales probadas con el primer del marcador SCAR. M3, el marcador de 100 bp; Vc1, Vc2, Vc3, Vc4, Vc5, Vc6, Vc7 y Vc8, variedades comerciales dispuestas en dupletas; B, control blanco.

Las variedades comerciales Vc2(Astoa), Vc5 (BHN C4599 100 CM 150103), Vc6 (BHN C5499 100 CM 150103), Vc7 (Tomate don Jose F1 lote# A94253) y Vc8 (Tomate don Jose F1 lote# A94253), presentan la secuencia SCAR de 700 pb en su genoma; mientras que las variedades Vc1 (Shaddy Lady), Vc3 (Advantage) y Vc4 (Flora Dade), no presentan amplificación. Cabe recalcar que se realizaron varios ensayos a estas mismas condiciones para verificar que sean repetitivos.

A continuación en la siguiente figura se muestra los resultados finales para la amplificación de una secuencia de 700 pb correspondiente al marcador SCAR (SCG09<sub>700</sub>), en las variedades silvestres.



**Figura 3.9.** Gel de agarosa al 2 % de las variedades silvestres probadas con el primer del marcador SCAR. A) M3, marcador de 100 bp; Vs1, Vs2, Vs3, Vs4, Vs5, Vs6, Vs7; B) Vs8, Vs9, variedades silvestres dispuestas en dupletas; C+, control positivo (*Solanum peruvianum*); B, control blanco; M3, marcador de 100 bp

Según lo presentado en la anterior figura, se puede observar que en ninguna de las variedades silvestres de tomate se encuentra presente el fragmento de 700 pb, correspondiente al marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), únicamente existió amplificación en el control positivo (*Solanum peruvianum*). Se hicieron 6 repeticiones a las mismas condiciones para constatar los resultados obtenidos.

### **3.5 Estandarización de la técnica PCR para la amplificación de un fragmento de 342 pb. del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate.**

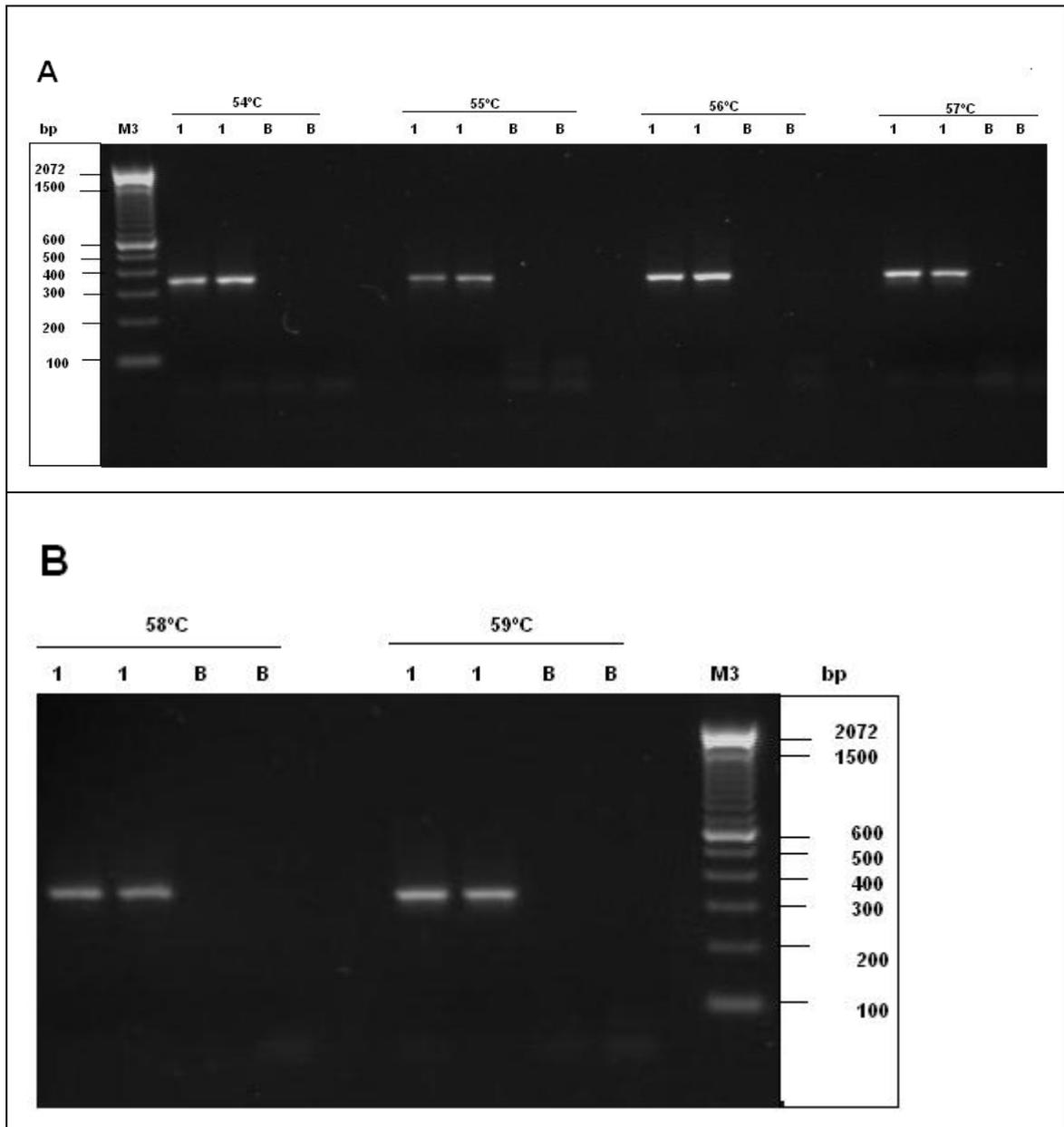
Una vez diseñados los primers específicos para la amplificación por PCR de un fragmento de 342 pb correspondiente al gen Tm-2, utilizando los programas FAST PCR y Primer 3, se probó diferentes temperaturas de annealing para en primer lugar estandarizar la técnica y posteriormente aplicarla al resto de variedades utilizadas en esta investigación, tomando como control positivo a la variedad comercial ASTONA (Vc2),

Las temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) calculadas para este primer fue:

2.1 Forward → 5'ggatategattggctccaga3' (20 nucleótidos), con una T<sub>m</sub> (temperatura de melting) de 60°C.

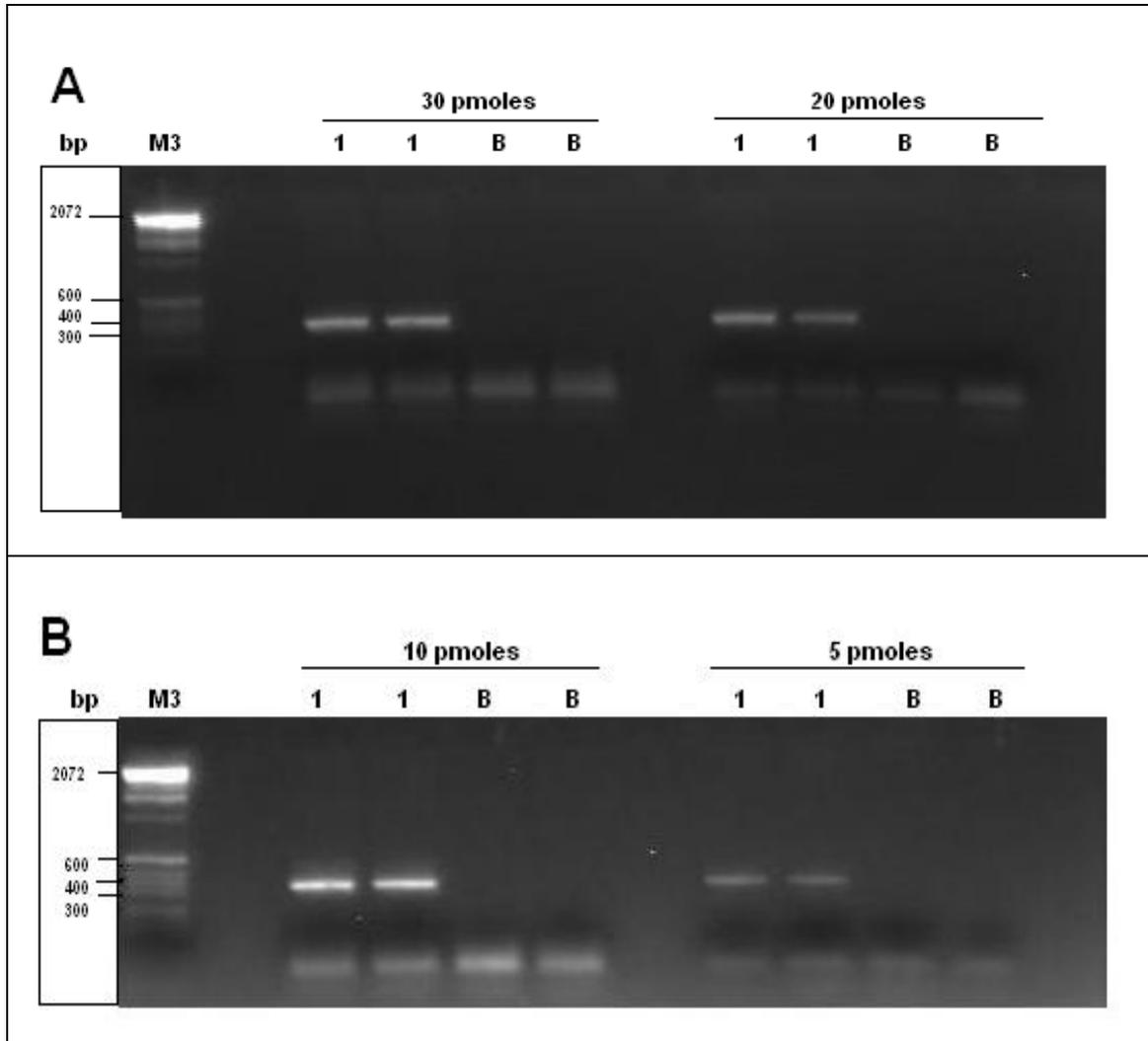
2.1 Reverse → 5'gttctgctggatcgagaag3' (20 nucleótidos), con una T<sub>m</sub> (temperatura de melting) de 62°C.

