



Título

Evaluación de la efectividad genética de dos genes en la resistencia a Begomovirus utilizando marcadores moleculares y evaluaciones de campo.

Nombre de integrantes del equipo de investigación

Msc. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez, Ing. Agr. Brenda Esperanza García Contreras, Ing. Agr. Rudy Teni, Ana Cristina Barrillas Dr. Luis Mejía de León y Dr. Douglas Maxwell,

Fecha

Guatemala 9 de enero de 2009

Instituciones participantes y co-financiantes

Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala; Semillas Tropicales, S. A.; Universidad de Wisconsin-Madison y Proyecto USAID/CDR No. C25-037.

Índice de contenido

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	1
3.	ANTECEDENTES	2
	3.1. Germoplasma	2
	3.2. Protocolos para la detección de los genes asociados con la resistencia a begomovirus.	2
	3.2.1. Protocolo para el gen Ty2	2
	3.2.2. Diseño de los cebadores P625-F2/R5	3
4.	JUSTIFICACIÓN	3
5.	OBJETIVOS	4
	5.1. General	4
	5.2. Específicos	4
6.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	6.1. Virus	4
	6.2. Geminivirus y begomovirus del tomate	4
	6.3. Mosca blanca	5
	6.4. Mejoramiento genético	6
	6.5. Marcadores moleculares	6
	6.5.1. PCR	6
	6.5.2. Cebadores	6
	6.5.3. RFLP	6
	6.5.4. RAPDs	7
	6.5.5. SCAR	7
	6.5.6. CAPS	7
7.	METODOLOGÍA	7
	7.1. Evaluación de familias F3 homocigotas para el gen Ty3.	7
	7.1.1. Evaluación de campo	8

7.1.2. Evaluación de marcadores para verificar la pérdida de la resistencia	8
7.3. Combinación de los genes Ty2 y Ty3.	8
8. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	9
8.1. Evaluación de la efectividad genética de Ty3 en la resistencia a begomovirus.	9
8.1.1. Evaluación de familias F3 homocigotas para el gen Ty3.....	9
8.1.2. Evaluación de marcadores para verificar la pérdida de la resistencia	12
8.1.3. Evaluación de líneas endogámicas recombinantes.....	13
8.2. Determinación de la efectividad genética asociada a los genes Ty2 y Ty3 con la resistencia a los begomovirus presentes en Guatemala.	14
8.2.1. Combinación de los genes Ty2 y Ty3.....	14
9. DISCUSIÓN.....	17
9.1. Evaluar la efectividad genética del gen Ty3 en la resistencia a begomovirus.	17
9.2. Determinar la efectividad genética asociada a los genes Ty2 y Ty3 con la resistencia a los begomovirus presentes en Guatemala.	18
10. CONCLUSIONES.....	19
11. RECOMENDACIONES.....	19
12. BIBLIOGRAFÍA.....	19

Índice de figuras

FIG. 1. Gel de agarosa al 1.5% utilizando los cebadores T0302F/TY2R1.	2
FIG. 2. Fragmentos de PCR obtenidos con los cebadores P6-25F2/R5.	3
FIG. 3. Fragmento de PCR obtenido en la evaluación de la familia F3.....	9
FIG. 4. Transplante de la familia F3 a la parcela experimental en Sanarate.	10
FIG. 7. Valores (0-6) del índice de severidad de la enfermedad (DSI).....	10
FIG. 5a. Imagen del parental susceptible M82 a los 45 días después del trasplante	11
FIG. 5b. Imagen de la familia F3 número 25 con el genotipo <i>Ty3/Ty3</i>	11
FIG. 6a. Imagen de la familia F3 número 60, con el genotipo <i>ty3/ty3</i>	11
FIG. 6b. Imagen de la familia F3 número 56 con el genotipo <i>Ty3/Ty3</i>	12
FIG. 8. Producto de PCR de las 10 plantas seleccionadas en la familia F3.	13
FIG. 9. Fragmento de secuencia de Gh13 y M82 usando el marcador T0507.	13
FIG. 10. Fragmento del producto de PCR obtenido en la evaluación de líneas endogámicas recombinantes.	14

Índice de cuadros

CUADRO 1. Resultados de análisis genotípico y fenotípico de la familia F3.....	9
CUADRO 2. Mínimos cuadrados medios para las familias F3.....	10
CUADRO 3. Influencia de diferentes factores en la varianza fenotípica.....	12
CUADRO 4: Resultado de la evaluación de la familia F4.....	13
CUADRO 5. Resultados de análisis moleculares de líneas endogámicas recombinantes.....	14
CUADRO 6. Resultados de análisis genotipo y fenotipo en la combinación de genes.....	15
CUADRO 7. Análisis genotípico de la familia F2 para los genes Ty2 y Ty3.....	16
CUADRO 8. Análisis genotípico de la familia F2 a los 44 días	17

1. Resumen

El mejoramiento de tomate con resistencia a begomovirus puede ser apoyado en la evaluación de diferentes introgresiones de especies silvestres, para su efectividad en condicionar la resistencia. Familias F3 con y sin la introgresión *Ty3* de la especie silvestre *Solanum chilense* fueron evaluadas fenotípicamente en el campo. Se encontró que aquellas familias F3 que tenían la introgresión *Ty3* fueron significativamente más resistentes a begomovirus que aquellas familias F3 sin la introgresión. El marcador SCAR co-dominante (P6-25F2/R5) puede ser utilizado efectivamente para detectar las introgresiones *Ty3* y, por consiguiente, tiene una aplicación en programas de mejoramiento utilizando selección asistida por marcadores. Una población de líneas endogámicas recombinantes fue desarrollada y puede ser utilizada para mapear genes asociados a la resistencia a begomovirus.

2. Introducción

La virosis transmitida por la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, causada por un complejo de especies virales del género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*, constituye uno de los mayores factores limitantes al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Jones, 2003; Polston y Anderson, 1994). El empleo de variedades resistentes es la estrategia de control más deseable. Se han caracterizado varios genes de resistencia a los begomovirus transmitidos por mosca blanca, entre ellos *Ty2*, procedente de la especie silvestre *Solanum habrochaites* (Hanson et al., 2006) y *Ty3*, procedente de la especie silvestre *S. chilense* (Ji et al., 2007a y 2007b). El gen *Ty2* fue incorporado al genoma del tomate (Hanson et al. 2006), en donde se localizó una introgresión grande, cercana de los 90 cM en el cromosoma 11. Mejía y Maxwell (información no publicada) encontraron que el marcador RFLP TG105A en el cromosoma 11 podía ser utilizado para detectar la introgresión en algunas plantas portadoras del gen *Ty2*, pero no en todas las plantas. García y Maxwell (información no publicada) desarrollaron un marcador codominante tipo SCAR a partir del marcador RFLP TO302 a una altura de 89 cM y este marcador efectivamente detectó la introgresión *Ty2* en líneas del AVRDC, con introgresiones de menor tamaño.

El gen *Ty3* fue reportado recientemente por (Ji et al., 2007a y 2007b). en el cromosoma 6 cerca de 25 cM. Salus, Martin y Maxwell (información no publicada) colaboraron con Ji y Scott de la Universidad de Florida para desarrollar un marcador tipo SCAR utilizando los cebadores FLUW25. Martin y Maxwell (información no publicada) encontraron que una línea de USAC, Gc171, tenía una secuencia diferente en la región *Ty3* a 25 cM y este gen es el denominado *Ty3a*. Jenson y Maxwell (información no publicada) y han desarrollado un marcador tipo CAPS que diferencia a los genes *Ty3* y *Ty3a* de la secuencia de *Solanum lycopersicum* a 25 cM. El objeto del presente estudio es determinar la contribución de cada uno de estos genes, en forma separada o en combinación, a la resistencia observada frente a los begomovirus locales.

3. Antecedentes

3.1. Germoplasma

En 1998 se inició en la Universidad de San Carlos de Guatemala un programa de mejoramiento de tomate para desarrollar líneas de tomate con resistencia a los begomovirus (Mejía et al., 2005). Una de estas líneas, Gh13, fue seleccionada del híbrido FAVI 9, proporcionado por F. Vidavsky and H. Czosnek de la Universidad Hebrea de Jerusalén, HUI, Israel. Las líneas resistentes Gh13, homocigotas para el gen *Ty3* (Mejía et al., 2005) y AVDRC-*Ty2*, homocigota para *Ty2* (Hanson et al., 2002) fueron utilizadas como progenitores en varios cruces. El gen de resistencia *Ty3* se originó de la especie silvestre *S. chilense* y el gen de resistencia *Ty2* tuvo su origen en la especie *S. habrochaites*. Los progenitores susceptibles utilizadas en estos cruces fueron las líneas HUI-VF y M82 (también obtenidas de la Universidad Hebrea de Jerusalén) sin ninguno de estos genes de resistencia.

3.2. Protocolos para la detección de los genes asociados con la resistencia a begomovirus.

3.2.1. Protocolo para el gen *Ty2*

Hanson et al. (2002) mapeó una introgresión proveniente de *S. habrochaites*, que proporciona resistencia al begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* en la línea H24, en el cromosoma 11, entre los marcadores moleculares TG36 (84 cM) y TG26 (92 cM). Este gen de resistencia ha sido denominado *Ty2* (Hanson et al., 2006). Maxwell y Mejía (2002, datos no publicados) diseñaron cebadores de PCR a partir de la secuencia del marcador TG105A (90 cM) y amplificaron fragmentos de PCR a partir de ADN proveniente de las líneas susceptibles M82-1-8, H24 y *S. habrochaites* LA1223. Las comparaciones de las secuencias indicaron que la de línea H24 era casi idéntica con la de la especie silvestre *S. habrochaites* y muy diferente a la de M82-1-8. García et al. (2007) utilizaron cebadores de PCR para amplificar fragmentos de ADN correspondientes al marcador T0302. Los cebadores de PCR utilizados fueron:

Cebador delantero:

TG0302F, 5' TGGCTCATCCTGAAGCTGATAGCGC

Cebador reverso:

TY2R1, 5' TGAT(T/G)TGATGTTCTC(T/A)TCTCT(C/A)GCCTG

Estos cebadores permiten la amplificación de marcadores del gen *Ty2* co-dominantes tipo SCAR (*Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas*), que permiten la identificación de los genotipos homocigotos resistentes y susceptibles así como los heterocigotos (Fig. 1).

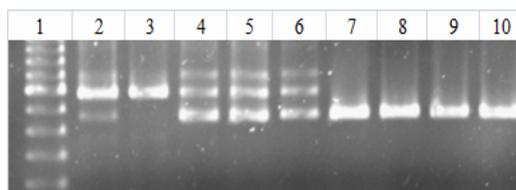


Fig. 1. Gel de agarosa al 1.5% utilizando los cebadores T0302F/TY2R1. Carril 1, marcador; Carril 2, línea resistente AVRDC (*Ty2/Ty2*); Carril 3, línea resistente H24 (*Ty2/Ty2*); Carril 4, híbrido resistente TY-Queen (*Ty2/ty2*); Carril 5 y 6, plantas F1 (*Ty2/ty2*); Carril 7, línea susceptible HUI-VF (*ty2/ty2*); Carril 8, línea TY172 (*ty2/ty2*); Carril 9, línea TY197 (*ty2/ty2*); Carril 10, híbrido *Shanty* (Semillas Hazera) (*ty2/ty2*).

