

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**BÚSQUEDA DE LOS GENES DE RESISTENCIA *Mi-1* Y
Mi-3 AL NEMÁTODO FORMADOR DE NUDO
MELOIDOGYNE SPP. EN VARIAS ESPECIES
SILVESTRES DE LA FAMILIA *SOLANCEAE* DEL
ECUADOR**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

SANTIAGO ZÁRATE BACA

SANGOLQUÍ, 27 de Mayo de 2008

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

Los cultivos comerciales solanáceos como la naranjilla (*Solanum quitoense*), tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*), papa (*Solanum tuberosum*), pepino dulce (*Solanum muricatum*) y algunas variedades de ajíes (*Capsicum* spp.) tienen un notable impacto en la economía de los agricultores de la región andina, estos cultivos son muy cotizados internacionalmente por las propiedades de sus frutos en la industria de pulpas y conservas (CIAT, 2006). La naranjilla, por ejemplo, tiene una producción masiva en las estribaciones externas de la cordillera oriental y llanura amazónica de nuestro país (INIAP, 2003). Para el año 2002 se reportaron 8000 hectáreas cultivadas de naranjilla (INEC, 2002). De igual forma, el tomate riñón, otro cultivo importante, en la actualidad tiene una superficie cultivable de 4088 hectáreas (MAG, 2005), mientras que, el tomate de árbol llega a las 5000 hectáreas (Cadena, 2000).

A pesar del incremento de la superficie cultivable, su producción se ha visto disminuida especialmente por el ataque del nemátodo formador de nudo *Meloidogyne incognita* (Valarezo y Samaniego, 1982), que impide el desarrollo normal de la planta y limita la absorción de nutrientes del suelo. En cultivos de tomate de árbol y naranjilla el problema es aun más complejo, dado que existe una alta incidencia de *Meloidogyne* en aparente interacción con *Fusarium* sp. El Ecuador estima pérdidas del 90% en rendimiento de cultivo en tomate de árbol y cerca del 30% en naranjilla a causa de *Meloidogyne incognita* (Revelo, 2003). A nivel mundial, en cambio, se han registrado pérdidas anuales de 100 billones de euros en alrededor de 3000 plantas hospederas para este nemátodo (Abad *et al.*, 2003).

Varios han sido los mecanismos empleados para contrarrestar la disminución de la producción en los cultivos, sin embargo, el método químico predomina por el bajo

costo y accesibilidad. Actualmente, la Biotecnología por medio de nuevas técnicas moleculares, está en constante búsqueda de genes para el control y resistencia de plagas (Pagliano, 2002). Se han descrito algunos genes: *Mi-1* (Milligan *et al.*, 1998) y *Mi-3* (Yaghoobi *et al.*, 1995) presentes inicialmente en tomate silvestre (*S. peruvianum*) e introducidos por cruce en tomate cultivable (*S. lycopersicum*); y, *Mi-9* en la especie *Solanum arcanum* (Jablonska *et al.*, 2007), como los responsables de conferir resistencia natural al nemátodo formador de nudo *Meloidogyne* spp. en cultivos solanáceos (Williamson *et al.*, 1994; Kaloshian *et al.*, 1998; Ammiraju *et al.*, 2003).

Con el fin de tener variedades resistentes a nemátodos y aptas para el consumo humano es necesario plantear acciones urgentes y de trabajo conjunto entre investigadores y agricultores, desarrollando nuevas técnicas que brinden la posibilidad de trabajar con cultivos de alta calidad para el bien de la comunidad y la conservación del medio ambiente.

1.2. Justificación del Problema

La región andina constituye un centro de domesticación de varios cultivos solanáceos de importancia económica como la papa, el tomate riñón, la naranjilla, el tomate de árbol y algunas variedades de ajíes. Para los agricultores ecuatorianos representan una fuente continua de ingresos debido a que son plantas de ciclo corto (CIAT, 2006).

A pesar de que el área de cultivo se ha extendido por varias zonas del país, su productividad no se ha incrementado en la misma proporción. La causa principal tiene que ver con problemas fitosanitarios, el más importante es debido al ataque del nemátodo formador de nudo *Meloidogyne* spp. (Valarezo y Samaniego, 1982; Revelo, 2003), que impide la normal absorción de nutrientes del suelo, disminuyendo el rendimiento y la vida útil del cultivo (Abad *et al.*, 2003).

Actualmente, se han destinado varios mecanismos para controlar la plaga, tanto físicos (injertación, poda y rotación de cultivos) como químicos (nematicidas). Lamentablemente, no se han conseguido resultados satisfactorios, por el contrario, el

empleo de químicos es cada vez mayor provocando contaminación del producto y del medio ambiente (Revelo, 2003).

A fin de reducir estos problemas, la Biotecnología, busca identificar factores genéticos de resistencia natural en especies silvestres para incursionar en planes de mejoramiento vegetal. Algunas investigaciones describen que especies silvestres de la familia solanácea, especialmente en las secciones *Lasciocarpa* (Revelo, 2003) y *Lycopersicon* (Yaghoobi *et al.*, 1995), poseen resistencia natural al nemátodo. En algunos casos, esta respuesta es producto de una proteína traducida del gen *Mi-1*, que reconoce una molécula elicitora del patógeno y desencadena en la planta una reacción de hipersensibilidad que evita la proliferación de la plaga (Williamson *et al.*, 1994; Milligan *et al.*, 1998). Investigaciones recientes mencionan la presencia de los genes homólogos *Mi-9* (Jablonska *et al.*, 2007) y *Mi-3* (Yaghoobi *et al.*, 2005), con la misma respuesta biológica de resistencia a *Meloidogyne* que *Mi-1* (Kaloshian *et al.*, 1998; Veremis *et al.*, 1999; Ammiraju *et al.*, 2003).

Por tal razón, la presente investigación desarrollará las bases de un trabajo de mejoramiento de cultivos comerciales solanáceos, buscando el progreso de la economía del sector agrícola del país y la región andina, una mejor calidad de vida de las personas con productos libres de químicos y un medio ambiente menos contaminado.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Identificar los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3* para el nemátodo formador de nudo *Meloidogyne* spp. en entradas silvestres de solanáceas del Ecuador.

1.3.2. Objetivos Específicos

- 1.3.2.1.** Implementar y estandarizar un protocolo de extracción de ADN para solanáceas.

- 1.3.2.2. Estandarizar y optimizar la técnica molecular PCR para la detección del fragmento correspondiente a la región exónica del gen de resistencia *Mi-1*.
- 1.3.2.3. Estandarizar y optimizar la técnica molecular PCR para la detección del fragmento correspondiente a la región intrónica del gen de resistencia *Mi-1*.
- 1.3.2.4. Identificar la presencia del marcador PCR TG180 que se encuentra ligado al gen de resistencia *Mi-3*.
- 1.3.2.5. Identificar la presencia del marcador PCR N22R que se encuentra ligado al gen de resistencia *Mi-3*.
- 1.3.2.6. Secuenciar el fragmento de la región exónica de las entradas silvestres de solanáceas que contienen los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3*.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Cultivos Solanáceos

1.4.1.1. Generalidades de la familia *Solanaceae*

La familia *Solanaceae* dentro de las angiospermas constituye un grupo importante para la vida del hombre. Varias especies de esta familia se destinan como alimentos: papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), naranjilla (*Solanum quitoense*), pepino (*Solanum muricatum*); como drogas y fuente de solanina, daturina y estramonina: tabaco (*Nicotiana tabacum* y *rustica*), floripondio (*Brugmansia aurea*) y guanto (*Brugmansia sanguinea*); y, como ornamentales: petunia (*Petunia hybrida* hort) y flor mariposa (*Schizanthus pinnatus* Ruiz & Pavón) (Knapp *et al.*, 2004).

Actualmente, la familia *Solanaceae* cuenta con 90 géneros y cerca de 3000 a 4000 especies (Cuadro 1.1). Alrededor de la mitad de esta familia se ubican en el género *Solanum*, haciéndolo representativo entre las angiospermas tanto por su diversidad como por su utilidad. Miembros de esta familia habitan en desiertos, valles templados o bosques tropicales en un amplio rango de plantas herbáceas anuales, arbustos o árboles

y con una infinita variación morfológica en flores y frutos. La diversidad a nivel de género y de especies está concentrada en los Andes de América del Sur, constituyendo un área de riqueza genética en relación al resto del mundo (Solanaceae Source, 2008).

Cuadro 1.1 Géneros actuales y representativos de la familia *Solanaceae*. Se indica el número aproximado de especies dentro de cada género de solanáceas.

Género	Nº aproximado de especies
Solanum	1000 - 2000
Cestrum	250
Lycianthes	250
Nolana	80
Physalis	75
Lycium	75
Nicotiana	70
Brunfelsia	45

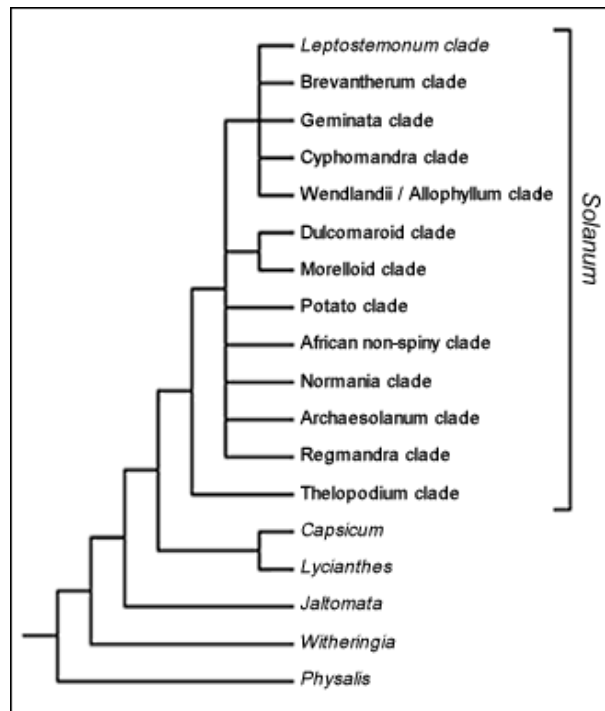
Fuente: Solanaceae Source, 2008

El último trabajo completo de taxonomía realizado en esta familia terminó hace un siglo, los siguientes trabajos fueron orientados a pequeños grupos representativos de interés comercial. Actualmente, se trabaja en el Proyecto Inventario Planetario de Biodiversidad: *Solanum* (PBI) que busca realizar una filogenia exhaustiva de esta familia utilizando herramientas moleculares (Knapp *et al.*, 2004). Estudios recientes han vinculado a *Solanaceae* las familias: *Nolanaceae* (Nolana), *Goetzeaceae* (Goetzea, Henoonia, Espadaea, Coeloneurum), *Duckeodendraceae* (Duckeodendron), *Sclerophylacaceae* (Sclerophylax) (Solanaceae Source, 2008).

1.4.1.2. El género *Solanum*

Es el género más representativo de la familia *Solanaceae* (1000 – 2000 especies) y uno de los más grandes en la división Magnoliophyta. *Solanum* pertenece a la extensa y compleja tribu *Solaneae* de la subfamilia *Solanoideae*. Este género fue dividido en 70 subgéneros de acuerdo sistema de D'Arcy. (D'Arcy, 1991). Bohs (2004), identificó trece clados emblemáticos mediante el estudio molecular de secuencias ndhF

en cloroplastos dentro de *Solanum*, tal como se ilustra en la Figura 1.1. Datos adicionales procedentes de análisis con marcadores nucleares en taxones más grandes están corroborando la investigación publicada por Bohs (Solanaceae Source, 2008).



Fuente: Solanaceae Source, 2008

Figura 1.1 Esquema de los clados actuales y representativos del género *Solanum* obtenidos mediante análisis molecular de secuencias *nhdF* de cloroplastos en especies solanáceas.

A nivel mundial el género *Solanum* se distribuye ampliamente en el continente Americano donde el mayor remanente de especies se ubican en los Andes Sudamericanos. En menor proporción están en México, Estados Unidos, América Central, Brasil oriental, India occidental y Madagascar. Esta heterogénea distribución pone de manifiesto la diversidad de hábitats donde se desarrollan las especies de éste género.

Desde el punto de vista biológico, el género *Solanum*, exhibe una amplia diversidad morfológica y reproductiva que ha permitido a los científicos seleccionar varias especies para entender interrogantes biológicas, entre ellas el estudio evolutivo de la forma de las hojas (Sinha, 1997; Bharathan *et al.*, 2002); morfología y química de frutos (Knapp, 1986; Cipollini *et al.*, 2002); evolución vegetal, auto incompatibilidad y poliploidia (Bell & Dines, 1995; Richman & Kohn, 2000; Stone, 2002), entre otros.

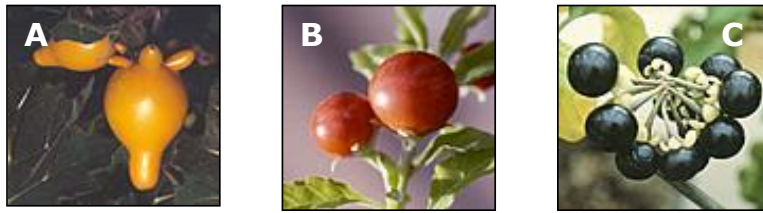
Las especies de este género se caracterizan por tener flores pentámeras, como se aprecia en la Figura 1.2, que pueden ser solitarias o inflorescencias escorpiodes y están provistas de una corola rotácea (Rueda, 2003), la porosidad de sus anteras dehiscentes permite que en las flores se lleve el fenómeno de polinización por insectos. Su follaje es variado en forma, tamaño, distribución axial, pubescencia y en presencia o ausencia de espinas o brácteas.



Fuente: Solanaceae Source, 2008.

Figura 1.2 Fotografías de algunas flores de especies solanáceas. Son pentámeras y de corola rotácea, provistas de diversos colores y pueden estar tanto de forma solitaria: A) *Solanum inelegans* y B) *Solanum macbridei*; como de forma de inflorescencia: C) *Solanum peruvianum*.

El fruto en baya es característico de *Solanum* (Figura 1.3), el mismo que puede ser jugoso como el caso de Dulcamara (*S. dulcamara*) o seco como el ají (*Capsicum annum*), los frutos además están provistos de colores intensos, algunos cubiertos por vellosidades e incluso presencia de glicoalcaloides (propio de especies del clado *Leptostemonum*) que puede perderse y dar un sabor blando (*Solanum* sección *Solanum*) (Solanaceae Source, 2008).



Fuente: Solanaceae Source, 2008.

Figura 1.3 Fotografías de algunos frutos de especies solanáceas. Son de diversos colores y con la presencia de glicoalcaloides, algunos presentan vellosidades e incluso espinas. A) *Solanum mammosum*, B) *Solanum pseudocapsicum*, C) *Solanum scabrum*.

1.4.1.3. Cultivos solanáceos ecuatorianos de importancia económica

La Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)

La naranjilla (*S. quitoense* Lamark) es una especie autógama perteneciente a la sección *Lasciocarpa* (Bohs, 2004), presenta baja variabilidad intra específica desde el punto de vista morfológico, fisiológico y organoléptico, aunque es nativa de Ecuador y Colombia su cultivo se ha extendido en otros países como Panamá, Costa Rica, Guatemala y Nueva Zelanda. Las especies silvestres *S. candidum* y *S. hirtum* originarios de Colombia serían los posibles ancestros según ensayos de cruce (Montero *et al.*, 2003).

En el Ecuador se cultivan dos variedades de naranjilla, *S. quitoense*: var. *quitoense*, carente de espinas, y var. *septentrionales* Schultes y Cuatrecasas con espinas. Existen también los híbridos inter específicos: INIAP-Puyo e INIAP-Palora con la característica de ser más resistentes a plagas y enfermedades (Heiser, 1993). Esta especie se desarrolla en ambientes con una temperatura promedio de 20 °C y 3000 mm de pluviosidad anual (Montero *et al.*, 2003). Las estribaciones externas de la cordillera oriental en el valle del Pastaza y las estribaciones occidentales en el valle de Yungillas son refugio para este cultivo (INIAP, 2003). Según cifras del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) para el año 2002 se reportó la existencia de 8000 hectáreas cultivadas con una producción de 24211 toneladas (Montero *et al.*, 2003).

Actualmente, el cultivo de naranjilla representa una fuente promisoría de ingresos para agricultores y productores, no sólo porque generan ganancias a mediano plazo debido a su ciclo corto, sino también, por su gran aceptación en el mercado internacional como fruta exótica destinándola a la industria de jugos y pulpas (Santamaria, Mulrooney & Kitto, 2004). A pesar de haberse incrementado su área de cultivo, factores de tipo fitosanitario han impedido que la producción crezca en la misma proporción (Valarezo y Samaniego, 1982).

Tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es una especie perteneciente a la sección *Pachyphylla* del clado *Cyphomandra* (Bohs, 2004); este frutal aparentemente es nativo del sur Boliviano y adyacente del noroeste argentino, fue domesticado en climas subtropicales de los Andes (Bohs, 2004). En la actualidad el cultivo se ha extendido a países como Argentina, Brasil, Colombia, Venezuela, e incluso Nueva Zelanda y Kenia con un volumen de producción quince veces mayor al de Ecuador (Cadena, 2000).

Los valles interandinos ecuatorianos de Imbabura, Pichincha y Tungurahua son áreas representativas del cultivo de tomate de árbol. En el mercado nacional se reconocen las variedades comerciales tipo mora, común y redondo, todos ellos establecidos en un área de 5000 hectáreas con rendimientos anuales que oscilan de 60 a 80 toneladas por hectárea (MAG, 2001).

Las propiedades nutritivas y organolépticas hacen que el tomate de árbol represente al igual que la naranjilla un producto incidente en la economía de pequeños agricultores nacionales. La industria de jugos y conservas son el principal destino de este fruto. Lamentablemente, su producción está limitada por factores fitosanitarios como el resto de cultivos solanáceos (MAG, 2001).