A partir de estos resultados se varió en un rango de – 6°C bajo los 60°C, es decir, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C y se obtuvo presencia de bandas a todas estas temperaturas, pero la banda correspondiente a los 56°C es más clara a comparación de las otras (Fig. 3.10), por lo que se tomó a esta como la temperatura de annealing final para este primer.



**Figura 3.10** Gel de agarosa al 2 % con diferentes temperaturas de alineamiento para el primer de amplificación para PCR. M3, marcador de 100 bp; 1, variedad ASTONA; B, control blanco sin ADN. A) 54°C, 55°C, 56°C, 57°C. B) 58°C, 59°C.

A continuación se varió la concentración de primer en 5, 10, 20 y 30 pM, utilizando el ADN de la variedad comercial ASTONA, y se observó una banda más clara a la concentración de 10 pM en comparación con las otras bandas (Fig. 3.11).



**Figura 3.11** Gel de agarosa al 2 % a diferentes concentraciones del primer de amplificación para PCR. M3, el marcador de 100 bp; 1, variedad ASTONA; B, control blanco sin ADN. A) 30 pM, 20 pM. B) 10 pM, 5 pM.

Los parámetros del programa de la PCR están especificados en la tabla 3.6 para un total de 40 ciclos. Es importante tener en cuenta que el programa debe tener la opción de heated lid a 105° y el termociclador debe ser encendido de 30 minutos a 1 hora antes de empezar.

**Tabla 3.6** Programa de la PCR para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2 en el termociclador.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	5 min
Denaturación	92°C	45 seg
Annealing	56°C	30 seg
Extensión	72°C	1 min
Extensión final	72°C	5 min

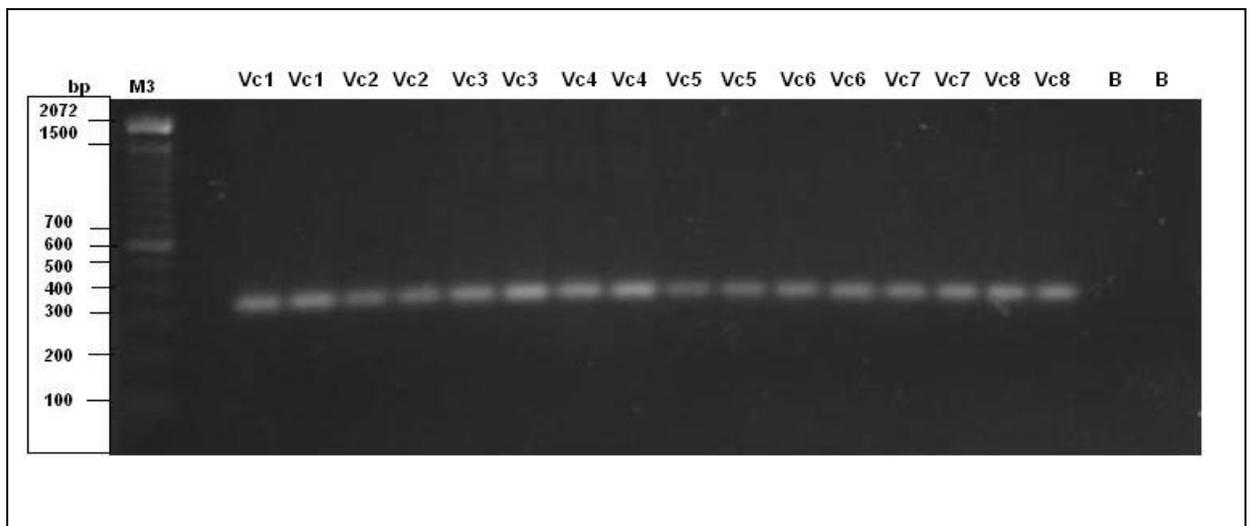
La preparación del master mix se llevó a cabo siguiendo las condiciones especificadas en la tabla 3.7, que se presenta a continuación.

**Tabla 3.7** Condiciones para la preparación de la master mix para la amplificación por PCR.

MASTER MIX				
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	ul por reacción	En 19 reacciones (ul)
Buffer	10 X	1X	2.5	47.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75	14.25
dNTP's	10 mM	100 uM	0.25	4.75
Taq polimerasa	5U/ul	1U/ul	0.2	3.8
Primer 2.2 F	100 um	10 pm	0.1	1.9
Primer 2.2 R	100 um	10 pm	0.1	1.9
			3.9	74.1

Luego de establecer todos los parámetros necesarios para estandarizar la técnica de amplificación por PCR del fragmento de 342 pb correspondiente al gen Tm-2. Se procedió a probar las mismas condiciones de la técnica en las otras variedades silvestres y comerciales.

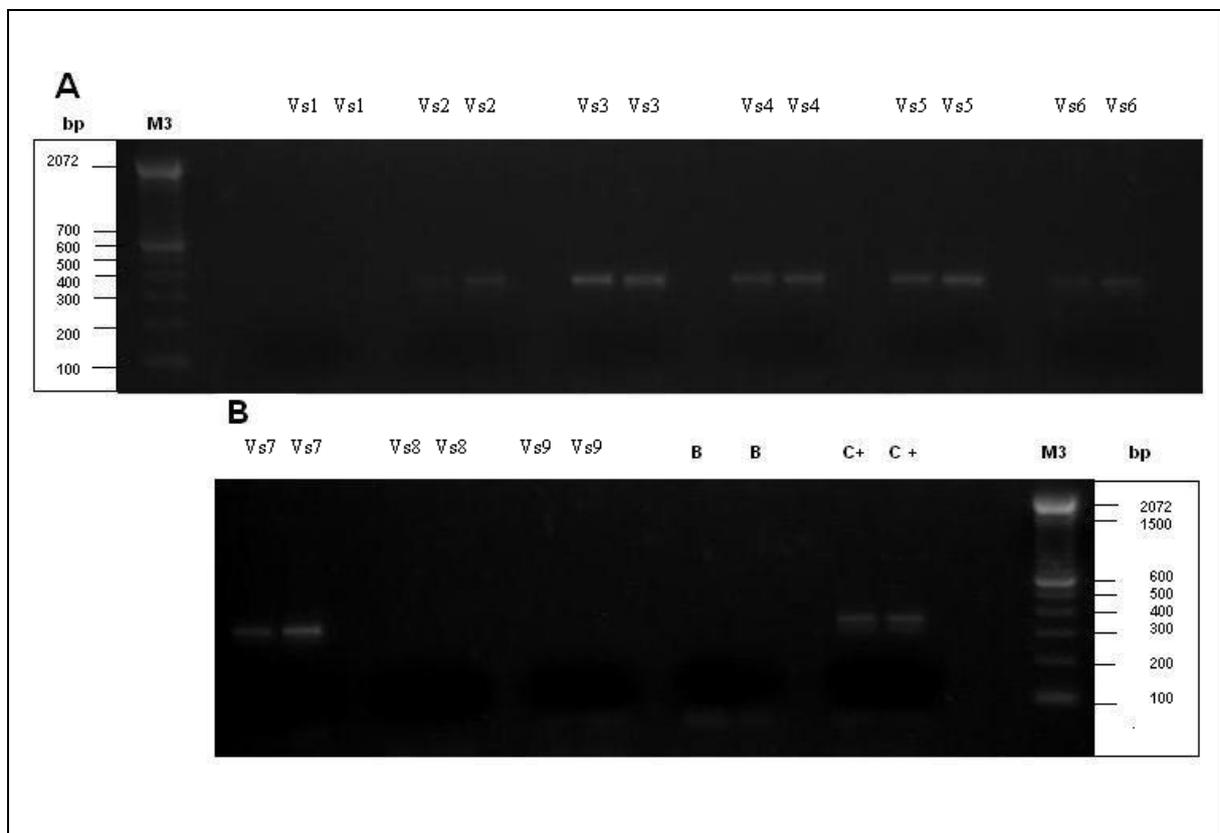
La siguiente figura (Fig 3.12) muestra los resultados finales para la amplificación de una secuencia de 342 pb correspondiente al gen Tm-2, en las variedades comerciales.



