

## EVALUACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE TOMATE POR SU RESISTENCIA A *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* Y *Ralstonia solanacearum* CON FINES DE MEJORAMIENTO

Iris Pérez-Almeida<sup>1</sup>, Rafael Morales-Astudillo<sup>2</sup>, Reina Medina-Litardo<sup>3</sup>, Galo Salcedo-Rosales<sup>3</sup>, Andrea F. Dascon<sup>4</sup> y Tulio Solano-Castillo<sup>2</sup>

### RESUMEN

Las enfermedades del tomate causadas por *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Ralstonia solanacearum* preocupan a nivel mundial por las pérdidas económicas debido a daños en el cultivo o al costo de las medidas de control. El desarrollo de variedades resistentes reduce el uso de plaguicidas, siendo fundamental disponer de germoplasma caracterizado morfológica, molecular y agronómicamente. En la presente investigación se planteó validar el uso de los marcadores moleculares SCAR Mi-23F/Mi-23R; At2-F3/At2-R3; I-2/5F/I-2/5R; P7-43DF3/P7-43DR1; P7-43DF1/P7-43DR1; TSCARaatF/R y TSCARaagF/R, asociados a los genes de resistencia *Mi-1.2*, *I-1*, *I-2*, *I-3* y *TRSR-1*, para caracterizar 144 materiales que incluyeron *Solanum lycopersicum*, *Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*, *S. pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, y familias avanzadas F<sub>3</sub> de cruces de silvestres por una variedad tradicional, con fines de mejoramiento. Utilizando el marcador asociado al gen de resistencia *Mi-1.2* se determinó que los materiales resultaron susceptibles, excepto un testigo comercial con la banda asociada al gen de resistencia a nematodos. Gran parte de las accesiones analizadas mostraron la banda asociada con el gen de resistencia *I-1*, aunque se observaron bandas de susceptibilidad, heterocigocidad o resistencia asociadas a los genes *I-2* e *I-3*. Los materiales analizados revelaron bandas asociadas al gen de resistencia a *R. solanacearum*. Los marcadores moleculares permitieron separar genotipos por su resistencia a tres de las principales enfermedades que afectan actualmente al tomate.

**Palabras claves adicionales:** Caracterización molecular, enfermedades del tomate, resistencia, selección asistida por marcadores, *Solanum* spp.

### ABSTRACT

#### Molecular screening of tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum* for genetic improvement

Tomato diseases caused by *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and *Ralstonia solanacearum* are worldwide major concerns because of economic losses due to crop damage or to the cost of the control measures. Resistant varieties development reduces pesticide usage, therefore it is strongly desirable to have morphological, molecular and agronomically characterized germplasm. This research aimed to validate the use of SCAR molecular markers Mi-23F/Mi-23R; At2-F3/At2-R3; I-2/5F/I-2/5R; P7-43DF3/P7-43DR1; P7-43DF1/P7-43DR1; TSCARaatF/R and TSCARaagF/R, associated with *Mi-1.2*, *I-1*, *I-2*, *I-3* and *TRSR-1* resistance genes, to characterize molecularly 144 materials including *Solanum lycopersicum*, *Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*, *S. pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, and advanced families derived from crosses of wild genotypes with a local variety for purposes of plant breeding. Using a marker associated to the resistance gene *Mi-1.2* we determined that most of the materials had the band associated with susceptibility to the nematode except for the commercial genotype used as control, presumably with the resistance gene. Most of the assessed accessions had the bands associated to resistance gene *I-1*, although bands associated to susceptibility, heterozygosity, or resistance towards *I-2* and *I-3* genes were observed. Studied genotypes showed resistance genes towards *R. solanacearum*. Molecular markers allowed the screening of genotypes for resistance to three major diseases currently affecting tomato.

**Additional keywords:** Marker-assisted breeding, molecular characterization, resistance, *Solanum* spp., tomato diseases

Recibido: Septiembre 8, 2015

Aceptado: Marzo 18, 2016

<sup>1</sup> Investigador Prometeo U de Guayaquil. Dpto. Biotecnología. Instituto Nacional de Investig. Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental Litoral Sur. Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas, Ecuador. e-mail: iris.perez@iniap.gob.ec

<sup>2</sup> Ingeniería Agropecuaria, Universidad Nacional de Loja, Ecuador

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias para el Desarrollo, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Guayaquil. Ecuador

<sup>4</sup> Universidad de Azuay, Escuela de Biología, Ecología y Gestión. Ecuador

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del tomate preocupan a nivel mundial por las pérdidas económicas debido a daños en el cultivo o el costo de las medidas de control (FAO, 2015).

El nematodo *Meloidogyne incognita* es posiblemente el parásito más dañino de los cultivos en el mundo (Trudgill y Blok, 2001), responsable de grandes pérdidas en cultivos de importancia económica como el tomate (*Solanum lycopersicum*).