Tomate de mesa o riñón (*Solanum lycopersicum*)

El tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) es una especie solanácea perteneciente a la sección *Lycopersicon* (Bohs, 2004). Este frutal originario América fue naturalizado en Europa después de la conquista y en la actualidad se lo produce en todo

el mundo especialmente en los países mediterráneos en una variedad considerable de tamaños, colores y resistencia a enfermedades.

Las zonas cálidas de la serranía ecuatoriana producen tomate destinado como verdura, mientras que, la región del litoral produce tomate riñón destinado a la industria de pastas y salsas. Las provincias de Los Ríos, Manabí, Imbabura y Loja consolidan una superficie cultivable de 4088 hectáreas (MAG, 2005).

El cultivo de tomate riñón en el Ecuador ha tenido un notable decrecimiento en su producción en los últimos 5 años debido a factores fitosanitarios, climáticos y económicos llegando al punto de importar este frutal desde Chile para cubrir las necesidades de la industria (MAG, 2005).

1.4.1.4. Enfermedades y plagas en los cultivos solanáceos ecuatorianos

La naranjilla es susceptible a varias enfermedades de origen viral, bacteriano o fúngico tales como la Antracnosis causada por (*Colletotrichum gloeosporioides*), marchites (*Fusarium spp.* o *Pseudomonas solanacearum*) o lunares en hojas (*Cercospora spp.*), así mismo sufre el ataque de pestes como el gusano de la fruta (*Neoleucinodes elagantalis*) o perforador de cuello (*Faustinus apicalis*). Sin embargo, el principal problema está dado por el nemátodo formador de nudo (*Meloidogyne spp.*), su ataque disminuye la vida productiva del cultivo de 5 a 2 años, la planta sufre una pérdida de nutrientes debido a las nodulaciones que genera en la raíz hospedera (Montero *et al.*, 2003 y Santamaría, 2004).

Por otro lado, el tomate de árbol, también presenta una alta incidencia de *Meloidogyne incognita* en aparente interacción con *Fusarium spp.* estimando pérdidas de rendimiento de cultivo en 90% y reducción de su vida útil en 50%. Además esta especie es blanco para las enfermedades como el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), antracnosis del fruto (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la “mancha negra del tronco” (*Fusarium solani*) (Revelo, 2003).

El tomate de mesa al igual que la naranjilla y tomate de árbol es susceptible a las mismas enfermedades arriba citadas, sin embargo, por ser un cultivo ampliamente

distribuido en el mundo y motivo de muchas investigaciones, cuenta en la actualidad con una variedad muy grande de cultivos comerciales con mejores patrones de resistencia a plagas y enfermedades (MAG, 2005).

1.4.2. Métodos de control al ataque del nemátodo *Meloidogyne* spp. en cultivos solanáceos ecuatorianos

1.4.2.1. Control Físico

El método físico busca establecer nuevas áreas de cultivo, tierras nuevas desprovistas del nemátodo *Meloidogyne*, que permitan incrementar la producción, lamentablemente el desplazamiento de la plaga en conjunto con la pérdida de bosques nativos tropicales y subtropicales han sido el único resultado. Otros métodos como la injertación utilizando variedades leñosas en forma de patrones como el caso de *S. arboreum* para naranjilla y floripondio rosado (*Brugmansia versicolor* L.), floripondio blanco (*Brugmansia arborea* L.), palo blanco (*Solanum auriculatum* sp.) y turpag (*Solanum asperolanatum*) para tomate de árbol además de poda asistida tampoco han podido manejar el ataque del nemátodo (Heiser, 1985).

1.4.2.2. Control Químico

El método de control químico ha predominado en las últimas décadas, el bajo costo y el fácil acceso a nematicidas como el carbofuran por parte de los agricultores y productores inquirió en un abuso constante y sin control por sus buenos resultados a corto plazo, lamentablemente no se percataron en los de largo plazo caracterizados por plagas más resistentes, tierras con persistencia de moléculas citotóxicas y frutos nocivos para el consumo humano (Estrada, 2002).

1.4.2.3. Control Biológico

En la actualidad se incursiona con métodos de control biológico utilizando organismos antagonistas como los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma arzanum* o la micorriza *Glomus mosseae*, u organismos patógenos estrictos a *Meloidogyne* como la bacteria *Pasteuria penetrans* (MAG, 2005). Se han

empleado además, extractos botánicos de semillas de papaya (*Carica papaya*) y hojas de Ruda (*Ruta graveolens*) para probar los efectos fitotóxicos hacia el nemátodo. Las evaluaciones de las pruebas de campo aun continúan, Colombia asegura resultados promisorios mientras que Ecuador incursiona recién en esta área (Revelo, 2003).

1.4.2.4. Mejoramiento genético tradicional

El método genético tradicional también puso sus intentos para controlar a *Meloidogyne*, la obtención de híbridos más resistentes y que mantengan las propiedades del fruto fueron las motivaciones iniciales. Varios estudios se han hecho en este tema, según Montero *et al.* (2003), en Ecuador, existen 2 híbridos inter específicos entre Naranja (*S. quitoense*) y Cocona (*S. sessiliflorum*) denominados INIAP- Puyo (obtenido por el cultivador Raúl Viteri) e INIAP- Palora. INIAP-Puyo es más resistente a plagas y enfermedades, sin embargo, sus semillas son pocas o ausentes y la planta tiene la mitad del tamaño que la naranja tradicional, este hecho obliga a los agricultores a emplear químicos como el ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4 D) para recuperar el tamaño original. En la misma línea se ha intentado inducir resistencia al nemátodo mediante mutaciones con rayos gama en semillas de *S. quitoense* y *S. betaceum* (Montero *et al.*, 2003; Revelo, 2003) o variación somaclonal por técnicas de cultivo *in vitro* (Santamaría *et al.*, 2004).

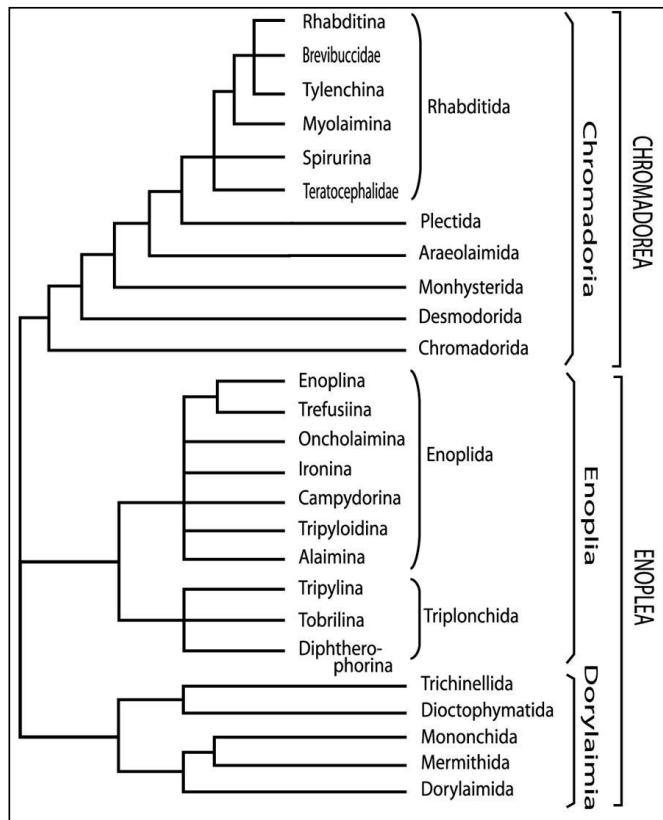
1.4.2.5. Mejoramiento biotecnológico

La falta de desarrollo biotecnológico en el Ecuador ha limitado la incursión de este tipo de mejoramiento en cultivos como la naranja y el tomate de árbol. Sin embargo, para el caso del cultivo de tomate riñón se registran estudios iniciales como la detección por marcadores SCAR y PCR del gen de resistencia al virus del mosaico del tomate *Tm-2* (Sandoval, 2007). Las necesidades actuales demandan el empleo de nuevas tecnologías que permitan controlar estos problemas y específicamente al nemátodo *Meloidogyne* spp. sin deslindar trabajos previos como los descritos en esta parte.

1.4.3. El nemátodo formador de nudo *Meloidogyne* spp.

El género *Meloidogyne* pertenece a la familia *Heteroderidae*, de la clase Chromadorea del phylum Nematoda (Cuadro 1.2). Las especies dentro de este grupo son endoparásitos sedentarios obligados distribuidos por todo el mundo los cuales obtienen su alimento del citoplasma de las células de la planta hospedera. El ataque del nemátodo se refleja en la formación de nudos en las raíces que penetran, ocasionando que la planta no crezca, se debilite, deshidrate e incluso sea susceptible a otros patógenos como *Phytophthora infestans* y *Fusarium* spp (Williamson & Hussey, 1996). Las especies de *Meloidogyne* spp. causan pérdidas cuantiosas alrededor del mundo (100 billones de euros al año) en diversos cultivos incluidos los solanáceos (Abad *et al.*, 2003).

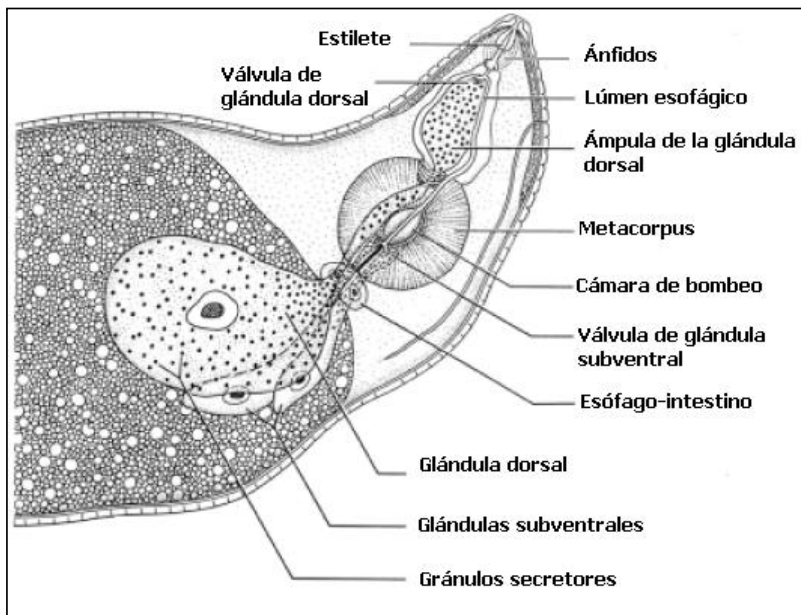
Cuadro 1.2 Esquema de la filogenia del phylum Nematoda basada en las secuencias ribosomales de RNA 18s (Modificado de De Ley, 2002). *Meloidogyne* pertenece a la clase Chromadorea



Fuente: De Ley & Blaxter 2006.

1.4.3.1. Morfología

Son gusanos cilíndricos de aproximadamente 1 mm de largo difícilmente apreciables por el ojo humano. En la Figura 1.4 se aprecia que cada nemátodo está provisto de un sistema nervioso central y de ánfidos, órganos que conforman un complejo quimiosensorial de interacción con su hospedero. Poseen además dos estructuras especializadas en la parasitosis: a) estiletes, ubicados en el polo anterior del nemátodo que le permiten penetrar las pared y membrana celular de las células vegetales y, b) glándulas secretoras esofágicas, que proveen de sustancias bioquímicas tanto para la penetración y migración del nemátodo como para el desarrollo de las nodulaciones producto de las alteraciones metabólicas dadas por sus secreciones (Williamson & Hussey, 1996).



Fuente: Modificado de Hussey *et al.* (1994).

Figura 1.4 Representación morfológica del esófago de una hembra adulta de un nemátodo formador de nudo. El polo anterior del nemátodo está provisto de un estilete, ánfidos y glándulas secretoras necesarias para la parasitosis.

1.4.3.2. Ciclo de vida

Los nemátodos formadores de nudo permanecen la mayor parte de su vida en el interior de las raíces de las plantas que infectan. Se reproducen por partenocarpia mitótica (genera progenie clonal por divisiones mitóticas) o meótica facultativa (permite a la vez partenocarpia y reproducción sexual). El ciclo de vida de *Meloidogyne*, como se observa en la Figura 1.5, está dado por una serie de cuatro estadíos juveniles, separados por mudas (cambio de cutícula). El primer estadío se caracteriza por un huevo embrionario donde crece una pequeña larva. Esta fase termina con la primera muda. El segundo estadío denominado J2 es el infectivo dado a que el nemátodo penetra la raíz y migrar a un sitio cercano del tejido vascular para destinarlo como un sitio permanente de alimento. El sedentarismo del nemátodo se inicia con la alimentación y da inicio al tercer estadío. La adultez la alcanza en el cuarto estadío. Las hembras adultas son bulbosas y carecen de movilidad, la producción de huevos empieza pasadas las 3 a 6 semanas de la infección inicial dependiendo de las condiciones ambientales y características de las especies. El género es determinado epigenéticamente, los machos con frecuencia aparecen en condiciones de cultivo o de baja nutrición y pasan a ser móviles en el tercer estadío (Williamson & Hussey, 1996).

Fuente: Modificado de Rothamsted Research, 2008.

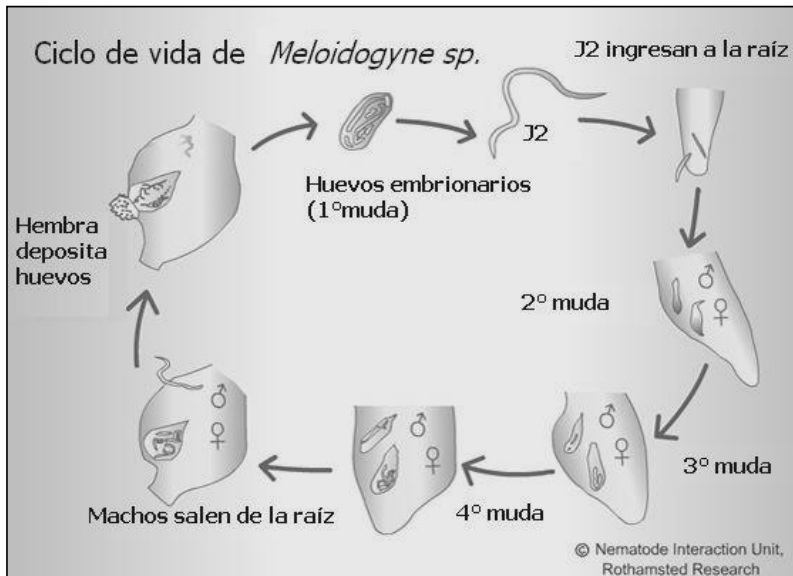


Figura 1.5 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. El ciclo de vida está dado por cuatro estadíos juveniles separados por mudas. El segundo estadío juvenil J2 es el infectivo y penetra en las raíces.

El parasitismo se inicia con la penetración de los nemátodos de segundo estadío juvenil en la zona de elongación de la raíz. Una vez adentro migran entre la lamella y el tejido cortical separando las células vegetales. Este proceso se realiza por la interacción de una fuerza mecánica y la influencia de secreciones enzimáticas. Al llegar a la zona de diferenciación, alteran las células del huésped con señales activadoras (proteínas y carbohidratos) presentes en sus secreciones esofágicas, el resultado final son células gigantes, multinucleadas y metabólicamente activas como fuente permanente de alimento para el endoparásito. Cada nemátodo desencadena la formación de 70 a 100 de estas células gigantes (Williamson & Hussey, 1996).

Los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en la planta huésped durante el establecimiento de los sitios de alimentación del nemátodo desencadenan una complicada alteración génica de la planta. Las respuestas moleculares que se generan en los sitios de infección y de alimentación del nemátodo, están dirigidas por miembros de familias de genes con un sistema de regulación difícil de explicar. La complejidad aumenta debido a la interacción de niveles anormales de fitohormonas posteriores a la infección del nemátodo (Abad *et al.*, 2003).

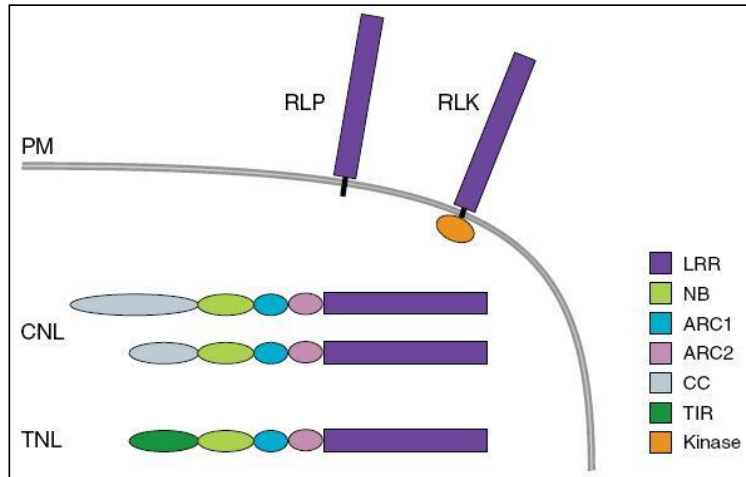
1.4.4. Genes de Resistencia en plantas

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para enfrentar el ataque de un amplio rango de patógenos como bacterias, virus, hongos, nemátodos e insectos. Estos mecanismos pueden ser de carácter *pasivo* o *activo*. La respuesta pasiva se caracteriza por la acumulación de compuestos tóxicos contra microorganismos o fitófagos en las partes expuestas a ataques (Zhang *et al.*, 2004). En cambio, la respuesta activa, está asociada a cambios en la expresión génica. Consiste en una serie de eventos complejos y coordinados que involucran la activación de genes de defensa, esta a su vez puede dividirse en inmunidad adaptativa cuando interviene un mecanismo de respuesta antiviral semejante a un RNA de interferencia (RNAi), o inmunidad innata, más general

y que reconoce una variedad de patógenos a través de receptores especializados. Estos receptores se ubican en dos grupos, el primero referido al grupo de los Patógenos o Receptores de Reconocimiento Patrón (PRRs) que permiten reconocer distintos invasores utilizando un limitado grupo de receptores, y el segundo referido a las proteínas de Resistencia (R) que reconocen proteínas de avirulencia (Avr) o elicitoras del patógeno. Esta interacción gen *R* de la planta y gen *Avr* del patógeno se denominó inmunidad “gen por gen de resistencia”. Las proteínas R son codificadas por una extensa familia de genes y a menudo están asociadas con la muerte celular localizada en el sitio de infección del patógeno, denominado respuesta de hipersensibilidad (HR) (van Ooijen *et al.*, 2007).