**Figura 3.12** Gel de agarosa al 2 % de la 8 variedades comerciales probadas con el primer para amplificación por PCR. M3, el marcador de 100 bp; Vc1, Vc2, Vc3, Vc4, Vc5, Vc6, Vc7 y Vc8, variedades comerciales dispuestas en dupletas; B, control blanco.

En este caso, las 8 variedades comerciales (Shaddy Lady, Astota, Advantage, Flora Dade, BHN C4599 100 CM 150103, BHN C5499 100 CM 150103, Tomate don Jose F1 lote# A94253, Tomate Syta F1 lote# B14109) presentan la amplificación del fragmento de 342 pb correspondiente al gen Tm-2. Se realizaron varias pruebas a las mismas condiciones para verificar este resultado.

A continuación se presentan en gel de agarosa al 2% (Fig 3.13), los resultados de la amplificación de una secuencia de 342 pb correspondiente al gen Tm-2, en las nueve variedades silvestres.



**Figura 3.13** Gel de agarosa al 2 % de las variedades silvestres probadas con el primer para la amplificación por PCR. A) M3, marcador de 100 bp; Vs1, Vs2, Vs3, Vs4, Vs5, Vs6; B) Vs7, Vs8, Vs9, variedades silvestres dispuestas en dupletas; C+, control positivo (*Solanum peruvianum*); B, control blanco; M3, marcador de 100 bp

En el caso de las variedades silvestres, encontramos que existe amplificación en la Vs2 (*Solanum lycopersicon* var. *ceraciforme*), Vs3, Vs4, Vs5, Vs6 y Vs7 (*Solanum pimpinellifolium*) mientras que en las otras variedades Vs1 (*Solanum lycopersicon*), Vs8 (*Solanum lycopersicon* var. *ceraciforme*) y Vs9 (*Solanum pimpinellifolium*), no se observo ningún tipo de amplificación en todas las repeticiones que se realizaron de este ensayo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores en cada una de las variedades comerciales y silvestres, con respecto a la amplificación obtenida tanto para el marcador molecular SCAR como para el fragmento de 342 pb del gen Tm-2, se pueden evidenciar los resultados finales de resistencia al virus del mosaico del tomate en las siguientes tablas:

**Tabla 3.8** Determinación de resistencia para las variedades comerciales (*Solanum lycopersicon*)

No. Variedad	Nombre	Casa comercial	SCAR	PCR
1c	Shaddy Lady	ALASKA	Negativo	Positivo
2c (control +)	Astona	ALASKA	Positivo	Positivo
3c	Advantage	AGROVITAL	Negativo	Positivo
4c	Flora Dade	AGROVITAL	Negativo	Positivo
5c	BHN C4599 100 CM 150103	ALASKA	Positivo	Positivo
6c	BHN C5499 100 CM 150103	ALASKA	Positivo	Positivo
7c	Tomate don Jose F1 lote# A94253	ALASKA	Positivo	Positivo
8c	Tomate Syta F1 lote# B14109	ALASKA	Positivo	Positivo

**Tabla 3.9.** Determinación de resistencia para las variedades silvestres.

No. variedad	Código	Especie	Procedencia	SCAR	PCR
1s	31-1	<i>Solanum lycopersicon</i>	Ecuador - Napo	Negativo	Negativo
2s	58-1	<i>Solanum lycopersicon</i> var. <i>ceraciforme</i>	Ecuador- Tungurahua	Negativo	Positivo
3s	63-6	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí	Negativo	Positivo
4s	75-5	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí	Negativo	Positivo
5s	75-1	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí	Negativo	Positivo
6s	76-1	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Manabí	Negativo	Positivo
7s	77-5	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Ecuador- Machalilla	Negativo	Positivo
8s	93-7	<i>Solanum lycopersicon</i> var. <i>ceraciforme</i>	Perú	Negativo	Negativo
9s	94-2	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	Loja	Negativo	Negativo
Control +		<i>Solanum Peruvianum</i>	Ecuador	Positivo	Positivo

### 3.6 Desarrollo del diseño estadístico

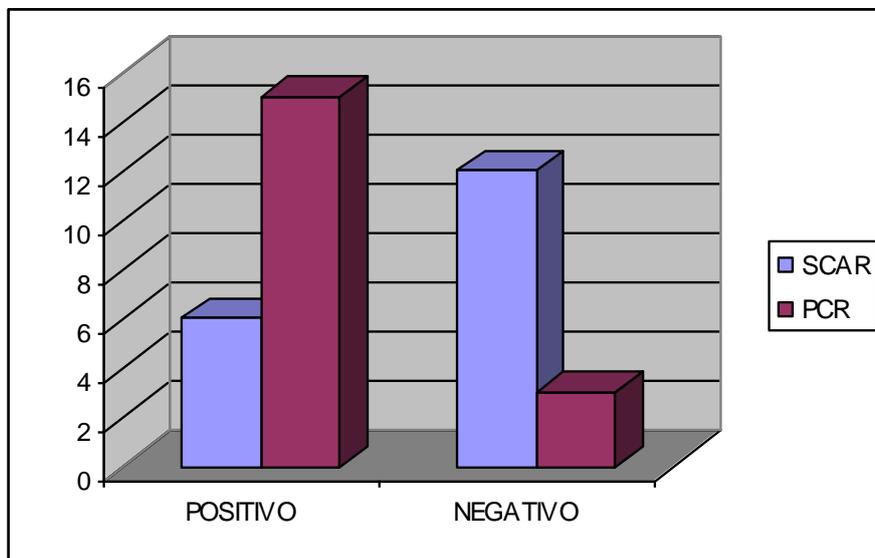
#### 3.6.1 Representaciones estadísticas

Para comprender lo obtenido en el capítulo III de resultados, es necesario que a continuación se los represente en tablas e histogramas, que ayudaran a visualizar los resultados para las variedades comerciales y silvestres.

a) Número de individuos que resultaron positivos y negativos para el estudio de la variable SCAR (amplificación del marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub>.) y la variable PCR (amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2).

**Tabla 3.10** Número de variedades comerciales y silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variable SCAR y PCR

	POSITIVO	NEGATIVO
SCAR	6	12
PCR	15	3



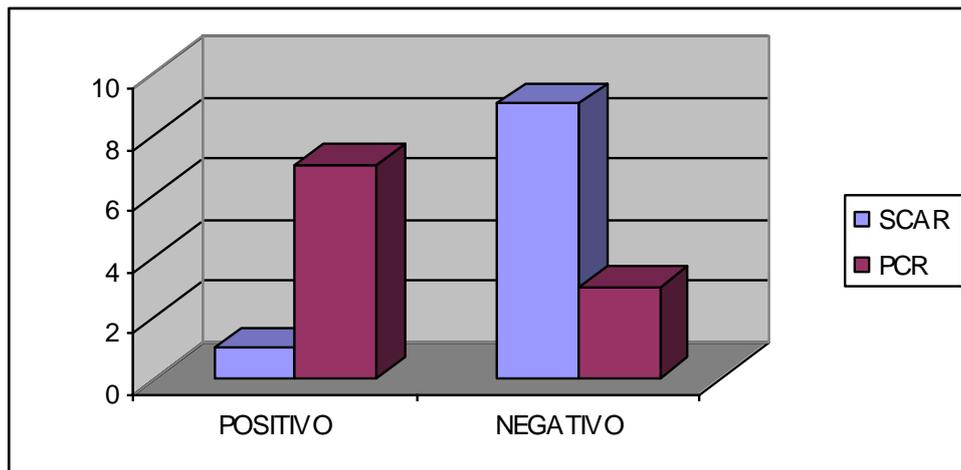
**Figura 3.14** Histograma que representa el número de variedades comerciales y silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR

Los datos descritos en la tabla 3.10, revela que para un total de 18 variedades de tomate, existen 15 resultados positivos y 3 resultados negativos para la amplificación por PCR, mientras que para la amplificación del marcador molecular SCAR existen, 6 resultados positivos y 12 resultados negativos. En el Histograma de la figura 3.14, se observa que los resultados positivos para la amplificación por PCR son mayores a los resultados positivos que se obtuvo con la amplificación del marcador molecular SCAR. Mientras existe mayor proporción de resultados negativos en la amplificación del marcador molecular SCAR que en la amplificación por PCR.

b) Número de individuos de las variedades silvestres que presentaron resultados positivos y negativos para el estudio de la variable SCAR (marcador molecular) y la variable PCR (amplificación).