Se ha planteado que el gen *Mi1-2* suprime el desarrollo y reproducción de los nematodos formadores de agallas *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* en tomate (Bleve-Zacheo et al., 2007; Verdejo-Luca y Sorribas, 2007). Se ha desarrollado un marcador tipo SCAR (siglas del inglés Sequenced characterized amplified region o Secuencia amplificada de una región conocida) ligado a este gen, denominado Mi-23, el cual es codominante, y amplifica un fragmento de 450 pb correlacionado con los fenotipos susceptibles de líneas de *S. lycopersicum* (*mi/mi*), otro de 400 pb con los resistentes (*Mi/Mi*) y ambos fragmentos (*Mi/mi*) con los heterocigotas (Seah et al., 2007a; Pérez-Almeida et al., 2015). Mi-23F/Mi-23R tiene la ventaja de que no se necesita emplear enzimas de restricción como en otro tipo de marcadores, no se amplifican falsos positivos en líneas resistentes a begomovirus, introgresadas de *S. habrochaites* y *S. chilense*, y pueden utilizarlo mejoradores que hayan introducido otras características de resistencia ubicadas en la región *Mi* (Seah et al., 2007b).

La marchitez del tomate es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans. Tres razas o patovares (1, 2 y 3) se distinguen por su virulencia en cultivares diferenciales de tomate que poseen distintos genes dominantes de resistencia (Mes et al., 1999). Basados en la existencia de resistencia dominante monogénica, se ha asumido una relación gen por gen entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el tomate. Los patovares contienen genes de avirulencia los cuales corresponden a genes dominantes de resistencia en cultivares de tomate a los cuales son incapaces de infectar (Flor, 1971).

La estrategia de control de patógenos más duradera y amigable con el ambiente consiste en

desarrollar cultivares mejorados resistentes a la marchitez (Beckman, 1989). Para identificar genes dominantes de resistencia es esencial entender la interacción entre patógeno y cultivo a un nivel genético, es así como los marcadores moleculares son útiles como herramienta (Grube et al., 2000; Foolad y Panthee, 2012).

La resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0 (ex raza 1) se introgresó de *S. pimpinellifolium* y fue mapeada al brazo corto del cromosoma 11 (Scott et al., 2004). Arens et al. (2010) desarrollaron un marcador SCAR dominante At2-F3/At2-R3 el cual amplifica un producto de 130 pb en los materiales resistentes, mientras que una delección de siete nucleótidos impide amplificar productos en los susceptibles. El gen dominante *I-2* de tomate confiere resistencia contra las razas 1 y 2 del patógeno. Fue introgresado del tomate silvestre *S. pimpinellifolium* (Stall y Walter, 1965) y mapeado al cromosoma 11 (Laterrot, 1976). El locus *I-2* posee varios miembros (Ori et al. 1997). El marcador SCAR codominante *I-2/5F* e *I-2/5R* específicamente diseñado en la secuencia del gen *I-2* (Yu y Zou, 2008), distingue genotipos resistentes *I-2 / I-2* con un fragmento de 693 pb; susceptibles *i-2/ i-2*, con 633 pb; y ambas bandas en los heterocigotas *I-2/i-2*. El locus *I-3* introgresado de *S. pennellii* confiere resistencia a la raza 1, 2 y 3, fue mapeado al cromosoma 7 (Bournival et al., 1989; 1990). Aunque *I* e *I-2* se han utilizado más con fines de mejoramiento (Scott, 2008), actualmente *I-3* se prefiere dado que la raza 3 se está haciendo más común y existen pocos cultivares disponibles con el gen de resistencia *I-3* (Foolad y Panthee, 2012). Los marcadores SCAR P7-43DF1/R1 y P7-43DF3/R1 se encuentran estrechamente ligados al gen *I-3* en tomate (Barillas et al., 2008). Un gen *I-7* adicional que confiere resistencia a la raza 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se descubrió recientemente (González et al., 2015). La acumulación de varios genes de resistencia en el mismo genotipo es importante pues favorece la resistencia horizontal, más difícil de romper por el patógeno y por ende más duradera.

*Ralstonia solanacearum* es un patógeno del suelo de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales, causa la enfermedad

conocida como marchitez bacteriana, que afecta una gran diversidad de cultivos (Hernández et al., 2005). Los estudios de herencia de la resistencia a esta enfermedad son complejos y se han obtenido resultados diferentes según los materiales empleados. Según Miao et al. (2009) están involucrados dos genes de resistencia y con dominancia incompleta, los cuales tienen efecto complementario. Se han localizado dos marcadores dominantes tipo SCAR TSCAR<sub>AAG/CAT</sub> y TSCAR<sub>AAT/CGA</sub>, a 4.6 y 8.4 cM del gen de resistencia *TRSR-1*, respectivamente.