3.2.2. Diseño de los cebadores P625-F2/R5

Ji et al. (2007b) describieron un locus de resistencia a begomovirus, *Ty3*, en el cromosoma 6, a cerca de 25 cM. Se desarrolló un marcador co-dominante tipo SCAR, P6-25F2/R5, para esta introgresión (Fig. 2, Ji et al., 2007a). Estudios con marcadores moleculares indicaron que la línea Gh13 tenía una introgresión en el cromosoma 6, entre 20 cM a 32 cM (C. Martin y D. P. Maxwell, datos no publicados; Martin et al., 2007) y que la secuencia de esta introgresión era idéntica a la de la introgresión *Ty3* (Ji et al., 2007b).

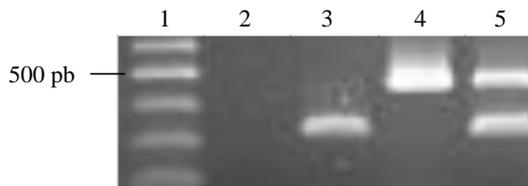


Fig. 2. Fragmentos de PCR obtenidos con los cebadores P6-25F2/R5. Carril 1) Marcador Promega 100 pb; Carril 2) Control sin ADN; Carril 3) M82 (*ty3/ty3*); Carril 4) Gh13 (*Ty3/Ty3*); Carril 5) Línea heterocigota (*Ty3/ty3*)

4. Justificación

La virosis causada por los begomovirus, geminivirus transmitidos por mosca blanca, ha sido la principal causa de pérdidas en la producción de tomate en muchas regiones tropicales y subtropicales de planeta. El manejo de esta enfermedad en Guatemala ha sido difícil debido a la alta diversidad en los begomovirus (Nakhla et al., 2005) y el aumento en las poblaciones del vector, la mosca blanca, *B. tabaci*. En la última década se han introducido varias prácticas de manejo, estas incluyen la utilización de plántulas libres de virus y de nuevos insecticidas.

Para obtener una producción de tomate aceptable, con la cual poder cubrir los altos costos ocasionados por este cultivo, los productores utilizan una considerable cantidad de pesticidas para el control de plagas y enfermedades. Sin embargo, cuando sus plantaciones han sido afectadas por la virosis transmitida por mosca blanca esto no ha sido efectivo, debido a las poblaciones del insecto, así como su alta capacidad infectiva. Se estima que la presencia de una mosca blanca por cada ocho plantas de tomate es suficiente para obtener un 100% de incidencia de la enfermedad en un campo de cultivo. Además, los insectos adquieren resistencia a los pesticidas, lo que hace que se deban utilizar cada vez dosis más altas. Finalmente, se producen tomates con altas cantidades de estos productos químicos, los cuáles son consumidos por la población.

La producción de híbridos de tomate con resistencia a los begomovirus se ha convertido en uno de los principales objetivos de varias compañías productoras de semillas. La especie de tomate cultivada, *Solanum lycopersicum*, es susceptible a los begomovirus, la resistencia ha sido identificada en las especies silvestres emparentadas con este cultivo (Ji et al., 2007c). Se han introducido genes de resistencia de *S. chilense* y de *S. habrochaites* a *S. lycopersicum* (Hanson et al., 2000; Scott et al., 1995; Vidavsky y Czosnek, 1998). En el 2007, la empresa Semillas Tropicales, S.A. introdujo al mercado nacional varios híbridos con niveles moderados de resistencia a begomovirus. Estos híbridos fueron obtenidos utilizando líneas desarrolladas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

El conocimiento de los genes asociados con la resistencia a los begomovirus sería de gran utilidad para el desarrollo de nuevos híbridos resistentes. El conocer el efecto de cada gen sobre la resistencia permitiría combinarlos de diferentes maneras en los híbridos, sobreponiendo los más efectivos. La utilización de marcadores moleculares asociados a estos genes de resistencia

permitiría identificar su presencia en las líneas parentales de los nuevos híbridos resistentes. Esta será una herramienta de gran utilidad para los futuros programas de mejoramiento genético.

El equipamiento de un laboratorio para la realización de técnicas moleculares y el entrenamiento de técnicos en la utilización de estas técnicas constituye un valioso aporte que permitirá a la Facultad de Agronomía de la USAC participar activamente en la incorporación de esta nueva tecnología para la resolución de diversos problemas que afectan a la agricultura nacional.

5. Objetivos

5.1. General

- Evaluar la efectividad genética de dos genes de resistencia a Begomovirus en tomate y evaluaciones de campo a híbridos desarrollados en Guatemala.

•

5.2. Específicos

- Evaluar la efectividad genética del gen *Ty3* en la resistencia a begomovirus.
- Determinar la efectividad genética asociada a los genes *Ty2* y *Ty3* con la resistencia a los begomovirus presentes en Guatemala.

6. Revisión de literatura

6.1. Virus

Los virus son entidades biológicas, capaces de autoreplicarse, que solo pueden reproducirse dentro de las células de otros organismos. En estas células, el ácido nucleico del virus dirige la síntesis de más partículas virales utilizando la maquinaria ya existente. Los virus son microscópicos, su genoma consiste de ácidos nucleicos, que puede ser ADN o ARN, de cadena sencilla o doble, circular o lineal, contenido en una sola molécula (genoma monopartita) o en varias (genoma multipartita), que se multiplican única y exclusivamente en una célula viva. Los virus están compuestos básicamente por una cápside proteica, que envuelve al genoma. La cápside o cubierta proteica está constituida por proteínas múltiples, llamadas capsómeros y una de sus funciones es determinar la forma del virus. Todos los virus son parásitos de células y tiene la capacidad de inducir enfermedades, en casi todos los organismos vivos, unicelulares o multicelulares (protozoarios, hongos, bacterias, animales y plantas). En las plantas existe una gran cantidad de virus que las infectan y causan numerosos daños en los cultivos, el 90% de estos virus tienen genomas de ARN, mientras que el 10% restante posee genomas de ADN (Agrios, 1989).

6.2. Geminivirus y Begomovirus del tomate

Los geminivirus son virus de DNA que infectan un amplio rango de plantas hospederas. Sus genomas consisten de una o dos moléculas de DNA de cadena sencilla, covalentemente cerradas (circulares). Los geminivirus del género *Begomovirus* pueden tener genomas monopartitos o bipartitos (ADN-A y ADN-B), son transmitidos por mosca blanca y naturalmente infectan a varias plantas dicotiledones, incluyendo cultivos de pertenecientes a las *Solanaceas*, tales como chile, tomate y tabaco. Las infecciones mixtas, con dos o más geminivirus infectando una misma planta son comunes.

En base al vector y la planta hospedera la familia Geminiviridae se divide en tres géneros. En América, el tomate es infectado principalmente por geminivirus bipartitos del género Begomovirus (conocido anteriormente como subgrupo III). Sin embargo, en 1994 un geminivirus monopartita, el virus del enrollamiento foliar amarillo del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus* o TYLCV) fue identificado en tomate en el Caribe (Jones, 2005; Polston and Anderson, 1994).

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. Los begomovirus han sido la principal causa de importantes pérdidas en la producción de tomate, estos se han convertido en patógenos emergentes que se han incrementado en número, distribución e importancia en los últimos 20 años (Morales y Anderson, 2007). Se ha informado de aproximadamente 17 virus de la familia Geminiviridae y más de 22 virus de otras familias como los causantes de las infecciones del tomate en América. Los síntomas de infecciones causadas por geminivirus en tomate son semejantes a los inducidos por otros virus, especialmente, los causados por los Potyviridae y Tobamoviridae. Los síntomas de la infección por geminivirus varían de acuerdo al virus y a la cepa, el cultivar, la edad de la planta al momento de la infección y las condiciones ambientales. Los síntomas pueden ser combinaciones de: mosaico amarillo brillante, moteados cloróticos, márgenes foliares cloróticos, rizado, deformación, reducción en el tamaño de las hojas, crecimiento menor de las plantas infectadas, abscisión de la flor y como resultado reducción en la producción (Polston y Anderson, 1994).

6.3. Mosca blanca

B. tabaci, pertenece a la familia *Aleyrodidae*, conocida comúnmente como mosca blanca del algodón, tiene su origen en las regiones del centro del oriente asiático. Se ha extendido, en corto tiempo, por diversas regiones europeas y americanas, originando grandes pérdidas en los cultivos afectados.

Las especies de mosca blanca presentan cuatro estados diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto; a su vez el estado de larva tiene tres estadios. La mosca blanca es capaz de transmitir gran cantidad de virus, de los cuáles un buen número afectan al tomate. Es conocida su alta eficacia en la transmisión de virus tales como:

- Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV).
- Tomato Yellow Mosaic Virus (TYMV).
- Tomato Leaf Curl Virus (TLCV).
- Chino del tomate (CdTV).
- Tomato Golden Mosaic Virus (TGMV).
- Tomato Yellow Dwarf Virus (TYDV).
- Leaf Curl Chili Virus (LCChV).
- Yellow Mosaic French Bean Virus (YMFBV).
- Tomato Mottle Virus (ToMoV).

La transmisión del TYLCV por *B. tabaci* se realiza de forma persistente circulativa. Es adquirido, tanto por las larvas como por los adultos, al alimentarse del floema de las plantas infectadas. El período de adquisición oscila entre 15 y 30 minutos, necesitando de un tiempo similar para inocularlo. Los adultos son capaces de transmitir el virus antes de las 17 horas después de su primera ingestión, permaneciendo infectivo durante más de 8 días, hasta un máximo de 20 días. Durante ese período, la infectividad del vector disminuye progresivamente,

pudiendo readquirirlo en sucesivas alimentaciones. En ningún caso el virus se transmite a la progenie. Los síntomas en las plantas pueden aparecer a los 15 o 20 días.

6.4. Mejoramiento genético

Desde sus comienzos, el objetivo del mejoramiento genético ha sido seleccionar genotipos superiores a partir del reconocimiento e fenotipos superiores. El grado de éxito en este proceso depende de i) el control genético de la característica, es decir el número de genes que la codifican y controlan (herencia monogénica o poligénica) y las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad), ii) el grado de influencia ambiental que se mide normalmente a través del parámetro de heredabilidad.

6.5. Marcadores Moleculares

Una serie de técnicas moleculares de gran desarrollo en los últimos veinte años permiten conocer la información genética que los organismos portan. Funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y se los conoce en forma genérica como marcadores moleculares. El tipo de marcadores moleculares que se utilizaron en este proyecto se basan en la técnica de PCR y son 1) Tipo SCAR (*sequence characterized amplified region*) codominante (que segrega con los genes y permite la identificación de los individuos homocigotos y heterocigotos) y 2) Tipo CAPS (*cleavage amplified polymorphic sequences*).

6.5.1. PCR

La Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica (descrita en 1985, por Kary Mullis) de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN o ARN particular, partiendo de un mínimo, en teoría, de una única copia de ese fragmento.

6.5.2. Cebadores

Son pequeñas moléculas de ADN (de alrededor de 20 nucleótidos) que son complementarias al ADN blanco o *target* (ADN que se desea amplificar por PCR). Una vez estas moléculas, los cebadores delantero y reverso, reconocen su secuencia complementaria sirven de cebadores para que la ADN polimerasa sintetice múltiples copias de la secuencia comprendida entre ambos cebadores.