**Tabla 3.11** Número de variedades silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.

	POSITIVO	NEGATIVO
SCAR	1	9
PCR	7	3



**Figura 3.15** Histograma que representa el número de variedades silvestres que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.

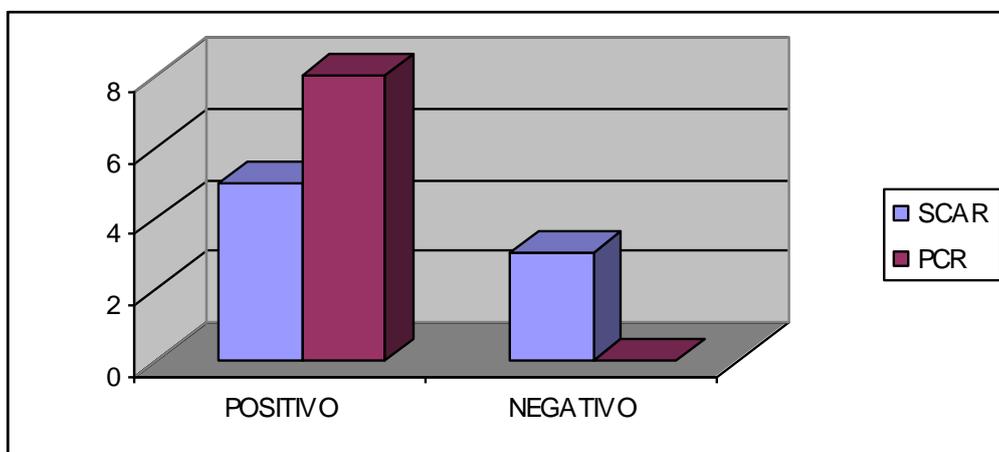
Los datos descritos en la tabla 3.11, revela que para las 10 variedades silvestres de tomate, existen 7 resultados positivos y 3 resultados negativos para la amplificación por PCR, mientras que para la amplificación del marcador molecular SCAR existen, 1 resultado positivo y 9 resultados negativos. En el Histograma de la figura 3.15, se observa que los resultados positivos para la amplificación por PCR son mayores a los resultados positivos que se obtuvo con la amplificación del marcador molecular SCAR.

Mientras existe mayor proporción de resultados negativos en la amplificación del marcador molecular SCAR que en la amplificación por PCR.

c) Número de individuos de las variedades comerciales que presentaron resultados positivos y negativos para el estudio de la variable SCAR (marcador molecular) y la variable PCR (amplificación).

**Tabla 3.12** Número de variedades comerciales que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR

	POSITIVO	NEGATIVO
SCAR	5	3
PCR	8	0



**Figura 3.16** Histograma que representa el número de variedades comerciales que presentaron resultados negativos y positivos al estudio de las variables SCAR y PCR.

Los datos descritos en la tabla 3.12, revela que para las 8 variedades comerciales de tomate, existen únicamente resultados positivos de todas las variedades para la amplificación por PCR, mientras que para la amplificación del marcador molecular

SCAR existen, 5 resultados positivos y 3 resultados negativos. En el Histograma de la figura 3.16, se observa que los resultados positivos para la amplificación por PCR son mayores a los resultados positivos que se obtuvo con la amplificación del marcador molecular SCAR. Mientras que sólo existe resultados negativos en la amplificación del marcador molecular SCAR.

### 3.6.2 Test exacto de Fisher y Chi cuadrado

Este test nos permitirá evaluar las probabilidades que se obtienen bajo la hipótesis nula de independencia de las dos variables que se están analizando (SCAR y PCR).

A continuación se propone la tabla de contingencia (Tabla 3.13) para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades totales que se utilizaron en este estudio.

**Tabla 3.13** Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en este estudio, tanto para la variable SCAR y la variable PCR.

<b>SCAR /PCR Crosstabulation</b>				
<b>Count</b>				
		<b>PCR</b>		<b>Total</b>
		<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>SCAR</b>	<b>Positivo</b>	6		6
	<b>Negativo</b>	9	3	12
<b>Total</b>		15	3	18

**Tabla 3.14** Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable SCAR y la variable PCR.

## Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
<b>Pearson Chi-Square</b>	1.800(b)	1	0.180		
<b>Fisher's Exact Test</b>				0.515	0.270

Distribución binomial

Resultados solo para tabla de 2x2

P=0.05

Los resultados obtenidos para la prueba del Chi cuadrado de 0.18 y test exacto de Fisher de 0.515 (Tabla 3.14), estos son altamente significativos, lo que indica que se debe aceptar la hipótesis de independencia entre las variables analizadas SCAR y PCR.

A continuación se adecuo la tabla de contingencia (Tabla 3.15) para realizar el estudio de la relación de dependencia o independencia que existe entre la variable (SCAR o PCR) y la variedad (silvestre o comercial).

Se presenta a continuación los cuadros en los que se realizó el test exacto de Fisher y la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades, con los resultados obtenidos para la variable SCAR.

**Tabla 3.15** Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en el estudio de la variable SCAR.

<b>SCAR /Variedad Crosstabulation</b>				
Count				
		<b>Variedad</b>		<b>Total</b>
		<b>Comercial</b>	<b>Silvestre</b>	
<b>SCAR</b>	<b>Positivo</b>	5	1	6
	<b>Negativo</b>	3	9	12
<b>Total</b>		8	10	18

**Tabla 3.16** Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable SCAR.

<b>Chi-Square Tests</b>					
	<b>Value</b>	<b>df</b>	<b>Asymp. Sig. (2-sided)</b>	<b>Exact Sig. (2-sided)</b>	<b>Exact Sig. (1-sided)</b>
<b>Pearson Chi-Square</b>	5.513(b)	1	0.019		
<b>Fisher's Exact Test</b>				0.043	0.032

Distribución binomial  
 Resultados solo para tabla de 2x2 P=0.05  
 P = 0.05

Los resultados obtenidos (Tabla 3.16) para la prueba del Chi cuadrado de 0.019 y test exacto de Fisher de 0.043, estos no son significativos e indican que se debe rechazar la hipótesis de independencia entre la variable SCAR y las variedades silvestres y comerciales.

A continuación se adecuo la tabla de contingencia (Tabla 3.17) para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en el estudio para la variable PCR.

Se presenta a continuación los resultados para el test exacto de Fisher y la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades con los resultados obtenidos para la variable PCR.

**Tabla 3.17** Tabla de contingencia para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado, tomando en cuenta las 18 variedades que se utilizaron en el estudio para la variable PCR.

		Variedad		Total
		Comercial	Silvestre	
SCAR	Positivo	8	7	15
	Negativo		3	3
Total		8	10	18

**Tabla 3.18** Resultados para el test exacto de Fisher y para la prueba del chi cuadrado en las 18 variedades estudiadas para la variable PCR.

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
<b>Pearson Chi-Square</b>	2.880(b)	1	.090		
<b>Fisher's Exact Test</b>				.216	.147

\* Distribución binomial

\* Resultados solo para tabla de 2x2

\* P = 0.05

Los resultados obtenidos (Tabla 3.18) para la prueba del Chi cuadrado de 0.090 y test exacto de Fisher de 0.216, los cuales son altamente significativos, e indican que se debe aceptar la hipótesis de independencia entre la variable PCR y las variedades silvestres y comerciales.

### 3.6.3 Test T para proporciones

Los resultados para este test, tomaron en cuenta la proporción entre el número de variedades comerciales y silvestres positivas para la variable SCAR (Tabla 3.18), lo mismo fue hecho con las variedades silvestres y comerciales positivas para PCR (Tabla 3.19).

**Tabla 3.19** Prueba T para proporciones para la variable SCAR en las variedades silvestres y comerciales.

SCAR	
V. Comerciales (%)	V. Silvestres (%)
62.5	10

**Tabla 3.20** Prueba T para proporciones para la variable PCR en las variedades silvestres y comerciales.

PCR	
V. Comerciales (%)	V. Silvestres (%)
100	70

En un total de 18 variedades, se puede realizar la proporción de amplificación tanto en las variedades comerciales con un 72% de resultados positivos y en las variedades silvestres con un 44% de resultados positivos.

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación se realizó en su totalidad con variedades de tomate (*Solanum lycopersicon*) silvestres y comerciales, debido a que esta es una de las plantas hortícolas más populares y más ampliamente cultivadas en nuestro país, ocupando el tercer lugar en producción a nivel nacional. Sin embargo, la falta de programas eficaces en materia de sanidad, la pérdida de las cosechas a causa de enfermedades han ocasionado que la extensión de este cultivo sea limitado; es por tal motivo que se ha realizado en las últimas décadas un mejoramiento genético clásico, el cual ha permitido obtener un gran número de nuevos cultivares con características deseables de resistencia, pero estos pueden llegar a ser poco efectivos por la rápida evolución y diseminación de patógenos resistentes.