En la actualidad más de 55 genes *R* han sido clonados en varias especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (van Ooijen *et al.*, 2007), así como también un sin número de genes *Avr* han sido identificados en bacterias, virus y hongos. Lamentablemente, se conoce poco sobre la interacción *R-Avr* y los mecanismos que ésta desencadena para generar resistencia (Hwang & Williamson, 2003).

Las proteínas R comparten un limitado número de elementos conservados, los mismos que han permitido dividirlos en cuatro clases. La mayoría dispone de un subdominio central de unión nucleotídica (NB) que forma parte de una entidad mayor NB-ARC (presente en el factor APAF-1, proteínas R y CED-4) (van Ooijen *et al.*, 2007). En la región C-terminal de NB-ARC se encuentra un dominio de alta repetición de leucinas (LRR, secuencias de 20-30 aminoácidos). Las proteínas R se las denomina como NB-LRR y varios estudios las señalan como responsables de los mecanismos (proteína-proteína o péptido-ligando) de reconocimiento del patógeno (Hwang *et al.*, 2002). Dependiendo de su N-terminal, las proteínas NB-LRR se agrupan en dos tipos, el primero, denominado TIR-NB-LRR (TNL) si presentan homología a los dominios Toll de *Drosophylla* y Receptor humano de Interleucina-1, y el segundo, denominado CC-NB-LRR (CNL) si presentan estructuras CC (coiled-coil). Se cree que las proteínas R del grupo NB-LRR actúan a nivel citoplasmático. Otras proteínas R como RLK (Receptor semejante a quinasa) y RLP (Receptor semejante a proteínas), poseen un dominio LRR y actúan de forma extracelular (Figura 1.6) vía transmembrana. Las proteínas RLK no han sido identificadas en plantas solanáceas (van Ooijen *et al.*, 2007).



Fuente: (van Ooijen *et al.*, 2007).

Figura 1.6 Representación esquemática y localización de las cuatro clases de proteínas R. Las proteínas RLK y RLP con dominio LRR están en la membrana celular. CNL y TNL se localizan de forma intracelular (citoplasma, núcleo o de unión membrana).

Varios genes *R* que proporcionan resistencia al ataque de nemátodos han sido identificados en cromosomas vegetales (Cuadro 1.3), por ejemplo *Hs1pro-1*, un gen aislado a partir de una especie silvestre de remolacha con resistencia al nemátodo *Heterodera schachtii*. *Gpa2*, un gen en papa, que genera resistencia al nemátodo *Globodera pallida*, ó el gen *Hero* aislado a partir de una línea resistente de tomate a un amplio rango de nemátodos (Hwang & Williamson, 2003). Específicamente para resistencia a *Meloidogyne* spp. se han identificado varios genes tales como *Mi-1*, *Mi-3* y *Mi-9* en tomate; *Me3* en pimiento o los genes *Mae* y *Mag* en maní (Abad *et al.*, 2003).

Cuadro 1.3 Resumen de los genes de resistencia R contra nemátodos identificados en varias especies vegetales.

Ubicación de loci de resistencia a nemátodos*					
Cultivo	Especie de origen	Locus	Nemátodo	Localización genética	Referencia
Tomato	<i>L. peruvianum</i>	<i>Mi</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i>	Chromosome 6	Messeguer <i>et al.</i> (1991) Ho <i>et al.</i> (1992)
Tomato	<i>L. peruvianum</i>	<i>Mi3</i>	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i>	Chromosome 12	Yaghoobi <i>et al.</i> (1995)
Tomato	<i>L. pimpinellifolium</i>	<i>Hero</i>	<i>G. rostochiensis</i>	Chromosome 4	Gana1 <i>et al.</i> (1995)
Potato	<i>Solanum tuberosum</i> <i>spp andigena</i>	<i>H1</i>	<i>G. rostochiensis</i> , pathotypes <i>Ro1</i> and <i>Ro4</i>	Chromosome 5	Pineda <i>et al.</i> (1993) Gebhardt <i>et al.</i> (1993)
Potato	<i>S. spgazzinii</i>	<i>Gro 1</i>	<i>G. rostochiensis</i> , pathotypes <i>Ro1</i> and <i>Ro5</i>	Chromosome 7	Ballvora <i>et al.</i> (1995)
Potato	<i>S. spgazzinii</i>	<i>Gpa</i>	<i>G. pallida</i> , pathotypes <i>Pa2</i> and <i>Pa3</i>	Chromosome 5	Kreike <i>et al.</i> (1994)
Potato	<i>S. vernei</i>	<i>GroV1</i>	<i>G. rostochiensis</i> , pathotype <i>Ro1</i>	Chromosome 5	Jacobs <i>et al.</i> (1996)
Potato	<i>S. bulbocastanum</i>	<i>R_{MC1}</i>	<i>M. chitwoodi</i>	Chromosome 11	Brown <i>et al.</i> (1996)
Sugar beet	<i>B. patellaris</i>	<i>Hs1^{Pa1-1}</i>	<i>H. schachtii</i>	Chromosome 1	Salentijn (1992)
Soybean	<i>Glycine max</i>	<i>Rhg₄</i>	<i>H. glycines</i> , race 3	Linkage group A	Webb <i>et al.</i> (1995)
Wheat	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Cre</i>	<i>H. avenae</i>	Long arm of chromosome 28	Williams <i>et al.</i> (1994)
Wheat	<i>T. tauschii</i>	<i>Cre3</i>	<i>H. avenae</i>	Long arm of chromosome 2D	Eastwood <i>et al.</i> (1994)

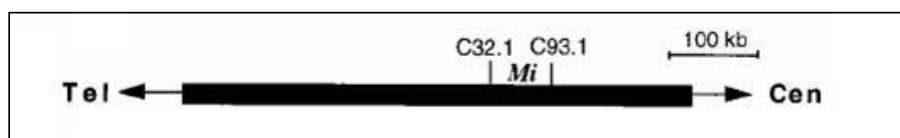
* Lista representativa de la ubicación de locis dominantes de resistencia a nemátodos

Fuente: Modificado de Williamson & Hussey, 1996.

1.4.4.1. Genes de Resistencia *Mi* al nemátodo *Meloidogyne* spp.

El gen *Mi* es miembro de la familia de genes que codifican proteínas R del tipo NB-LRR, el cual confiere resistencia a tres de las especies de nemátodos formadores de nudos más devastadoras: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Hwang & Williamson, 2003), áfidos (Rossi *et al.*, 1998) y mosca blanca (Nombela *et al.*, 2003). El gen *Mi* fue identificado por primera vez en accesiones de tomate silvestre (*S. peruvianum*) e introducido en tomate cultivable (*S. lycopersicum*) a través de introgresión génica (Hwang *et al.*, 2000). El gen *Mi* traduce una proteína de 1257 aminoácidos y carece de señales de secuencia de adherencia a membrana. Esto afirma que ella se localiza en el citoplasma y no a nivel de membrana celular (Milligan *et al.*, 1998).

Mediante técnicas de posición clonal, el gen *Mi* fue aislado (Figura 1.7) y por análisis de recombinación se aseguró que ocupa una región corta de 65 kb del cromosoma 6 de tomate (*S. lycopersicum*) entre los marcadores C32.1 y C93.1. Estudios complementarios de secuenciación de DNA en varios candidatos identificaron dos genes homólogos denominados *Mi-1.1* y *Mi-1.2* (Milligan *et al.*, 1998). Las dos secuencias se ubican en una región de 65 kb donde se localiza *Mi* y expresan proteínas que comparten un 91% de similitud en sus secuencias aminoacídicas con 113 aminoácidos diferentes distribuidos en la región codificadora. Los dos genes homólogos pertenecen al subgrupo de genes que expresan proteínas del tipo NB-LRR, provistos de un dominio CC en su extremo N-terminal. Se diferencian del resto de genes R porque este extremo alberga cerca de 540 aminoácidos en extensión a los 200 aminoácidos promedio de los demás genes (Hwang & Williamson, 2003).

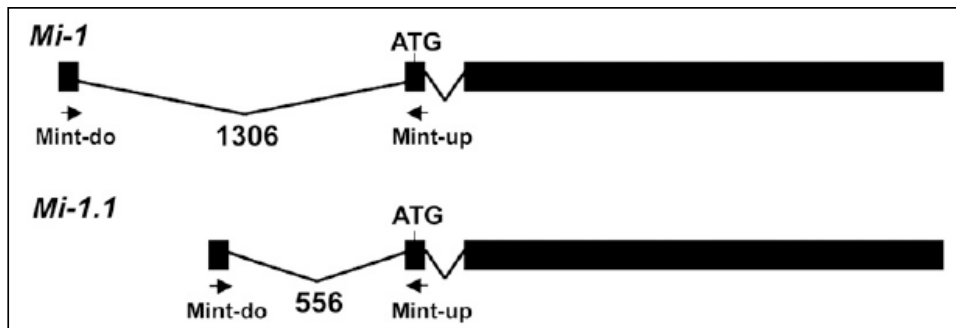


Fuente: Modificado de Milligan *et al.*, 1998.

Figura 1.7 Región *Mi* en el genoma de tomate. La barra negra representa los \approx 650 kb de DNA introgresado de *S. peruvianum* donde se ubica el gen *Mi*. Cen y Tel representan la dirección hacia el telómero y centrómero, respectivamente. C32.1 y C93.1 marcadores moleculares.

Gen *Mi-1*

Milligan *et al.* (1998) introdujeron vectores que portaban secuencias de los homólogos *Mi-1.1* y *Mi-1.2* en líneas de tomate susceptible a *Meloidogyne* por transformación bacteriana, los resultados revelaron que sólo *Mi-1.2* era capaz de conferir resistencia con un inserto de DNA de 14.7 kb. En el mismo estudio, análisis de secuencias entre el DNA genómico y cDNA de ambos homólogos demostraron la presencia de dos intrones en posiciones conservadas de la región 5' (Figura 1.8). El intrón 1 es más largo en *Mi-1.2* (1306 pb) que *Mi-1.1* (556 pb), mientras que, en el intrón 2 sus secuencias tienen una similitud del 97% (Milligan *et al.*, 1998). Actualmente, el gen *Mi-1.2* se denomina *Mi-1* y es el gen funcional que confiere resistencia al nemátodo formador de nudo (Jablonska *et al.*, 2007).



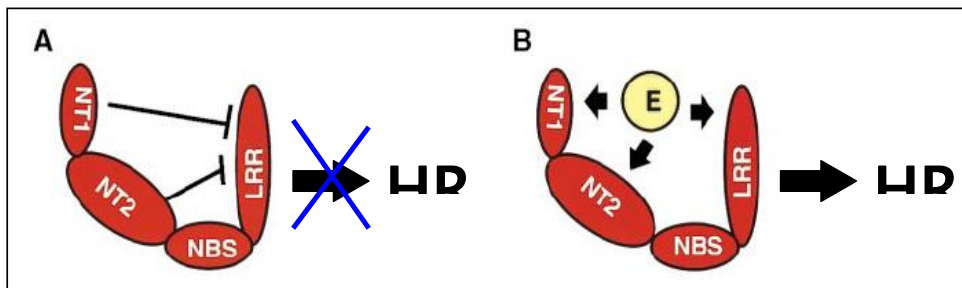
Fuente: Modificado de Jablonska *et al.*, 2007.

Figura 1.8 Diagrama esquemático de los genes *Mi-1* (*Mi-1.2*) y *Mi-1.1* representando las posiciones relativas del intrón 1 flanqueado por los primers Mint-do y Mint-up. Las barras representan exones y las líneas en ángulo, intrones.

Hwang *et al.* (2000) realizaron ensayos de resistencia a nemátodos en raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* que portaban genes quiméricos *Mi-1.2* y *Mi-1.1*, para comprobar la efectividad del primer homólogo. Alinearon las secuencias de aminoácidos de la proteína expresada por cada gen e identificaron que la diferencia más grande se encontraba en 6 unidades consecutivas (LRLTL) (Aminoácidos de *Mi-1.2* desde 1172 a 1177) de la región LRR. Finalmente, utilizaron pruebas de expresión con los mismos genes en *Nicotiana benthamiana* y concluyeron que la sustitución del DNA codificante de estos seis aminoácidos consecutivos de *Mi-1.1* en genes quiméricos *Mi-1.2* y viceversa, generan una pérdida de la habilidad de conferir resistencia tanto en las raíces transformadas, como en los análisis de expresión en *N. benthamiana*, afirmando que los seis aminoácidos de la región LRR de *Mi-1.2* son esenciales pero no suficientes para conferir resistencia a nemátodos.

Hwang *et al.* (2000) estudiaron también la región N-terminal de las proteínas *Mi-1.1* y *Mi-1.2* (*Mi-1*) mediante modelamientos computarizados de las estructuras secundarias. Predijeron las regiones NT1 (aminoácidos N-terminal de 1-161) y NT2 (aminoácidos N-terminal de 162-540) en el coiled-coil que probablemente actúan como reguladores negativos de la interacción proteína-proteína (R-Avr) en la respuesta de

resistencia al ataque del nemátodo, por lo que el modelo obtenido sugiere además que, la región LRR es parcialmente responsable de la señal para la reacción de hipersensibilidad HR. El coiled-coil (NT1 y NT2) posiblemente anula la señal para producir HR hasta que una molécula elicitora “E” del nemátodo o de la planta en respuesta al nemátodo altera estructuralmente el coiled-coil y produce la señal para la HR (Figura 1.9).



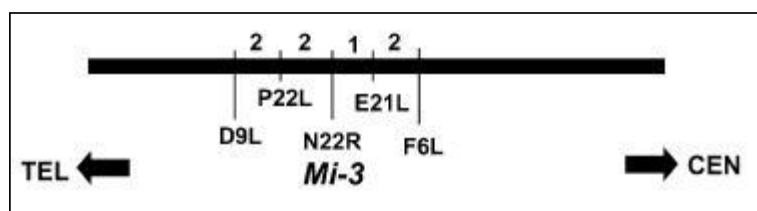
Fuente: Modificado de Hwang *et al.*, 2000.

Figura 1.9 Modelo de la regulación de la proteína *Mi-1* que confiere resistencia al nemátodo. A) El coiled-coil (NT1 y NT2) evitan una HR. B) Una molécula elicitora “E” altera estructuralmente el coiled-coil y produce HR. NB sitio de unión nucleotídica.

Gen *Mi-3*

La resistencia a nemátodos del género *Meloidogyne* spp. ha sido reportada en diversas accesiones de tomate silvestre (*S Peruvianum*) (Cap *et al.*, 1993; Yaghoobi *et al.*, 1995). Algunas de estas especies confieren resistencia a nemátodos que son virulentos para entradas portadoras del gen *Mi-1*. Otras fuentes en cambio, generan resistencia en temperaturas mayores a 30 °C en la cual *Mi-1* no es tan efectivo. Sin embargo, escasos genes de este tipo han sido mapeados y clonados (Yaghoobi *et al.*, 2005). *Mi-3* es uno de estos genes y actualmente está en estudio. Este gen fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 12 de tomate y confiere resistencia a cepas de *Meloidogyne* virulentas en especies con *Mi-1* (Yaghoobi *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2004). Además, varias investigaciones postulan que *Mi-3* o un gen cercanamente ligado a él, confiere resistencia a temperaturas sobre los 30 °C (Veremis & Roberts, 1996).

Uno de los trabajos más importantes en el estudio del gen *Mi-3* fue realizado por Yaghoobi *et al.* (2005), donde mapearon una región del cromosoma 12 mediante el análisis de recombinación y el uso de marcadores moleculares. Delimitaron a *Mi-3* en una región de 25-30 kb conforme a una estimación física de distancia génica de 83 kb/cM para esta región del cromosoma. El gen, según el mapa génico obtenido, se encuentra a una distancia menor a 0.25 cM entre los marcadores P22L y E21L; y, además co-segrega con el marcador N22R (Figura 1.10).



Fuente: Modificado de Yaghoobi *et al.*, 2005.

Figura 1.10 Mapa genético para el gen *Mi-3*. La barra es la región del cromosoma 12 de tomate donde se alinea el gen *Mi-3*. Números superiores son el número de recombinaciones de poblaciones F2. Los números inferiores son marcadores BAC. Tel y Cel representan la dirección del Telómero y el Centrómero.

Por otro lado, ensayos de resistencia realizados en la misma investigación determinaron que, *Mi-3* confiere resistencia contra nemátodos *Mi-1* virulentos cuando la temperatura es de 27 °C, y contra nemátodos *Mi-1* avirulentos cuando la misma llega a 32 °C. Ellos afirman que esta doble respuesta está dada por el mismo gen, en cambio, Veremis & Roberts (1996) sugieren que los fenotipos están controlados por la presencia de otro gen denominado *Mi-5* y completamente ligado a *Mi-3*. La divergencia de estas dos posturas según Yaghoobi *et al.* (2005) es debido a las entradas de tomate utilizadas en las respectivas investigaciones, en el primer caso, fueron plantas resistentes y susceptibles de *S. peruvianum*, mientras que, en el segundo fueron híbridos entre *S. peruvianum* y *S. lycopersicum* (línea EPP-1).

