

**Variabilidad Genética para Virulencia en *Fusarium
oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen (Fol),
Fuentes de Resistencia y Forma de Herencia en Especies de
*Lycopersicon***

ADA ASCENCIO ALVAREZ

TESIS

**Presentada como requisito parcial
Para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
PROGRAMA DE GRADUADOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Diciembre del 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSTGRADO

Variabilidad Genética para Virulencia en *Fusarium oxysporum* f. sp.
lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen (Fol), Fuentes de Resistencia y Forma
de Herencia en Especies de *Lycopersicon*

TESIS

POR

ADA ASCENCIO ALVAREZ

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal

Dr. Alfonso López Benítez

Asesor:

Dr. Fernando Borrego Escalante

Asesor:

Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera

Asesor:

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:

Dr. Florencio Jiménez Díaz

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Posgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila a diciembre 2006

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA MATER. Por acogerme en su seno y permitirme culminar mis estudios de Postgrado.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT). Por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y doctorado; por el apoyo económico que me proporcionó y las atenciones finísimas que tuvo hacia mi persona.

AL DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO. Por contribuir a mi formación y enseñanzas adquiridas, por el apoyo y facilidad brindado dentro de sus instalaciones.

AL COMITÉ ASESOR. Por su apoyo en la conducción, seguimiento y culminación de dicho trabajo, además de la revisión del escrito. Muy en especial al Dr. Florencio Jiménez, Díaz, por creer en mí, por ser más que un asesor un buen amigo.... Un padre.

A la hija más hermosa que Dios me pudo dar **YAHAIRA SARABI RODAS ASCENCIO.** Por su colaboración en la redacción de los datos del análisis molecular de este trabajo.

DEDICATORIA

CON TODO CARIÑO, RESPETO, ADMIRACION Y SOBRE TODO
AMOR PARA MI HIJA:

YAHAIRA SARABI RODAS ASCENCIO

Gracias mi amor, por existir en mi vida, por ser parte de este gran logro que no es mio sino solamente tuyo, gracias por escogermme como madre, pues tu ser me he animado a culminar este triunfo personal y a seguir superándome como persona, madre, amiga, hermana y ser humano, porque tu vales todo. Gracias por darme tu tiempo para terminar esta logro profesional, espero y algún día te des cuenta que todo, absolutamente todo lo que hago es por ti. Te quiero.

A mi madre:

JUANITA ALVAREZ CORONADO †

Por darme la vida, por enseñarme a ser una mujer en toda la extensión de la palabra, porque a pesar de que ya no esta me sigue enseñando cosas que pensé que ya las tenía bien claras.

Una dedicatoria muy en especial a la familia:

RODAS NUCAMENDI

Gracias Señores por su ayuda para terminar este sueño, porque al cuidar el tesoro más grande de mi vida (mi hija), les debo mucho mas de lo que pensaba. Gracias por darme esta oportunidad de culminar este logro, de convivir con mi hija y que mi hija conozca a su familia paterna. Muchas, pero muchas gracias.

A el amor de mi vida

Gracias hermoso, simplemente por existir, por el estímulo, ayuda, paciencia y comprensión a este logro, por las inquietudes y anhelos compartidos; pero sobre todo por aguantarme, se que soy una persona difícil de tolerar y con tu amor se puede todo. Por permitirme compartir una parte de tu vida, por todo lo que me enseñaste, absolutamente todo, por dejar acompañarte en este corto recorrido en tu vida. Yo en lo personal jamás te podré olvidar, pues ya formas parte de mi vida.

COMPENDIO

Variabilidad Genética para Virulencia en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen (Fol), Fuentes de Resistencia y Forma de Herencia en Especies de *Lycopersicon*

POR

ADA ASCENCIO ALVAREZ

DOCTOR EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO

UNIVERSIDAD AUTONÓMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 2006

Dr. Alfonso López Benítez –Asesor-

Palabras Claves: Variabilidad genética, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon*, resistencia, herencia.