Factores que se toman en cuenta para la realización de un cebador. Tamaño del cebador, 20 a 25 nucleótidos son muy específicos de secuencia, siempre que la temperatura de hibridación sea óptima. El contenido de G/C de los cebadores debe ser de 45 a 60%. Esto proporciona una apropiada temperatura de hibridación. El diseño de los cebadores debe ir de 5' a 3'.

6.5.3. RFLP

RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN. Involucra la detección de un segmento específico en el ADN de estudio por hibridación con un fragmento marcado radiactivamente de secuencia complementaria al marcador (sonda). En el proceso, el ADN en estudio es digerido por medio

de una enzima de restricción. Este tipo de enzimas corta el ADN en una secuencia determinada o sitio de restricción. La variabilidad genética presente en el marcador molecular se observa como diferencias en la secuencia del ADN genómico (Gupta et al., 1999).

6.5.4 RAPDs

RAPDs (Random amplified polymorphic DNA). Esta técnica utiliza cebadores de 10 nucleótidos y baja temperatura de hibridación. Estos pueden encontrar regiones homólogas en el genoma que ocurren al azar y amplifican productos discretos de ADN. Los productos son separados en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Cada producto se deriva de una región del genoma que contiene dos segmentos cortos de ADN con homología con el cebador. Estos segmentos deben estar presentes en filamentos opuestos y lo suficientemente cerca el uno de otro para que la amplificación pueda ocurrir.

6.5.5. SCAR

SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas). Esta técnica aprovecha que los RAPD proporcionan principalmente fragmentos de DNA altamente repetido. Estos fragmentos de RAPD se clonan (no necesariamente) y secuencian para elaborar cebadores oligonucleótidos específicos. Aunque permite el desarrollo rápido de marcadores moleculares, el grado de polimorfismo obtenido es bastante bajo (Díaz 1997).

6.5.6. CAPS

CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada). Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y los fragmentos de restricción se migran en un gel de agarosa. Las variaciones que se detectan corresponden a la presencia o ausencia de sitios de restricción. Se pueden así localizar cambios finos en una zona específica.

7. Metodología

7.1. Evaluación de familias F3 homocigotas para el gen *Ty3*.

Se realizó un cruce entre la línea resistente a begomovirus Gh13 con la línea susceptible M82. Se permitió la autofecundación de las plantas F1 para obtener semilla F2. Las plantas F2 se genotiparon para el gen *Ty3*, la segregación del marcador fue Mendeliana 1:2:1. Se descartaron las plantas heterocigotas y las plantas homocigotas se avanzaron a la generación F3, con la cual se dio inicio al proyecto, se reconfirmó el genotipo homocigoto de las familias F3, se sembraron las semillas en cajas Petri, colocando 10 semillas de cada familia. Luego, se seleccionaron 5 plántulas con cotiledones para la extracción de ADN y análisis molecular utilizando la técnica de PCR con los cebadores P625F2/R5. Las familias F3 de genotipo homocigoto fueron seleccionadas junto con los parentales y los controles (plantas susceptibles) para obtener pilones. Fueron trasplantadas las plantas susceptibles a la orilla de la parcela experimental como fuente de inóculo de virus. Un mes después, se trasplantaron a campo definitivo tres réplicas de cinco plantas, en un diseño completamente al azar. La parcela se ubica en Sanarate, El Progreso. Se obtuvo semilla F4 de algunas plantas de interés y se plantaron, entre ellas 10 plantas de la familia denominada número 3 para análisis molecular y secuenciación.

7.1.1. Evaluación de campo

De las familias F3 sembradas en Sanarate, se tomaron datos del índice de severidad de la enfermedad (DSI, por su siglas en inglés, disease severity index) a los 30 y 42 días del trasplante. En los resultados se encontró correlación entre la presencia del gen *Ty3* y la resistencia. Dos familias, identificadas como 3 y 39, fueron susceptibles a pesar de poseer el marcador para el gen *Ty3*. Se cosechó las semillas de todas las plantas de las familias 3 y 39 para determinar si podría haberse producido una recombinación.

7.1.2. Evaluación de marcadores para verificar la pérdida de la resistencia

Se estudió la región cerca del marcador P6-25F2/R5 entre 22 cM y 30 cM para verificar la pérdida de la resistencia, por una recombinación entre el marcador y el gen de resistencia. Marcadores moleculares para esta región fueron desarrollados anteriormente por el Dr. Maxwell (<http://www.plantpath.wisc.edu/GeminivirusResistantTomatoes/Markers/ TomatoMarkers.htm>).

De la familia número 3 fueron seleccionadas diez plantas; seis con fenotipo susceptible y 4 con fenotipo resistente, de las que se obtuvo la familia F4, las cuales fueron evaluadas para determinar el genotipo, mediante la técnica de PCR y secuenciación.

7.2. Evaluar líneas endogámicas recombinantes (RIL's)

Con anterioridad se realizó un cruce entre la línea resistente a begomovirus Gh13 con la línea susceptible HUIJ-VF. Se permitió la autofecundación de las plantas F1 para obtener semilla F2 y así sucesivamente hasta obtener plantas F4; con las cuales se dio inicio al proyecto. Las plantas F4 se sembraron en el invernadero, se realizó análisis molecular y se obtuvo semilla para obtener la familia F5 la cual se sembró en la parcela experimental en Sanarate para evaluar fenotipo a los 45 días después del trasplante.

De las plantas F4 fue determinado el genotipo mediante la técnica del PCR, se extrajo ADN (utilizando Kit de Gentra) de una mezcla de 5 plantas, y se obtuvo estos genotipos *Ty3/Ty3*, *Ty3/ty3* y *ty3/ty3* utilizando los cebadores P6-25F2/R5, que fue diseñado del clon BAC 56B23 a 25 cM (Ji et al., 2007) denominado marcador co-dominante SCAR, para la detección del gen *Ty3* obteniendo fragmentos de 320 pb para plantas susceptibles y de 450 pb para plantas resistentes para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1.5%.

7.3. Combinación de los genes *Ty2* y *Ty3*.

Se sembraron semillas de Gh13 (portadora del gen *Ty3*) y CLN2116 (portador del gen *Ty2*), en bandejas para la obtención de plántulas en pilón, seleccionando las tres mejores plántulas para los cruces que se realizaron en el invernadero de la FAUSAC.

Se realizó análisis molecular de los padres y los cruces utilizando los cebadores TG0302F/R denominados marcador co-dominante SCAR diseñados (García et al., 2007) y el marcador co-dominante SCAR (P6-25F2/R5, Ji et al., 2007). De los cruces se obtuvo plantas F1 heterocigotas, de las cuales se cosechó para obtener semilla F2, se trasplantaron 106 plantas F2 a la parcela experimental en Sanarate para evaluación fenotipo a los 45 días y se colectó tejido para determinar el genotipo.

8. Presentación de resultados

8.1. Evaluación de la efectividad genética de *Ty3* en la resistencia a begomovirus.

8.1.1. Evaluación de familias F3 homocigotas para el gen *Ty3*.

a) Análisis molecular y evaluación de campo

El genotipo de la introgresión *Ty3* fue determinada en 64 plantas F2. Las plantas homocigotas *ty3* producen un fragmento de 320 pb y homocigotas *Ty3* producen un fragmento de 450 pb. Las plantas heterocigotas producen fragmentos de 320 y 450 pb (Fig. 3). La proporción de estos genotipos *Ty3/Ty3:Ty3/ty3:ty3/ty3* fue de 18:29:17, la cual se adecua a la proporción que esperábamos 1:2:1 ($\chi^2=0.59$, $p=0.1-0.5$).

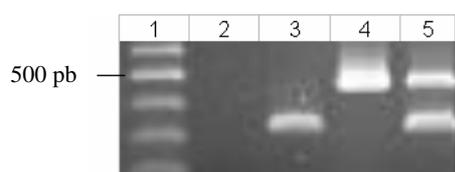


Fig 3. Fragmento de PCR obtenido en la evaluación de la familia F3, con los cebadores P6-25F2/R5. Carril 1) Marcador Promega 100 pb; carril 2) No amplifico ADN; carril 3) M82 (*ty-3/ty-3*); carril 4) Gh13 (*Ty-3/Ty-3*); carril 5) Línea heterocigota (*Ty-3/ty-3*).

Se permitió que plantas homocigotas se auto polinizaran en el invernadero en el campo en la Universidad de Wisconsin Madison. Antes de trasplantar los pilones al campo, el genotipo de las familias F3 fue confirmado por medio de la extracción de cinco plantas juntas por familia y luego completando el PCR con el marcador SCAR co-dominante. Solamente se trasplantaron aquellas familias F3 (Fig. 4) que fueron homocigotas para los genotipos *Ty3* o *ty3* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de análisis genotípico y fenotípico de la familia F3; (evaluado a los 42 días después del trasplante) de las familias F3, se considera una planta resistente si el DSI es <2.5 y susceptible si es >2.5 . S = *ty3/ty3*; R = *Ty3/Ty3*, H = *Ty3/ty3*

Familia F3	Genotipo	DSI	Fenotipo
M82	<i>ty3/ty3</i>	6	S
Gh13	<i>Ty3/Ty3</i>	0.9	R
44	<i>ty3/ty3</i>	4.9	S
66	<i>ty3/ty3</i>	4.1	S
48	<i>ty3/ty3</i>	4.6	S
34	<i>ty3/ty3</i>	4.5	S
40	<i>ty3/ty3</i>	4.1	S
32	<i>ty3/ty3</i>	4.9	S
11	<i>ty3/ty3</i>	3.9	S
49	<i>ty3/ty3</i>	4	S
62	<i>ty3/ty3</i>	4.7	S
55	<i>ty3/ty3</i>	4.8	S
51	<i>ty3/ty3</i>	4.7	S
68	<i>ty3/ty3</i>	4.1	S
54	<i>ty3/ty3</i>	5.1	S
60	<i>ty3/ty3</i>	4.1	S
69	<i>ty3/ty3</i>	4.9	S
61	<i>Ty3/Ty3</i>	1.9	R
56	<i>Ty3/Ty3</i>	1.6	R
10	<i>Ty3/Ty3</i>	1.7	R
18	<i>Ty3/Ty3</i>	1.8	R
25	<i>Ty3/Ty3</i>	1.8	R

6	Ty3/Ty3	1.7	R
52	Ty3/Ty3	1.6	R
57	Ty3/Ty3	1.7	R
1	Ty3/Ty3	1.7	R
46	Ty3/Ty3	1.8	R
39	Ty3/Ty3	3	S
3	Ty3/Ty3	3.2	S



Fig.4. Trasplante de la familia F3 a la parcela experimental en Sanarate el Progreso en Diciembre del 2007.

Los valores de DSI a los 42 días después del trasplante (Fig. 5a, 5b) y a los 120 días después del trasplante (Fig. 6a, 6b) fueron promediados para cada bloque y analizados para la estimación de mínimos cuadrados medios, lo cual se obtuvo utilizando el programa SAS versión 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary NC). Los mínimos cuadrados medios para los DSI de aquellas familias con la introgresión *Ty-3* fueron de 2.0 y 4.5, respectivamente (Cuadro 2, Fig. 7). Una familia F3 con la introgresión, nombrada número 3, tuvo una media de DSI de 3.2 y tenía plantas con ambos genotipos, resistente y susceptible. La media de DSI para las familias con la introgresión (2.0) fue mayor que la media del parental resistente, Gh13 (0.9) y la media de DSI para las familias sin la introgresión (4.5) fue menor que la media del parental susceptible, M82 (6.0). Esto indica que otros genes, además del de la introgresión *Ty-3*, influyen en la expresión de los fenotipos.