Por último, los investigadores sugirieron que la resistencia a nemátodos mediada por el gen es más efectiva cuando las plantas son individuos homocigotos que

heterocigotos para *Mi-3*, sin embargo, en ambos casos la resistencia que confieren estos genes es sólida.

Gen *Mi-9*

Como se dijo anteriormente, varios estudios se han realizado con accesiones de *S. peruvianum*, por ser fuente promisoría de factores de resistencia a enfermedades, el gen *Mi* contra el ataque del nemátodo *Meloidogyne* es un claro ejemplo (Atherton & Rudich, 1986). Según Jablonska *et al.* (2007) hasta la fecha están registradas dos accesiones en las que se ha podido identificar locis de resistencia. La primera de ellas es el clon 1MH de la accesión 126443 que confiere resistencia a cepas virulentas de *Meloidogyne* y es resistente a temperaturas altas. La segunda, corresponde a la accesión LA2157 perteneciente al ancestro Maranon del complejo de *S. peruvianum*.

Actualmente, esta accesión fue asignada a la especie *Solanum arcanum* (Peralta *et al.*, 2005) y en ella fue identificada el gen *Mi-9*, que confiere resistencia a cepas avirulentas de *Meloidogyne* como *arenaria*, *incognita* y *javanica*, en temperaturas de 25 °C a 32 °C (Ammiraju *et al.*, 2003). Estudios en poblaciones segregantes F2 permitieron mapear este gen en el cromosoma 6 (Veremis *et al.*, 1999). *Mi-9* fue posteriormente mapeado en el brazo corto del cromosoma mencionado entre los marcadores CT119 y C8B, en un intervalo similar como *Mi-1* (Ammiraju *et al.*, 2003; Jablonska, *et al.*, 2007).

Posteriormente, Jablonska *et al.* (2007) volvieron a mapear el gen mediante marcadores RFLPs en recombinantes F2 de las accesiones LA2157 y LA392, *Mi-9* fue encontrado entre los marcadores C32.1 y C8B. En este mismo estudio se analizaron las secuencias de algunos genes candidatos con los homólogos *Mi-1.1* y *Mi-1*, mediante la amplificación del intrón 2 (funcional en *Mi-1*) descrito por Milligan *et al.* (1998), ellos ratificaron que la secuencia de 1306 pb corresponde al intrón que genera resistencia a nemátodos formadores de nudo. Encontraron también varios patrones de bandas que representan pseudogenes para este fragmento y que es característico cuando se analizan genes de Resistencia R (Michelmore & Meyers, 1998).

1.4.5. Técnicas Moleculares

1.4.5.1. Extracción y cuantificación de DNA

La extracción de los ácidos nucleicos como el DNA es la parte inicial de todo ensayo molecular, lejos de ser una técnica simple, su correcta ejecución permitirá al investigador minimizar los índices de fracaso en análisis posteriores, ahorrando además recursos e insumos costosos.

Para la extracción del DNA vegetal se debe considerar en primer lugar el tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente (los tejidos jóvenes contienen más ADN que los tejidos viejos). Además, es necesario considerar la composición bioquímica de los tejidos (ricos en compuestos fenólicos, carbohidratos o aceites), en segundo lugar se debe tener en cuenta el tipo de ADN que se va a extraer (nuclear, mitocondrial y cloroplástico). Los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas semejantes. Sin embargo, el tipo de información biológica que codifican es completamente diferente, y en tercer lugar el tipo de análisis a realizar (RFLP, RAPD, AFLP, secuenciación, entre otros).

En plantas existen múltiples protocolos para extraer y purificar el DNA. Sin embargo, todos ellos incluyen cuatro pasos indispensables: a) Ruptura de tejidos y paredes celulares (pulverizar el material), b) ruptura de membranas (busca liberar el DNA). Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes (SDS, Triton o detergentes comerciales), también se emplean métodos físicos, como aquellos basados en ultrasonido, c) inhibición de enzimas que destruyen al DNA (se inhiben enzimas que destruyen al DNA como el caso de las DNAsas) mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (a temperaturas de 65 °C) o con métodos químicos a través de solventes orgánicos (fenol y cloroformo), antioxidantes (beta-mercaptoetanol), agentes quelantes (EDTA) o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas (Rogers & Bendich, 1988), y d) extracción de contaminantes (proteínas, RNA) mediante incubación con proteinasas, centrifugación, electroforesis, entre otros. Todos los pasos anteriormente mencionados se basan en las características fisicoquímicas del DNA. Pues aparte de ser una molécula de alto peso molecular, muy larga y delicada, es un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente

(cationes). Además, es soluble en soluciones concentradas de sales, pero insoluble en alcoholes (tipo etanol o isopropanol). Adicionalmente, el DNA es destruido a pH ácido (menor de 4.0), insoluble a pH 5.6, pero es soluble a pH 8.0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica (Dellaporta, 1983).

Una vez extraído el DNA es imprescindible cuantificar su concentración a fin de que los ensayos moleculares posteriores sean eficaces. Se utilizan métodos precisos como espectrofotometría, donde el DNA es medido a una longitud de onda de 260 nm, y el valor obtenido es transformado a concentración mediante la relación “1 (A_{260}) unidad de DNA = 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA”. Se debe tener en cuenta el factor de dilución para multiplicarlo al final. También se emplea la fluorometría (mide rangos de 5-50 ng), donde la concentración es calculada a partir de la fluorescencia emitida por los fluoróforos fijados específicamente en el DNA analizado y comparada con patrones estándar para este ácido nucleico. Existen también métodos no tan precisos como el uso de marcadores de peso molecular, donde la cuantificación está limitada a la apreciación del operario, el cálculo está dado por la comparación de la intensidad de las bandas del DNA obtenido con la banda del marcador de peso molecular que fue colocado en un volumen determinado.

1.4.5.2. Reacción de la Cadena Polimerasa PCR para la síntesis de Ácido Desoxirribonucleico

Es una técnica molecular de síntesis de DNA formulada por Kary Mullis en el año de 1983. Se basa en la replicación exponencial *in vitro* de un fragmento de DNA blanco de cualquier organismo vivo por acción de la DNA polimerasa en una mezcla homogénea de reactivos biológicos: Deoxinucleótidos trifosfatos o dNTPs (son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa, constituyen el sustrato de la Taq polimerasa que incorpora a la nueva cadena en dirección 5'-3'), cebadores o primers (secuencias cortas, específicas y complementarias a la secuencia molde, de entre 6 y 40 nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que al ser reconocidos por la polimerasa inician la síntesis), Taq polimerasa (enzima termoestable que realiza la síntesis del DNA a partir de una cadena molde); reactivos químicos estables: Buffer de enzima (contiene la concentración de sales

óptima para que se de la reacción enzimática llevada por la polimerasa), $MgCl_2$ (actúa como cofactor de la Taq polimerasa), estabilizadores (ayudan en la eficiencia de la reacción enzimática): Aceite mineral, suero fetal bovino; y agua en concentraciones idóneas (Sambrook & Ruseell, 2001).

El método de PCR se basa en ciclos de amplificación que constan de tres etapas: A) *Denaturación*, dado por la separación de las hebras del DNA bicatenario por incubación a temperaturas altas (93-97 °C); B) *Hibridación*, disminuye la temperatura (50-65 °C) y los cebadores se alinean por complementariedad a las regiones 3' de cada cadena simple para iniciar la síntesis; y, C) *Extensión*, paso final caracterizado por la adición complementaria de dNTPs a las cadenas molde en sentido 5' → 3' llevado a cabo por la DNA polimerasa (Sambrook & Ruseell, 2001).

El número de ciclos de amplificación para producir una banda visible en un gel de agarosa depende del número de copias de DNA molde y la eficiencia de los primers. El límite de la reacción (mayor concentración de productos amplificados) ocurre generalmente después de los 30 ciclos con una concentración de 10^5 copias del DNA molde y una eficiencia de la DNA polimerasa del 70% (Sambrook & Ruseell, 2001).

La Temperatura de Fusión, T_m , es la temperatura a la cual la mitad del DNA de cadena doble se separa en cadena simple. Muchas fórmulas útiles y prácticas se han desarrollado para calcularla. Los principales factores que afectan este valor son: concentración de sales, concentración de DNA, presencia de agentes desnaturalizantes (DMSO o formamida), secuencia, longitud y condiciones de hidridización

La ecuación más simple para calcular la T_m está dada por la Regla de Wallace:

$$(1) T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

donde A, G, C, y T corresponden al número de cada nucleótido presentes.

Esta ecuación se desarrolló para oligos 'cortos' de 14 a 20 bases que hibridarían con sus correspondientes complementarios unidos a una membrana con una concentración de NaCl 0.9M. Otra ecuación válida para oligos cuya longitud es mayor a 14 residuos y en presencia de una concentración de 50mM de cationes monovalentes:

$$(2) \quad T_m = 64.9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times (G+C - 16.4)/N$$

Otra ecuación válida para oligos cuya longitud está entre los 20 a 100 residuos y concentraciones de cationes presentes, particularmente [Na+] en rangos de 0.01 M a 1.0M y L la longitud del fragmento:

$$(3) \quad T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 0.41(G\%+C\%) + 16.6 \log[\text{Na}^+] - 675/L$$

Las temperaturas de fusión de los oligos se calculan de una manera muy exacta con cálculos termodinámicos usando la siguiente fórmula:

$$(4) \quad T_m = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log 10 [\text{K}^+]$$

donde H (kcal/mol) es la entalpía y S (kcal/mol) la entropía para la formación de la hélice, R es la constante molar de los gases (1.987Cal/°C*Mol) y c es la concentración del oligo. La Temperatura de Annealing, *T_a*, es la temperatura a la cual se hibridiza un primer a la cadena a amplificar, esta generalmente está en rangos de inferiores de 2-6 °C de la temperatura de melting (Premier Biosoft, 2005; Vincent, 2005).

1.4.5.3. Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos son macromoléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura. La separación efectiva de los fragmentos de ADN o ARN (resolución) depende tanto de la masa como de la carga de los distintos fragmentos, en realidad de la relación carga/masa (Técnicas de Biología Molecular, 2001).

La electroforesis puede llevarse a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida dependiendo del tamaño a separarse. Los geles de poliacrilamida son efectivos para

separar fragmentos de 5-500 pb debido a su alto poder de resolución. Los geles de agarosa permiten separar fragmentos más grandes 2–60 kb, tienen menor poder de resolución y se los emplea en concentraciones típicas de 0.5-2% (p/v). Además se emplean marcadores de peso molecular (fragmentos de tamaño estándar conocido) para estimar el peso y número de pares de bases de los fragmentos que migraron (Sambrook & Ruseell, 2001).

La migración de una molécula de DNA tiene una tasa inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases y su velocidad será proporcional a la fuerza del campo eléctrico aplicado, se recomienda un voltaje de 5-8 V/cm para geles de agarosa. La composición y cantidad del buffer de corrida también afecta la migración, un déficit en volumen retrasa la movilidad, mientras que, altas concentraciones de sales aumentan drásticamente la velocidad y temperatura fundiendo el gel y denaturando el DNA. Los buffers más empleados son TAE (Tris – Acetato - EDTA), TBE (Tris – Borato - EDTA) y TPE (Tris - Fosfato) (Sambrook & Ruseell, 2001).

La revelación del gel de agarosa se hace a través de la adición de bromuro de etidio (se añade en la elaboración del gel o se usa como solución de revelado), esta molécula se intercala en los surcos de la doble hélice del DNA y en presencia de rayos UV se visualizan bandas de distintas intensidades dependiendo de la concentración DNA presente. El bromuro de etidio puede causar rigidez y disminución de la carga negativa de las moléculas de DNA afectando la migración electroforética (Sambrook & Ruseell, 2001).

1.4.5.4. Secuenciación de DNA

Es una técnica molecular empleada para la determinación secuencial de las bases nitrogenadas que integran una región específica de DNA (plásmido, gen, productos PCR) que se desea conocer. El método tradicional utilizado por mucho tiempo fue el Modelo Enzimático de Terminación de Cadena o Método didesoxi de Sanger.

Para obtener la secuencia de bases nitrogenadas de un segmento de ADN por el método de Sanger, se necesitan: a) DNA molde o segmento de DNA que se desea secuenciar con una alta concentración. Además, debe estar en estado de hélice sencilla y

con alto grado de pureza; b) Enzima de replicación de DNA (DNA Polimerasa I); c) Un cebador o primer de alrededor de 20 bases de longitud con una secuencia complementaria a las bases del fragmento de DNA de interés o al vector de clonación. Puede estar marcado radiactivamente; d) Cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) que pueden estar marcados radiactivamente cuando no está marcado el primer. Se marca radiactivamente uno de los cuatro nucleótidos trifosfato en cada reacción; y, e) Cuatro nucleótidos didesoxi (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP), nucleótidos modificados sin el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de DNA en formación, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de DNA

El ensayo se realiza en cuatro tubos diferentes, cada uno contiene una mezcla de reacción que posee los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, de dTTP y dGTP), la DNA polimerasa I, un primer marcado radiactivamente y un nucleótido didesoxi diferente por tubo. El nucleótido didesoxi utilizado (ddCTP versus dCTP) competirá con su homólogo por incorporarse a la cadena de DNA que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y lugar donde se incorpora. Cada mezcla de reacción produce una serie de moléculas de DNA con diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido y marcadas todas radiactivamente por el extremo 5'.

Los fragmentos nuevos se separan por tamaños mediante electroforesis en geles verticales de acrilamida muy finos (0,5 mm de espesor) y de gran longitud (aproximadamente 50 cm). Los productos de cada tubo se colocan en cuatro carriles diferentes del gel. Al término de la electroforesis, el gel se pone en contacto con una película fotográfica de autorradiografía para el revelado. La aparición de una banda en una posición concreta de la autorradiografía de los cuatro carriles nos revela la base correspondiente al nucleótido didesoxi utilizado en la síntesis del DNA en estudio. La lectura de la película empieza por los fragmentos de menor tamaño (extremo 5') hasta los de mayor tamaño (hacia extremo 3').

Actualmente, se dispone de un método automático de secuenciación, mejorando los resultados a través de la aplicación de la fluorometría para detección de cada base

nitrogenada en la secuencia de DNA en estudio. La principal diferencia con el método de Sanger radica en el tipo de marcaje, el método automático utiliza fluorescencia en vez de radiactividad, cada una de las cuatro mezclas de reacción contiene un nucleótido trifosfato marcado con un fluorocromo distinto. El sistema permite leer al mismo tiempo los ADN recién sintetizados producto de las cuatro mezclas de reacción. Además el sistema de detección de los fragmentos de DNA por fluorescencia se lleva a cabo al mismo tiempo de la electroforesis, de manera que, los fragmentos de menor tamaño que ya han sido detectados escapan del gel permitiendo aumentar el número de nucleótidos a determinarse en cada secuenciación (Rodríguez, 2008).

1.4.6. Análisis bioinformático de secuencias de DNA y proteínas

La Bioinformática es “la aplicación del desarrollo de la computación y las matemáticas que permite la administración, análisis y comprensión de datos para resolver preguntas biológicas” (Alcaraz, 2006). Actualmente, esta en constante desarrollo y genera un sinnúmero de programas de análisis, la mayoría son gratuitos y disponibles en Internet, como por ejemplo: BioEdit (programa que facilita la edición, alineamiento, manipulación y análisis de secuencias de nucleótidos), CLUSTALW (programa que permite el alineamiento múltiple de secuencias de DNA o proteínas), MEGA3 (programa que realiza alineamientos de secuencias de DNA infiriendo en parámetros de evolución molecular), Treeview (programa que facilita la observación de árboles filogenéticos), entre otros.

1.4.6.1. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias es la herramienta más utilizada en bioinformática, consiste en la comparación de dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos, mediante algoritmos matemáticos que permiten destacar regiones similares entre ellas. Al determinar si una secuencia desconocida es similar, en algún sentido a secuencias conocidas, podremos identificar y predecir su estructura (repeticiones internas, regiones conservadas, entre otros) y función (regulación, dominios funcionales de proteínas, entre otras) (Sanchez, 2008).

Existen varias formas de alineamiento, el más simple, está dado por la comparación de dos secuencias y emplea métodos como DOTPLOT (genera diagrama de puntos en cada similitud), o algoritmos óptimos de alineamiento global (alineamiento de secuencias completas) o local (alineamiento de subsecuencias). Otra forma utilizada son los alineamientos múltiples, que permiten comparar la secuencia estudiada con otras que están presentes en los bancos mundiales de datos como el GenBank o Unigen. Los algoritmos FASTA y BLAST son los más utilizados para la búsqueda en las bases de datos. Por ejemplo la familia aplicaciones BLAST incluye programas que permiten hacer diferentes tipos de búsquedas: BLASTN identifica secuencias de genes parecidos en bases de datos de secuencias de ADN, usando la secuencia genómica como "query", BLASTX traduce la secuencia "query" en las seis fases de lectura posibles y hace búsquedas en bases de datos de proteínas, BLASTP busca secuencias de proteínas parecidas en bases de datos de proteínas, entre otras.