Se colectaron 102 muestras de tallo con síntomas de *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* (Fol) de variedades comerciales de tomate, en diferentes lotes de Culiacán Sinaloa. Se realizó aislamientos, purificación e identificación morfológica del hongo y se obtuvieron cultivos monospóricos. Los genotipos utilizados como materiales diferenciales para la identificación de las diferentes razas de Fol fueron Bonny Best, Manapal, Walter e I₃R₃; los cuales se inocularon con una suspensión conidial de Fol de 10⁷ ml l⁻¹ de cada una de las posibles razas de este hongo, a través de la inmersión de raíces con pequeñas heridas en las mismas. Se hicieron extracciones de ADN y se determinó calidad del mismo, se hizo amplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias espaciadoras intergénicas usando los iniciadores IGSF 5' CTG AAC GCC TCT AAG TCA G 3' e IGSR 5' AAT GAG CGA TTC GCA GTT TC 3'). Posteriormente se realizó un análisis del patrón de bandas generada por la técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFPLs), usando las enzimas de restricción: EcoRI, RsaI, DraI y HinfI, con el fin de encontrar variabilidad entre las cepas. Para buscar fuentes de resistencia se utilizaron 27 accesiones de 48 diferentes especies del género *Lycopersicon* procedentes del Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis; la inoculación y la evaluación de estas accesiones se hizo de la misma forma que con los materiales diferenciales. Posteriormente, se utilizaron las poblaciones segregantes F₂ producto del entrecruzamiento de progenitores tolerantes y susceptibles a la raza 3 de Fol. La evaluación por medios convencionales se basó en la respuesta típica de resistencia vertical a través de la observación de síntomas (plantas sanas o enfermas). En el caso de la metodología por medios moleculares se hizo un análisis estadístico; para obtener una matriz de disimilaridad genética por apareamiento simple; asignando el dígito 1 para el fragmento presente y 0 para el ausente. El análisis fenético se realizó con el programa de análisis multivariado de taxonomía numérica (NTSYS-pc versión 2.3). La matriz de similitud se calculó con el coeficiente DICE. Para definir el tipo de herencia se utilizó la prueba G y para calcular los valores de dicha prueba, se empleó el software propuesto por McDonald *et al.*, 1996. Al observar la respuesta de los materiales diferenciales a la inoculación, se detectó la presencia de tres

razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en los lotes muestreados en Culiacán, Sinaloa. De todos los aislamientos el 24 % corresponde a la raza 1, 14% a la raza 2 y 62% a la raza 3. A través de medios moleculares, se determinó que no existe variabilidad entre las cepas evaluadas; sin embargo, hay diferencias genéticas que permiten diferenciar las razas presentes. En los genotipos evaluados con posibles fuentes de resistencia se encontró que todos eran susceptibles a la raza 1, 16 resistentes a la raza 2 y sólo 4 resistentes a la raza 3, destacando un material mejorado (*L. esc.* cv. *motelle*) y dos silvestres (*Lycopersicon peruvianum* y *Lycopersicon pimpinellifolium*). Es importante destacar que la especie *peruvianum* reunió la resistencia vertical para las razas 2 y 3, por lo que destaca como potencial fuente de resistencia; esta especie es originaria de la región andina del Perú, permitiendo probablemente una mayor variabilidad genética en la resistencia a las diferentes razas de Fol. Al evaluar el tipo de herencia se observó que las especies *esculentum*, *peruvianum* y *pimpinellifolium* presentaron genes de resistencia vertical a la raza 3. Las frecuencias genéticas 3:1 de plantas resistentes y susceptibles para el caso de las poblaciones segregantes, fueron similares, ya que en todos los casos el valor G (2.8, 0.68 y 1.35, respectivamente) tienen una $p \geq 0.05$, por lo que presentan una herencia mendeliana simple. En este sentido destaca la especie *pimpinellifolium*, ya que posee alelos de resistencia vertical a las razas 2 y 3.

ABSTRACT

Genetic variability for virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen (Fol) resistance sources and heredity form in *Lycopersicon* species

by

**DOCTORATE IN
PLANT BREEDING**

ADA ASCENCIO ALVAREZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO COAHUILA. December, 2006**

Ph. D. Alfonso López Benitez-Adviser-

Key words: Genetic variability, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Lycopersicon*, resistance, heredity.

There were collected 102 samples stem with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) symptoms of tomatoes commercial varieties from Culiacán Sinaloa. The fungi was isolated, purified and morphologically identified, producing monosporic isolates. The differential genotypes used were Bonny Best, Manapal, Walter and I₃R₃; those were inoculated in a Fol conidial suspension of 10⁷ ml l⁻¹ containing every possible race of Fol using the immersion of root with small wounds. The high quality DNA was obtained and amplified using the polymerase chain reaction (PCR), of sequencing of the intergenic spacer, using primers IGSF 5' CTG AAC GCC TCT AAG TCA G 3' e IGSR 5' AAT GAG CGA TTC GCA GTT TC 3'. It was carried out a polymorphism patterns analysis using the restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) technique, using the restriction enzymes: EcoRI, RsaI, DraI and HinfI to find variability in the monosporic isolates. There were used 27 accessions from the Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis, of 48 different genera of *Lycopersicon* to identify genetic sources of resistance; the inoculation and evaluation were in the same way that differential genotypes. Later, the segregants F₂ populations resulting of resistant and susceptible race 3 of Fol. parent crossover were evaluated using the typical symptoms of vertical resistance answering (sick and health plants). In the molecular methodology a statistical analysis was made to obtain a dissimilarity matrix analysis by simple mating; assigning digit 1 for presence and digit 0 for absence. The phenetic analysis was did it using a multivariate analysis of numeric taxonomy (NTSYS-pc ver 2.3). The similarity matrix was calculated with the DICE coefficient. To define the inheritance was used the G test using the software proposed by McDonald *et al.*, 1996. The differential genotypes responses detected the 3 races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* presence in the Culiacán Sinaloa commercial production lots. From all the isolations, 24% presented race 1, 14% race 2 and 62% race 3. Through the molecular analysis it was determined that the variability among monosporic isolates does not exist; however, there are genetic differences that allow defining the races. In the evaluated genotypes it was found that all of them were susceptible to race 1, 16 were resistant to race 2 y 4 resistant to race 3, standing out an improved genotype (*L. esc* cv. *motelle*) and 2 wild (*Lycopersicon peruvianum* and