Cuadro 2. Mínimos cuadrados medios para las familias F3 con genotipos homocigotos para la introgresión (*Ty-3/Ty-3*) y homocigotos sin la introgresión (*ty-3/ty-3*).

Genotipo del marcador	Mínimo cuadrado medio	Error estándar	Valor de P de la diferencia entre medias
<i>Ty-3/Ty-3</i>	1.96	0.13	< 0.0001
<i>ty-3/ty-3</i>	4.49	0.11	

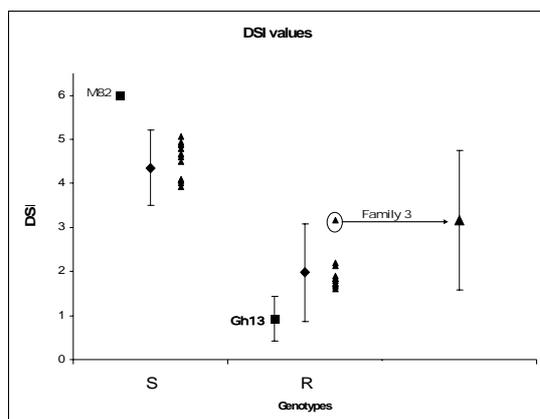


Fig. 7. Valores (0-6) del índice de severidad de la enfermedad (DSI) de la media de cada familia (\blacktriangle), de todas las familias (\blacklozenge) en una clase, parentales resistente (Gh13) y susceptible (M82) padres (\blacksquare). Las barras indican la desviación estándar cercana a la media. Todas las plantas de M82 tuvieron un DSI = 6, por lo que no hay barra para la media. R = 11 familias F3 con la introgresión *Ty-3* y S = 15 familias F3 familias sin la introgresión para *Ty-3*. Familia 3 = una familia F3, número 3, la cual tenía la introgresión, pero también tenía plantas resistentes y susceptibles.

Las medias también fueron analizadas en un ANDEVA de dos entradas, que permitió para diferentes varianzas para cada genotipo e incluyó los efectos del genotipo, bloque y la interacción bloque-genotipo. El modelo se determinó utilizando PROC MIXED del programa SAS. El análisis de varianza indica que el genotipo para la introgresión Ty-3 (P6-25F2/R5) explica significativamente los valores de DSI para los fenotipos resistente y susceptible ($p < 0.0001$). No hay una contribución significativa del bloque ($p = 0.0953$) ni de la interacción bloque-genotipo ($p = 0.9291$).



Fig. 5a. Imagen del parental susceptible M82 a los 45 días después del trasplante. DSI=4.



Fig. 5b. Imagen de la familia F3 número 25 con el genotipo Ty3/Ty3 a los 45 días después del trasplante. DSI=2.



Fig. 6a. Imagen de la familia F3 número 60, con el genotipo ty3/ty3 a los 120 días después del trasplante. DSI=6. Sin frutos.



Fig. 6b. Imagen de la familia F3 número 56 con el genotipo Ty3/Ty3 a los 120 días después del trasplante. DSI=2. Muchos frutos.

Debido a que el experimento se condujo en el campo en Sanarate, Guatemala, durante la época seca, hay muchos factores que pueden influir en el DSI de cada planta. Algunos de estos factores son: el tiempo de infección de las plantas, la posibilidad de infección de las plantas por diferentes begomovirus (Nakhla et al., 2005) o por infecciones mixtas de begomovirus y la variación en las condiciones de campo asociadas a cada planta y bloque. A pesar de estos factores, los cuales se espera que causen variación en el DSI de cada planta, el 85% de la variación entre familias F3 fue explicada por el marcador SCAR (Cuadro 3). Este valor también incluye a la familia número 3, con una supuesta recombinación que disminuye el porcentaje de variación explicado por el marcador. Estos resultados son consistentes con la observación similar de Ji et al. (2007b), en la cual la introgresión Ty3 contribuyó grandemente a la resistencia al virus del amarillamiento y acoloramiento de la hoja del tomate (TYLCV). Por ende, esta introgresión tiene un gran efecto sobre la resistencia a begomovirus y el marcador molecular SCAR (P6-25F2/R5) puede utilizarse para predecir la esta resistencia en un programa de mejoramiento de tomate.

Cuadro 3. Influencia de diferentes factores en la varianza fenotípica observada.

Fuente	Varianza	Porcentaje de varianza
Genotipo del marcador	3.18	85.1%
Bloque	0.05	1.2%
Interacción Genotipo*Bloque	-0.05	-1.2%*
Error	0.55	14.9%

8.1.2. Evaluación de marcadores para verificar la pérdida de la resistencia

Se cosechó semilla F4 de la cual se obtuvo pilones que fueron trasplantados en el invernadero. Algunas plantas de una familia número 3, fueron susceptibles a pesar de tener el marcador por lo que se estudió la región cerca del marcador, se realizó análisis molecular mediante la técnica del PCR (Fig. 8) y secuenciación de ADN del fragmento amplificado. Utilizando los marcadores P6-25F2/R5 a 25 cM, TG590 a 22 cM, T0507 a 25 cM, T1098 a 30 cM y T0834 a 32 cM. La técnica de secuenciación (Fig. 9) fue utilizada para los marcadores TG590, T0507 y T1098 debido a que para las plantas susceptibles y resistentes el tamaño de banda obtenido del PCR es el mismo. Comparando cada una de estas secuencias con Gh13 y M82. En los (Anexos) se presenta los alineamiento entre estas secuencias y se marca con diferente color los SNP e indeles encontrados en cada uno de los marcadores.

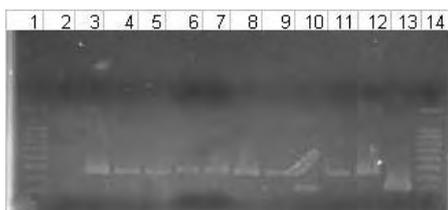


Fig. 8. Producto de PCR de las 10 plantas seleccionadas en la familia F3. (los carriles 2 a la 11) y controles Gh13 (carril 12) y M82 (carril 13), utilizando los cebadores P625F2/R5 diseñados para el gen *Ty3*. Plantas susceptible; fragmento de 320 pb; y plantas resistente; fragmento de 350 pb; gel de agarosa al 1.5%.

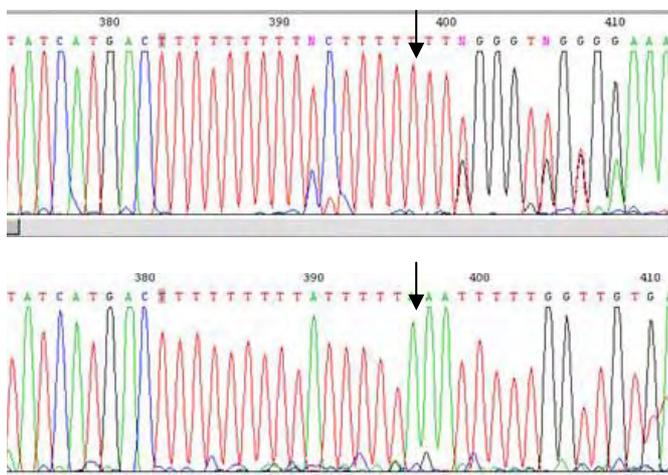


Fig. 9. Fragmento de secuencia de ADN de Gh13 y M82 usando el marcador T0507. Las flechas indica la diferencia entre nucleótidos (SNP).

Mediante la técnica del PCR y secuenciación se obtuvieron resultados de 9 plantas utilizando los diferentes marcadores (cuadro 4), determinando que el genotipo es igual a Gh13, lo que indica que los marcadores no están ligados al gen de resistencia y se seguirá evaluando más marcadores cerca de esta región para verificar la pérdida de la resistencia.

Cuadro 4: Resultado de la evaluación de la familia F4 con diferentes marcadores.

Código de	Marcadores evaluados en el cromosoma 6				Fenotipo
	Campo	TG590 (22 cM)	P625(25cM)	T507 (25 cM)	
BII3-5(s)	-	Ty3/Ty3	-	Ty3/Ty3	S
BII3-5(s)	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	S
BII3-5(s)	-	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	S
BII3-1(s)	-	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	S
BII3-1(s)	-	Ty3/Ty3	-	Ty3/Ty3	S
BII3-1(s)	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	S
BII3-2(R)	-	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	R
BII3-2(R)	-	Ty3/Ty3	-	Ty3/Ty3	R
BIII3-2(R)	ty3/ty3	ty3/ty3	ty3/ty3	ty3/ty3	R
BIII3-2(R)	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	Ty3/Ty3	R

8.1.3. Evaluación de líneas endogámicas recombinantes

Se realizó la evaluación de genotipo y fenotipo de 87 plantas F4. Como resultado de la evaluación de genotipo se determinaron 39 plantas homocigotas dominantes (*Ty3/Ty3*), 47 homocigotas recesivas (*ty3/ty3*) y una planta heterocigoto (*Ty3/ty3*) (Cuadro 5); mediante la técnica de PCR utilizando los marcadores P625F2/R5 (Fig. 10).

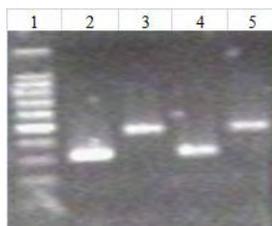


Fig. 10. Fragmento del producto de PCR obtenido en la evaluación de líneas endogámicas recombinantes. Utilizando los cebadores P625F2/R5 diseñados para el gen *Ty3*. Carril 1, marcador de peso, Carril 2, 189-1-1-1-1 (suceptible); fragmento de 320 pb; Carril 3, 189-1-2-1-1 (resistente); fragmento de 350 pb; Carril 4, 189-1-3-1-1 (suceptible); Carril 5, 189-1-4-1-1 (resistente), gel de agarosa al 1.5%.