Los parientes silvestres del tomate cultivado constituyen un rico acervo de genes de resistencia a estreses bióticos y abióticos, así como de otras características importantes para el mejoramiento del cultivo. De allí que la introducción de genes silvestres al tomate cultivado sea la base para el logro de cultivares e híbridos con nuevas características (Foolad, 2007). El uso de variedades resistentes a los principales estreses bióticos reduce el uso de plaguicidas y preserva el ambiente, pero para obtenerlas es fundamental disponer de un germoplasma caracterizado morfológica, molecular y agrónomicamente. Para realizar tal caracterización se han desarrollado gran cantidad de marcadores moleculares en tomate, cuyas bases se actualizan rápidamente desde la secuenciación del genoma (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Algunos de estos marcadores moleculares, entre ellos los SCAR, se realizan a través de una PCR sencilla y se analizan en geles de agarosa, lo cual está al alcance de muchos laboratorios en América Latina. Por lo tanto pueden implementarse rutinariamente en tomate así como en otros cultivos para facilitar el trabajo de los fitomejoradores apoyados por herramientas biotecnológicas.

Los marcadores moleculares tienen la potencialidad de complementar las pruebas de patogenicidad, con la ventaja de que la reacción no está enmascarada por la dominancia (Arens et al., 2010). Tienen como ventaja sobre las pruebas biológicas que se pueden discriminar individuos homocigotas resistentes de aquellos heterocigotas en los lotes de semillas o de plántulas en primeros estados de desarrollo (Arens et al., 2010).

En la presente investigación se planteó el uso

de marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Ralstonia solanacearum* para caracterizar accesiones de tomate, incluyendo variedades comerciales de *Solanum lycopersicum*, especies silvestres y familias avanzadas F<sub>3</sub>, con fines de implementarlos en el proceso de mejoramiento genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron hojas libres de enfermedades de los siguientes materiales vegetales: 3 variedades comerciales de tomate (*S. lycopersicum* L.), esto es Sena, Floradade y 135; 16 accesiones silvestres de tomate [*Solanum pimpinellifolium* (06); *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (02); *S. neorickii* (04); *S. habrochaites* (04)]; así como 125 plantas F<sub>3</sub> derivadas de cruzamientos en los cuales se utilizó la variedad 135, cultivada por los agricultores de la provincia de Loja (Ecuador), como progenitor femenino y como donantes de polen accesiones silvestres de *S. neorickii*, *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. habrochaites*, así como progenitores comerciales importados (*S. lycopersicum*). Estos cruzamientos habían sido realizados en la Universidad Nacional de Loja en años previos.

**Extracción de ADN.** Las hojas seleccionadas se maceraron con mortero y pestillo de porcelana en 1 mL del búfer de extracción (100 mM Tris HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % CTAB, 1 % polietilenglicol y 0,5 % de sulfito de sodio) precalentado a 75 °C (Risterucci et al., 2000; Pérez-Almeida et al., 2011), se transfirió el macerado a microtubos de 1,5 mL, se incubó a 65 °C por 20 min a 550 rpm. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de cloroformo: isoamilalcohol en proporción 24:1. Después de centrifugar por 15 min a 14 mil rpm se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 1 mL de etanol absoluto y 50 µL de acetato de sodio 3 M con pH 5,2 invirtiendo suavemente hasta observar la formación del pellet de ADN. Los microtubos se colocaron a -20 °C por 12 h para recuperar el máximo de ADN. Se realizó un lavado con etanol al 70 % y se secó el exceso colocando los tubos en una centrífuga a 45 °C por

30 min. El ADN fue resuspendido en 50  $\mu$ L de bufer TE 1X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA 0,5 M y pH 8).

La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% y la cantidad de ADN obtenido por cada muestra se determinó por absorbancia utilizando un lector Synergy HT. Las diluciones de ADN de trabajo fueron preparadas a 25  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

**Amplificación por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR).** Las muestras se amplificaron en un termociclador Eppendorf utilizando los marcadores tipo SCAR Mi23F: 5'-TGGAAAAA TGTTGAATTTCTTTTG-3', Mi23R: 5'-GCATA CTATATGGCTTGTTTACCC-3' (Seah et al., 2007a; Pérez et al., 2015); At2-F3 5'-CGAATCT GTATATTACATCCGTCGT-3'; At2-R3 5'- GG TGAATACCGATCATAGTCGAG-3' (Arens et al., 2010); I-2/5F 5'- CAAGGAACTGCGTCTGT CTG-3'; I-2/5R 5'-ATGAGCAATTTGTGGCCA GT-3' (Yu y Zou, 2008); P7-43DF1 5'-GGTAAA GAGATGCGATGATTATGTGGAG-3'; P7-43D F3 5'-CACGGGATATGTTTRTTGATAAGCATG T-3'; P7-43DR1 5'- GTCTTTACCACAGGAAC TTTATCACC-3' (Barillas et al., 2008); TSCAR<sub>AAT/CGA</sub>F 5'- TAGATGGAATCCAATAT CAGG-3'; TSCAR<sub>AAT/CGA</sub>R 5'- AACCACAGTG AAGGAATATACA-3' (Miao et al. 2009), descritos en la literatura como asociados a los genes *Mi-1.2*, *I-1*, *I-2*, *I-3*, y *TRSR-1* de resistencia a *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y *Ralstonia solanacearum*. Se preparó la mezcla de PCR en un volumen total de 10  $\mu$ L que contenía 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10X Buffer GoTaq Promega, 400 $\mu$ M dNTPs, 10  $\mu$ M de cada iniciador, 1U GoTaq polimerasa Promega y 50 ng de ADN genómico.