Lycopersicon pimpinellifolium). The *peruvianum* specie had booth vertical resistance to races 2 and 3, showing it like a potential resistance source, which was originated in the Andean region where it was possible the resistance develop to the different Fol. races. The *peruvianum* and *pimpinellifolium* species had resistance to race 3. The 3:1 genetic frequencies of resistant and susceptible plants in segregant populations were similar, since the G value (2.8, 0.68 and 0.02, respectively) had a $p \geq 0.05$, showing a simple Mendelian inheritance. In this way, the *pimpinellifolium* specie has vertical resistant alleles to races 2 and 3.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos	3
Hipótesis.....	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	
Origen e historia del tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	4
Clasificación taxonómica del tomate	5
Marchitamientos del tomate por <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> (Fol).....	7
Sintomatología	7
Patógeno	8
Variabilidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> (Fol).....	10
Marcadores moleculares que determinan variabilidad	11
Tipo de marcadores moleculares más utilizados.....	13
Mejoramiento genético para resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> (Fol)	15
Métodos de mejoramiento genéticos más utilizados para introducir resistencia a enfermedades en tomate	16
Fuentes de resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> (Fol)	17
Tipos de herencia para resistencia a patógenos	18
Tipos de pruebas estadísticas para analizar variables discretas.....	18
Metodología de la Prueba G	19
III MATERIALES Y MÉTODOS	
Muestreo del patógeno.....	20
Aislamiento, purificación y mantenimiento de los cultivos fúngicos.....	20
Identificación de variabilidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol) por medios convencionales	
Siembra de cultivares diferenciales	21
Inoculación de los cultivares diferenciales.....	21
Identificación de variabilidad genética de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>lycopersici</i> (Fol) por medio moleculares	

Extracción de ADN.....	22
Determinación de la integridad del ADN.....	22
Amplificación de oligonucleotidos de Fol mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
Visualización de los productos amplificados de PCR.....	23
PCR-RFLP's.....	23
Evaluación de variabilidad genética por medios convencionales y moleculares.....	23
Respuesta de diferentes cultivares y especies de <i>Lycopersicon</i> a la inoculación con las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol) identificadas.....	24
Inoculación.....	24
Herencia de la resistencia a la raza 3 de Fol.....	26
Inoculación de la generación F ₂	26
IV RESULTADOS Y DISCUSION	
Variabilidad genética mediante cultivares diferenciales.....	28
Variabilidad genética por medios moleculares.....	30
Materiales resistentes a las 3 razas de Fol.....	32
Herencia de la resistencia a la raza 3 en los materiales de <i>Lycopersicon</i> resistente.....	33
V CONCLUSIONES	36
VI RESUMEN	37
VII LITERATURA CITADA	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. División del género <i>Lycopersicon</i> nombre, su equivalente y distribución.	6
Cuadro 2. Cultivares y especies de <i>Lycopersicon</i> evaluadas por su reacción a las razas colectadas en Culiacán Sinaloa de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>lycopersici</i>	25
Cuadro 3.- Cepas identificadas morfológicamente de Fol inoculadas en los diferentes materiales diferenciales de las razas de este hongo, por localidad.	29
Cuadro 4. Respuesta de 27 genotipos de <i>Lycopersicon</i> a las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> (Fol), colectadas en Culiacán Sinaloa.	33
Cuadro 5.- Prueba G de frecuencias genéticas de los materiales evaluados de 3 especies de <i>Lycopersicon</i> resistentes a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i>	34

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.- Resultados de la amplificación de secuencias específicas de Fol con primer IGSF e IGSR. MM= marcador de peso molecular; Carril 9: Raza 1; Carril 7: Raza 2 y Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10: Raza 3.	30
Fotografía 2.- Resultados de la amplificación de secuencias específicas de Fol con las enzimas 3 restricción. MM= marcador de peso molecular; Carriles del 1 al 10: razas de Fol.	31

I INTRODUCCION

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia a nivel mundial, debido al gran número de productos que se obtienen de él (producto en fresco, o procesado como salsa, purés, y reactivos para laboratorio entre otros). Por su nivel de producción ocupa el segundo lugar entre las hortalizas, superada solamente por el cultivo de la papa.