Específicamente para el caso del virus del mosaico del tomate que se ha estudiado a lo largo esta investigación, los métodos tradicionales resultan poco efectivos, ya que el virus necesita multiplicarse en el interior de las células vivas hospederas utilizando sus mecanismos de replicación, transcripción y traducción a proteínas (Pecaut, 1965), por este motivo no es posible utilizar métodos directos como lo es los medios químicos, pues los productos que interfieren en la replicación del virus también lo hacen con la célula huésped, tampoco se dispone de agentes que permitan bloquear la adsorción y penetración del virus dentro de la célula vegetal (Rodríguez *et al.*, 1997); todos estos factores hacen más difícil su erradicación en el cultivo. Con el fin de obtener mejores resultados, se ha venido trabajando en los últimos años en técnicas modernas de biología molecular, y es precisamente alrededor de esta propuesta, donde este trabajo de investigación tiene su alcance e importancia, pues aporta con información valiosa para mejorar y optimizar el cultivo del tomate, ya que aplica técnicas biotecnológicas modernas que identifican cultivares en cuyo genoma este presente el gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate, con el fin de obtener plantas de alta calidad que aseguren una buena producción. Además, cabe recalcar que no existen trabajos previos relacionados a mejoramiento de tomate con marcadores moleculares tipo SCAR en el Ecuador, esta es una investigación pionera en su campo de aplicación y por lo tanto constituye la base para futuros estudios relacionados con el tema, con miras a promover una producción más sostenible que nos permita abrir nuestros mercados a nivel.

## **Extracción y cuantificación de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de las variedades comerciales y silvestres, basados en diferentes protocolos. Las variedades silvestres fueron tomadas de la colección del banco de germoplasma de la Universidad de Loja. En la visualización en gel de agarosa al 1% de los resultados de las diferentes extracciones de ADN con los 5 protocolos, se evidenció que el protocolo 5 del DNeasy mini kit (QIAGEN) no presenta residuos vegetales que podrían interferir en la amplificación, con un tiempo total de extracción de 2 horas; por otro lado, el protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP) presenta también una banda clara, con un tiempo de extracción de 6 horas. Sin embargo, es importante considerar que la diferencia de tiempo entre estos dos protocolos es de 4 horas, por lo que el protocolo 5 del DNeasy mini kit (QIAGEN) representa una gran ventaja para optimizar la técnica. Hay que considerar también el alto costo del DNeasy mini kit para la extracción de ADN, es por tal razón que si no existiese suficiente presupuesto para la compra del kit, se recomienda usar el protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP).

Con respecto a los otros 3 protocolos de extracción (protocolo 1 de Ferreira y Grattapaglia (1998), protocolo 2 de Morillo (1999) y el protocolo 3 modificado de Fulton ) al ser visualizados en gel de agarosa al 1%, no presentaron banda alguna, por lo que se podría suponer que estos protocolos son ineficientes para la extracción de ADN, sin embargo, una vez hechas las lecturas de cuantificación por fluorómetro de las muestras extraídas, se reflejan ciertos valores mínimos que indican presencia de ADN pero en concentraciones demasiado bajas para ser utilizadas en la amplificación por PCR (Tabla 3.1). Por otro lado, pese a que la técnica de los marcadores moleculares tipo SCAR no requieren de grandes concentraciones de ADN (Kasai *et al.*, 2000), en la mayoría de estudios realizados con este tipo de marcadores, la concentración más baja mostrada es de 10 ng/ $\mu$ l de ADN; al comparar esto con los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación, se observa que las cifras son muy parecidas, pues la mínima y máxima concentración de ADN con la cual se estandarizó la técnica fue de 8.4 ng/ $\mu$ l y 18.8 ng/ $\mu$ l respectivamente.

El proceso de extracción de ADN vegetal es más complicado que los llevado a cabo en células bacterianas o animales, pues requieren de la aplicación de fuerza física para lograr romper la membrana celular (Surzycki, 1999), con el fin de facilitar este

proceso se utilizó nitrógeno líquido para lograr homogenizar la muestra óptimamente. Como ya se lo explico en el capítulo II de Materiales y Métodos, en este trabajo de investigación se utilizaron dos clases de tejido vegetal, uno de hojas frescas para las variedades comerciales y otro de fruto seco para las variedades silvestres, entre las cuales existió diferencia en el proceso de maceración en el mortero con nitrógeno líquido. En el caso del tejido vegetal de hojas frescas fue fácil y la cantidad de hoja utilizada fue de aproximadamente 100 mg, y para el caso del material vegetal de fruto seco se necesitó más cantidad de tejido, aproximadamente 200 mg, ya que fue difícil homogenizar la muestra hasta llegar a conseguir un polvo fino y compacto, además que al momento de agregar el nitrógeno líquido se perdía pequeñas cantidades del macerado por lo que era necesario colocar más cantidad de fruto.

Pese a los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN para las variedades comerciales y silvestres, las cuales no varían mucho entre sí; se podría atribuir estos valores al uso del DNeasy mini kit para extracción, ya que este optimiza el proceso para obtener una concentración de 10 a 15 ng por cada 100 mg de tejido de tomate (ANEXO H), sin embargo, si se utiliza el protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP), resulta difícil obtener buena cantidad de sobrenadante en el paso lisis de la extracción, en el cual se utilizaron buffers de como el CTAB, sorbitol, EDTA y sarkosyl, que son compuestos que logran formar complejos con las proteínas y polisacáridos de la célula, este tipo de complejos son insolubles en agua y son removidos en el paso de centrifugación dejando el ADN en la fase líquida (Surzycki, 1999); pero es justamente en este paso donde la cantidad de líquido que se recolectó del sobrenadante fue mínima y dificultó el proceso de extracción, ya que la cantidad requerida era de 800  $\mu$ l y para el caso del tejido vegetal de fruto seco se logró en su mayoría solo 200  $\mu$ l.

La razón para el buen resultado obtenido con el protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP), podría deberse a que en el buffer de lisis utiliza una combinación de Sorbitol, Tris HCL, EDTA, NaCl, CTAB y Sarkosyl. Según Surzycki (1999), estos compuestos son considerados poderosos detergentes para lograr la lisis de la célula vegetal, pero sobretodo el Sarkosyl que puede desnaturalizar proteínas y solubilizar lípidos con mucha más eficacia. El EDTA además facilita el proceso de extracción, pues es un inhibidor de DNAsas muy efectivo y el aumento de la concentración de este podría mejorar los resultados.

Los valores de cuantificación obtenidos por el método del fluorómetro y del marcador High DNA mass ladder son similares y no presentan mayor cambio en cuanto a la concentración en ng/ $\mu$ l de ADN extraído, de acuerdo con los valores presentados (Tabla 3.2 y Tabla 3.3) en el apartado de resultados. La concentración final extraída de ADN varía en un rango desde los 10 ug/ $\mu$ l a los 20 ug/ $\mu$ l, lo cual entra en el rango de valores esperados de concentración de ADN especificadas en el manual del usuario del DNeasy Mini Kit (QIAGEN) (Ver anexo E), en el que se tiene valores que están cercanos a los descritos en esta investigación.

Los métodos utilizados para la cuantificación del ADN, fluorómetro y marcador High DNA mass ladder, resultan ser de gran eficiencia y no requieren de interpretaciones complicadas, además, la cantidad de ADN utilizada es mínima (aproximadamente 5  $\mu$ l de ADN), esto a diferencia de las mediciones hechas por espectrofotometría, que a parte de ser un método más caro pues se necesita de cubetas de cuarzo, requiere de una mayor cantidad de ADN para lograr lecturas reales de concentración.

### **Diseño de primers**

Como se explicó en el Capítulo II de materiales y métodos, se utilizaron dos programas para el diseño de primers en la secuencia del gen Tm-2 de resistencia al ToMV, el programa PRIMER 3, encontrado en el sitio WEB ([http://www.brad.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.brad.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)), proporciona varias combinaciones de oligonucleotidos, cuyas secuencias se acoplan adecuadamente al gen Tm-2, dando fragmentos de distintos tamaños. Este programa ha sido usado en otros estudios hechos para la detección de genes de resistencia utilizando marcadores SCAR en *Plasmodiophora brassicae* (Piao Z *et al.*, 2004) y en mapeo de secuencias de genes específicos como el Vf gen en manzana (Mingliang *et al.*, 2001). Sin embargo, el programa FAST-PCR para diseño de primers, creado [Dr. Ruslan Kalendar](#) de la Universidad de Helsinki, resulta ser más eficiente, puesto que especifica varias combinaciones de primers para la amplificación del gen Tm-2, e incluso indica cual es la calidad de cada uno de ellos. A diferencia del PRIMER 3, el FAST PCR, proporciona

un último resultado en el que selecciona de todas las opciones de pares de primers, uno solo como el más óptimo para la amplificación.