1.4.6.2. Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético es un diagrama que permite visualizar las relaciones evolutivas que existen entre grupos de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Está constituido por nodos y brazos. Un nodo (poblaciones, especies, individuos o genes) representa las unidades taxonómicas y los brazos representan usualmente la cantidad de cambios ocurridos entre los nodos que conecta (Abascal, 2006). Existen dos tipos de árboles: a) con raíz, que representa un árbol directo, con un único nódulo que corresponde al ancestro común más reciente de todas las OTUs analizadas, b) sin raíz, cuyo árbol ilustra la relación de los nódulos de cada brazo sin hacer inferencia sobre ascendencia. Se utilizan varios métodos para la construcción de un árbol filogenético: i) métodos de distancia, donde los alineamientos de secuencias son convertidos en una matriz de distancias genéticas en base al modelo evolutivo seleccionado, que luego es interpretada por un algoritmo (UPGMA, Neighbor Joining, entre otros) para la construcción del árbol, ii) métodos discretos (MP, ML, Bayesianos) que consideran cada sitio del alineamiento (o una función probabilística para cada sitio) directamente (Ramírez, 2006).

1.4.7. Diseño Estadístico

1.4.7.1. Análisis de varianza (ANOVA) dos factores

El ANOVA es también llamado *vía de efectos fijos*, se trata de un análisis de varianza que permite estudiar simultáneamente los efectos de dos o más factores (fuentes de variación) sobre una variable respuesta. Existen tres tipos de modelos que pueden estar inmersos en este análisis, partiendo de una observación individual:

$$Y_{ijk}, \quad i=1, \dots, a \quad j=1, \dots, b \quad k=1, \dots, n$$

El primer subíndice indica el nivel del primer factor, el segundo el nivel del segundo factor y el tercero la observación dentro de la muestra. Los factores pueden ser ambos de efectos fijos (se habla entonces de modelo I), de efectos aleatorios (modelo II) o uno de efectos fijos y el otro de efectos aleatorios (modelo mixto). El modelo matemático de este análisis es:

$$\begin{aligned} Y_{ijk} &= \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} && \text{MODELO I} \\ Y_{ijk} &= \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk} && \text{MODELO II} \\ Y_{ijk} &= \mu + \alpha_i + B_j + (\alpha B)_{ij} + \varepsilon_{ijk} && \text{MODELO III} \end{aligned}$$

donde μ es la media global, α_i o A_i el efecto del nivel i del 1º factor, β_j o B_j el efecto del nivel j del 2º factor y ε_{ijk} las desviaciones aleatorias alrededor de las medias, que también se asume que están normalmente distribuidas, son independientes y tienen media 0 y varianza σ^2 .

A las condiciones de muestreo aleatorio, normalidad e independencia, este modelo añade la de aditividad de los efectos de los factores. A los términos $(\alpha\beta)_{ij}$, $(AB)_{ij}$, $(\alpha B)_{ij}$, se les denomina interacción entre ambos factores y representan el hecho de que el efecto de un determinado nivel de un factor sea diferente para cada nivel del otro factor (Molinero, 2003; HU, 2008).

1.4.7.2. Prueba H de Kruskal-Wallis para muestras k independientes

En aquellas situaciones en las que se haya rechazado la hipótesis acerca de la igualdad de las distribuciones poblacionales de las cuales hayan sido extraídas las muestras, será necesario, igual que en el caso del ANOVA, realizar contrastes a posteriores que determinen o precisen entre qué muestras existen las diferencias significativas que provocan el rechazar la hipótesis nula del contraste de Kruskal-Wallis.

El contraste de Kruskal-Wallis (William Kruskal y W. Allen Wallis) es una prueba no paramétrica, que sirve para determinar un grupo de datos que proviene de la misma población. Es idéntico al ANOVA con los datos reemplazados por categorías. Es una extensión del test de la U de Mann-Whitney para 3 o más grupos. La única exigencia radica en la aleatoriedad en la extracción de las muestras. Al igual que las demás técnicas no paramétricas, ésta se apoya en el uso de los rangos asignados a las observaciones (HU, 2008). Para la exposición de este contraste, supongamos que tenemos k muestras representadas en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1 Establecimiento de niveles y observaciones para el análisis de Kruskal-Wallis.

Niveles	Observaciones de \mathbf{X}				
Nivel 1 (n_1 datos)	X_{11}	X_{12}		X_{1n_1}
Nivel 2 (n_2 datos)	X_{21}	X_{22}	X_{2n_2}	
Nivel k (n_k datos)	X_{k1}	X_{k2}		X_{knk}

El número total de elementos en todas las muestras es: $N = n_1 + n_2 + \dots + n_k$

La hipótesis a contrastar es:

H_0 : Las k muestras vienen de la misma población

H_1 : alguna proviene de una población con mediana diferente a las demás

El modo de realizar el contraste comienza por ordenar las observaciones de menor a mayor, asignando a cada una de ellas su rango (1 para la menor, 2 para la siguiente,..., N para la mayor). Luego, para cada una de las muestras, se calcula R_i , $i=1 \dots k$, como la suma de los rangos de las observaciones que les corresponden. Si H_0 es falsa, cabe esperar que esas cantidades sean muy diferentes. Se calcula el estadístico de prueba con la fórmula:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

La regla para decidir si se ha de rechazar o no la hipótesis nula es la siguiente: a) Si el número de muestras es $k=3$ y el número de observaciones en cada una de ellas no pasa de 5 se rechaza H_0 si el valor de H supera el valor teórico que encontramos en la tabla de Kruskal-Wallis. b) En cualquier otro caso, se compara el valor de H con el de la tabla de la χ^2_{k-1} con $k-1$ grados de libertad. Se rechaza H_0 si el valor del estadístico supera el valor teórico $\chi^2_{k-1;1-\alpha}$ (HU, 2008).

1.4.7.3. Análisis de Homogeneidad

El análisis de homogeneidad se conoce también por el nombre de HOMALS, del inglés homogeneity analysis alternating least squares (análisis de homogeneidad mediante mínimos cuadrados alternantes). El análisis permite cuantificar los datos (categóricos) nominales mediante la asignación de valores numéricos a los casos (los objetos) y a las categorías.

El objetivo de HOMALS es describir las relaciones entre dos o más variables nominales en un espacio de pocas dimensiones que contiene las categorías de las variables así como los objetos pertenecientes a dichas categorías. Los objetos pertenecientes a la misma categoría se representan cerca los, mientras que los objetos de diferentes categorías se representan alejados los unos de los otros. Cada objeto se encuentra lo más cerca posible de los puntos de categoría para las categorías a las que pertenece dicho objeto.

El análisis de homogeneidad es similar al análisis de correspondencias, pero no está limitado a dos variables. Es por ello que el análisis de homogeneidad se conoce también como el análisis de correspondencias múltiple. También se puede ver el análisis de homogeneidad como un análisis de componentes principales para datos nominales.

El análisis de homogeneidad es más adecuado que el análisis de componentes principales típico cuando puede que no se conserven las relaciones lineales entre las variables, o cuando las variables se miden a nivel nominal. Además, la interpretación del resultado es mucho más sencilla en HOMALS que en otras técnicas categóricas,

como pueden ser las tablas de contingencia y los modelos loglineales. Debido a que las categorías de las variables son cuantificadas, se pueden aplicar sobre las cuantificaciones técnicas que requieren datos numéricos, en análisis subsiguientes (SPPSS, 2008).

1.5. Sistema de Hipótesis

La siguiente investigación considerando los antecedentes antes expuestos plantea las siguientes hipótesis:

- 1.5.1.** Los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3* al nemátodo *Meloidogyne* spp. están presentes en las entradas silvestres de solanáceas.
- 1.5.2.** Las entradas silvestres de la sección *Lasiocarpa* tienen más incidencia del gen de resistencia *Mi-1* que el resto de las secciones analizadas.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

1.6. Participantes

La presente investigación involucró la participación de la Escuela Politécnica del Ejército, a través de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y del Centro Internacional de la Papa CIP, ambas instituciones son ecuatorianas con amplio nivel de prestigio en el ámbito académico y científico.

El alumno responsable de la ejecución de la tesis fue el señor Santiago Zárate Baca, egresado de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Los profesionales que asesoraron el trabajo fueron, por parte de ESPE, las doctoras Karina Proaño y Patricia Jiménez; y por parte del CIP, el doctor Ricardo Oliva y el Biólogo Francisco Jarrín.

1.7. Zona de estudio

El estudio fue ejecutado en su mayor parte en las instalaciones de la Escuela Politécnica del Ejército, a través de los Laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ubicados en el campus Politécnico Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. Contó además, con el aporte científico y tecnológico del Centro Internacional de la Papa CIP, ubicado en la parroquia Cutucglagua, cantón Mejía, Provincia de Pichincha.

1.8. Período de inicio de la investigación

La presente investigación fue iniciada en el mes de septiembre del año 2007 culminando en el mes de marzo del año 2008.

1.9. Diseño

El diseño estadístico se fundamentó en un análisis descriptivo de las variables que se especifican en la tabla 2.1. Se tomó en cuenta el número de bandas amplificadas del exón, intrón, marcador TG180 y marcador N22R, además de su peso molecular expresado en pares de bases. Al final se elaboró una matriz de datos para analizar la incidencia de los genes *Mi-1* y *Mi-3* en cada una de las 8 secciones referidas para la presente investigación. Se aplicó un análisis univariante a través de la herramienta bioinformática SPSS, para identificar la interacción entre variables y la incidencia de cada uno en función del resto.

Tabla 2.1 Variables empleadas en la investigación de la búsqueda de genes de resistencia

Variable	Definición	Factor a determinar
<i>Exón</i>	Región del ARNm codificante de proteínas.	a) Número de bandas amplificadas. b) Número de pares de bases de cada banda amplificada
<i>Intrón</i>	Región del ARNm no codificante de proteínas.	a) Número de bandas amplificadas. b) Número de pares de bases de cada banda amplificada
<i>TG180</i>	Marcador molecular PCR que co-	a) Número de bandas amplificadas.

	segrega con el gen <i>Mi-3</i> .	b) Número de pares de bases de cada banda amplificada
N22R	Marcador molecular PCR que co-segrega con el gen <i>Mi-3</i> .	a) Número de bandas amplificadas. b) Número de pares de bases de cada banda amplificada
Sección	Categoría taxonómica que se ubica entre el género y la especie	a) Presencia o ausencia de los genes <i>Mi-1</i> y <i>Mi-3</i>

1.10. Procedimientos

1.10.1. Material Vegetal

El material vegetal utilizado en la investigación pertenece a entradas silvestres de la familia *Solanaceae* del Ecuador, estas muestras se ubican en las secciones *Anarrhichomenum*, *Basarthrum*, *Cyphomandra*, *Juglandifolium*, *Lasciocarpa*, *Lycopersicon*, *Petota* y *Torva* de esta familia de plantas (Tabla 2.2), tratando así de abarcar un mayor rango de estudio. La mayoría del material vegetal provino de donaciones de colecciones naturales que reposan en el CIP, básicamente son hojas secas y semillas; otra parte correspondió a frutos secos donados por la Universidad Nacional de Loja UNL. Los permisos de obtención y uso del material vegetal donado fueron acordados por las partes involucradas en la investigación. Además se utilizaron entradas de origen comercial que pertenecen a la sección *Lycopersicon* (Ly11 – Ly18 en la Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Entradas silvestres de la familia *Solanaceae* empleadas en la búsqueda de los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3*.

#	Código	Nombre Científico	Sección	Procedencia
1	A1	<i>S. brevifolium</i>	Anarrhichomenum	CIP
2	A2	<i>S. sodiroi</i>	Anarrhichomenum	CIP
3	A3	<i>S. sodiroi</i>	Anarrhichomenum	CIP
4	A4	<i>S. brevifolium</i>	Anarrhichomenum	CIP
5	B2	<i>S. caripense</i>	Basarthrum	CIP
6	C1	<i>S. betaceum</i>	Cyphomandra	CIP
7	C2	<i>S. falax</i>	Cyphomandra	CIP
8	J2	<i>S. juglandifolium</i>	Juglandifolium	CIP

9	J3	<i>S. juglandifolium</i>	Juglandifolium	CIP
10	J4	<i>S. juglandifolium</i>	Juglandifolium	CIP
11	J5	<i>S. ochranthum</i>	Juglandifolium	CIP
12	La1	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
13	La2	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
14	La3	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
15	La4	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
16	La5	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
17	La6	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
18	La7	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
19	La8	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
20	La9	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
21	La10	<i>S. quitoense</i>	Lasciocarpa	CIP
22	La12	<i>S. quitoense var dulce</i>	Lasciocarpa	CIP
23	La13	<i>S. hiporodium</i>	Lasciocarpa	CIP
24	La14	<i>S. hirtum</i>	Lasciocarpa	CIP
25	La15	<i>S. grandiflorum</i>	Lasciocarpa	CIP
26	La16	<i>S. hiporodium</i>	Lasciocarpa	CIP
27	La17	<i>S. hirtum</i>	Lasciocarpa	CIP
28	La18	<i>S. hirtum</i>	Lasciocarpa	CIP
29	La19	<i>S. hirtum</i>	Lasciocarpa	CIP
30	La20	<i>S. pectinatum</i>	Lasciocarpa	CIP
31	La21	<i>S. pectinatum</i>	Lasciocarpa	CIP
32	La22	<i>S. pectinatum</i>	Lasciocarpa	CIP
33	La23	<i>S. robustum</i>	Lasciocarpa	CIP
34	Ly1	<i>S. lycopersicon</i>	Lycopersicon	UNL
35	Ly2	<i>S. lycopersicum var. Ceraciforme</i>	Lycopersicon	UNL
36	Ly3	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
37	Ly4	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
38	Ly5	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
39	Ly6	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
40	Ly7	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
41	Ly8	<i>S. lycopersicum var. Ceraciforme</i>	Lycopersicon	UNL
42	Ly9	<i>S. Pimpinellifolium</i>	Lycopersicon	UNL
43	Ly10	<i>S. peruvianum</i>	Lycopersicon	CIP
44	Ly11	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
45	Ly12	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
46	Ly13	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
47	Ly14	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
48	Ly15	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
49	Ly16	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
50	Ly17	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial
51	Ly18	<i>S. lycopersicum</i>	Lycopersicon	Comercial

52	Ly20	<i>S. peruvianum</i>	Lycopersicon	CIP
53	Ly22	<i>S. habrochaites</i>	Lycopersicon	CIP
54	Ly23	<i>S. habrochaites</i>	Lycopersicon	CIP
55	Ly24	<i>S. habrochaites</i>	Lycopersicon	CIP
56	Ly25	<i>S. hirsutum</i>	Lycopersicon	CIP
57				
57	P4	<i>S. regularifolium</i>	Petota	CIP
58	P5	<i>S. paucijugum</i>	Petota	CIP
59	P6	<i>S. tuquerense</i>	Petota	CIP
60	P7	<i>S. andreanum</i>	Petota	CIP
61	P8	<i>S. minutifolium</i>	Petota	CIP
62				
62	T1	<i>S. hispidum Tipo</i>	Torva	CIP
63	T2	<i>S. hispidum-like</i>	Torva	CIP
64	T3	<i>S. hispidum-like</i>	Torva	CIP
65	T4	<i>S. hispidum-like</i>	Torva	CIP

Todas las entradas vegetales fueron procesadas y codificadas en una base de datos de Excel (ANEXO A). Para su conservación se dividió el material seco del fresco. El primero, fue mantenido a la temperatura ambiental del laboratorio (18 °C) en recipientes plásticos, herméticos, provistos con sílica gel evitando que la humedad del ambiente altere las muestras, especialmente las semillas. El segundo, fue triturado con nitrógeno líquido para dejarlo en forma de polvo, que luego fue depositado para su conservación en tubos falcon de 50 ml, estériles y sellados con parafilm, estas muestras se mantuvieron a -80 °C. Todos los recipientes fueron debidamente rotulados y con control periódico de su estado.

1.10.2. Extracción de DNA

En esta primera etapa se utilizaron dos tipos de muestras: a) frutos secos pertenecientes a las entradas Ly1 - Ly9; y, hojas secas procedentes de las entradas La1-La10 hasta estandarizar el método idóneo de extracción de DNA. Los protocolos elegidos se citan a continuación: a) Protocolo 1 de Khanuja, Shasany; Darokar & Kumar (1999); b) Protocolo 2 de CIP (2000); c) Protocolo 3 de Poresbsk, *et al.* (1997); y, d) Protocolo 4 de Doyle & Doyle (1990). Todas las muestras fueron manipuladas con guantes y material de metal estéril para reducir los índices de contaminación.

1.10.2.1. Protocolo N° 1 de Khanuja *et al.* (1999)

El material vegetal (50 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo final. Se añadieron 3 ml de buffer de extracción: 100 mM Tris.Cl pH 8,0; 1.5M NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0; CTAB 2,5%; PVP 1%; 2b-mercaptoetanol 0,2% para macerar la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se trasladó la mezcla a tubos falcon de 15 ml estériles con la ayuda de espátulas de polipropileno también estériles para ser incubada en baño maría a 60 °C por 2 horas, con agitación y volteo cada 20 minutos.

Terminada la lisis se añadieron 3 ml de cloroformo: alcohol isoamílico CIA (24:1), se mezcló suavemente por inversión del tubo y se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo falcon de 15 ml estéril, se añadieron 1.5 ml de NaCl 5M y 0.6 volúmenes de alcohol isoamílico frío. Se mezcló lentamente por inversión de tubo y se dejó reposar por 1 hora a -20°C.

Pasado el reposo, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol frío al 70%, se secó durante 20 minutos y resuspendió en TE sales para añadir 3 ul de RNA (10 mg/ul). Las muestras fueron incubadas en baño maría durante 30 minutos a 37 °C, al término del mismo se añadieron 300 ul de CIA 24:1 y se mezcló por inversión de tubo. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante pasó a un eppendorf estéril y se añadió 300 ul de etanol frío al 90%, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el pellet fue lavado con etanol frío al 80% y secado por 20 minutos. Al final el pellet fue resuspendido en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y almacenado a -20 °C.