En México, el cultivo del tomate está considerado como la segunda especie hortícola con mayor superficie sembrada y la más importante por su nivel de producción.

Este cultivo es considerado un buen generador de divisas para los países exportadores; México es considerado el segundo exportador más importante de esta hortaliza, ya que el tomate representa más del 37% del total de sus exportaciones agropecuarias; siendo el principal proveedor de Estados Unidos, donde se comercializa más del 90% de la producción. El consumo nacional de tomate está destinado principalmente para la industria procesadora, y para el consumo fresco (SAGARPA, 2005).

El tomate es cultivado como una planta anual; aunque es susceptible al frío, puede cultivarse exitosamente en lugares frescos, debido a que se han desarrollado cultivares para diferentes ambientes, métodos de producción y usos alimenticios. La diversidad de usos y de los ambientes se debe a la gran variabilidad genética existente en el género *Lycopersicon* y en sus parientes silvestres.

Los principales países productores son: USA, Canadá, Grecia, Italia, México, Turquía, Egipto, India y España. La producción mundial creció 9.5% anual en los últimos cuarenta años, siendo la hortaliza más cultivada. (SAGARPA, 2005).

A nivel nacional se siembra alrededor de 81,184 hectáreas de territorio donde se obtienen 2'156,900 toneladas aprox., siendo los principales estados: Sinaloa, Baja California, San Luís Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán, a menor escala: Jalisco, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo y Puebla (SAGARPA, 2005).

Actualmente el cultivo se ve afectado por enfermedades que bajan la producción y calidad del producto ocasionando pérdidas parciales y en ocasiones totales del cultivo; éstos son causadas por agentes abióticos (temperatura, humedad y deficiencia nutricional, entre otros) y bióticos (hongos, bacterias y virus, entre otros); dentro del grupo de agentes bióticos se pueden considerar a las enfermedades como el principal problema de la producción de este cultivo, y dentro de este se encuentran las más destructivas producidas por virus, fitoplasmas y diversas especies de hongos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Aún cuando esta enfermedad prospera particularmente bien en climas cálidos con un favorable rango de temperaturas de 20 a 28 °C, suelos arenosos de pH ácido y pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio, con días cortos y baja intensidad luminosa (Blancard, 1997), se le puede encontrar en una diversidad de condiciones ambientales de cultivo, desde trópicos secos hasta climas templados, prácticamente en cualquier lugar donde se cultive tomate

Los agricultores, para evitar el daño de estas enfermedades, realizan un gran número de aplicaciones de agroquímicos por ciclo y en ocasiones sin los criterios técnicos correctos, como serían entre otros, un correcto número de aplicaciones y en el momento adecuado, concentración y producto a utilizar indicado, lo que ocasiona mayores costos de producción, contaminación del ambiente, del tomate comercial, y por lo tanto mayores riesgos para la salud.

La utilización de cultivares genéticamente resistentes a enfermedades es el método más económico, efectivo, seguro y sencillo de control de enfermedades (Stackman y Harrar 1958). De aquí la importancia de formar variedades de plantas cultivadas, capaces de resistir los daños causados por

las enfermedades. La importancia de las variedades o cultivares resistentes es reconocida universalmente, pues el éxito o fracaso de un cultivo, depende frecuentemente de la reacción que tenga éste frente a un patógeno determinado.

Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron:

- Determinar la variabilidad genética para virulencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) en algunas regiones tomateras de Culiacán, Sinaloa.
- Identificar potenciales fuentes de resistencia a las razas presentes de Fol.
- Determinar la forma de herencia de la resistencia a esta enfermedad en los materiales identificados como resistentes.

HIPÓTESIS.-

- La variabilidad genética para virulencia en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* para especies del género *Lycopersicon*, está presente en proporciones mayores a la raza de actual descubrimiento (raza 3) en la región de interés.
- De las especies y materiales genéticos evaluados al menos uno será resistente a la raza más prevaleciente del patógeno.
- La resistencia a esta enfermedad es de herencia simple, o determinada por genes mayores.

II REVISION DE LITERATURA

Origen e historia del tomate (*Lycopersicon esculentum*).

El origen del género *Lycopersicon* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile, pero fue en México donde se domesticó, quizá porque crecía como mala hierba entre los huertos. Durante el siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños e incluso colores. En algunos países europeos como Alemania solo se utilizaba en farmacias y, así se mantuvieron hasta comienzos del siglo XIX. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio, África, países asiáticos, Estados Unidos y Canadá (Phillips, 2003; Rick, 1986).