Se utilizó el siguiente programa de PCR: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de los iniciadores a 54 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min), extensión final a 72 °C por 7 min. Las amplificaciones se replicaron tres veces para confirmar los resultados.

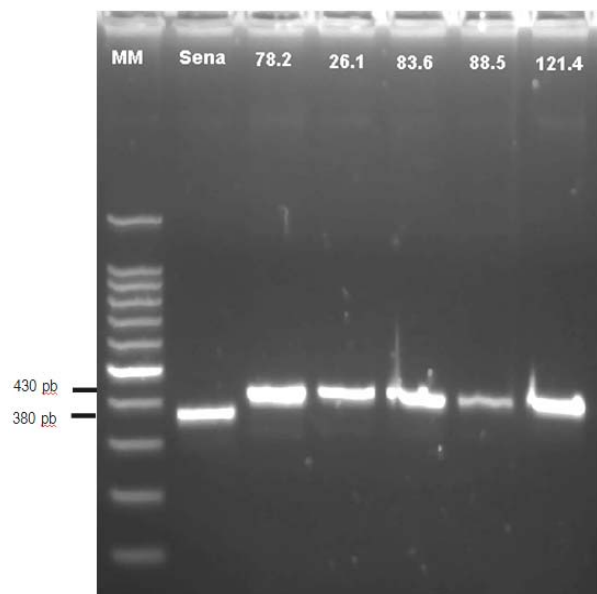
Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 %, teñidos con Sybr Safe (1  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), aplicando 100 V – 400 mA durante 1 h en buffer TAE 1X pH 8 y se visualizaron en un transiluminador ChemiDoc XR

Biorad.

Para la determinación del tamaño de los fragmentos se utilizaron los marcadores de peso molecular de ADN de 100 pb y 1 kb plus de Promega.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 144 materiales estudiados, destacó la variedad Sena como portadora de la banda asociada al gen de resistencia al nematodo *Meloidogyne incognita*, al utilizar el marcador Mi-23. El resto de los materiales resultaron susceptibles. En la Figura 1 se muestran las amplificaciones de algunos materiales a manera ilustrativa y la variedad Sena, con el patrón de bandas característico. Esta variedad se encuentra aún en uso en el país y puede servir como control positivo de análisis sucesivos.



**Figura 1.** Productos de amplificación PCR con el marcador SCAR Mi-23. Carril 1: variedad Sena, fragmento de 380 pb, correspondiente a resistencia; materiales 78.2, 26.1, 83.6, 88.5 y 121.4, aproximadamente 430 pb, banda de susceptibilidad. MM= Marcador de peso molecular 100 pb Promega

Cabe señalar que los tamaños observados son ligeramente menores a los visualizados en el reporte original de Seah et al (2007a), pero mantienen una diferencia de aproximadamente 50

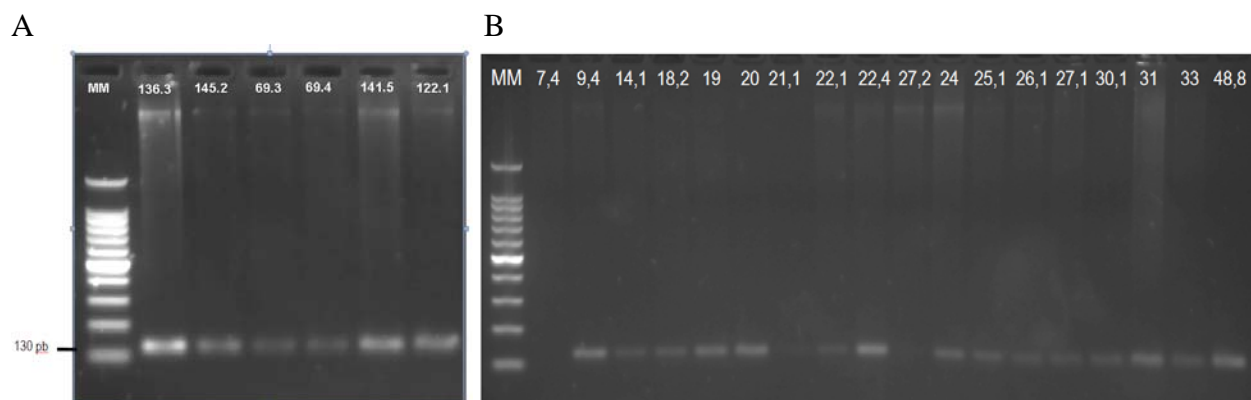
**Pérez-Almeida et al. Evaluación de genotipos de tomate por resistencia a patógenos**