### **Amplificación por PCR y Marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>).**

Según el estudio hecho por Sobir en el año 2000, existen tres marcadores SCAR eficientes ligados al locus Tm-2, gen de resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), estos marcadores SCAR descritos como SCG09<sub>700</sub>, SCN13<sub>1000</sub>, SCE16<sub>900</sub>, resultan ser altamente homólogos entre ellos y las secuencias que amplifican son de 700 bp, 1000 bp y 900 bp respectivamente; los cuales no solo pueden ser utilizados para la detección del gen Tm-2, sino para el gen Tm-2<sup>2</sup> y otros alelos del Tm-2.

En el caso del presente trabajo de investigación, el marcador molecular utilizado fue el SCAR SCG09<sub>700</sub>, el cual posee un alto porcentaje de homología de su secuencia amplificada (98.88%) con las secuencias de las variedades utilizadas en la investigación de Sobir (2000), incluyendo en estas a *Solanum peruvianum* y otras líneas, de las cuales se conoce que son homocigotas para los genes de resistencia Tm-2 y Tm-2<sup>2</sup>. Esta es la principal razón del porque se empleó en el presente trabajo este marcador.

La temperatura óptima de annealing para la amplificación por PCR del gen Tm-2 de resistencia al ToMV, de acuerdo a la claridad de banda, es de 56°C (Fig 3.10), con buenos resultados también a 58°C, esto coincide con la temperatura de annealing dada en el programa Fast-PCR (Fig 3.4). Mientras que la temperatura óptima de annealing para la amplificación por el marcador molecular SCAR, de acuerdo a la claridad de banda, es de 62°C (Fig 3.6), con buenos resultados también a 60°C, tomando en cuenta en este punto que a la temperatura de 70°, la Taq polimerasa empieza a degradarse (Surzycki, 1999), por lo cual no se pudo variar en rangos mayores a las temperaturas de melting (Tm) calculadas, que fueron de 68°C para el primer reverse y 70°C para el primer forward.

### **Variedades resistentes al virus del mosaico del tomate**

Al inicio de la investigación se vio la necesidad de tomar un control positivo para las variedades comerciales y otro para las variedades silvestres, esto con el objetivo de comprobar los resultados que se obtenían con el resto de las variedades. Así que se tomó como control positivo en el caso de las variedades comerciales a la variedad ASTONA (resistente al TMV), cuyas características se describen en el capítulo II de materiales y métodos (Tabla 2.3); y para las variedades silvestres se tomó a *Solanum peruvianum* como nuestro control positivo, pues posee el gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate (Ohmori *et al.*, 1995). En base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se sabe que todas las variedades comerciales presentan resultados positivos para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2, lo cual significa que todas ellas son consideradas resistentes al virus del mosaico del tomate (ToMV).

Para la amplificación del fragmento de 700 pb correspondiente al marcador molecular SCAR, realizadas en las variedades comerciales, se presentaron resultados positivos para la amplificación en BHN C4599 100 CM 150103 (Vc5), BHN C5499 100 CM 150103 (Vc6), Tomate don Jose F1 lote# A94253 (Vc7), Tomate Syta F1 lote# B14109 (Vc8) y Astona (Vc2). Mientras que las tres variedades restantes Shaddy Lady (Vc1), Advantage (Vc3) y Flora Dade (Vc4) presentaron resultados negativos para la amplificación. Estas diferencias entre un resultado y otro, pueden deberse al hecho de que el marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), pese a estar íntimamente ligado al gen Tm-2 de resistencia al ToMV, pudo haber detectado otros alelos de este gen, o incluso detectar la presencia del gen Tm-2<sup>2</sup> (Sobir *et al.*, 2000), el cual es otro gen de resistencia al ToMV (Pelham, 1966; Ohmori *et al.*, 1998, 1995; Meshi *et al.*, 1989). Por lo que se podría suponer que las variedades BHN C4599 100 CM 150103 (Vc5), BHN C5499 100 CM 150103 (Vc6), Tomate don Jose F1 lote# A94253 (Vc7), Tomate Syta F1 lote# B14109 (Vc8) y Astona (Vc2), no únicamente tienen el gen Tm-2, sino también el gen Tm-2<sup>2</sup>, ambos de resistencia al ToMV; en consecuencia se obtendría una mayor probabilidad de que estas variedades no sean infectadas con este virus, pues dado el caso que existiese la presencia de síntomas de la infección en la planta, cualquiera de estos dos genes desataría la respuesta de hipersensibilidad, que evitaría la propagación de la infección al resto del cultivo. (Krush *et al.*, 1964; Pelham *et al.*, 1966; Schoroeder *et al.*, 1967; Hall *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1992; Ohmori *et al.*, 1995)

Con respecto a las variedades silvestres analizadas, únicamente la variedad *Solanum peruvianum* (control +), tuvo resultados positivos tanto para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2 como para la amplificación del marcador molecular SCAR, debido a que esta variedad posee el gen Tm-2 y Tm-2<sup>2</sup> de resistencia al ToMV (Ohmori *et al.*, 1995); mientras que las variedades *Solanum lycopersicon var. Ceraciforme* del Tungurahua y *Solanum pimpinellifolium* de Manabí, tuvieron resultados positivos únicamente para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2 y las variedades *Solanum lycopersicon var. Ceraciforme* del Perú, *Solanum pimpinellifolium* de Loja y *Solanum lycopersicon* del Napo, presentaron resultados negativos tanto para la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2 como para la amplificación del marcador molecular SCAR.

Las dos técnicas utilizadas para la detección del gen (Tm-2) de resistencia al virus del mosaico del tomate (amplificación del marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>,) y amplificación por PCR), presentaron resultados rápidos, fáciles de interpretar y reproducir, altamente estables y de gran confiabilidad, por lo que pueden ser consideradas altamente eficientes. Pues no solo se puede detectar el gen Tm-2 y sus alelos, sino el gen Tm-2<sup>2</sup> o también podría relacionarse con la detección de un grupo de locis que proporcionan a la planta la resistencia al virus del mosaico del tomate

### **Diseño estadístico**

Se realizó varias pruebas estadísticas en las que se incluyó al Test exacto de Fisher, Chi cuadrado y prueba T para proporciones, para encontrar si existe una relación de independencia o dependencia entre las dos variables utilizadas (amplificación con el marcador molecular SCAR y la amplificación del fragmento de 342 pb del gen Tm-2, probado en las 18 variedades de tomate.

Según los valores presentados en las pruebas del Test exacto de Fisher y Chi cuadrado (Tabla 3.14), existe total independencia entre los resultados obtenidos de la amplificación por PCR (detección del fragmento de 342 pb del gen Tm-2) y de la

amplificación con el marcador molecular SCAR (detección del fragmento de 700 pb ligado al gen Tm-2), estas dos variables son altamente significativas, es decir, diferentes y no presentan resultados que las relacione entre sí.

Al realizar las pruebas del test exacto de Fisher y la prueba de chi cuadrado (Tabla 3.16) para identificar si existe alguna relación entre la variedad (comercial o silvestre) y los resultados obtenidos con la prueba de amplificación por PCR (detección del fragmento de 342 pb del gen Tm-2), revelan que estas son independientes entre sí, estas dos variables son altamente significativas. Por el contrario al realizar el test exacto de Fisher y la prueba del Chi cuadrado (Tabla 3.18), entre la variedad (comercial o silvestre) y la prueba de la amplificación con el marcador molecular SCAR (detección del fragmento de 700 pb ligado al gen Tm-2), presentan dependencia entre sí, estas dos variables no son significativas, es decir es decir, este marcador SCAR esta relacionado con la variedad, esto explica el por qué únicamente existe amplificación de *Solanum peruvianum* en las variedades silvestres. Sin embargo, si se ampliara el número de variedades silvestres en una investigación

Existe un mayor porcentaje (72%) de resultados positivos en las amplificaciones por SCAR y PCR en las variedades comerciales que en las silvestres (44%), esto puede deberse al hecho que las variedades comerciales fueron tomadas de semillas que son distribuidas en casas comerciales autorizadas, y que poseen ciertas características de resistencia a varias enfermedades o son producto del cruce con otras de la misma especie que han sido mejoradas, mientras que la variedades silvestres no han sido producto de ningún tipo de mejoramiento y su origen es natural.

Es importante mencionar que el número de individuos estudiados durante este trabajo de investigación fue de 18, una cantidad suficiente para cumplir con los objetivos que se propusieron en este trabajo de investigación. Sin embargo, es necesario que en posteriores trabajos se establezcan conclusiones que se apliquen a un rango más amplio de variedades, sobretodo para el caso de las variedades silvestres. Además, se podría suponer que las especies familiarmente cercanas a *Solanum peruvianum*, tendrán mayor probabilidad de tener en su genoma los genes de resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV).