En la región andina del Perú se encuentra, a lo largo y ancho, numerosos parientes silvestres y cultivados del tomate; también en Ecuador y Bolivia, así como en las islas Galápagos. Esos parientes silvestres del tomate, ocupan diversas condiciones ambientales basadas en latitud y altitud y representan un amplio grupo de genes para el mejoramiento de la especie (Alcazar, 1991).

Rick (1990), dice que son muchos los aspectos poco claros con respecto al origen y la domesticación del tomate cultivado. Sin embargo hay un punto con un grado razonable de certeza como es el hecho de que el tomate cultivado tuvo su origen en el Nuevo Mundo; No era conocido en Europa ni en el resto del Viejo Mundo antes del descubrimiento de América. Sin embargo, el cultivo y domesticación del tomate, al parecer ocurrió fuera de su centro de origen, y fue realizado por los primeros pobladores de México.

El tomate cultivado ahora es común en Perú; sin embargo, éste es usado principalmente como alimento por la población no indígena, donde es cultivado por los nativos y de reciente adición a su dieta. Pasa lo contrario en México, donde es ampliamente usado por estos, y en donde la gran diversidad de cultivares es evidente (Pérez, *et al.*, 1997).

Esta hortaliza fue traída del viejo mundo por los primeros colonizadores a Norteamérica en 1710, pero no fue ampliamente aceptada por la persistencia de la creencia de que los frutos eran venenosos. Fue hasta 1830 que el tomate empieza a adquirir la popularidad que lo ha hecho un alimento muy consumido hasta nuestros días (Tigchelaar, 1986).

Posteriormente los colonizadores europeos lo llevaron a Europa a mediados del siglo XVI donde fue aceptado y empleado para sazonar y condimentar platillos, especialmente carnes. Y fue hasta el siglo XVII cuando el tomate mexicano fue conocido y consumido en todo el mundo, aclimatándose a casi todos los países, siendo en este siglo aceptado como fruto comestible. (Valadez, 1996).

Clasificación taxonómica del tomate.

Según el autor anterior el cultivo del tomate se clasifica de la siguiente forma:

Familia: Solanaceae

Género: *Lycopersicon*

Especie: *esculentum*

Nombre común: Tomate o Jitomate.

Lycopersicon esculentum se clasificó en cinco variedades botánicas:

- Var. *commune*: Tomate común
- Var. *grandifolium*: Tomate hoja de papa
- Var. *validium*: Tomate arbusto o erecto
- Var. *cerasiforme*: Tomate cherry
- Var. *pyriforme*: Tomate pera.

Cuadro 1. División del género *Lycopersicon*, nombre del tomate, su equivalente y su distribución (Peralta, 2000).

No.	Nombre del tomate	<i>Lycopersicon</i> (equivalente)	Distribución
1	<i>Solanum juglandifolium</i> Dunal	<i>Lycopersicon juglandifolium</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	De las partes forestales del centro de Colombia (cordillera central y occidente) a Perú; 1900-4100 m.
2	<i>Solanum ochranthum</i> Dunal	<i>Lycopersicon ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Se encuentra en las orillas de los caminos en los bosques del Noreste de Colombia hasta el sur de Ecuador; 1200-3100 m
3	<i>Solanum sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>Lycopersicon sitiens</i> (I.M. Johnst.) J.M.H. Shaw	Se encuentra en las laderas rocosas del oeste andino hasta el norte de Chile; 2350-3500 m.
4	<i>Solanum lycopersicoides</i> Dunal	<i>Lycopersicon lycopersicoides</i> (Dunal in DC.) A. Child ex J.M.H. Shaw	Laderas rocosas del sur de Perú al norte de Chile; 2900-3600 m
5	<i>Solanum pennellii</i> Correll	<i>Lycopersicon pennellii</i> (Correll) D'Arcy	Desde el norte de Perú hasta el Norte de Chile; 3000 m.
6	<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp y D.M Spooner	<i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal	Desde el occidente del Ecuador hasta la parte central de Perú; 500-2500 m
7	<i>Solanum peruvianum</i> descrito por Peralta (4 razas geográficas: humifusum, lomas, Marathon, Chotano-Yamaluc)	Part of <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller (incl. var.humifusum y raza Marathon)	Al norte de Perú; 100-2500 m.
8	<i>Solanum "Callejón de Huaylas"</i> descrito por Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	En las costas rocosas del callejón de Huaylas hasta el río santa de Perú; 1700-3000 m
9	<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle	Del sur de Perú hasta el Sur de Ecuador; 1950-2600 m.
10	<i>Solanum chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle	Desde el sur de Perú hasta el Norte de Bolivia; 2300-2880 m
11	<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr. (1 raza geográfica: Misti nr. Arequipa)	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; también conocido como <i>Lycopersicon glandulosum</i> C.F. Mull.	Desde el oeste de los Andes (casi Lima) hasta el sur de Perú; 1000-3000 m.
12	<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Desde el centro de Perú hasta el norte de Chile; 600 m.
13	<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal	Desde el norte de Perú hasta el norte de Chile; 20 m.
14	<i>Solanum cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Desde las islas Galapagos hasta Ecuador; 500 m.
15	<i>Solanum galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley (previamente conocido como la var. <i>minor</i>)	Originario de las islas Galápagos.
16	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	Distribuido en casi toda latinoamerica
17	<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Nativo de las costas de Ecuador hasta el centro de Chile; 0-500 m.