pb, como señalado anteriormente por Pérez et al. (2015). Es interesante destacar que este marcador ha mostrado correlación entre los ensayos biológicos y moleculares (Arens et al., 2010), pese a la influencia del ambiente en la reacción hospedero patógeno *in vivo*.

No se observó amplificación en las accesiones de materiales silvestres utilizados en esta evaluación, lo cual era de esperarse pues la región *Mi* se introgresó a materiales cultivados a partir de *S. peruvianum*.

Utilizando el marcador SCAR At2-F3/At2-R3

se observó que gran número de las accesiones analizadas mostraron la banda asociada al gen de resistencia *I-1* a aproximadamente 130 pb (Figuras 2A y 2B ilustran algunos materiales), el cual se conoce como ligado a la resistencia en *I-1* (Arens et al., 2010). Los cebadores SCAR At2-F3/At2-R3 fueron diseñados para amplificar sólo en variedades con resistencia, pues uno de ellos es el cebador reverso homólogo a los 7 pb adicionales presentes en materiales con resistencia y el otro cebador positivo ancla en una región común en resistentes y susceptibles.



**Figura 2.** (A) Productos de amplificación PCR con el marcador SCAR At2-F3/At2-R3. Los materiales 136.3, 145.2, 69.3, 69.4, 141.5 y 122.1 muestran una banda de aproximadamente 130 pb, lo cual indica resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0. MM = Marcador de peso molecular 100 pb Promega. (B) Productos de amplificación PCR con el marcador SCAR At2-F3/At2-R3. Los materiales 9,4; 14,1; 18,2; 19; 20; 21,1; 22,1; 22,4; 24; 25,1; 26,1; 27,1; 30,1; 31; 33 y 48,8 muestran una banda de aproximadamente 130 pb, lo cual indica resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 0; mientras que 27,2 no amplifica, lo cual indica susceptibilidad. MM = Marcador de peso molecular 100 pb Promega

Por otro lado, el marcador asociado al gen *I-2* de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pudo discriminar materiales por bandas asociadas a susceptibilidad (aproximadamente a 693 pb) o resistencia (aproximadamente a 633 pb) (Figura 3). Se encontraron materiales como los silvestres PS3 y PS16 de la Península de Santa Elena, los cuales amplificaron la banda asociada con la resistencia con los cebadores I-2/5F// I-2/5R (Figura 3) así como Pimpi de Puerto Ayora (no se muestra). Estos resultados se pueden explicar dado que la resistencia a la raza 2 del patógeno fue introgresada a materiales cultivados a partir de *S. pimpinellifolium* por lo cual estos materiales poseen la resistencia naturalmente.

En cuanto a *I-3*, la mayor parte de los

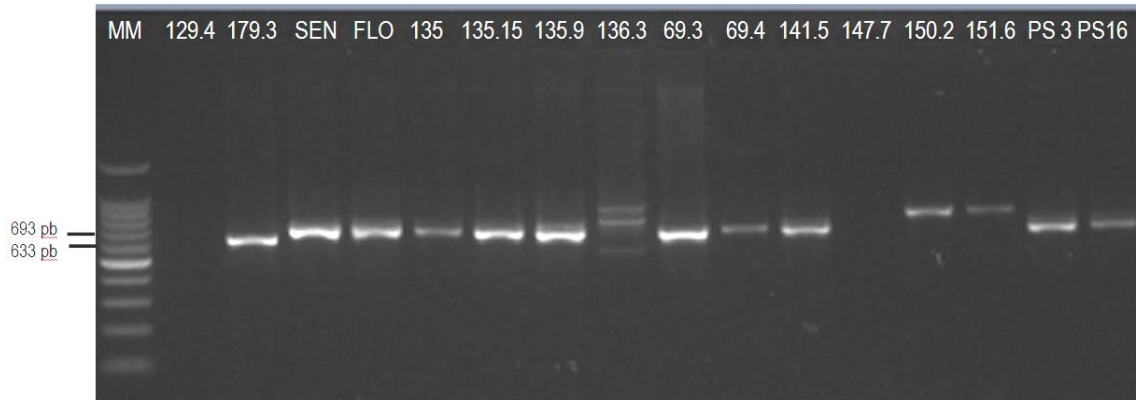
materiales revelaron dos bandas (heterocigotas), excepto números 19, 20 (Figura 4) y 78.2 (no se muestra) que amplificaron la banda asociada a la resistencia, y otros como 26.1 que mostraron la banda asociada a la susceptibilidad. La resistencia encontrada hasta ahora y que ha sido introgresada a los materiales comerciales proviene de *S. pennellii* (Catanzariti et al., 2015; González et al. 2015).