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

- El uso del DNeasy mini Kit facilita el proceso de extracción de ADN, simplificando tiempo y aumentando el rendimiento de concentración de ADN en un rango de 10 a 20 ng/ul, a partir de 100 mg de hojas frescas y de 200 mg de fruto seco.
- Los métodos de cuantificación de ADN tales como; el fluorómetro y Marcador High DNA mass ladder, son fáciles de manejar e interpretar, además de que aumentan la eficiencia para encontrar la concentración del DNA extraído, sin recurrir a la cuantificación por espectrofotometría, el cual es más costoso y requiere de mayor cantidad de ADN.

- El programa FAST PCR resulta eficiente en el diseño de primers, pues proporciona varias posibles combinaciones de estos y especifica cual de ellos es el más adecuado para la amplificación del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate, las secuencias tomadas fueron: 5'ggatatcgattggctccaga3' para el primer forward y 5'gttctgctggatcggagaag3' para el primer reverse, que proporcionan un amplicon de 342 pb.
- Las concentraciones óptimas tanto para la amplificación por PCR del gen Tm-2 de resistencia al ToMV como para la amplificación por el marcador molecular SCAR (SCG09<sub>700</sub>), del fragmento de 700 pb ligado al gen Tm-2, son: de MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 100 μM de dNTPs, 10 pM de primer, 1 U de taq polimerasa, para un volumen final de reacción de 25 μl.
- Las condiciones en el programa del termociclador para la amplificación por PCR del gen Tm-2 de resistencia al ToMV son: temperatura de denaturación de 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 92°C por 45 segundos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y un 72°C por 1 minuto para la temperatura de extensión final.
- Las condiciones en el programa del termociclador para la la amplificación por el marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub>, del fragmento de 700 pb ligado al gen Tm-2 son: temperatura de denaturación de 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 92°C por 45 segundos, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto para la temperatura de extensión final.
- La técnica de amplificación del marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub> para la detección del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del tomate, no requiere de altas concentraciones de ADN, estas van en un rango de 10 a 20 ng/ul.
- Las variedades comerciales Shaddy Lady, Advantage, Flora Dade (Vc4), Astona, BHN C4599 100 CM 150103, BHN C5499 100 CM 150103, Tomate don Jose F1 lote# A94253, Tomate Syta F1 lote# B14109 y Las variedades silvestres *Solanum lycopersicon var. Ceraciforme* del Tungurahua y las 4

variedades de *Solanum pimpinellifolium* de Manabí, poseen el gen Tm-2, por lo que son resistentes al virus del mosaico del Tomate (ToMV), detectado por la técnica de amplificación por PCR.

- El marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub>, puede detectar también otros locus relacionados al gen Tm-2 e incluso el gen de TM-2<sup>2</sup>, que es otro gen relacionado con la resistencia al virus del mosaico del tomate, por lo que puede ser considerado un marcador altamente eficiente y de amplio uso.
  
- Posiblemente las variedades comerciales Astona, BHN C4599 100 CM 150103, BHN C5499 100 CM 150103, Tomate don Jose F1 lote# A94253, Tomate Syta F1 lote# B14109, tengan no únicamente el gen Tm-2, sino el gen Tm-2<sup>2</sup>, ambos relacionados con la resistencia al virus del mosaico del tomate, pues presentan resultados positivos tanto para la amplificación por PCR del gen Tm-2 de resistencia al ToMV, como para la amplificación por el marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub>, también ligado al gen Tm-2<sup>2</sup>.
  
- No se puede atribuir únicamente a un solo gen la respuesta de hipersensibilidad y la resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV), pues aun no está claro cuántos genes contiene el locus Tm-2 o si la resistencia al virus es también causada por el gen Tm-2<sup>2</sup>.
  
- Los resultados presentados en el Test exacto de Fisher y prueba del Chi cuadrado, evidencian que las pruebas de la amplificación hecha por PCR del gen Tm-2 y la hecha con el marcador molecular SCAR son altamente significativas, es decir los resultados en cada una son totalmente independientes.
  
- El marcador molecular SCAR SCG09<sub>700</sub>, está ligado a la variedad, de acuerdo a las pruebas del test exacto de Fisher y Chi cuadrado.

## **CAPITULO 6**

### **RECOMENDACIONES**

- El uso de un Kit de extracción (DNeasy Mini Kit (QIAGEN)) en este trabajo de investigación facilitó la estandarización de la técnica, pero en caso de no contar con los recursos monetarios necesarios para la adquisición de este, es recomendable utilizar la técnica del protocolo 4 del Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Esta investigación, detectó la presencia o ausencia del gen Tm-2 de resistencia al virus del mosaico del Tomate a nivel molecular, esto debería ampliarse en un futuro estudio comprobando en campo y mediante la inoculación del virus en las variedades estudiadas, si estas responden a la presencia del virus y manifiestan la respuesta de hipersensibilidad que se espera en las variedades catalogadas resistentes.
- Se recomienda que cualquier técnica que sea utilizada en el laboratorio, la cual requiera del uso del termociclador, tenga en cuenta el precalentado del aparato de 30 minutos a 1 hora antes de usarlo.

- Para lograr homogenizar cualquier tipo de muestra vegetal y lograr romper efectivamente las paredes celulares, se recomienda el uso del nitrógeno líquido.
- La técnica de extracción de ADN, por cualquiera que fuera el método a utilizar, resulta más eficiente si se la hace con hojas jóvenes frescas, por la facilidad al momento de triturar la muestra.

## CAPITULO 7

### BIBLIOGRAFIA

1. Acquaah, G. (1992). Practical electrophoresis for genetic research. Portland: Discorides Press.
2. AVRDC. (2004) Tobacco mosaic virus (pepper diseases). The World vegetable center – Fact sheet. Publication 04 -594.
3. Barry, J., y Miller, W. (2002). A 21 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 99:11133-11138.
4. Bayer Crop Science. (2005) Recomendaciones para su cultivo de tomate. Alemania: Autor. Extraído el 12 de Enero, 2007, de: [http://sia.huaral.org/sia\\_uploads/ec06355af5fedeeef1ec61030822a9a09/Li To\\_mate Bayer.pdf](http://sia.huaral.org/sia_uploads/ec06355af5fedeeef1ec61030822a9a09/Li_To_mate_Bayer.pdf)
5. BCE. (2005) Banco Central del Ecuador, Información Central-Proyecto Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería-Ecuador. Cifras provisionales acumuladas de enero a noviembre.

Quito: Autor. Última actualización 24/01/2005. Extraído el 20 de Febrero, 2007, de: [www.bce.com](http://www.bce.com).

6. Berkelman, T., Stenstedt, T. (1998). Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
7. Caetano, G., Gresshoff, P. (1997). DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. (pp. 353)Ed. Wiley-Liss Inc USA.
8. Comisión Europea sobre medio ambiente en los países en desarrollo. (2005). Producción sostenible de tomate. Un breviario para el MIP en proyectos destinados a los países en desarrollo, con financiamiento presupuestario de la DG de Desarrollo para programas de la comisión europea. Reseña sobre manejo de plagas N° 13, Europa: Autor.
9. Dax, E., Livneh, O., Aliskevicius, E., Edelbaum, O., Kedar, N., Gavish, N., Milo, J., Geffen, F., Blumenthal, A., Rabinowich, H., Sela, I. (1998). A Scar marker to the ToMV resistance gene, Tm2<sup>2</sup>, in tomato. Euphytica,101, 73-77.
10. Derrick, P., Barker, H., Oparka, K. (1992). Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. The Plant Cell, 4, 1405-1412.
11. Diaz, G. (2003). Marcadores moleculares: Qué son? Como se obtiene? Para qué valen?, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. Málaga-España. P 1-3. Extraído el 6 de noviembre, 2006, en: [www.ndsu.nodak.edu/insctruct/mcclean/plsc431/markers/](http://www.ndsu.nodak.edu/insctruct/mcclean/plsc431/markers/) y [opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html](http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MG01.html).
12. Fannin, F., y Shaw, J. (1987). Evidence for concurrent spread of tobacco mosaic virus from infected epidermal cells to neighboring epidermal and mesophyll cells. Plant Sci, 51, 305-310.

13. Fernández, V. (1969) Introducción a la fitopatología-VIRUS. Buenos Aires: I.N.T.A.
14. Ferreira, M., y Grattapaglia, D. (1995). Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia: EMBRAPA.
15. Giovanucci, E. (1999). Lycopene. Asociación para la Investigación contra el Cáncer de Estados Unidos- Facultad de Medicina de Harvard. Boston-Estados Unidos.
16. Green, S., y Wang, T. (2001). Tomato (tobacco) mosaic virus. AVRDC: International Cooperators Fact Sheet.
17. Hamilton, A., y Baulcombe D. (1999). A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. Science, 286, 950-952.
18. Hammond, K., y Jones J. (2000). Responses to plant pathogens. En. p. 1102-1156. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of plants. Maryland: American Society of Plant Physiology.
19. Hall, J. (1966). Resistance al the Tm-2 locus in tomato to tomato mosaic virus. Euphytica, 29, 189-197.
20. Helling, R., Goodman, H., Boyer, H. (1974). Analysis of endonucleasas R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarosa gel electroforesis. J Virol. 14, 1235.
21. Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., Martin, A. (1999). Development of SCAR markers in olive(*Olea europea*) by direct secuencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. Theor Appl Genet, 101, 788-791.