1.10.2.2. Protocolo N° 2 de CIP (2000)

El material vegetal (100 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo final. Se añadió 1 ml de buffer de extracción: sorbitol 140 mM, 220 mM Tris.Cl pH 8,0; 800 mM NaCl, 22 mM EDTA pH 8.0; CTAB 0,8%; Sarkosyl 1%; 2b-mercaptoetanol 0,2% macerando la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se añadió 0.5 ml de CIA y se maceró la mezcla para

trasladarla a un tubo eppendorf de 2ml estéril con la ayuda de espátulas de polipropileno también estériles. Se incubó en baño maría a 55 °C por 30 minutos con agitación y volteo cada 10 minutos.

Terminada la lisis se enfriaron las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente para ser centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado sin topar la interfase a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml estéril, se añadió 1 ml de alcohol isoamílico frío. Se mezcló lentamente por inversión de tubo y se dejó reposar por 1 hora a -20°C.

Pasado el reposo, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol frío al 70%, se secó durante 20 minutos y resuspendió en RTE (Trizma base 10 mM, EDTA 0.1 mM) para añadir 2 ul de RNA (10 mg/ul). Las muestras fueron incubadas en baño maría durante 30 minutos a 37 °C y almacenadas a -20 °C.

1.10.2.3. Protocolo N° 3 de Poresbsk, *et al.* (1997)

El material vegetal (50 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido y macerado con 5 mg de PVP hasta tener un polvo final. Se añadieron 500 ul de buffer de extracción: 100 mM Tris.Cl pH 8,0; 1.4M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0; CTAB 0.2%; 2b-mercaptoetanol 0,3% a 65 °C para macerar la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se trasladó la mezcla a tubos eppendorf de 1.5 ml estériles con la ayuda de espátulas de polipropileno también estériles para ser incubada en baño maría a 65 °C por 1 horas, con agitación cada 20 minutos.

Terminada la lisis se dejó enfriar cada tubo por 5 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo eppendorf y se repitió la purificación por CIA hasta no tener interfase después de la centrifugación. Se añadió mitad del volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol frío al 90%.

Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con etanol frío al 70%, se secó durante 20 minutos

y resuspendió en TE a 4 °C durante toda la noche. Se añadió 3 ul de RNA (10 mg/ul). Las muestras fueron incubadas en baño maría durante 30 minutos a 37 °C, al término del mismo se añadió 3 ul de proteinasa K y se incubó a 37 °C por treinta minutos más.

Posteriormente se colocó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante pasó a un eppendorf estéril y se añadió la décima parte del volumen con Acetato de sodio 2M. Se dejó en reposo toda la noche a -80 °C. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el pellet fue lavado con etanol frío al 70% y fue resuspendido con 200 – 300 ul de TE. Se almacenó a -20 °C.

1.10.2.4. Protocolo N° 4 de Doyle & Doyle (1990)

El material vegetal (25 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo final. Se añadieron 500 ul de buffer de extracción: 100 mM Tris.Cl pH 8,0; 1.4M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0; CTAB 0.4%; 2b-mercaptoetanol 0,2%, a 65 °C para macerar la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se trasladó la mezcla a tubos eppendorf de 1.5 ml estériles con la ayuda de espátulas de polipropileno también estériles para ser incubada en baño maría a 65 °C por 1 hora, con agitación cada 20 minutos.

Terminada la lisis los tubos se enfriaron por 5 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente por inversión del tubo y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo estéril y se repitió la limpieza con CIA. El DNA fue precipitado con las dos terceras partes de alcohol isopropílico frío.

Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol frío al 70% durante 5 minutos, se secó durante 20 minutos y resuspendió en agua ultrapura a -4°C durante toda la noche. Las muestras fueron luego almacenadas a -20 °C.

1.10.3. Cuantificación de DNA

La pureza y concentración de DNA fue vista en geles de agarosa al 1% (p/v) y bromuro de etidio (5ul/100ml de gel) preparados con TBE 1X. La cuantificación del DNA se realizó utilizando 2ul de marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder INVITROGEN® a fin de comparar la intensidad de cada banda y extrapolar la cantidad de material genético obtenido. Cada pocillo fue cargado con 2ul de buffer de carga Blue Juice 10X INVITROGEN® y 8 ul de DNA. La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300mA durante una hora.

1.10.4. Amplificación del exón del gen *Mi-1*

Se sintetizaron los primers específicos 1R y 1F (tabla 2.3) a través de la casa comercial INVITROGEN® para la amplificación de una región conservada del exón del gen *Mi-1* de aproximadamente 1000 pb. La secuencia original del gen *Mi-1* identificado por Milligan *et al.* (1998) corresponde a la Accesoión N° U65668 del GenBank. Los primers 1R y 1F, que fueron sugeridos vía mail por la doctora Valerie Williamson del Departamento de Nematología de la Universidad de California (ANEXO C), flanquean una región comprendida entre los 4678 y los 5676 pb.

Tabla 2.3 Detalle de los primers utilizados en la amplificación de la región conservada de 1000 pb del exón de *Mi-1*.

Nombre	Secuencia	Longitud	%CG	Tm (°C)	Ta (°C)
1F	5' aactcgagaaaaggaagtgg 3'	20 bases	45	58 ¹	54 ²
1R	5'caagattgatcctttgtagacac 3'	24 bases	38	66 ¹	62 ²

¹ Calculado con la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$

² Calculado con la fórmula $T_a = T_m - 4$

La master mix de la reacción se llevó a cabo con reactivos INVITROGEN® como: buffer de la enzima, juego de dNTPs, MgCl₂, primers 1R y 1F, Taq Polimerasa y agua grado PCR en las concentraciones que se especifican en la tabla 2.4. Se utilizó el DNA de entradas provenientes a la sección *Lycopersicon* para ensayos iniciales. El control positivo fue DNA de *S. peruvianum* y el control negativo fue agua PCR en la misma alícuota de DNA empleado por reacción. Posteriormente se optimizaron las

concentraciones de los reactivos. El ensamblaje de la mix se realizó en una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

Tabla 2.4 Condiciones de reacción de la mix para la amplificación del exón del gen *Mi-1*.

Reactivo	[C inicial]	[C final]	V final (ul)
Buffer	10 X	1 X	2.50
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTPs	10 mM	100 uM	0.25
Primer F	100 uM	30 pM	0.30
Primer R	100 uM	30 pM	0.30
Taq polimerasa	5U/ul	1 U/ul	0.20
H ₂ O	-	-	15.70
DNA	5 ng/ul	-	5.00
TOTAL			25.00

La amplificación del exón se realizó en el termociclador Techne-TC-512 con una denaturación inicial de 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos, cada uno con una denaturación de 92 °C por 1 minuto, annealing de 55 °C por 1 minuto y extensión de 72 °C por 1 minuto. La extensión final de la reacción fue de 72 °C por 5 minutos. Posteriormente se optimizaron los tiempos y temperaturas para la amplificación.

1.10.5. Amplificación del intrón del gen *Mi-1*

Se sintetizaron los primers específicos 4R y 4F (tabla 2.5) a través de la casa comercial INVITROGEN® para la amplificación de una región intrónica funcional del gen *Mi-1* de aproximadamente 1300 pb. Estos primers fueron tomados de la investigación realizada por Jablonska *et al.* (2007) en la identificación del gen *Mi-9* de *Solanum arcanum* y que es homólogo al gen *Mi-1*. Según su estudio los primers flanquean una región desde los 1280-1300 pb hasta los 2629-2651 pb para la secuencia de *Mi-1* (Accesión N° U65668 del GenBank) y desde los 1045-1065 pb hasta 1644-1,666 pb para la secuencia de *Mi-1.1* (Accesión N° U65667 del GenBank).

Tabla 2.5 Detalle de los primers utilizados en la amplificación de la región intrónica del gen *Mi-1*.

Nombre	Secuencia	Longitud	%CG	Tm (°C)	Ta (°C)
4F	5' ttctctagctaaacttcagcc 3'	21 bases	43	60 ¹	56 ²
4R	5' ttttcgttttccatgattctac 3'	23 bases	30	60 ¹	56 ²

¹ Calculado con la fórmula $Tm = 2(A+T) + 4(C+G)$

² Calculado con la fórmula $Ta = Tm - 4$

La master mix de la reacción se llevó a cabo con reactivos INVITROGEN® como: buffer de la enzima, juego de dNTPs, MgCl₂, primers 4R y 4F, Taq Polimerasa y agua grado PCR en las concentraciones que se especifican en la tabla 2.4 del apartado 2.5.4. Posteriormente se optimizaron las concentraciones de los reactivos. Se utilizó el DNA de entradas provenientes a la sección *Lycopersicon* para ensayos iniciales. El control positivo fue DNA de *S. peruvianum* y el control negativo fue agua PCR en la misma alícuota de DNA empleado por reacción. El ensamblaje de la mix se realizó en una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

La amplificación del intrón se realizó en el termociclador Techne-TC-512 con una denaturación inicial de 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos, cada uno con una denaturación de 92 °C por 1 minuto, annealing de 55 °C por 1 minuto y extensión de 72 °C por 1 minuto. La extensión final de la reacción fue de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente se optimizaron los tiempos y temperaturas para la amplificación.

1.10.6. Amplificación del marcador TG180 ligado al gen *Mi-3*

Se sintetizaron los primers específicos 3R y 3F (tabla 2.6) a través de la casa comercial INVITROGEN® para la amplificación diferenciada de individuo homocigoto (1 banda de 1200 pb) y heterocigoto (2 bandas: 900 pb y 1200 pb) de un marcador co-segregante con el gen *Mi-3*. Estos primers fueron tomados de la investigación realizada por Yaghoobi *et al.* (2005) en la identificación del gen *Mi-3* en *Solanum peruvianum* y que es homólogo al gen *Mi-1*.

Tabla 2.6 Detalle de los primers utilizados en la amplificación del marcador codominante TG180 ligado al gen *Mi-3*.

Nombre	Secuencia	Longitud	%CG	Tm (°C)	Ta (°C)
3F	5' atactctttgcaggaacagctcac 3'	25 bases	44	72 ¹	68 ²
3R	5' cacattagtgatcataaagtaccag 3'	25 bases	36	68 ¹	64 ²

¹ Calculado con la fórmula $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$

² Calculado con la fórmula $T_a = T_m - 4$

La master mix de la reacción se llevó a cabo con reactivos INVITROGEN[®] como: buffer de la enzima, juego de dNTPs, MgCl₂, primers 3R y 3F, Taq Polimerasa y agua grado PCR en las concentraciones que se especifican en la tabla 2.4 del apartado 2.5.4. Se utilizó el DNA de entradas provenientes a la sección *Lycopersicon* para ensayos iniciales. El control positivo fue DNA de *S. peruvianum* y el control negativo fue agua PCR en la misma alícuota de DNA empleado por reacción. Posteriormente se optimizaron las concentraciones de los reactivos. El ensamblaje de la mix se realizó en una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

La amplificación del marcador TG180 se realizó en el termociclador Techne-TC-512 con una denaturación inicial de 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos, cada uno con una denaturación de 92 °C por 1 minuto, annealing de 56 °C por 1 minuto y extensión de 72 °C por 1 minuto. La extensión final de la reacción fue de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente se optimizaron los tiempos y temperaturas para la amplificación.

1.10.7. Amplificación del marcador N22R ligado al gen *Mi-3*

Se sintetizaron los primers específicos 2R y 2F (tabla 2.7) a través de la casa comercial INVITROGEN[®] para la amplificación diferenciada de homocigosis (1 banda de 1200 pb) y heterocigosis (2 bandas: 1200 pb y 1300 pb) de un marcador co-segregante con el gen *Mi-3*. Estos primers fueron tomados de la investigación realizada por Yaghoobi *et al.* (2005) en la identificación del gen *Mi-3* en *Solanum peruvianum* y que es homólogo al gen *Mi-1*.

Tabla 2.7 Detalle de los primers utilizados en la amplificación del marcador codominante N22R ligado al gen *Mi-3*.

Nombre	Secuencia	Longitud	%CG	Tm (°C)	Ta (°C)
2F	5' cgagctcgggtaccaccactacc 3'	22 bases	64	72 ¹	68 ²
2R	5' ttataagcccaactagacc 3'	20 bases	45	58 ¹	54 ²

¹ Calculado con la fórmula $Tm = 2(A+T) + 4(C+G)$

² Calculado con la fórmula $Ta = Tm - 4$

La master mix de la reacción se llevó a cabo con reactivos INVITROGEN® como: buffer de la enzima, juego de dNTPs, MgCl₂, primers 2R y 2F, Taq Polimerasa y agua grado PCR en las concentraciones que se especifican en la tabla 2.4 del apartado 2.5.4. Se utilizó el DNA de entradas provenientes a la sección *Lycopersicon* para ensayos iniciales. El control positivo fue DNA de *S. peruvianum* y el control negativo fue agua PCR en la misma alícuota de DNA empleado por reacción. Posteriormente se optimizaron las concentraciones de los reactivos. El ensamblaje de la mix se realizó en una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

La amplificación del marcador N22R se realizó en el termociclador Techne-TC-512 con una denaturación inicial de 94 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos, cada uno con una denaturación de 92 °C por 1 minuto, annealing de 59 °C por 1 minuto y extensión de 72 °C por 1 minuto. La extensión final de la reacción fue de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente se optimizaron los tiempos y temperaturas para la amplificación.

1.10.8. Visualización de los productos PCR

La visualización de los productos PCR se realizó en geles de agarosa al 2% (p/v) y bromuro de etidio (5ul/100ml de gel) preparados con TBE 1X. Se utilizaron 2ul de los marcadores de peso molecular Low DNA Mass Ladder y 1 kb Ladder INVITROGEN® para ubicar los fragmentos de interés. Cada pocillo fue cargado con 2ul de buffer de carga Blue Juice 10X INVITROGEN® y 8 ul de DNA. La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300mA durante dos a tres horas.

1.10.9. Secuenciación y análisis de las entradas con presencia del gen *Mi-1*

Se seleccionaron las entradas de solanáceas que presentan un interés notable para la identificación del gen *Mi-1*. Se realizó una amplificación del exón de este gen con cuatro repeticiones por muestra con las condiciones detalladas en el apartado 2.5.4.

Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (p/v) y bromuro de etidio (5ul/100ml de gel) preparados con TBE 1X. Se emplearon 5ul de marcador molecular 1 kb Ladder INVITROGEN[®]. Cada pocillo fue cargado con 20ul de buffer de carga Blue Juice 10X INVITROGEN[®] y 80 ul de DNA amplificado. La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300mA durante tres-cuatro horas.

Los exones identificados fueron escindidos del gel con un bisturí estéril y colocados en tubos de 1.5 ml. Se empleó el KIT PureLink[®] Gel Extraction de INVITROGEN[®] para recuperar el DNA de interés retenido en la agarosa. Posteriormente los fragmentos fueron cuantificados como se describe en el apartado 2.5.3 y liofilizados en un equipo (Leico 2000). La secuenciación fue realizada por la compañía Macrogen S.A. en un secuenciador 6 Applied Biosystems 3730xl. Los resultados fueron analizados con los programas bioinformáticos: BioEdit (Obtenido de <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>), FastPCR (Obtenido en <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm>), MEGA 4 (Obtenido de <http://www.megasoftware.net/index.html>), TreeView (Obtenido de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) y Blast (Obtenido en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Con ellos se obtuvieron datos referentes en: a) alineamiento global y local con otros genes homólogos, b) traducción en proteína y su composición, c) homología con otras secuencias aminoacídicas, y d) elaboración de árboles de similitud.

1.11. Análisis de datos

Los datos obtenidos corresponden a la presencia o ausencia de fragmentos, por un lado, del exón e intrón del gen *Mi-1* y por otro, de los marcadores TG180 y N22R ligados al gen *Mi-3*. Estos datos están definidos por: a) el número de bandas

amplificadas por cada marcador empleado y b) el peso molecular de cada banda de interés. A partir de éstos se elaboró una matriz (ANEXO B) en una hoja electrónica para el proceso de análisis.

La matriz resultante fue modificada en el programa SPSS[®] y fue sometida a un análisis de varianza de dos factores con el fin de estudiar la interacción entre las variables arriba mencionadas. Además, se realizaron pruebas como el test H de Kruskal-Wallis para muestras k independientes en la interacción primer-sección, y de Comparación múltiple como Tukey, DMS y Scheffe. Por último, se ejecutó un análisis de homogeneidad para describir las relaciones entre dos o más variables nominales en un espacio de pocas dimensiones provisto de las categorías de las variables y los casos pertenecientes a dichas categorías.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La presente investigación analizó varios cultivos solanáceos importantes a nivel económico, para el sector agrícola del país y la región andina, que se han visto amenazados por múltiples factores de tipo biótico y abiótico. El caso del tomate o de la naranjilla, es un claro ejemplo que a pesar de haber incrementado el área cultivable en los últimos años, su producción no ha crecido en la misma proporción (Estrada, 1992). La mayor parte del problema es debido a factores fitosanitarios junto a las malas prácticas de cultivo lo que agudiza la situación. Uno de estos factores, y que por excelencia es el más devastador constituye el ataque del nemátodo *Meloidogyne* spp. (Abad *et al.*, 2003), un endoparásito con la capacidad de disminuir notablemente el área destinada al cultivo con pérdidas cuantiosas para muchos productores.

El cultivo de tomate de mesa o riñón ha tenido un vertiginoso adelanto en el en el ámbito científico. Se han desarrollado múltiples variedades comerciales resistentes al nemátodo (Schaff *et al.*, 2007). En cambio, en los cultivos de tomate de árbol y naranjilla, pese a los múltiples esfuerzos y las técnicas tradicionales aplicadas (INIAP, 2003), no se ha podido controlar el problema. Esto ocurre posiblemente porque el tomate de mesa es un cultivo extendido ampliamente en todo el mundo al cual se lo ha estudiado en diferentes ámbitos para mejorarlo. Caso contrario, en el tomate de árbol y la naranjilla no se han reportado estudios en la misma proporción generando una brecha entre cultivos que poseen una valiosa importancia y potencialidad en el mercado nacional e internacional.