Se observa que los materiales 19 y 20 muestran la banda asociada con la resistencia, mientras que el 26.1, la de susceptibilidad. El resto de materiales muestran ambas bandas, como heterocigotas; o fallan en amplificar.

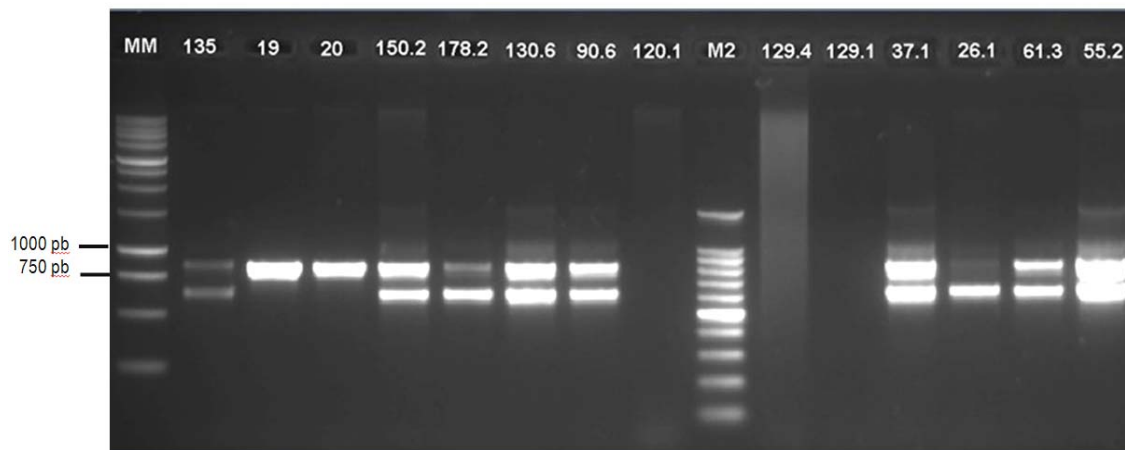
A partir de estos resultados se seleccionaron los materiales para continuar el proceso de

mejoramiento tomando en cuenta dos criterios fundamentales: rendimiento y la respuesta molecular la cual se estableció según el patrón de bandas del marcador asociado a la resistencia ante

cada raza de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* así como la reacción a *M. incognita*. De esta manera se escogieron 32 materiales presentados en el Cuadro 1.



**Figura 3.** Amplificación observada después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el marcador molecular SCAR I-2/5F/ I-2/5R. Materiales: 129.4, 147.7 (no amplificaron); 179.3; PS3 y PS16 banda asociada a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2; SEN (Sena), FLO (Floradade), 135, 135.15, 135.9, 69.3, 69.4, 141.5, 150.2, 151.6 muestran bandas asociadas a susceptibilidad. 136.3 bandas inespecíficas. MM = Marcador de peso molecular 100 pb Promega



**Figura 4.** Patrón de bandas observado en la PCR con la combinación de cebadores P7-43DF3// P7-43DR1 asociada a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3. MM = Escalera de ADN 1kb; M2 = Escalera de ADN 100 pb, de Promega

Adicionalmente los materiales seleccionados fueron analizados con el marcador TSCAR<sub>AAT/CGA</sub> asociado a la resistencia a *Ralstonia solanacearum* (Miao et al., 2009), mostrando las bandas de tamaño correspondiente a resistencia (Figura 5). Ya estos autores observaron que las líneas susceptibles no amplifican cuando se emplean

estos marcadores dominantes.

Los genotipos promisorios identificados en la caracterización molecular deben ser validados *in vivo* a través de la realización de ensayos de interacción hospedero patógeno, los cuales permitirán corroborar las observaciones *in vitro*.

En este trabajo se pudo determinar cuáles

**Pérez-Almeida et al. Evaluación de genotipos de tomate por resistencia a patógenos**

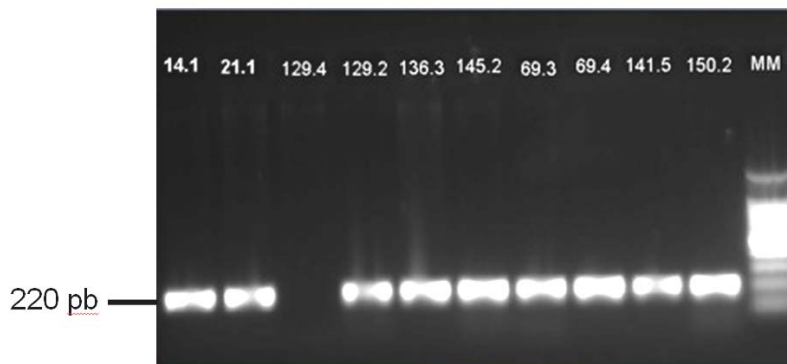
materiales genéticos se pueden usar como testigos resistentes o susceptibles en investigaciones locales. Los materiales que resultaron heterocigotas resistentes en familias F<sub>3</sub> con buenas

características agronómicas serán autofecundados para separar homocigotas resistentes y así avanzar en la obtención de nuevos materiales genéticos para suministrar a los productores de tomate.