Cuadro 5. Resultados de análisis moleculares de líneas endogámicas recombinantes, S = *ty3/ty3*; R = *Ty3/Ty3*, H = *Ty3/ty3*

Línea No.	Resultado	Línea No.	Resultado	Línea No.	Resultado
189-1-1-1-1	S	189-1-32-1-1	R	189-1-68-1-1	R
189-1-2-1-1	R	189-1-33-1-1	R	189-1-69-1-1	R
189-1-3-1-1	S	189-1-34-1-1	R	189-1-70-1-1	S
189-1-4-1-1	R	189-1-35-1-1	S	189-1-71-1-1	R
189-1-5-1-1	S	189-1-36-1-1	S	189-1-72-1-1	S
189-1-6-1-1	S	189-1-37-1-1	R	189-1-73-1-1	R
189-1-8-1-1	S	189-1-38-1-1	R	189-1-74-1-1	S
189-1-9-1-1	R	189-1-39-1-1	S	189-1-75-1-1	R
189-1-10-1-1	R	189-1-41-1-1	S	189-1-76-1-1	R
189-1-11-1-1	R	189-1-42-1-1	R	189-1-77-1-1	R
189-1-12-1-1	S	189-1-45-1-1	H	189-1-79-1-1	S
189-1-13-1-1	R	189-1-46-1-1	S	189-1-80-1-1	R
189-1-14-1-1	S	189-1-47-1-1	S	189-1-81-1-1	S
189-1-15-1-1	S	189-1-48-1-1	S	189-1-82-1-1	R
189-1-16-1-1	R	189-1-49-1-1	S	189-1-84-1-1	S
189-1-17-1-1	S	189-1-51-1-1	R	189-1-85-1-1	S
189-1-18-1-1	S	189-1-52-1-1	R	189-1-86-1-1	S
189-1-19-1-1	S	189-1-53-1-1	S	189-1-87-1-1	R
189-1-20-1-1	R	189-1-54-1-1	S	189-1-88-1-1	S
189-1-21-1-1	S	189-1-55-1-1	R	189-1-89-1-1	S
189-1-22-1-1	S	189-1-56-1-1	S	189-1-92-1-1	R
189-1-23-1-1	S	189-1-57-1-1	S	189-1-93-1-1	R
189-1-24-1-1	S	189-1-58-1-1	S	189-1-94-1-1	R
189-1-25-1-1	S	189-1-60-1-1	S	189-1-95-1-1	R
189-1-26-1-1	S	189-1-61-1-1	R	189-1-96-1-1	S
189-1-27-1-1	R	189-1-62-1-1	S	189-1-97-1-1	S
189-1-28-1-1		189-1-63-1-1	S	189-1-98-1-1	R
189-1-29-1-1	R	189-1-65-1-1	S	189-1-99-1-1	S
189-1-30-1-1		189-1-66-1-1	R	189-1-100-1-1	R
189-1-31-1-1	R	189-1-67-1-1	R		

8.2. Determinación de la efectividad genética asociada a los genes *Ty2* y *Ty3* con la resistencia a los begomovirus presentes en Guatemala.

8.2.1. Combinación de los genes *Ty2* y *Ty3*.

La efectividad genética asociada a los genes de *Ty2* y *Ty3* fue determinada creando el híbrido F1 realizando los cruces entre Gh13 homocigoto para el gen *Ty3* y CLN2116 homocigoto para el gen *Ty2*. Ciento seis plantas F2 fueron trasplantadas a la parcela experimental en Sanarate. Tejido fue colectado de cada una de las plantas para determinar genotipo utilizando los marcadores co-dominantes tipo SCAR para los genes *Ty2* y *Ty3*. Cuarenta y cuatro días después

del trasplante se determinó el DSI (Cuadro 6). Datos moleculares para el gen *Ty2* fueron obtenidos de 80 plantas, para el gen *Ty3* de 90 plantas y para ambos genes 76 plantas (Cuadro 5).

Cuadro 6. Resultados de análisis genotipo y fenotipo en la combinación de genes *Ty2* y *Ty3* (DSI evaluado a los 44 días después del trasplante) de las plantas F2. S = *ty2/ty2* o *ty3/ty3*; R = *Ty2/Ty2* o *Ty3/Ty3*, H = *Ty2/ty2* o *Ty3/ty3* y C = control susceptible, híbrido Silverado.

Código No.	DSI	Ty3	Ty2	Código No.	DSI	Ty3	Ty2	Código No.	DSI	Ty3	Ty2
1	2.5	S	S	C1	5			78	4	H	R
2	4	S	S	C2	6			79	3	R	H
3	2.5	H	R	C3	6			80	3.5	H	S
4	4	R		41	5	H		C1	3		
5	3	H	S	42	5	H		C2	Muerta		
6	4	S	R	43	4	S	S	C3	4		
7	3.5	S	S	44	3.5	H	H	81	2	R	R
8	3	S	R	45	Muerta			82	Muerta		
9	4	H	S	46	3	R	H	83	Muerta		
10	3	S	R	47	Muerta	S		84	4	S	S
C1	4			48	4	H	S	85	1.5	H	S
C2	5			49	5	S	S	86	1.5	H	S
C3	5			50	2.5	R	S	87	2.5	H	H
11	3	S	H	C1	Muerta			88	2	H	S
12	4	H	H	C2	6			89	3	H	R
13	3.5	S	H	C3	5			90	2	S	R
14	2.5	R	S	51	5	S		C1	3		
15	Muerta			52	2.5	R		C2	4		
16	2.5	S	S	53	3	S	S	C3	3		
17	2.5	R	R	54	2.5	S	H	91	Muerta	S	
18	Muerta			55	3	S		92	3	S	S
19	3	S		56	3	S	H	93	4	S	H
20	2	H	S	57	2	H	H	94	1.5	H	H
C1	Dead			58	Muerta		S	95	Muerta	R	S
C2	5			59	4	H	H	96	Muerta		
C3	Muerta			60	Muerta	S	H	97	Muerta		
21	2	R	H	C1	5			98	1.5	R	S
22	3.5	S	H	C2	5			99	4	R	H
23	4	S	S	C3	5			100	2	S	R
24	3.5		S	61	5	S	H	C1	4		
25	Muerta		H	62	2.5	H	R	C2	3		
26	4	H	S	63	5	R	H	C3	Muerta		
27	5	H	H	64	5	H	H	101	2.5	R	H
28	Muerta			65	5	S	R	102	3	R	
29	3	R	S	66	Muerta			103	5	S	S
30	3	R		67	3	R	H	104	Muerta	R	
C1	Muerta			68	5	H	R	105	Muerta	H	

C2	Muerta			69	4			106	Muerta		
C3	5			70	4	H	R	C1	4		
31	4	S	S	C1	5			C2	4		
32	3.5	R	R	C2	5			C3	6		
33	6	S	H	C3	5						
34	4	H	H	71	4	S	S				
35	4		R	72	3	H					
36	3.5	S	R	73	4	S	H				
37	2.5	R	H	74	4	S	R				
38	3.5	S	H	75	5	R	R				
39	3.5	H	S	76	3.5	R					
40	3.5	R	H	77	2.5	S	R				

El genotipo de la introgresión *Ty2* y *Ty3* fue determinada en 76 plantas F2. La proporción de estos genotipos *Ty2/Ty2:Ty2/ty2:ty2/ty2* fue de 20:30:30, la cual no se adecua a la proporción que esperábamos 1:2:1 ($\chi^2=7.5$, $p= 5.99$). La proporción de estos genotipos *Ty3/Ty3:Ty3/ty3:ty3/ty3* fue de 24:29:37, la cual no se adecua a la proporción que esperábamos 1:2:1 ($\chi^2=15.13$, $p= 5.99$).

Nueve genotipos se esperan en la familia F2. El análisis de Chi cuadrado muestra que la proporción de los genotipos de la familia F2 no coincide con la proporción esperada ($X^2=25.1$, $P=15.50$). Tres genotipos fueron significativamente diferentes a lo esperado: *Ty2/ty2;Ty3/ty3*, *ty2/ty2;Ty3/Ty3* y *ty2/ty2;ty3/ty3*.

Cuadro 7. Análisis genotípico de la familia F2 para los genes *Ty2* y *Ty3*.

Genotipos	Resultados esperados	Resultados obtenidos
<i>Ty2/Ty2;Ty3/Ty3</i>	4.75	4
<i>Ty2/Ty2;Ty3/ty3</i>	9.5	9
<i>Ty2/Ty2;ty3/ty3</i>	4.75	5
<i>Ty2/ty2;Ty3/ty3</i>	19	9
<i>Ty2/ty2;ty3/ty3</i>	9.5	10
<i>Ty2/ty2;Ty3/Ty3</i>	9.5	6
<i>ty2/ty2;Ty3/Ty3</i>	4.75	9
<i>ty2/ty2;Ty3/ty3</i>	9.5	11
<i>ty2/ty2;ty3/ty3</i>	4.75	13

El DSI para cada planta fue determinado a los 15, 44 y 53 días después del trasplante. El DSI para los 44 días se reporta en el Cuadro 6. Todos los controles del híbrido Silverado tenían DSI de 6 o estaban muertos.

Los valores de DSI a los 44 días después del trasplante, fueron analizados utilizando el modelo estadístico ANOVA. Para determinar la varianza que se observa en cuanto a la resistencia y susceptibilidad según el marcador utilizando para el gen *Ty2* y *Ty3*. Para el análisis se utilizó un umbral de 5% o 0.05, lo que quiere decir que los marcadores utilizados expliquen mas del 95% de la variabilidad. Para el gen *Ty2* fue de 0.483, (Cuadro 8) lo cual indica que el marcador no explica la resistencia y la susceptibilidad. Para el gen *Ty3* fue de 0.113 (Cuadro 8).que es una

probabilidad menor que para el *Ty2* y explica mejor la resistencia. Los resultados obtenidos no se adecua a la proporción que esperábamos para ambos genes. Esto puede ser explicado por la asociación de genes sub-letales con estas dos introgresiones.

Cuadro 8. Análisis genotípico de la familia F2 a los 44 días después del trasplante para los genes *Ty2* y *Ty3*.

Genotipos del marcador	Error estándar	Valor de P, 0.05
<i>Ty2/Ty2</i>	0.753	0.483
<i>Ty3/Ty3</i>	2.1858	0.113

9. Discusión

9.1. Evaluar la efectividad genética del gen *Ty3* en la resistencia a begomovirus.

La efectividad de la introgresión *Ty3* para conferir resistencia a begomovirus fue evaluada en familias F3 del cruce de la línea endogámica, Gh13, por la línea susceptible M82. El marcador SCAR co-dominante fue utilizado para detectar la introgresión *Ty3* en la población F2. La segregación de este marcador coincide con la proporción esperada para un gen simple. Familias F3 fueron derivadas de las plantas F2 que fueron homocigotas para la introgresión *Ty3* o de aquellas plantas sin la introgresión. Solamente las familias F3 con y sin la introgresión fueron trasplantadas al campo. Familias F3 fueron utilizadas ya que fue posible replicar cada familia tres veces con cinco plantas por réplica y, por consiguiente, la evaluación estadística fue más precisa que al utilizar plantas F2, las cuales no se pueden replicar. Nuestros resultados claramente demuestran que la introgresión *Ty3* es efectiva en proporcionar resistencia a begomovirus en Guatemala. Dado que la introgresión *Ty3* fue detectada con el marcador SCAR co-dominante, P6-25F2/R5, éste puede ser utilizado en selección asistida por marcadores para facilitar la detección de plantas resistentes a begomovirus en un programa de mejoramiento de tomate. Además, este marcador permitirá la sobreposición de diferentes genes de resistencia a begomovirus en híbridos de tomate con resistencia a begomovirus más duradera.

Debido a que el campo en Guatemala puede tener presentes más de siete begomovirus bipartitos presentes (Nakhla et al., 2005), se espera que el locus o los loci de la resistencia que están asociados con la introgresión *Ty3* sean efectivos en otras regiones del mundo. Esto está respaldado por la observación del híbrido FAVI 9, el cual tiene la introgresión *Ty3*, que presentó resistencia a begomovirus bipartitos en Israel, India (Maruthi et al., 2003) y Sudáfrica (Pietersen y Smith, 2002); y que las líneas de mejoramiento con resistencia a begomovirus, que provienen de la misma fuente de resistencia que Gh13, fueron resistentes en Jordania, Líbano, Egipto y Marruecos (D. P. Maxwell, datos no publicados).