Sin embargo, existen esfuerzos profesionales en distintas áreas para tratar de solventar estos problemas. El presente trabajo científico pretende establecer las bases desde el punto de vista biotecnológico que encaminen a la solución real de un problema nacional.

4.1.1.12. Extracción y cuantificación de ADN

Con formato: Numeración y viñetas

En la extracción de DNA se pudo comprobar que de los cuatro protocolos empleados en la extracción de DNA, el descrito por Khanuja *et al.* (1999) (P1) generó un DNA de buena calidad para análisis de PCR debido a su pureza, ausencia de degradación y con un promedio de concentración de 30-40 ng/ul.

El protocolo 2 (CIP, 2000), tuvo buenos resultados, sin embargo, la diferencia de concentración y pureza fue notable comparado con (P1), posiblemente no tuvimos buenos resultados debido q que el detergente Sarkosyl, empleado en la buffer de extracción, no estaba en óptimas condiciones. Los resultados de los protocolos (P3) y (P4) fueron escasos. P3 fue el único protocolo que no presentó DNA debido posiblemente a que el procedimiento contempla múltiples etapas de purificación, lo que podría generar una pérdida de muestra en cada uno de los pasos.

Cabe mencionar que (P1) utiliza NaCl a una concentración de 5M y según Khanuja *et al.* (1999) este purifica el DNA de muestras vegetales con cantidades considerables de metabolitos secundarios. Tal es el caso de las entradas de naranjilla donde el protocolo funcionó bien pese a ser muestras que presentan mayor problema. Por otro lado, es importante considerar el tipo de tejido empleado (semilla u hoja) y su estado (fresco o seco) los cuales no fueron limitantes para obtener un DNA óptimo.

Finalmente, se consideró el tiempo de extracción de DNA, para el caso de (P1) se vio que demoró tres horas más en relación a (P2) y a (P4), debido a que P1 involucra pasos adicionales en las fases de arrastre. A pesar de ser el tiempo un limitante, se fijó el protocolo de Khanuja *et al.* (1999) (P1) como el método adecuado para la extracción por la buena calidad y concentración de DNA conseguido.

4.2.1.13. Identificación del gen *Mi-1*

Con formato: Numeración y viñetas

La identificación de una región conservada del exón permitió realizar una búsqueda inicial del estado del gen *Mi-1* en todas las entradas, y además, la

identificación del intrón funcional dio mayor información para validar las entradas que son potencialmente resistentes al nemátodo formador de nudo *Meloidogyne* spp.

Al comparar las secuencias de primers y condiciones de hibridación sugeridas por la Dra. Williamson (comunicación personal) para la identificación del exón, con los propuestos por Rossi *et al.* (1998) y Kaloshian *et al.* (1998) para la búsqueda de homólogos al gen *Mi-1*, se observó que en todos los casos se identificaron fragmentos en un orden de 1600-1000 pb. Esto confirma que la estrategia planteada para la identificación del exón del gen *Mi-1* fue acertada.

Por otro lado, los fragmentos obtenidos de la PCR con los primers 1R y 1F fueron heterogéneos entre las secciones. En la Figura 3.3 del capítulo de Resultados, se pudo observar claramente que a parte de la amplificación de un fragmento aproximado de 1000 pb correspondiente al exón, se observaron otras bandas de menor peso molecular. Meyers *et al.* (1998) y Noel *et al.* (1999), denominaron a estos fragmentos como pseudogenes, algo muy común en los genes de resistencia, donde pseudogenes y genes funcionales parecen estar agrupados en una familia de genes más grande, producto de la evolución en los mecanismos de defensa de la planta (Jablonska *et al.*, 2007). Todo esto sugiere que posiblemente los primers utilizados amplificaron regiones de genes de resistencia R, procedentes de duplicaciones y variaciones de un gen ancestral de resistencia (Zhang, 2003). Cabe además mencionar que estas secuencias de primers permitieron diferenciar individuos dentro de cada sección de solanáceas, debido al patrón de bandas característico amplificado por cada especie.

Finalmente, la incidencia del exón en el 75 % de las entradas analizadas en la presente investigación confirmaría la posibilidad de que este fragmento provino de un gen común y antiguo como se dijo anteriormente, el mismo que pudo haber evolucionado de varias formas (Michelmore & Meyers, 1998) con el fin de que estas especies reconozcan algunos de los cambios generados a nivel celular producto del ataque de nemátodos.

Hasta ahora existe la certeza de que la mayoría de las especies muestreadas, poseen parte de la región conservada del exón del gen *Mi-1* que nos interesa, sin embargo, es conocido que cualquier gen puede ser o no funcional, y que al serlo

depende de todo un mecanismo de regulación y expresión (Mjolsness *et al.*, 2002). En este caso la investigación consideró la amplificación del “intrón 1” (de 1306 pb) descrito por Milligan *et al.* (1998), que según los estudios de Jablonska *et al.* (2007) sugiere que esta región caracteriza al gen que confiere resistencia a nemátodos. Es así que, el estudio complementó el hallazgo inicial del exón con la identificación del intrón arriba mencionado.

Al utilizar los primers para el “intrón 1” descritos en el estudio de Jablonska *et al.* (2007), se encontró que únicamente las entradas La13 y J4 presentaron una banda aproximada de 1300 pb sugiriendo que probablemente el gen *Mi-1* reside en estos individuos y genera resistencia a *Meloidogyne* spp. Cabe mencionar también que las entradas P5, P6, P7 y P8 presentaron una banda cercana a los 1200 pb; al ser especies lejanas filogenéticamente al tomate, se esperaría que este fragmento corresponda al intrón funcional o parte de él, que al igual que el exón provino de un ancestro antiguo y evolucionó para generar resistencia al ataque del nemátodo.

Jablonska *et al.* (2007) y Milligan *et al.* (1998) describen además del “intrón 1” que los primers amplifican un intrón no funcional (“intrón 2”) de aproximadamente 556 pb. En el presente estudio y tal como se observa en la Figura 3.5 del capítulo de Resultados, encontramos un fragmento similar en 19 especies, a pesar que la bibliografía señala que no confiere resistencia, se podría considerar en futuras investigaciones para evaluar el grado de resistencia al ataque de nemátodos.

Los hallazgos mencionados anteriormente definen un total de 2 entradas con posible presencia del gen *Mi-1* y 19 con *Mi-1.1*, sin embargo, surge la necesidad de diseñar estrategias como mapeo y pruebas de funcionalidad para comprobar la resistencia generada al nemátodo (Burch-Smith *et al.*, 2004).

4.3.1.14. Identificación del gen *Mi-3*

La búsqueda del gen *Mi-3*, homólogo a *Mi-1* y *Mi-9*, biológicamente estable a temperaturas sobre los 30 °C y que actúa contra el ataque de cepas virulentas de *Meloidogyne* spp. (Veremis *et al.*, 1999) es una buena opción para mejorar las características de resistencia que expresa *Mi-1*.

Con formato: Numeración y viñetas

Actualmente, el gen *Mi-3* está en estudio y no se dispone de su secuencia, por tanto, el empleo de marcadores ligados a éste surge como una buena alternativa. El empleo del marcador TG180 utilizado en la investigación de Yaghoobi *et al.* (2005) permitió tener una aproximación del gen en las entradas del presente estudio. Al igual que los resultados obtenidos de los investigadores mencionados, los fragmentos amplificados en las especies analizadas con el marcador TG180 permitieron diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos para el gen *Mi-3*. A pesar que la secuencia del marcador fue diseñada para el análisis en tomate (*S. lycopersicum*), especies como la naranjilla y el tomate de árbol, presentaron patrones de homocigosis y heterocigosis similares al estudio, probablemente porque el locus de este gen está conservado debido a la sintenia presente en los genomas de plantas solanáceas (Prince *et al.*, 1992; Picoli *et al.*, 2006).

Yaghoobi *et al.* (2005) demostraron que los individuos homocigotos para *Mi-3* generan una resistencia más efectiva que los individuos heterocigotos, sin embargo, en ambos casos la respuesta es sólida. En nuestro estudio el 40 % de las entradas de solanáceas estudiadas presentaron el marcador TG180 en estado de homocigosis, sin embargo, no podemos asegurar totalmente que se trate del gen *Mi-3* debido a que el marcador está a una distancia de 1.1 cM del supuesto gen y no siempre co-segregaría con él. Por esta razón, intentamos amplificar otro marcador, N22R, utilizado en el mismo estudio de *Mi-3*, que co-segrega en su totalidad con el gen.

A diferencia del marcador TG180, N22R presentó resultados más complejos a nivel de individuos y secciones. Yaghoobi *et al.* (2005) enfatizan que el alto nivel de polimorfismo presente en el complejo *S. peruvianum* genera resultados heterogéneos al utilizar este marcador, hecho que podría explicar la diversidad de resultados obtenidos tanto a nivel de especies como en secciones de nuestro estudio.

Un total de 11 especies resultaron ser buenos candidatos para la expresión de *Mi-3*: 10 heterocigotos y 1 homocigoto. Por otro lado, se consideran también cuatro entradas de la sección *Lycopersicon* que amplificaron una sola banda de alrededor de 1230 pb, ubicándolas como posibles homocigotos resistentes. Tal vez una buena forma de continuar el estudio de *Mi-3* sería aprovechar la alta sintenia entre genomas de

tomate, papa y pimienta (Grube *et al.*, 2000) para estudiar relaciones genéticas con homólogos como *Me-3* (gen R a *Meloidogyne* spp. en pimienta), cuya estructura y función se conoce más (Djian-Caporalino *et al.*, 2001). Kaloshian *et al.* (1998) y Yaghoobi *et al.* (2005) coinciden que las investigaciones de este gen especialmente en *S. Lycopersicum* mediante análisis de cruces segregantes, han sido problemáticas debido a la cercanía del gen *Mi* al centrómero, este hecho suprime la recombinación génica en los cruces y evita la obtención de un modelo casi preciso de la estructura del mapa del gen.

Al igual que los resultados anteriores, la presencia del exón, intrón y el marcador TG180 en entradas que no incluyan únicamente a *S. lycopersicum*, propone una alternativa en el empleo de nuevas variedades que se involucren en planes de mejoramiento de cultivos como naranjilla, tomate de árbol entre otros.

4.3.1.1.14.1. Secuenciación y análisis de las entradas con presencia del gen

Con formato: Numeración y viñetas

Mi-1

Al realizar las secuenciación se observó que tan solo la secuencia Ly10 y parte de la secuencia La12 tuvieron buena calidad, el resto presentó problemas en la concentración final en la resuspensión del DNA liofilizado lo que afectó la secuenciación del exón de otras muestras de interés.

En el caso de Ly10, tanto el alineamiento local de la Accesoión N° 65668 con esta línea, como el alineamiento global mediante BLAST confirmaron que la secuencia de 816 pb obtenida corresponde a una región conservada del gen *Mi-1* que confiere resistencia al nematodo *Meloidogyne* spp.

Por otro lado, el alineamiento local de secuencias de nucleótidos con la secuencia La12 pone de manifiesto la existencia de polimorfismos, algo predecible debido a que Ly10 es una especie de la sección *Lycopersicon* y La12, de *Lasciocarpa*, pero ambas pertenecientes a la misma familia. Esto sugeriría que se trata de una región que provino de un ancestro común y que evolucionó de forma diferente en cada especie. Cabe señalar que, debido a la corta secuencia de La12, ésta no se pudo traducir a proteína para analizar si los polimorfismos cambian el marco de lectura y generan otra cadena de aminoácidos.

En cuanto a la proteína de 271 aminoácidos traducida de la secuencia Ly10, se determinó que es similar a 14 accesiones de proteínas que confieren resistencia a *Meloidogyne*. Además, según el alineamiento con BLASTX se vio que comparte 84 aminoácidos de la región NB y está provista de un motivo estructural de la forma axxLxxLxxLxa (...RLIRVLDL...) propio de la región LRR. Estos hallazgos llevan a sugerir que la proteína obtenida pertenece a la familia de proteínas de los *genes R* caracterizada por la presencia de una región conservada NB y un sitio LRR, como también de un dominio CC en el extremo N-terminal (Milligan *et al.*, 1998). Claro está que se debería tener un valor mayor al 50 % en la presencia del motivo estructural de leucinas comentado arriba para validar la presencia de esta secuencia y aseverar de que se trata una región LRR (Hwang *et al.*, 2000). En cuanto al sitio CC en el extremo N-terminal no podemos inferir por falta de una secuencia más amplia.

4.4-1.15. Análisis de datos

Con formato: Numeración y viñetas

El modelo estadístico empleado ayudó a representar de mejor forma las interacciones entre las variables: primer (exón, intrón y marcadores TG180 N22R), sección (*Anarrhichomenum*, *Lycopersicon* y otras) y la interacción primer-sección. Lo que facilitó complementar de forma estadística las observaciones obtenidas en los apartados 4.2 y 4.3. Mediante el análisis de varianza se pudo comprobar que los primers utilizados para la identificación del gen *Mi-1* fueron independientes de los que usaron para identificar al gen *Mi-3* y que cada uno genera un patrón específico de fragmentos. El mismo resultado se obtuvo con el análisis de varianza de la interacción (primer-sección). En cambio, a nivel de secciones, el análisis de varianza demostró que esta variable no determina por sí sola la amplificación de un patrón de bandas específico. Todo esto dio respaldo a la estrategia diseñada para la búsqueda de los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3*.

Por último, el análisis de homogeneidad ayudó con la ubicación gráfica de la interacción de las variables antes mencionadas. A través de este método dimos respaldo a la hipótesis planteada de que existía mayor incidencia del gen *Mi-1* en la sección *Lasciocarpa* que en el resto de secciones. En cuanto a los marcadores TG180 y N22R, notamos que el primero involucró secciones como *Lycopersicon* y *Lasciocarpa*,

importantes para nuestro estudio, mientras que para N22R observamos una cercanía notable a la sección *Lycopersicon*. De esta forma comprobamos el potencial estudio que deben tener estas secciones de solanáceas como fuente de especies con resistencia natural a nemátodos formadores de nudo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- 1.16. El protocolo obtenido de Khanuja *et al.* (1999) es idóneo para la extracción de DNA en cualquier especie solanácea, independiente de su procedencia (semilla, tallo joven u hoja) y de su estado (seco o fresco). La cuantificación a través del marcador Low DNA Mass Ladder INVITROGEN[®], cuantificó valores con este protocolo de DNA (≈30-40 ng).
- 1.17. La estandarización de la master mix para todos los primers utilizados se fijó en un volumen final de 20 ul de reacción con la optimización del 80% de los reactivos utilizados. Por otro lado, la optimización de los programas PCR para todos los fragmentos analizados (exón, intrón y marcadores TG180 y N22R) no presentaron problema alguno y brindaron resultados satisfactorios.
- 1.18. Las entradas silvestres de solanáceas analizadas presentaron una alta incidencia del exón del gen *Mi-1*, siendo la sección *Lasciocarpa* la más representativa con un mayor índice de aparición de este fragmento que el resto de secciones. Se identificaron también bandas menores, que probablemente forman parte de otros genes de resistencia R, o quizás son genes obtenidos de duplicaciones y variaciones de un gen ancestral.
- 1.19. A diferencia de la presencia mayoritaria del exón, el intrón funcional (1306 pb) fue identificado en las entradas La13 y J4 y, posiblemente en P5, P6, P7 y P8. Esto afirmaría que probablemente estas especies constituyen una fuente promisoría para el gen de resistencia *Mi-1*.

- 1.20. El marcador TG180 determina que cerca de la mitad de las especies muestreadas podrían tener el gen *Mi-3*, siendo las secciones *Lasciocarpa* y *Lycopersicon* las que más evidenciaron el estado de homocigosis resistente.
- 1.21. El marcador N22R fue más discriminante que TG180 e identificó un único homocigoto (La19) resistente, convirtiéndolo como un individuo potencial de estudio para el gen *Mi-3*. De esta forma la sección *Lasciocarpa* tiene una especie con *Mi-1* (La13) y también con *Mi-3*, constituyendo en una posible fuente alternativa de resistencia para el resto de especies.
- 1.22. La secuencia Ly10 obtenida de los exones seleccionados corresponde a una región conservada del exón del gen *Mi-1* y es similar con 19 accesiones procedentes de especies solanáceas como *S. peruvianum* y *S. lycopersicum*. que confirieren resistencia al nemátodo *Meloidogyne* spp.
- 1.23. La secuencia La12 presenta polimorfismos comparada con la región conservada del gen *Mi-1*, sugiriendo que las especies de la sección *Lasciocarpa* poseen una copia de este gen de resistencia y que probablemente tienen el mismo campo de acción que sus homólogos contra *Meloidogyne* spp.
- 1.24. La proteína traducida a partir de la secuencia Ly10 es similar a la secuencia aminoacídica de la familia de proteínas de los genes R que confieren resistencia a *Meloidogyne* spp., porque presenta 84 aminoácidos constitutivos de la región conservada NBS además de una repetición de Leucinas propia de la LRR.
- 1.25. El análisis ANOVA dos factores validó los resultados obtenidos para la identificación de los dos genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3*, demostrando que los primers utilizados fueron específicos para cada caso.
- 1.26. El análisis de homogeneidad facilitó la observación de la interacción primer-sección y su contribución para la búsqueda de los genes de resistencia *Mi-1* y *Mi-3*, indicando de forma gráfica la incidencia de cada fragmento según el peso molecular y procedencia vegetal.