**Cuadro 1.** Materiales seleccionados en este estudio de acuerdo a los criterios: respuesta molecular a enfermedades y rendimiento.

Material	Origen	Rendimiento	Respuesta molecular a enfermedades (Marcador utilizado <sup>2</sup> )				Bacteria
			Nematodos	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> raza	
14.1	SLc X SL	Alto	S	R	S	S	R
21.1	SLc X SL	Alto	S	R	S	S	R
129.4	SLc X SL	Alto	S	na	na	na	na
129.2	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
136.3	SP X SL	Alto	S	R	HT	HT	R
145.2	SP X SL	Alto	S	R	HT	HT	R
69.3	SLc X SL	Mediano	S	R	S	S	R
69.4	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
141.5	SLc X SL	Mediano	S	R	S	S	R
150.2	SLc X SL	Bueno	S	R	S	HT	R
178.2	SP X SL	Mediano	S	R	HT	HT	R
130.6	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
90.6	SLc X SL	Mediano	S	R	S	HT	R
55.5	SLc X SL	Bueno	S	R	S	HT	R
120.1	SLc X SL	Bueno	S	R	na	na	na
37.1	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
61.3	SN X SL	Bueno	S	R	S	S	R
78.2	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
26.1	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
83.6	SLc X SL	Bueno	S	R	HT	HT	R
88.5	SLc X SL	Bueno	S	R	HT	S	R
121.4	SLc X SL	Bueno	S	R	HT	S	R
129.1	SLc X SL	Bueno	S	R	na	na	na
102.1	SP X SL	Bueno	S	R	HT	HT	R
143.3	SLc X SL	Bueno	S	R	S	HT	R
135	SL	Bueno	S	R	S	S	R
135.15	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
135.9	SLc X SL	Bueno	S	R	S	S	R
142.3	SH X SL	Bueno	S	R	S	na	na
131.1	SH X SL	Bueno	S	R	S	HT	R
55.2	SH X SL	Bueno	S	R	S	HT	R
179.3	SH X SL	Alto	S	R	R	HT	R

<sup>1</sup>SL = *Solanum lycopersicum*; SLc = *S. lycopersicum* var. cerasiforme; SH = *S. habrochaites*; SP = *S. pimpinellifolium*; SN = *S. neorickii*. <sup>2</sup>Marcadores moleculares SCAR: Mi23= Mi-23F/Mi-23R; I1= At2-F3/At2-R3; I2 = I-2/5F/I-2/5R; I3 = I3F3/R1 P7-43DF3/P7-43DR1; TRSW = RS1 TSCARAAT/CGAF/ TSCARAAT/CGAR. na = no amplificaron; S = Susceptible; R = Resistente; HT = Heterocigota (presenta bandas de susceptibilidad y resistencia)



**Figura 5.** Amplificación por PCR al utilizar los cebadores TSCAR<sub>AAT/CGA</sub>F// TSCAR<sub>AAT/CGA</sub>R asociados a la resistencia a *Ralstonia solanacearum*. Todos los materiales con excepción de 129.4 muestran una banda de aproximadamente 220 pb, correspondiente a la resistencia. MM = escalera de ADN de 100 pb de Promega

## CONCLUSIONES

Se validaron marcadores moleculares diseñados para tres de las principales enfermedades que afectan actualmente al tomate, por medio de los cuales fue posible separar genotipos de una población bajo mejoramiento. El uso de los marcadores moleculares asociados a la resistencia a *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* permitió diferenciar genotipos resistentes, susceptibles y heterocigotas; mientras que los marcadores utilizados para detectar la reacción a *Ralstonia solanacearum* evidenciaron presencia de resistencia en la población estudiada. Algunos materiales genéticos se pueden emplear como testigos resistentes o susceptibles en investigaciones locales futuras.

## AGRADECIMIENTO

Al Programa Prometeo de la Secretaría de Ciencia, Educación y Tecnología (SENESCYT) del Ecuador, por financiar esta investigación.

A la Universidad de Guayaquil, Universidad Nacional de Loja y Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador-Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE-ESPOL) por facilitar el uso de sus instalaciones para los experimentos.