El gen que confiere resistencia no ha sido localizado en la introgresión *Ty3*. Estudiamos la longitud de la introgresión de *S. chilense* en la familia F3 número 3, la cual tenía la introgresión *Ty3* pero era susceptible. Cuatro marcadores moleculares fueron utilizados para determinar si las plantas susceptibles tenían la introgresión y fue determinado que la introgresión estaba entre 22 cM y 30 cM. Esto indica que el gen de resistencia a begomovirus no está localizado en esta región del cromosoma 6. La introgresión *Ty3* en Gh13, el parental resistente, está aproximadamente entre 18 cM y 32 cM. Dado esto, es probable que el gen de resistencia

begomovirus esté entre 18-22 cM y 30-32 cM. Estos resultados fueron útiles para mapear la ubicación del gen para la resistencia a begomovirus, el cual es un paso necesario hacia la clonación del gen específico responsable de esta resistencia.

Otra herramienta ponderosa, la cual es utilizada a menudo para mapear la ubicación de genes de resistencia, es el uso de líneas endogámicas recombinantes. La generación F5 de líneas endogámicas recombinantes aquí reportadas son las únicas líneas endogámicas recombinantes disponibles para estudiar la ubicación de genes asociados con la resistencia a begomovirus.

9.2. Determinar la efectividad genética asociada a los genes *Ty2* y *Ty3* con la resistencia a los begomovirus presentes en Guatemala.

Una meta para el mejoramiento de tomate con resistencia a begomovirus es crear un híbrido que sea resistente a begomovirus encontrados en distintas regiones del mundo. Para alcanzar esta meta, se supone que la sobreposición de los diferentes genes de resistencia logrará este objetivo. A la fecha, esto no ha sido probado. Nuestros experimentos son el primer esfuerzo para evaluar la suposición de que al tener dos genes de resistencia diferentes en una sola planta, se incrementará el nivel de resistencia. Para estudiar esta posibilidad, es necesario disponer de marcadores moleculares que detecten las introgresiones asociadas con los diferentes genes. Esto es posible para dos introgresiones: *Ty2* y *Ty3*. En Guatemala, plantas con la introgresión *Ty3* han expresado niveles satisfactorios de resistencia a múltiples begomovirus. Sin embargo, las plantas con la introgresión *Ty2* sólo tienen moderados niveles de resistencia (Mejía et al., datos no publicados). Se propuso que la combinación de estos dos genes de resistencia incrementaría el nivel de resistencia en plantas que fueran homocigotas para ambas introgresiones. Para estudiar esta propuesta, plantas F2 fueron sembradas en el campo en Noviembre de 2008 y sus genotipos y fenotipos fueron determinados. Las introgresiones para *Ty2* y *Ty3* no coincidieron con la segregación esperada. El número de plantas con estas introgresiones se redujo en la población F2 y el número de plantas sin las introgresiones fue mayor de lo esperado. Esto puede ser explicado por la asociación de genes sub-letales con estas dos introgresiones. Se conoce que las introgresiones de especies silvestres también pueden portar genes sub-letales.

De forma inesperada, no hubo incremento en la resistencia para las plantas que fueron homocigotas para ambas introgresiones cuando se compararon con las otras ocho clases. Estos resultados deben ser considerados como preliminares ya que no fue posible replicar los genotipos utilizando familias F3, como se realizó al evaluar las familias F3 para determinar la efectividad genética del gen *Ty3*. Además, no hubo diferencia estadística en los DSI entre plantas homocigotas para ambas introgresiones y aquellas plantas que no tenían las introgresiones. Esto pudo haber sido causado por una población alta de mosca blanca (vector del virus), la cual fue tan alta que la resistencia no se expresó bajo este nivel de inóculo.

10. Conclusiones

- La introgresión *Ty3* en la evaluación de la familia F3 segregó como según lo esperado en la población F2 para un gen simple y no hay genes sub-letales asociados con esta introgresión de la especie silvestre, *S. chilense*. Por consiguiente la introgresión *Ty3* fue asociada con la resistencia a begomovirus.
- El marcador SCAR co-dominante, P6-25F2/R5, puede ser utilizado efectivamente en un programa de mejoramiento de tomate que involucre la selección asistida por marcadores para genes de resistencia. Ahora es posible utilizar el marcador para la introgresión *Ty3* para la resistencia a begomovirus junto con otros marcadores para genes de resistencia a enfermedades causadas por hongos y bacterias.
- La generación F5 de líneas endogámicas recombinantes aquí reportadas son las únicas disponibles para estudiar la ubicación de genes asociados con la resistencia a begomovirus.
- Resultados preliminares indican que la introgresión *Ty2* puede tener genes sub-letales asociados a la misma. Debido a que de forma inesperada, no hubo incremento en la resistencia para las plantas que fueron homocigotas para ambas introgresiones. Estos resultados deben ser considerados como preliminares ya que no fue posible replicar los genotipos utilizando familias F3, como se realizó al evaluar las familias F3 para determinar la efectividad genética del gen *Ty3*. Además, no hubo diferencia estadística en los DSI entre plantas homocigotas para ambas introgresiones y aquellas plantas que no tenían las introgresiones.

11. Recomendaciones

- El marcador SCAR co-dominante, P6-25F2/R5, puede ser utilizado en un programa de mejoramiento para asistir en el desarrollo de líneas de mejoramiento con resistencia a begomovirus.
- Realizar investigaciones adicionales sobre la longitud de las introgresiones *Ty3* en las dos familias F3 que tienen la introgresión y son susceptibles.
- Continuar los experimentos con las introgresiones *Ty2* y *Ty3* y desarrollar las familias F3 para los diferentes genotipos.

12. Bibliografía

Agrios, GN. 1989. Fitopatología, enfermedades de plantas. Trad. Manuel Guzmán. México, Limusa. 769.

Díaz, M. "Marcadores Moleculares".1997. Sitio en Internet:

<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>.

Consultada 12 de abril, 2007

- InfoAgro. 2002. Cultivos. Metodos de control de mosca blanca, *B. tabaco*. Chile. En línea: <http://www.abcagro.com/>
- GUPTA, Pk.; VARSHNEY, Rk; SHARMA, Pc.; RAMESH, B. 1999. "Molecular markers and their applications in wheat breeding" Plant Breeding. Vol. No., 118 (Octubre 1999): Pag., 369-390
- Hanson, P., Green, S.K., and Kuo, G. 2006. *Ty2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. Tomato Genetic Cooperative Report 56:17-18.
- Hanson, P.M., bernacchi, D., Green, S., Tanksley, S.D., Muniyappa, V., Padmaja, A.s., Chen, H.M., Kuo, G., Fang, D., and Chen, J.T. "Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line". J. Amer. Soc. Hort. Sci. Vol. No.125 (Mayo, 2000): Pag, 15-20.
- Ji, Y., Salus, M.S., van Betteray, B., Smeets, J., Jensen, K., Martin, C.T., Mejía, L., Scott, J.W., Havey, M.J., and Maxwell, D.P. 2007a. Co-dominant SCAR markers for detection of the *Ty-3* and *Ty-3a* loci from *Solanum chilense* at 25 cM of chromosome 6 of tomato. Rept. Tomato Genetic Coop. 57:25-28.
- Ji, Y., Schuster, D.J., and Scott, J.W. 2007b. *Ty3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. Mol. Breeding 20:271-284.
- Ji, Y., Scott, J.W., Hanson, P., Graham, E., and Maxwell, D.P. 2007c. Sources of resistance, inheritance, and location of genetic loci conferring resistance to members of the tomato-infecting begomoviruses. In H. Czosnek (ed.), *Tomato yellow leaf curl virus* disease: management, molecular biology, breeding for resistance. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 343-362.
- Jones, D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. Europ. J. Plant Path. 109:195-219.
- Martin, C.T., Salus, M.S., Garcia, B.E., Jensen, K.S., Montes, L., Zea, C., Melgar, S., El Mehrach, K., Ortiz, J., Sanchez, A., Havey, M.J., Mejía, L., and Maxwell, D.P. 2007. Evaluation of PCR-based markers for scanning tomato chromosomes for introgressions from wild species. Rept. Tomato Genetic Coop. 57:31-34.
- Mejía, L., Teni, R.E., Vidavski, F., Czosnek, H., Lapidot, M., Nakhla, M.K., and Maxwell, D.P. 2005. Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for resistance to begomoviruses in Guatemala. Acta Hort. 695:251-255.
- Morales, F.L. y Anderson P.K. "The emergence and dissemination of whitefly transmitted geminivirus in Latin America." Arch. Virol. 146: 415-441. 2001. Sitio en internet: <http://www.censa.edu.cu/portals/0/pdf/rpv2003/vol.18%20no.3/p168-175.pdf>. Consultada 18 de Mayo 2007.
- Nakhla, M.K., Sorenson, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J.P., and Maxwell, D.P. 2005. Molecular Characterization of Tomato-Infecting Begomoviruses in Central America and Development of DNA-Based Detection Methods. Acta Hort. 695:277-288.

- Polston, J.E. and Anderson, P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358-1369.
- Scott, J.W., Stevens, M.R., Barten, J.H.M., Thome, C.R., Polston, J.E., Schuster, D.J., and Serra, C.A. 1996. Introgression of resistance to whitefly-transmitted geminiviruses from *Lycopersicon chilense* to tomato. In: *Bemisia* 1995: Taxonomy, Biology, Damage Control and Management, Ed. by D. Gerling and R.T. Mayer, Intercept Ltd., Andover, UK, p.357-367.
- Vidavsky, F., and Czosnek, H. 1998. Tomato breeding lines immune and tolerant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* 88:910-914.

ANEXOS

Marcador TG590 a 22 cM

Utilizando los cebadores TG5090F2-R2. Se comparo cada una de las siguientes secuencias (Cuadro 8); con los padres Gh13 (resistente), M82 (susceptible), para encontrar algunas diferencias entre secuencias, al hacer los alineamientos se encontraron 17 SNP (polimorfismos de nucleótidos) y 4 indeles (inserciones y deleciones), lo que indica que las secuencias entre las plantas susceptibles y resistentes son diferentes.

Cuadro 8. Listado de secuencias.