Marchitez del tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Los marchitamientos vasculares en general, son enfermedades que se encuentran ampliamente distribuidas y son muy destructivas, espectaculares y alarmantes, ya que se manifiestan en un marchitamiento más o menos rápido, empardecimiento y muerte de hojas y tallos suculentos de algunas plantas, lo cual da como resultado la muerte de estas últimas. Los marchitamientos se deben a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de las plantas. En pocas semanas el patógeno puede ocasionar la muerte de plantas completas o de sus órganos que se localizan por arriba del punto de invasión vascular en la mayoría de las plantas (Romero, 1993).

La enfermedad puede ocasionar pérdidas considerables, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables. A veces campos enteros de tomate son destruidos o severamente dañados antes de que puedan ser cosechados. Sin embargo la enfermedad no ocasiona pérdidas considerables, a menos que la temperatura del suelo y del aire sean muy favorables (Garcés *et al.*, 2001).

Generalmente en las plantas de tomate infectadas, el patógeno continúa propagándose internamente en forma de micelio o conidios a través de los vasos xilémicos hasta que muere toda la planta. Mientras que la planta infectada continúe viviendo, el hongo que produce los marchitamientos vasculares se limita a los tejidos vasculares del xilema y a algunas células circunvecinas y nunca sale a la superficie de la planta. Tampoco produce esporas y sólo cuando la enfermedad ocasiona la muerte de la planta, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula en la planta muerta o sobre la superficie de esta (Agrios, 2004).

Sintomatología.

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan como una ligera decoloración de las nervaduras en las hojas jóvenes, después de lo cual ocurre la epinastia de las demás hojas debido al debilitamiento de los pecíolos. Cuando las plantas se infectan en la etapa de plántula, es

frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno. En tanto la planta se encuentre viva, no aparecen sobre su superficie micelio o cuerpos fructíferos del hongo. Los frutos que ocasionalmente son infectados se pudren y desprenden sin que aparezcan manchas en ellos. Las raíces también son infectadas y después de un período inicial de achaparramiento se pudren las raíces laterales más pequeñas. En cortes transversales del tallo, cerca de la base de la planta infectada, se puede observar un anillo de color café en el área de los haces vasculares, y el avance de la decoloración hacia la parte superior de la planta depende de la severidad de la enfermedad (Fernández, 2001).

Patógeno.

El micelio de este hongo es incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y, bajo ciertas condiciones, adquiere una tonalidad rosa pálido o algo púrpura. Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales. Microconidias, que tienen una o dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Son las esporas que el hongo forma con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado. Las macroconidias, son las esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas con 3 a 5 células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y comúnmente se forman en grupos similares a los esporodocios. El último tipo de esporas son las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo. Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo y en el suelo, sin embargo, solo las clamidosporas sobreviven en este último sustrato durante más tiempo (Garcés *et al.*, 2001).

El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas frías. Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez que un área ha sido infectada se mantenga así por tiempo indefinido (Agrios, 2004).

Cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, los tubos germinales de las esporas o el micelio penetran directamente en las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y es así como llega a los vasos xilémicos. Se mantienen entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido acrópeta, hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidias que son desprendidas y llevadas hacia la parte superior de la planta en el torrente de savia. Estas germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidias en el siguiente vaso (Fernández, 2001).

La combinación de la obstrucción de los vasos por el micelio, esporas, geles, gomas y tilosis, con la presión que ejerce la proliferación de células parenquimatosas adyacentes se debe a la alteración del agua de las plantas infectadas. Cuando el volumen de agua disponible para las hojas es inferior al mínimo requerido para su funcionamiento, los estomas se cierran, las hojas se marchitan y mueren y, como consecuencia, muere el resto de la planta. El hongo invade entonces en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente. Las esporas son diseminadas hacia nuevas

plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores (Romero, 1993).

El uso de variedades resistentes es el único método práctico para controlar la enfermedad en el campo. En la actualidad se dispone de variedades con resistencia vertical. El hongo se encuentra tan ampliamente distribuido y es tan persistente en los suelos que la rotación de cultivos y la esterilización (se entiende que esta, la esterilización tiene poco valor porque su efecto solo dura un año) en invernaderos, aun cuando son métodos seguros, tienen poco valor. La esterilización del suelo es demasiado costosa para que se lleve a efecto en el campo, pero siempre debe practicarse en el caso de plantas en invernadero. El uso de semilla sana y de transplantes es necesario y el tratamiento con agua caliente de las posibles semillas infectadas debe efectuarse antes de sembrarse (Garcés *et al.*, 2001).

Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Fusarium oxysporum es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, denominado *forma especial* (f. sp.), según la planta hospedante u hospedantes relacionados que afecte. Es posible distinguir patotipos o razas fisiológicas de una misma forma especial, cuando se determina mediante variedades diferenciales a las razas (Garcés *et al.*, 2001).

Se sabe que los patógenos están constituidos por razas fisiológicas y que éstas pueden aparecer después de la introducción de nuevos cultivares resistentes, como es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agrios, 2004).

La marchitez por *Fusarium* en tomate, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, es una enfermedad devastadora en regiones tomateras de importancia mundial y se ha observado en por lo menos 32 países. Tres razas de Fol se han reportado; se distinguen por su virulencia hacia materiales diferenciales de tomate que llevan los correspondientes genes para resistencia. La raza 1 se describió inicialmente en 1886 y la raza

2 se reportó primero en 1945 en Ohio. La raza 3 se observó primero en Australia en 1978 (Booth, 1971) y posteriormente en varios estados de la Unión Americana, California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee (Chellemi *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1998 y Bost, 2001). También se ha encontrado en México (Valenzuela *et al.*, 1996). Actualmente, existen varios cultivares comercial con resistencia a la raza 3 (Cai *et al.*, 2003). Sin embargo, estos han sido obtenidos en otros países con características y condiciones de cultivo diferentes a las utilizadas en México.

Marcadores moleculares para determinar variabilidad.

El modelo fenotípico básico indica que las características de una planta son resultado de la suma de los efectos del genotipo, del ambiente y de la interacción entre ambos. De estos componentes solo el efecto del genotipo (valor aditivo) es heredable. El mejoramiento o avance que se puede tener al seleccionar plantas superiores dentro de una población con variabilidad genética, depende en buena medida de la correspondencia que exista entre el fenotipo y el genotipo. La selección basada directamente en las características del ADN es una idea atractiva, ya que permite maximizar esta correspondencia, evitando el efecto distorsionante que causa el ambiente sobre el fenotipo de una planta (Dreher *et al.*, 2000).

Adicionalmente, cuando se está interesado en caracteres donde la selección visual es difícil o imposible de realizar, como es el caso de proyectos de mejoramiento que involucran varios genes, genes recesivos, expresión tardía del carácter de interés, requerimientos especiales en cuanto a las condiciones de selección, o el costo es elevado para la cuantificación del carácter, el uso de marcadores moleculares puede significar un ahorro considerable de recursos (Nuez y Carrillo, 2000).

Además de apoyar el proceso de selección, los marcadores moleculares se están utilizando para ordenar, caracterizar y aprovechar la variabilidad genética que se utiliza en el mejoramiento genético, de esta manera se pueden conformar colecciones de germoplasma que resguarden la diversidad genética de las especies. Adicionalmente, las “huellas

moleculares” de las variedades se están utilizando para pronosticar cuáles cruzas producirán híbridos sobresalientes (Becerra y Paredes, 2000).

El descubrimiento de nuevas técnicas moleculares ha facilitado el análisis genético de caracteres de interés agronómico y la selección asistida por marcadores moleculares. Un argumento frecuentemente utilizado en contra de la selección asistida por marcadores es que el mejoramiento de caracteres de herencia simple no necesita de marcadores para selección si los fenotipos son fácilmente identificables. Si bien esto es correcto, en estos casos, la utilización de marcadores en un programa de mejoramiento puede aportar una ventaja muy importante basada en su naturaleza molecular y es que la selección se independiza del fenotipo y el ambiente. Estas características permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un fondo genético, proceso también denominado piramidación o apilamiento de genes (INTA, 2004).

En los últimos años ha habido un aumento en la disponibilidad de marcadores genéticos para estudios de variabilidad genética. Algunos de ellos tienen diferentes bases moleculares, pero todos están enfocados a determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones naturales y cultivadas. Además, ellos muestran la similitud entre y dentro de las poblaciones, evitando el efecto ambiental. Conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de genotipos superiores y complementación con datos fenotípicos y agronómicos, para el desarrollo de una población mejorada (Dreher *et al.*, 2000).

El uso de marcadores acelera los programas de mejoramiento genético, en el sentido que, los marcadores pueden suplantar los tradicionales marcadores morfológicos o fenotípicos, en especial cuando la expresión de esta característica es ambientalmente inestable o difícil de observar. Asimismo, los marcadores moleculares también pueden ser

utilizados en la identificación de grupos de genes o loci de caracteres cuantitativos (QTLs) que puedan proporcionar resistencia horizontal a enfermedades y colaborar con la búsqueda y selección de nuevas variedades con características comercialmente deseadas (Xiangning *et al.*, 1997).