## LITERATURA CITADA

1. Arens, P., C. Mansilla, D. Deinum, L.

Cavellini, A. Moretti, S. Rolland, H. Shoot, D. Calvache, F. Ponz, C. Collonnier, R. Mathis, D. Smilde, C. Caranta y B. Vosman. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness uniformity and stability testing. *Theor. Appl. Genet.* 120: 655-664.

2. Barillas, A.C., L. Mejia, A. Sánchez-Pérez y D.P. Maxwell. 2008. CAPS and SCAR markers for detection of *I-3* gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* race 3. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 58: 11-17.
3. Beckman, C.H., P.A. Verdier y W.C. Mueller. 1989. A system of defense in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 227-239.
4. Bleve-Zacheo, T., M.T. Melillo y P. Castagnone-Sereno. 2007. Biotechnology and root-knot nematode control in tomato. *Pest Technology* 1: 1-16.
5. Bournival, B.L., J.W. Scott y C.E. Vallejos. 1989. An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 78(4): 489-494.
6. Bournival, B.L., C.E. Vallejos y J.W. Scott. 1990. Genetic analysis of resistances to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. *Theor. Appl. Genet.* 79(5): 641-645.



7. Catanzariti, A.M., G.T.T. Lim y D.A. Jones. 2015. The tomato *I-3* gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt. *New Phytologist* 207: 106-118.
8. FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. FAO Statistical Databases. Statistics Division. (<http://faostat.fao.org/>). (consulta del 17/03/2016)
9. Foolad, M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 2007. Article ID 64358, 52 pages. doi: 10.1155/2007/64358.
10. Foolad, M.R. y D.J. Panthee. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Rev. Pt. Sci.* 31: 93-123.
11. Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
12. González-Cendales, Y., A.M. Catanzariti, B. Baker, D.J. McGrath. y D.A. Jones. 2015. Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology* 17(3): 448-463.
13. Grube, R.C., E.R. Radwanski y M. Jahn. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics* 155: 873-887.
14. Hernández, Y., N. Mariño, G. Trujillo y C. Urbina de Navarro. 2005. Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 22: 181-190.
15. Laterrot, H. 1976. Localisation chromosomique de *I-2* chez la tomate controlan la resistance au pathotype 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ann. Amelior. Plant.* 26: 485-491.
16. Mes, J.J., E.A. Weststeijn, F. Herlaar, J.J.M. Lambalk, J. Wijbrandi, M.A. B.J.C. Haring y Cornelissen. 1999. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopath.* 89: 156-160.
17. Miao, L.X., S.Y. Shou, J.Y. Cai, F. Jiang, Z.J. Zhu y H.B. Li. 2009. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Mol. Biol. Rep.* 36: 479-486.
18. Ori, N., Y. Eshed, I. Paran, G. Presting, D. Aviv, S. Tanksley, D. Zamir y R. Fluhr. 1997. The I2C family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucinerich repeat superfamily of plant resistance genes. *Pt. Cell* 9: 521-532.
19. Pérez-Almeida, I., L. Angulo Graterol, G. Osorio, C. Ramis, A.M. Bedoya, R. Figueroa-Ruiz, S. Molina y D. Infante. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro* 23: 27-34.
20. Pérez-Almeida, I., A. Vegas García, D. Pérez, J. Muñoz y S. Malyshev. 2015. Presencia del marcador *Mi-23* de resistencia a *Meloidogyne incognita* como apoyo a la caracterización del germoplasma de tomate en Venezuela. *Bioagro* 27: 11-16.
21. Risterucci, A., L. Grivet, J. N'Goran, I. Pieretti, M. Flament y C. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Gen.* 101: 948-955.
22. Scott, J.W., H.A. Agrama y J.P. Jones. 2004. RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2 and 3 in tomato. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 129: 394-400.
23. Scott, J.W. 2008. Fresh market tomato breeding in the USA. *Acta Hort.* 789: 21-25.
24. Seah, S., V. Williamson, B. Garcia, L. Mejia, M. Salus, C. Martin y D. Maxwell. 2007a. Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *TGC Report* 57: 37-40.
25. Seah S., A. Telleen y V. Williamson. 2007b. Introgressed and endogenous *Mi-1* gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1289-1302.
26. Stall, R.E. y J.M. Walter. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopath.* 55: 1213-1215.
27. The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into

- fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
28. Trudgill, D. y V. Blok. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Rev. Phytopathol.* 39: 53-77.
29. Verdejo-Lucas, S. y F.J. Sorribas. 2007. Resistance response of the tomato rootstock SC 6301 to *Meloidogyne javanica* in a plastic house. *Eur. J. Plant Pathol.* 7: 9243-9244.
30. Yu, S.C. y Y.M. Zou. 2008. A co-dominant molecular marker of *Fusarium* wilt resistance gene *I-2* derived from gene sequence in tomato. *Hereditas* 30: 926-932.