Nombre de.secuencias	Nombre de.secuencias
F4-2-TG5090F2-R2	Gh13- TG509F2-R2
F4-6-TG590F2-R2	F4-9-TG590F2-R2
F4-10-TG509F2-R2	M82- TG509F2-R2

ORIGIN

F4-2-TG5090F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACATTGATACTCTCTACCATTCTCAT	60
F4-6-TG590F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACATTGATACTCTCTACCATTCTCAT	60
F4-10-TG509F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACATTGATACTCTCTACCATTCTCAT	60
Gh13_TG590F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACATTGATACTCTCTACCATTCTCAT	60
F4-9-TG590F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACTTTGATACTTTCTACCATTCTCAT	60
M82_TG590F2-R2	GAGTGAGATCCATACAAACTAAAGCATCAACATACTTTGATACTTTCTACCATTCTCAT	60
Consensus	gagtgagatccatatacaactaaagcatcaacatac ttgatact tctaccatttctcat	
F4-2-TG5090F2-R2	GCTAATTGGTAACTCTGATCCAATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
F4-6-TG590F2-R2	GCTAATTGGTAACTCTGATCCAATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
F4-10-TG509F2-R2	GCTAATTGGTAACTCTGATCCAATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
Gh13_TG590F2-R2	GCTAATTGGTAACTCTGATCCAATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
F4-9-TG590F2-R2	GCTAATTGGTAACTCCGATCCGATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
M82_TG590F2-R2	GCTAATTGGTAACTCCGATCCGATCCAAACCGAAGCCAATAACAACAGTAGTAATAATCA	120
Consensus	gctaatttgtaactc gatcc atccaaacccaagccaataacaacagtagtaataatca	
F4-2-TG5090F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
F4-6-TG590F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
F4-10-TG509F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
Gh13_TG590F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
F4-9-TG590F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
M82_TG590F2-R2	AACACGGTATCTCACAAGAGGATCCTTAAGAATAAGACGTTTCGTGATAAACTCTCCATGC	180
Consensus	aacacggtatctcacaagaggatccttaagaataagacgtttcgtgataaaactctccatgc	
F4-2-TG5090F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCATCTACCGCTATAGTTTT	240
F4-6-TG590F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCATCTACCGCTATAGTTTT	240
F4-10-TG509F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCATCTACCGCTATAGTTTT	240
Gh13_TG590F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCATCTACCGCTATAGTTTT	240
F4-9-TG590F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCCTCTACCGCTATAGTTTT	240
M82_TG590F2-R2	ATAATCCTCGAAAGAAAATGAATTGAACATTTGACTTTCCTCCTCTACCGCTATAGTTTT	240
Consensus	ataatcctcgaagaaaatgaattgaacatttgactttcctc tctaccgctatagtttt	
F4-2-TG5090F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATGGCGATTTGATAGGAAG	300
F4-6-TG590F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATGGCGATTTGATAGGAAG	300
F4-10-TG509F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATGGCGATTTGATAGGAAG	300
Gh13_TG590F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATGGCGATTTGATAGGAAG	300
F4-9-TG590F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATAGCGATTTGATAGGAAG	300
M82_TG590F2-R2	TGAATCATTGTCGCCAAGGCCATCATCATCTTCGCTAAGTGATAGCGATTTGATAGGAAG	300
Consensus	tgaatcattgt gccaaggccatcatcatcttcgctaagtgat gcgatttgata gaag	
F4-2-TG5090F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGCGTAACTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
F4-6-TG590F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGCGTAACTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
F4-10-TG509F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGCGTAACTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
Gh13_TG590F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGCGTAACTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
F4-9-TG590F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGTGTAACCTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
M82_TG590F2-R2	CAAGGGAGAGACAGTGTTCATGAGCTAGTGTAACCTAACAATGTCATTGATAGACAGTG	360
Consensus	caagggagagacagtgttttcatgagctag gtaactaacaatgtcattgatagacagtg	

F4-2-TG5090F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
F4-6-TG590F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
F4-10-TG509F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
Gh13_TG590F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
F4-9-TG590F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
M82_TG590F2-R2	TGAGTTACTACTACCGCTGTTGATTTACCATTAGTTATAGGTACTGGTCTTCTCTCAC	420
Consensus	tgagttactactaccgctgttgatttcaccattagttataggtactggctcttctctcac	
F4-2-TG5090F2-R2	TTTTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTA.TCT	479
F4-6-TG590F2-R2	TTTTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTA.TCT	479
F4-10-TG509F2-R2	TTTTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTA.TCT	479
Gh13_TG590F2-R2	TTTTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTA.TCT	479
F4-9-TG590F2-R2	TTGTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTAATCT	480
M82_TG590F2-R2	TTGTTTACCTTTCCATTACTCCATACCTGTCCATTATCAACAAAAATTATAGTTAATCT	480
Consensus	tt tttcacctttccattactccatcacctgtccattatcaacaaaaattatagttatct	
F4-2-TG5090F2-R2	CAATTTGACAACACT..AAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGTTATAATAAGT	537
F4-6-TG590F2-R2	CAATTTGACAACACT..AAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGTTATAATAAGT	537
F4-10-TG509F2-R2	CAATTTGACAACACT..AAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGTTATAATAAGT	537
Gh13_TG590F2-R2	CAATTTGACAACACT..AAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGTTATAATAAGT	537
F4-9-TG590F2-R2	CAATTTGACAACACTTAAAAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGATATAATAAGT	540
M82_TG590F2-R2	CAATTTGACAACACTTAAAAATAGGAGCAAATAACATCATTTTTTACACTGATATAATAAGT	540
Consensus	caatttgacaacact aaataggagcaaataacatcattttttacactg tataataagt	
F4-2-TG5090F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACACTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACGGCTCC	597
F4-6-TG590F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACACTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACGGCTCC	597
F4-10-TG509F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACACTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACGGCTCC	597
Gh13_TG590F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACACTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACGGCTCC	597
F4-9-TG590F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACGCTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACAGCTCC	600
M82_TG590F2-R2	TCAATCAATCTATAGTTTTACCAACGCTGCAAATTTTCGTTTCATTTTTATTTGACAGCTCC	600
Consensus	tcaatcaatctatagttttaccaac ctgcaaatttcgtttcattttttatTTGAC gctcc	
F4-2-TG5090F2-R2	ATATATTTTT.ACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	656
F4-6-TG590F2-R2	ATATATTTTT.ACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	656
F4-10-TG509F2-R2	ATATATTTTT.ACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	656
Gh13_TG590F2-R2	ATATATTTTT.ACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	656
F4-9-TG590F2-R2	GTATATTTTTTACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	660
M82_TG590F2-R2	GTATATTTTTTACTAAACTAECTTTCGCAAAAAATTATAAGCTAGGGGTACCCAATATTATTC	660
Consensus	tatatTTTT actaaactaectttcgcaaaaaattataagctaggggtacccaatattatTC	
F4-2-TG5090F2-R2	CTTTCAATTGACGTCGAACAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	716
F4-6-TG590F2-R2	CTTTCAATTGACGTCGAACAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	716
F4-10-TG509F2-R2	CTTTCAATTGACGTCGAACAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	716
Gh13_TG590F2-R2	CTTTCAATTGACGTCGAACAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	716
F4-9-TG590F2-R2	CTTTCAATTGACGTTAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	720
M82_TG590F2-R2	CTTTCAATTGACGTTAACCAACTACAAAATTCATACTTAATTAACGTCCTCAAAATC	720
Consensus	ctttcaattgacgt gaacaaccaactacaaaattcatacttaatTAACGTCCTCAAAATC	
F4-2-TG5090F2-R2	TTT.AATTCTATTATTTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	775
F4-6-TG590F2-R2	TTT.AATTCTATTATTTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	775
F4-10-TG509F2-R2	TTT.AATTCTATTATTTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	775
Gh13_TG590F2-R2	TTT.AATTCTATTATTTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	775
F4-9-TG590F2-R2	TTTTATTCTATTACTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	780
M82_TG590F2-R2	TTTTATTCTATTACTGTGCCTTTTAAGTTAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	780
Consensus	ttt aattctatta ttgtgccttttaagttAAGCAAATAATGCAAATTATGTCACAAT	
F4-2-TG5090F2-R2	CATTAACAATACTTTGTCTGTAGCCTATCG	805
F4-6-TG590F2-R2	CATTAACAATACTTTGTCTGTAGCCTATCG	805
F4-10-TG509F2-R2	CATTAACAATACTTTGTCTGTAGCCTATCG	805
Gh13_TG590F2-R2	CATTAACAATACTTTGTCTGTAGCCTATCG	805
F4-9-TG590F2-R2	CATTAAaAATACTTTGTCTGTAGCC.....	805
M82_TG590F2-R2	CATTAAaAATACTTTG.CTGTAGCCTATCG	809
Consensus	cattaa aatactttg ctgtagcc	

Marcador T0507 a 25 cM

Utilizando los cebadores T0507F2-R1. Se comparo cada una de las siguientes secuencias (Cuadro 9); con los padres Gh13 (resistente), M82 (susceptible), para encontrar algunas diferencias entre secuencias, al hacer los alineamientos se encontraron 21 SNP (polimorfismos de nucleótidos) y 9 indeles (inserciones y deleciones), lo que indica que las secuencias entre las plantas susceptibles y resistentes son diferentes.

Cuadro 9. Listado de secuencias.

Nom. Secuencia	Nom. Secuencia
F4-7-T0507F2-R2	F4-4-T0507F2
F4-10-T0507F2-R2	F4-2-T0507F2-R1
F4-6-T0507F2-R1	M82- T0507F2-R1
Gh13- T0507F2-R1	F4-9-T0507F2-R2
F4-3-T0507F2-R1	

ORIGIN

```
F4-7-T0507F2-R2 TTTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 60
F4-10-T0507F2-R2 .TTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 59
F4-6-T0507F2-R1 TTTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 60
Gh13_T0507F2-R1 .TTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 59
F4-3-T0507F2-R1 .....TTTCGCTAA 9
F4-4-T0507F2. ....TTTCGCTAA 9
F4-2-T0507F2-R1 .TTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 59
M82_T0507F2-R1 .TTGCTTATGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 59
F4-9-T0507F2-R2 .....TGAGAGGAAGTCTACACAAAAGAATGCATTCATTAACATGAGTTTCGCTAA 52
Consensus ttt gctaa
```

```
F4-7-T0507F2-R2 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 120
F4-10-T0507F2-R2 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 119
F4-6-T0507F2-R1 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 120
Gh13_T0507F2-R1 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 119
F4-3-T0507F2-R1 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 69
F4-4-T0507F2. TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 69
F4-2-T0507F2-R1 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 119
M82_T0507F2-R1 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 119
F4-9-T0507F2-R2 TTCTTCCATTCTTAAAGATCATCTGTTGGGCGATATAGATCGATTGGTTAGGCTTAATTT 112
Consensus ttcttccattctttaaagatcatctgttgggcgatatagatcgattggttaggcttaattt
```

```
F4-7-T0507F2-R2 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 180
F4-10-T0507F2-R2 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 179
F4-6-T0507F2-R1 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 180
Gh13_T0507F2-R1 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 179
F4-3-T0507F2-R1 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 129
F4-4-T0507F2. GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 129
F4-2-T0507F2-R1 GGATTCGTGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 179
M82_T0507F2-R1 GGATTCATGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 179
F4-9-T0507F2-R2 GGATTCATGGACCGGCAGGGTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT 172
Consensus ggattc tggaccggcagggTTTTCTCATGGACGAGGCTAAGAAGGTAATCATTTTATT
```

```
F4-7-T0507F2-R2 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 240
F4-10-T0507F2-R2 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 239
F4-6-T0507F2-R1 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 240
Gh13_T0507F2-R1 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 239
F4-3-T0507F2-R1 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 189
F4-4-T0507F2. TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 189
F4-2-T0507F2-R1 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 239
M82_T0507F2-R1 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 239
F4-9-T0507F2-R2 TAATTATTTTCAATTCGGATTGTTGAGTTTGTGATGGATTAGAGAATAACAACCTTTAGTG 232
Consensus taattatTTTcaattcggattgTTGagTTTGTGatGGattAGAGAATAACAACCTTTagTG
```