- 1.27. Está claro que, la presente investigación realizada marca la pauta para seguir colaborando con estudios anteriores que a la final permitirán diseñar buenos planes de mejoramiento de cultivo para especies de solanáceas andina.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

- 1.28. Para tener una muestra de DNA libre de impurezas y degradaciones se recomienda extender la fase de purificación unos cinco minutos con CIA 24:1 además de una agitación leve por inversión de tubo.
- 1.29. Es necesario seguir analizando más entradas silvestres de solanáceas a fin de encontrar más individuos con la presencia del exón e intrón funcional del gen *Mi-1*. De encontrarse individuos con estas dos regiones es imprescindible secuenciar los fragmentos de interés para estar seguros de que los resultados obtenidos corresponden a las secuencias involucradas de generar resistencia al nematodo formador de nudo *Meloidogyne* spp.
- 1.30. Al igual que la identificación del gen *Mi-1*, la búsqueda de *Mi-3* en más entradas de especies solanáceas dará mayor fortaleza a la investigación y consolidará un banco de germoplasma que facilite la obtención de plantas resistentes a cepas virulentas y avirulentas de *Meloidogyne* spp. en suelos con temperaturas sobre los 30 °C.
- 1.31. Resulta importante dar continuidad a la presente investigación, incluyendo una fase de expresión génica y de campo para corroborar la efectividad de las plantas identificadas con indicios de resistencia en la investigación, así también de las que se pudiere encontrar posteriormente.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- 1.32. Abad P., Favery B., Rosso M. & Castagnone-Sereno P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. Molecular Plant Pathology 4 (4): 217–224.
- 1.33. Abascal, F. (2006). Alineamiento de secuencias, alineamientos múltiples. Extraído el 10 de marzo de 2008 de:
http://darwin.uvigo.es/people/fabascal/Teaching/Alineamiento_secuencias/practica.html
- 1.34. Ammiraju, J., Veremis, J., Huang, X., Roberts, P. & Kalovshian I. (2003). The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. Theor Appl Genet. 106: 478–484.
- 1.35. Atherton, J. & Rudich, J. (1986). The Tomato Crop. A Scientific Basis for Improvement. Chapman and Hall, New York.
- 1.36. Bell, A. & Dines, T. (1995). Branching patterns in the Solanaceae. P. C. Hoch and A. G. Stephenson (eds.), Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. pp: 157-171.
- 1.37. Bharathan, G., Goliber, T., Moore, C., Kessler, S., Pham, T. & Sinha, N. (2002) Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. Science 296: 1858-1860.
- 1.38. Bohs, L. (2004). Major clades in Solanum based in ndhF sequence analyses. In Solanaceae: William G. D'Arcy Memorial, Hollowell V, Keating T, Lewis W,

Croat T (eds). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.

- 1.39. Burch-Smith, T., Anderson, J., Martin, G. & Dinesh-Kumar, B. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. Plant J 39: 734–746.
- 1.40. Cadena, E. (2000). Estudio de prefactibilidad para tomate de árbol. SICA. Ecuador.
- 1.41. Calvo-Flores, A. y Segura, A. (2008). Análisis univariante de los ratios. Extraído el 6 de marzo, 2008 de la Facultad de Economía y Empresa de Universidad de Murcia de: <http://www.serviciosestadisticos.es/html/secc210.asp>.
- 1.42. Cap, G., Roberts, P. & Thomason, I. (1993). Inheritance of heat-stable resistance to *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon peruvianum* and its relationship to the Mi gene. Theor Appl Genet. 85: 777–783.
- 1.43. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. (2006). Productores de lulo y de mora competitivos mediante selección participativa de clones élite, manejo integrado de cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor. Autor: González, A.
- 1.44. Centro Internacional de la Papa CIP. (2000). Protocolo de Extracción de DNA-CTAB. Autor: Francisco Jarrín.
- 1.45. Cipollini, M., Bohs, L., Mink, K., Paulk, E. & Böhning-Gaese, K. (2002). Patterns of secondary compounds within fleshy fruits: ecology and phylogeny. D. J. Levey, W. R.
- 1.46. D'Arcy, W. (1991). The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee, and N. Estrada (eds.),

Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. pp: 75-137.

- 1.47. Dellaporta, S., Wood, J. & Hicks, J. (1983). A plantDNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter. Estados Unidos. v.1 no.14, pp:19-21.
- 1.48. Dennis, F., Herner, R. (1985). Naranjilla: a potential cash crop for the small farmer in Latin America. Acta Hort. 158: 475-481.
- 1.49. De Ley, P. (2006). A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. WormBook. doi/10.1895/wormbook.1.41.1. <http://www.wormbook.org>.
- 1.50. De Wit P. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends Plant Sci 2: 452-458.
- 1.51. Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A. & Abad, P. (2001). High-resolution genetic mapping of pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Theor Appl Genet 103: 592-600.
- 1.52. Doyle, J., & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- 1.53. Estrada, E. (1992). Genetic potential of lulo. (*Solanum quitoense* Lam.) and factors that limit its expression. Acta Hort. 310: 171-182.
- 1.54. Grube, R., Radwanski, E. & Jahn, M. (2000). Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. Genetics. 155: 873-887.
- 1.55. Heiser, C. (1985). Ethnobotany of the naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. Economic Bot. 39: 4-11.

- 1.56. Heiser, C. (1993). The Naranjilla (*Solanum quitoense*), The Cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid. Gene Conservation and Exploitation. pp: 29–34.
- 1.57. Hwang, C., Bhakta, A., Truesdell, G., Pudlo, W., & Williamson V. (2000). Evidence for a Role of the N Terminus and Leucine-Rich Repeat Region of the Mi Gene Product in Regulation of Localized Cell Death. The Plant Cell, Vol. 12: 1319–1329.
- 1.58. Hwang, C., & Williamson, V., (2003). Leucine-rich repeat–mediated molecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. The Plant Journal. 34: 585-593.
- 1.59. HU. (2008). Bioestadística. Extraído el 6 de marzo del Hospital de Madrid de: http://www.hrc.es/bioest/M_docente.html#tema3.
- 1.60. Huang X., McGiffen, M., Kaloshian, I. (2004). Reproduction of Mi-virulent Meloidogyne incognita isolates on Lycopersicon spp. J. Nematol 36: 69–75.
- 1.61. Hussey, S., Davis, E. & Ray, C. (1994). Meloidogyne stylet secretions. En: Lamberti, F., De Giorgi, C. & Bird D Mck (eds). Advances in Molecular Plant Nematology. Plenum Press. New York. pp.233-249.
- 1.62. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. (2003). Propuesta para el fortalecimiento de la cadena productiva de lana naranjilla en la amazonía ecuatoriana. Ecuador.
- 1.63. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS. (2002). III Censo Nacional Agropecuario. Resultados Nacionales y provinciales. Cultivos Permanentes. Quito: INEC. p. 110.
- 1.64. Jablonska, B., Ammiraju, J., Bhattarai, K., Mantelin, S., De Ilarduya, O., Roberts, P., & Kaloshian, I. (2007). The Mi-9 Gene from *Solanum arcanum*

Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. Plant Physiology Vol. 143: 1044–1054.

- 1.65. Knapp, S. (1986). Reproductive biology of Solanum section Geminata in a Costa Rican cloud forest. W. G. D'Arcy (ed.), Solanaceae: biology and systematics. Columbia University Press, New York. pp: 253-263.
- 1.66. Knapp, S., Bohs, M. Nee & Spooner, D. (2004). Solanaceae — a model for linking genomics with biodiversity Comparative and Functional Genomics. Comp Funct Genom 5: 285–291.
- 1.67. Kaloshian, I., Yaghoobi, J., Liharska, T., Hontelez, J., Hanson, D., Hogan, P., Jesse, T., Wijbrandi, J., Simons, G. & Vos, P. (1998). Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus Mi in tomato. Mol Gen Genet 257: 376–385.
- 1.68. Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M & Kumar, S. (1999). Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites Essential Oils. Plant Molecular Biology Reporter 17: 1-7.
- 1.69. Lobo, M. (2004). Tomate de Árbol. Frutal Promisorio para la Diversificación del Agro Andino. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Investigación Agraria, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Proyecto FTG-22/2001.
- 1.70. Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG. (2001) Tomate de árbol. pp: 3-31. Extraído el 10 de enero, 2008, de www.sica.gov.ec.
- 1.71. Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG. (2005) Tomate de mesa. (riñón). P3-33. Extraído el 20 de mayo, 2007, de www.sica.gov.ec.

- 1.72. Meyers, B., Chin, D., Shen, K., Sivaramakrishnan, A., Lavelle, S., Zhang, D.O. & Michelmore, R. (1998). The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. Plant Cell 10: 1817–1832.
- 1.73. Michelmore, R. & Meyers, W. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process. Genome Res. 8: 1113–1130.
- 1.74. Milligan, S., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P & Williamson, V. (1998). The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. The Plant Cell 10: 1307-1319.
- 1.75. Mjolsness, E., Jönsson, H., Shapiro, B. & Meyerowitz, E. (2002). Modeling Plant Development With Gene Regulation Networks Including Signaling And Cell Division. Third International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. Novosibirsk, Russia.
- 1.76. Molinero, L. (2003). Análisis de Varianza. Extraído el 6 de marzo, 2008 de: www.seh-lelha.org/stat1.htm.
- 1.77. Monteros, A., Muñoz, L., Revelo, J., Tapia, C., Zambrano, E., & Fiallos, J. (2003). Nematode Resistance Through Mutation Induction in a Local Variety of Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) in Ecuador. IAEA-TECDOC-1426: 87-90.
- 1.78. Nematode Interaction Unit. (2008). Extraído el 20 de febrero, 2008 de: Rothamsted Research: <http://www.rothamsted.ac.uk/ppi/pcncontrol/mellifecycle.htm>.
- 1.79. Noel, L., Moores, T., van Der Biezen, E., Parniske, M., Daniels, M., Parker, J. & Jones, E. (1999). Pronounced intraspecific haplotype divergence at the RPP5 complex disease resistance locus of Arabidopsis. Plant Cell 11: 2099–2112.

- 1.80. Nombela, G., Williamson, V. & Muniz, M. (2003). The root-knot nematode resistance gene Mi-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. Mol Plant Microbe Int 16: 645–649.
- 1.81. Pagliano, J. (2002). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. V. Echenique, C. Rubistein, L. Mroginski. El papel de las nuevas biotecnologías en la producción agropecuaria (pp. 21-23). Argentina: INTA.
- 1.82. Peralta, I. Knapp, S. & Spooner, D. (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicum*: Solanaceae) from Northern Peru. Syst. Bot. 30: 424-434.
- 1.83. PREMIER BIOSOFT. (2005). PCR Primer Design Guidelines. Extraído el 18 de febrero, 2008 de: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html.
- 1.84. Prince, J., Pochard, E. & Tanskley, S. (1992). Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of sinteny with tomato. Genome. 36: 404-417.
- 1.85. Picoli, E., Lima, G., Lau, D., Oliveira, J., Laia, M. & Zerbini, F. (2006). Resistance gene Sw-5 of tomato confers resistance to TCSV in *Solanum melongena*. International Journal of Horticultural Science. 12 (4): 41–47.
- 1.86. Porebski, S., Bailey, L. & Baum, B. (1997). Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter. 15(1): 8-15.
- 1.87. Ramírez, P. (2006). Qué es la bioinformática. Extraído el 10 de marzo de 2008 de <http://biologia.ucr.ac.cr/profesores/Pilar%20Ramirez/Que%20es%20la%20bioinform%C3%A1tica.ppt>.

- 1.88. Revelo, J. (2003). Manejo Integrado de Plagas para el Mejoramiento de la Producción Sostenible de Frutas en la Zona Andina. Proyecto FONTAGRO 5(28).
- 1.89. Richman, A. & Kohn, J. (2000). Evolutionary genetics of self-incompatibility in the Solanaceae. Plant Molecular Biology 42: 169-179.
- 1.90. Rodríguez, G. y Martínez, M. (2008). Secuenciación automática de ADN. Extraído el 25 de febrero, 2008 del Servicio de Secuenciación automática de ADN del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB - CSIC) de: <http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/biomed1.htm#biblio>.
- 1.91. Rogers, S. & Bendich, A. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers. Bélgica. A6: 1-10, de http://www.geocities.com/pedrojrocha/pr/rocha23_3.pdf.
- 1.92. Rossi, M., Goggin, F., Milligan, S., Kaloshian, I., Ulman, D. & Williamson, V. (1998). The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. Proc Natl Acad Sci .USA 95: 9750–9754.
- 1.93. Rueda, D. (2003). Botánica Sistemática. Quito-Ecuador. Compunor. 4^{ta} Edición. pp: 140-145.
- 1.94. Sánchez, A. (2008). Alineamiento de secuencias. Introducción a la Bioinformática de <http://somosierra.cnb.uam.es/doctorado/2008/practica2008.html>.
- 1.95. Sandoval, K. (2007). Detección del gen de resistencia (*Tm-2*) al virus del mosaico del Tomate (*ToMV*) mediante el uso de de la reacción en cadena de la polimerasa y el marcador SCAR (SCG09700) en variedades cultivadas y silvestres de tomate (*S. lycopersicum*) del Ecuador. Tesis previa la obtención de título de tercer nivel. Quito, Ecuador.
- 1.96. Sambrook, J. & Ruseell, D. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. New Cork: CSHL press.

- 1.97. Santamaria, Mulrooney & Kitto (2004). Screening For Root-Knot Nematode Response In Somaclonal Variants Of *Solanum Quitoense* Lam. Nematropica Vol. 34, No. 1.
- 1.98. Schaff, J., Nielsen, D., Smith, C., Scholl, E. & Bird, D. (2007). Comprehensive Transcriptome Profiling in Tomato Reveals a Role for Glycotransferase in Mi-Mediated Nematode Resistance. Plant Physiology 144: 1079-1092.
- 1.99. Silva & M. Galetti (eds.). Seed Dispersal and Frugivory: ecology, evolution and conservation. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. pp 111-128.
- 1.100. Sinha, N. (1997) Simple and compound leaves: reduction or multiplication? Trends in Plant Science 2: 396-402.
- 1.101. Solanaceae Source. (2008). Solanum Genera. Extraído el 16 de febrero, 2008 de The Natural History Museum, Cromwell Road, London: <http://www.nhm.ac.uk/solanaceaesource/>.
- 1.102. SPSS. [Computer software]. (2008). Versión 11.5.1. LEAD Technologies®.
- 1.103. Stone, J. (2002). Molecular mechanisms underlying the breakdown of gametophytic self-incompatibility. Quarterly Review of Biology 77: 17-32.
- 1.104. Técnicas avanzadas en Biología molecular, Ácidos Nucleicos, Extracción de ADN y ARN. (2001). Extraído el 16 de febrero, 2008 de: <http://www.upo.es/depa/webdex/biocel/Tecnicas/documentos/TAB-8.pdf>.
- 1.105. Valarezo, C. y V. Samaniego. (1982). El cultivo de la naranjilla (*S. quitoense* Lam) en el área del proyecto Zamora – Nangaritza. p.33 -45 In: F. Dennis y S. Camacho (eds). Memorias de la primera conferencia internacional de naranjilla. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Quito-Ecuador.

- 1.106. van Oijen, G., van den Burg, H., Cornelissen, B., & Takken, F. (2007). Structure and Function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants. Annu. Rev. Phytopathol. 45: 43-72.
- 1.107. Veremis, J. & Roberts, P. (1996). Relationship between *Meloidogyne incognita* resistance gene in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. , Theor Appl Genet 93: 950–959.
- 1.108. Veremis, J., van Heusden, A. & Roberts, P. (1999). Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. Theor Appl Genet 98: 274–280.
- 1.109. VINCENT, R. 2005. General Notes on Primer Design in PCR. Extraído el 16 de febrero, 2008 de: <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>.
- 1.110. Williamson, V., & Hussey, R. (1996). Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. The Plant Cell. 8: 1735-1745.
- 1.111. Williamson, V., Ho, J., Wu, F., Miller, N & Kaloshian, I. (1994). A PCR based marker tightly linked to the nematode resistance gene Mi in tomato. Theor. Appl. Genet. 87: 757-763.
- 1.112. Yaghoobi, J., Yates, L. & Williamson, V., (2005). Fine mapping of the nematode resistance gene Mi-3 in *Solanum peruvianum* and construction of a *S. lycopersicum* DNA contig spanning the locus. Mol Gen Genomics 274: 60-69.
- 1.113. Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Wen, Y. & Williamson, V., (1995) Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. Theor Appl Genet 91: 457–464.
- 1.114. Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. TRENDS in Ecology and Evolution 18: 6.

- 1.115. Zhang,H., Xie.X., Xu.Y.& Wu.N. (2004), Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibito II gene, Plant Physiology and Biochemistry 42: 437-444.

ABSTRACT

Andean region represents an important source of *Solanaceae* family plants with economic importance in Ecuadorian trade market. However, the productivity hasn't increased by phytosanitary problems, the knot-root nematode *Meloidogyne* spp. is the principal responsible, it avoids the normal absorption of the nutrients and it reduces the yield of the culture. Although the nematode resistance in commercial lines is small, some wild species show natural resistance. *Mi-1* and *Mi-3* genes were discovered in wild tomato (*S. peruvianum*) they confer resistance to three dangerous nematodes: *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*, also protect against whitefly and aphids. The goal of this research was to detect homologous genes to *Mi-1* and *Mi-3* in Ecuadorian wild species. Sixty one lines from eight important sections of *Solanaceae* family were used to identify these genes. The *Mi-1* case was resolved with differential PCR amplification between exon and intron regions. In contrast, *Mi-3* was identified using two molecular markers that co-segregate with this gene. The results demonstrated that *Lasiocarpa* section have the highest incidence to the exon from *Mi-1* gene that the rest. In other way, two species with *Mi-1* and one with *Mi-3* seem to be promissory plants to confer nematode resistance. Also, the Ly10 sequence presented similarity with nineteen accessions from GenBank, and the protein translated belongs to LRR-NBS proteins from resistance genes. The identification of these genetic factors will let us to improve the commercial cultures and to conserve the human health and environment.