22. Holmes, F. (1957). True-breeding resistance in tomato to infection by tobacco-mosaic virus. Phytopathology, 47, 16-17.
23. Infoagro, información agropecuaria por internet. (2005). El cultivo del tomate. P 5-8. Extraído el 20 de Agosto, 2006, de:  
<http://canales.hoy.es/canalagro/datos/hortalizas/tomate.htm>
24. IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para el estudio de diversidad genética de plantas, P 23-26.
25. Jacques, D. (2002). Tomato diseases. Departmental electronic publication of Agriculture and agri-food Canada. Última modificación: 2002 – 07 – 10. Extraído el 15 de Agosto, 2006, de:  
[http://www.agr.gc.ca/cal/epub/1479e/1479-0025\\_e.html#plateII](http://www.agr.gc.ca/cal/epub/1479e/1479-0025_e.html#plateII).
26. Kasai, K., Marikawa, Y., Sorri, V., Valkonen, J., Gebhart, C., Watanabe, K. (2000). Development of SCAR markers to the PVY resistance gene RYadg based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome, 43, 1-8.
27. Khush, G., Rick, C., Robinson, R. (1964). Genetic activity in a heterochromatic chromosome segment of the tomato. Science, 145, 1432-1434.
28. Krawetz, S., Pon, R., Dixon, G. (1989). Increased efficiency of the Taq polymerase catalysed polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 17, 8
29. Lanfermeijer, F., Dijkhuis, J., Sturre, M., de Haan, P., Hille, J. (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm<sup>2</sup> from *Lycopersicon esculentum*. Plant Molecular Biology, 52, 1037-1049.

30. Lanfermeijer, F., Warmink, J., Hille, J. (2005). The products of the broken Tm-2 and the durable Tm2<sup>2</sup> resistance genes from tomato differ in four amino acids. Journal of experimental Botany, 421, 2925-2933.
31. MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería.). (2005). Tomate de mesa (riñon). P 3-33. Extraído el 20 de Mayo, 2007, de [www.sica.gov.ec](http://www.sica.gov.ec).
32. Manoj, P., Bannerjee, N., Ravichandran, P. (2000). Development of sex-associated SCAR markers in *Piper longum* L. Issue, 141, 44-50.
33. Martinez, V. (2007). Antioxidantes – el mundo de las plantas. Extraído el 10 de junio, 2007, de [www.botanical-online.com](http://www.botanical-online.com).
34. Mas, E., Poza, J., Ciriza, J. (2001). Fundamento de la reacción en cadena de la Polimerasa. Revista Acuatic No. 15.
35. Meshi, T., Motoyoshi, F., Atsuko, A., Watanabe, Y., Takamatsu, N., Okada, Y. (1988). Two contaminant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus CONFER the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, Tm-1. The EMBO Journal, 6, 1575-1581.
36. Meshi, T., Motoyoshi, F., Maeda, T., Yoshiwoka, S., Watanabe, H., Okada, Y. (1989). Mutations in the Tobacco virus 30kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. The plant Cell, 1, 515-522.
37. Mingliang, X., Huaracha, E., Korban, S. (2001). Development of sequence-characterized amplified region (SCAR) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. Genome, 44, 63-70.
38. Moser, O., Gagey, M., Godefroy, T., Stussu, C., Ellwart, M., Nitschko, H., Mundry, K. (1988). The fate of the transport protein of tobacco mosaic virus in systemic and hypersensitive tobacco hosts. J. Gen Virol, 69, 1367-1373.

39. Motoyoshi, F., y Oshima, N. (1977) Expresión of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts. J. Gen Virol, 34, 499-506.
40. Murillo, I., Estrella, P., Erazo, N., Peralta, E. (2005). Mejoramiento genético del fréjol común. Asistido por marcadores moleculares. REDBIO-INIAP.
41. Ohmori, T., Murata, M., Motoyoshi, F. (1995). Identification of RAPD markers linked to the Tm-2 locus in tomato. Theor Appl Genet, 90, 307-311.
42. Ohmori, T., Murata, M., Motoyoshi, F. (1998). Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. Theor Appl Genet, 41: 156-159.
43. Paran, I., y 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.
44. Pavlov, A., Pavlova, N., Kozyavkin, S., Slesarev, A. (2004). Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. Trends Biotechnol, 22, 253-260
45. Pecaut, P. (1965). Tomate. II. Resistance au virus de la mosaïque du tabac(TMV). Rep Station d' Amel des Plantes Maraicheres(INRA), 1964, 50-53.
46. Pelham J. (1966) Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. Euphytica, 15, 258-267.
47. Pennington, T. (1996). Molecular Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Comparison with That by Bacteriophage Typing. J.Clin. Microbiol. 34, 959-961.

48. Pflieger, F., Zeyen, G. (1991). Tomato Tobacco mosaic virus. Plan Pathology, FS-01168.
49. Piao, Z., Deng, Y., Choi, S., Park, Y., Lim, Y. (2004). SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plamodiophora brassicae* in chinese cabbage (*Brassica rapa spp. Pekinensis*). Theor appl genet, 108, 1458-1465.
50. Rast, A. (1975) Variability of mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistance breaking and cross protection. Agric.Res, 834, 76.
51. Rodríguez, R., Tabares, J., Medina J. (1997) Cultivo moderno del Tomate Madrid-España.
52. Rueda, R. (2002) Botánica sistemática. Quito: Grupo Compunor.
53. Sambrook, J., y Ruseell, D. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. New York: CSHL press.
54. Scheef, E., Casler, M., Jung, G. (2003). Development of Species-Species SCAR Markers in Bentgrass. Crop Sci, 43, 345-349.
55. Schroeder, W., Provividenti, R., Robinson, R. (1967). Incubation temperature and virus strains important in evaluating tomato genotypes for tobacco mosaic virus reactions. Euphytica, 15, 258-267.
56. Shaw, P., Wang, J., But, P., Ha, W., Yau, F. (2004). Sequence characterized amplified region(SCAR) test for the authentication of traditional Chinese medical material. The Chinese university of Hong Kong.
57. Skoog, H. (1995). Principios de análisis instrumental. Estados Unidos: Nieman MC Graw Hill.

58. SICA. (2002) Servicios de Informacion de Censos Agropecuarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería-Ecuador. P 3-33. Extraído el 13 de Agosto, 2006, de: [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/hortalizas/tomate/tomate\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/hortalizas/tomate/tomate_mag.pdf).
59. Sobir, T., Ohmori, M., Murata, F., Motoyoshi, F. (2000). Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the Tm-2 locus of the genus *Lycopersicon*. Theor Appl Genet, 101, 64-69.
60. Smith, A. (1994). The tomato in America : early history, culture, and cookery. University of South Carolina. USA: Columbia, S.C.
61. Stange, C. (2006) Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. Cien. Inv. Agr, 33, 3-21.
62. Surzycki, S. (1999) Basic Techniques in Molecular Biology. Bloomington: Springer Lab Manual.
63. Tanksley, S., Ganai, M., Prince, J., de Vicente, M., Bonierbale, M., Broun, P., Fulton, T., Giovannoni, J., Grandillo, S., Martin, G., Messeguer, R., Millar, J., Paterson, A., Pineda, O., Roder, M., Wing, R., Wu, W., Young, N. (1992). High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics, 132, 1141-1150.
64. Turón, J., Pérez, M. (1997) Enciclopedia de la Agricultura. Barcelona-España.
65. Valiente, J. (2003). Virosis en cultivo hortícola. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Estación experimental Concepción del Paraguay. Año II-Nº 77.

66. Villaman, F. *Caracterización de microsátélites de Solanum tuberosum Subs. Tuberosum y en las otras especies de para cultivada*. Tesis para optar Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM, Lima- Perú (2000)
67. Watabnabe, Y., Kishibayashi, N., Motoyoshi, F., Okada, Y. (1987). Characterization of Tm-1 gene action on replication of common isolates and a resistance – breaking isolates of TMV. Virology, 161, 527-532.
68. Weber, H., Schutze, S., Artur, J.P. (1993). Two amino acid substitutions in the Tomato Mosaic Virus 30 Kilodalton movement protein confer the ability to overcome the Tm-2 resistance gene in the tomato. Virology, 67, 6432-3438.
69. Willar, L., Merrit, J., Dean, F. (1990). Métodos instrumentales de análisis. Estados Unidos: Editorial iberoamérica.
70. Yap, E., Mcgee, J. (1991). Short PCR product yield improved by coger denaturation temperaturas. Nucleic Acids Research 19, 1713.
71. Yiping, Z., John, R., Stommel R. (2001). Development of SCAR and CAPS markers linked to the beta gene in tomato. Crop Sci 41, 1602 – 1608.