F4-7-T0507F2-R2	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	299
F4-10-T0507F2-R2	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	298
F4-6-T0507F2-R1	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	299
Gh13_T0507F2-R1	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	298
F4-3-T0507F2-R1	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	248
F4-4-T0507F2.	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	248
F4-2-T0507F2-R1	TAGTTGTGGTGGGG GT ATGATTACTTTTCCAAA . TTAATTAATTAATGGAGACATAGTAT	298
M82_T0507F2-R1	TAGTTGTGGTGGGG . TAGATTACTTTTCCAAA AT TAATTAATTAATGGAGACATAGT AG	298
F4-9-T0507F2-R2	TAGTTGTGGTGGGG . TAGATTACTTTTCCAAA AT TAATTAATTAATGGAGACATAGT AG	291
Consensus	tagttgtgggtgggg tatgattactttttccaaa ttaattaattaatggagacatagta	
F4-7-T0507F2-R2	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	359
F4-10-T0507F2-R2	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	358
F4-6-T0507F2-R1	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	359
Gh13_T0507F2-R1	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	358
F4-3-T0507F2-R1	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	308
F4-4-T0507F2.	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	308
F4-2-T0507F2-R1	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	358
M82_T0507F2-R1	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	358
F4-9-T0507F2-R2	TATTATTATGTAC AG TAATTATTATGATGATAACACATGTGAATGTGGTGTATCATGA	351
F4-7-T0507F2-R2	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	419
F4-10-T0507F2-R2	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	418
F4-6-T0507F2-R1	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	419
Gh13_T0507F2-R1	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	418
F4-3-T0507F2-R1	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	368
F4-4-T0507F2.	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	368
F4-2-T0507F2-R1	CTTTTTTTTT TC TTTTTTTTGGGTT GTGGA AAAT GTA ATT CAG TTTATG GATGT AT GG AT	418
M82_T0507F2-R1	CTTTTTTTTT AT TTTTT AAAT TTT GG TT GTG AT GT AT	395
F4-9-T0507F2-R2	CTTTTTTTTT AT TTTTT AAAT TTT GG TT GTG AT GT AT	388
Consensus	cttttttttt tttt aaat tt g tt tg atg at	
F4-7-T0507F2-R2	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAGCTGATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	479
F4-10-T0507F2-R2	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	478
F4-6-T0507F2-R1	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	479
Gh13_T0507F2-R1	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	478
F4-3-T0507F2-R1	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	428
F4-4-T0507F2.	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	428
F4-2-T0507F2-R1	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG CT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	478
M82_T0507F2-R1	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG TT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	455
F4-9-T0507F2-R2	GTGCAGATAACGTTTAATCTAACAGTGAAGCAG TT GATGAGTTTTGATCCATGTGAGTGG	448
Consensus	gtgcagataacgtttaatctaacagtgaagcag tgatgagttttgatccatgtgagtg	
F4-7-T0507F2-R2	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	539
F4-10-T0507F2-R2	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	538
F4-6-T0507F2-R1	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	539
Gh13_T0507F2-R1	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	538
F4-3-T0507F2-R1	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	488
F4-4-T0507F2.	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	488
F4-2-T0507F2-R1	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	538
M82_T0507F2-R1	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	515
F4-9-T0507F2-R2	ACAGAGAATCTGATGAAAGAGTATATGCTTGTATTGAAGGTTTCTTCTGCATTCCCTTTG	508
Consensus	acagagaatctgatgaaagagtatatgcttgttattgaaggtttcttctgcattccctttg	
F4-7-T0507F2-R2	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	599
F4-10-T0507F2-R2	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	598
F4-6-T0507F2-R1	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	599
Gh13_T0507F2-R1	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	598
F4-3-T0507F2-R1	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	548
F4-4-T0507F2.	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	548
F4-2-T0507F2-R1	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	598
M82_T0507F2-R1	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	575
F4-9-T0507F2-R2	CCTATTTTCTCATCCACCTATCGCAAGGCCATTCAAGTATGTATTATAAAT CA AATTCAA	568
Consensus	cctatTTTctcatccacctatcgcaaggccattcaagtatgtattataaa tc aattcaa	
F4-7-T0507F2-R2	TC AATTAGCTTT ACT TTTGT TG TATATAT GT GA TGAATAATCATTT GC ATATGTATTTT .	658
F4-10-T0507F2-R2	TC AATTAGCTTT ACT TTTGT TG TATATAT GT GA TGAATAATCATTT GC ATATGTATTTT .	657
F4-6-T0507F2-R1	TC AATTAGCTTT ACT TTTGT TG TATATAT GT GA TGAATAATCATTT GC ATATGTATTTT .	658
Gh13_T0507F2-R1	TC AATTAGCTTT ACT TTTGT TG TATATAT GT GA TGAATAATCATTT GC ATATGTATTTT .	657

F4-3-T0507F2-R1	TCAATTAGCTTTACTTTTGTGTGATATATGTGATGAATAATCATTTGCATATGTATTTT.	607
F4-4-T0507F2.	TCAATTAGCTTTACTTTTGTGTGATATATGTGATGAATAATCATTTGCATATGTATTTT.	607
F4-2-T0507F2-R1	TCAATTAGCTTTACTTTTGTGTGATATATGTGATGAATAATCATTTGCATATGTATTTT.	657
M82_T0507F2-R1	TAATTAGCTTT.TACTTTGTTG.....GTGGTGAATAATCATTT.TGTATGTATTTT	626
F4-9-T0507F2-R2	TAATTAGCTTT.TACTTTGTTG.....GTGGTGAATAATCATTT.TGTATGTATTTT	619
Consensus	t aattagcttt ttgttg gtg tgaataatcattt tatgtatttt	
F4-7-T0507F2-R2	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGG.....	709
F4-10-T0507F2-R2	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGag.....	710
F4-6-T0507F2-R1	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGG.....	709
Gh13_T0507F2-R1	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	717
F4-3-T0507F2-R1	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	667
F4-4-T0507F2.	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	667
F4-2-T0507F2-R1	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	717
M82_T0507F2-R1	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	686
F4-9-T0507F2-R2	CAGGCGAGAACGAAAGTAGCGGAGGCGTTGGGATTGGTAGTGAGAGATCGGagaaaagaa	679
Consensus	caggcgagaacgaaagtagcggagggcgttgggattggtagtgagagatcgg	

Marcador T0834 a 32 cM

Utilizando los cebadores T1098F2-R2. Se comparo cada una de las siguientes secuencias (Cuadro 7); con los padres Gh13 (resistente), M82 (susceptible), para encontrar algunas diferencias entre secuencias, al hacer los alineamientos se encontraron 8 SNP (polimorfismos de nucleótidos) lo que indica que las secuencias entre las plantas susceptibles y resistentes son diferentes.

Cuadro 8. Listado de secuencias.

Nom. Secuencia	Nom. Secuencia
F4-1-T1098F2-R2	F4-3-T1098F2-R2
F4-2-T1098F2-R2	F4-5-T1098F2-R2
F4-10-T1098F2-R2	F4-4-T1098F2-R2
Gh13T1098F2-R2	F4-6-T1098F2-R2
F4-7-T1098F2-R2	F4-9-T1098F2-R2
F4-8-T1098F2-R2	M82_T1098F2

ORIGIN

F4-1-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-2-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-10-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
Gh130-98F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-7-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-8-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-3-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-5-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-4-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-6-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
F4-9-T1098F2-R2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
M82_T1098F2	GTTAGTTCCTTCTGAGAAGATGGCTGGACTTCCAGGATACAGCGCCCTTGCTCCCAAGAC	60
Consensus	gttagttccttctgagaagatggctggacttccaggatacagcgcccttgctcccaagac	

F4-1-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-2-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-10-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
Gh13-1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-7-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-8-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-3-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-5-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-4-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-6-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
F4-9-T1098F2-R2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
M82_T1098F2	TAAGAATCTGGTTATGGCTGGAGGTTTGACAGGATTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	120
Consensus	taagaatctggttatggctggaggttgacaggatTTGTTTTGGTGTGTACTACTACAC	

F4-1-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-2-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-10-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
Gh13-1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-7-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-8-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-3-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-5-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-4-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-6-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
F4-9-T1098F2-R2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
M82_T1098F2	TATGAGAGCTGTTGGAGGCTCAGATGAACTTCAAGTAGCCATTGATAAGTTTGAAGATGC	180
Consensus	tatgagagctgttggaggctcagatgaaacttcaagtagccattgataagtttgaagatgc	

F4-1-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-2-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-10-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
Gh13-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-7-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-8-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-3-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-5-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-4-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-6-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTGCATCCAATATG	240
F4-9-T1098F2-R2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTG GT TCCAATATG	240
M82-T1098F2	AAAACGCAGCAGTGACGCTGAAGCAAGTTTGGCACCCAAGCAATAAATTG GT TCCAATATG	240
Consensus	aaaacgcagcagtgacgctgaagcaagtttggcacccaagcaataaattg tccaatattg	

F4-1-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-2-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-10-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
Gh13-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-7-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-8-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-3-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-5-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-4-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-6-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
F4-9-T1098F2-R2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
M82_T1098F2	AAGGTGACACTGCAATTTGGAAGAA CA CTACTGGATGATTTTGAAGGAGTAGAACCAGACT	300
Consensus	aaggtgacactgcaatTTGGAAGAA CA tactggatgattttgaaggagtagaaccagact	

F4-1-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-2-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-10-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
Gh13-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-7-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-8-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-3-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-5-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-4-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-6-T1098F2-R2	GAATAACT TGTC CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
F4-9-T1098F2-R2	GAATAACT AAAA CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
M82_T1098F2	GAATAACT AAAA CTGTTTCTCATGCTTTGCGAATACACACACTTAGCTGTAAAGATATCA	360
Consensus	gaataact ctgTTTTctcatgctTTGCGAATACACACACTtagctgtaaagatatca	

F4-1-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-2-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-10-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
Gh13-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-7-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-8-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-3-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-5-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-4-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-6-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	420
F4-9-T1098F2-R2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATG.....	390
M82_T1098F2	AGATATTGCATCCTTTTTTAAGCTTTTTATG.....	390
Consensus	agatattgcatcctTTTTTAAGCTTTTTATGTTGAGATAAAATTTTCTTCCTTTTTGAATTT	

F4-1-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAG.....	441
F4-2-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAG.....	441
F4-10-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATAC.....	439
Gh13-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAGtcatcctg	449
F4-7-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATAC.....	439
F4-8-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAGtcatcctg	449
F4-3-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATAC.....	439
F4-5-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAG.....	441
F4-4-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATAC.....	439
F4-6-T1098F2-R2	CAATGTCTACAGACTATACAG.....	441
F4-9-T1098F2-R2	390
M82_ T1098F2	390
Consensus		



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
-USAC-

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION
-DIGI-

FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNVIERDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA -FAUSAC-

PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
NUTRICIÓN -PRUNIAN-

INFORME FINAL DELPROYECTO DE INVESTIGACION 2008:

**“EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD GENÉTICA DE DOS GENES EN LA
RESISTENCIA A BEGOMOVIRUS UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES Y EVALUACIONES DE CAMPO”**

Equipo de investigación

Msc. Gregorio Amílcar Sánchez Pérez (Coordinador)
Ing. Agr. Brenda Esperanza García Contreras (Investigadora)
Dr. Luis Mejía de León (Investigador asociado)
Ing. Agr. Rudy Tení (Investigador asociado)
Ana Cristina Barillas. (Investigador asociado)
Dr. Douglas Maxwell (Investigador asociado)

GUATEMALA, ENERO DE 2009