Tipos de Marcadores moleculares más utilizados.

Entre los marcadores más utilizados están los microsatélites, también llamados SSRs (Simple Sequence Repeats), los cuales son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 nucleótidos repetidos cierto número de veces y se encuentran en todos los genomas eucariontes. Los altos índices de heterocigosidad, su naturaleza codominante y ser una técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) hace de los microsatélites uno de los marcadores más escogidos para los programas de selección asistida por marcadores (MAS) y para los estudios de mapeo genético y de diversidad (Nuez y Carrillo, 2000).

Los genes de resistencia a enfermedades han sido estudiados ampliamente en especies como *Arabidopsis thaliana*, tomate, papa, lechuga, tabaco, etc. En numerosos casos se ha observado que los genes responsables de la resistencia específica a patógenos, son genes simples dominantes, cuyos productos actúan como receptores en interacciones específicas planta- patógeno (Davies, 2000).

La biotecnología, a través de la caracterización molecular, se puede utilizar para proveer una identificación más rápida y exacta de patógenos y otros organismos. En fitopatología, el concepto de diagnóstico se refiere a la identificación de un agente que está causando una enfermedad. Sin embargo, en muchos casos se desea saber si el agente está presente, sin importar si la planta exhibe o no los síntomas. En este caso es mejor referirse a métodos de detección, más que a métodos de diagnóstico. Los métodos basados en las propiedades del patógeno usan propiedades tales como: su forma y dimensiones; tipo, número y masa molecular de sus ácidos nucleicos y proteínas; estructura terciaria y la presencia de sitios antigénicos

específicos; entre otros. Los procedimientos basados en las propiedades del patógeno, generalmente pueden ser automatizados, por lo que son muy convenientes para realizar programas de detección a gran escala (Qaim, 1998).

El uso de la biotecnología y específicamente el de RAPDs (Polimorfismos amplificados aleatoriamente), ha permitido en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) encontrar genes de resistencia a la roya, causada por el hongo *Uromyces appendiculatus*. Estos genes de resistencia pueden ser usados en programas de mejoramiento y así ayudar al desarrollo de cultivares de frijol resistentes a esta enfermedad. En este trabajo se hicieron cruzamientos con doscientos catorce individuos F₂ del cultivar Ouro el Negro (resistente) y US Pinto111 (susceptible), inoculados con una mezcla de ocho razas de *U. appendiculatus*. La proporción de segregación que se obtuvo indicó que la resistencia es monogénica y dominante (Gelape *et al*, 2000).

Por otro lado, el uso de Loci para Caracteres Cuantitativos (QTLs) ha permitido encontrar genes (R) dominantes para resistencia a virus, nemátodos y hongos, y han sido colocados 14 de estos sobre el mapa molecular de la papa usando marcadores de ADN. Estos se localizaron en cinco puntos diferentes. El loci de características cuantitativas (QTL) para resistencia para el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, la pudrición del tubérculo causada por la bacteria *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*, y el nematodo de la raíz, han sido identificados en los 12 cromosomas de la papa. Estos QTL están vinculados uno al otro y/o en puntos específicos. Basado en el agrupamiento genético de genes R, y se propuso que algún QTL para la resistencia tiene base molecular similar a los genes simples R. El mapeo de genes de papa con secuencias similares para los genes R clonados de otras plantas y otros genes relacionados revela el ligamento entre genes R, y QTL para resistencia (Gebhardt, 2001).

La transformación de genes ha permitido la síntesis de enzimas líticas provenientes de virus, insectos y bacterias. En particular la expresión del gen

de la lisozima de fago T4 en papa, reduce el daño causado por *Erwinia carotovora*. Asimismo, se ha observado que plantas de papa transformadas con genes codificantes de cercopinas que reducen el daño causado por *Erwinia carotovora* y *Phytophthora infestans*. En la actualidad se está intentando utilizar genes responsables de la síntesis de proteínas antifúngales provenientes de diversas fuentes, para reducir el daño causado por hongos (Michelmore, 1995).

Mejoramiento genético para resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

El género *Lycopersicon* es uno de los más estudiados genéticamente, solamente superado por maíz. Al respecto en el año de 1979 ya se tenían reportados más de 970 genes de resistencia a varias enfermedades; por otra parte, desde 1971 se formó la Corporativa de Genética del Tomate en la Universidad de California en Davis, EUA, a través de la cual se han obtenido avances en el mejoramiento de la resistencia a factores adversos de esta especie. Esta organización publicó trabajos relacionados a la genética de tomate, la formación de nuevos cultivares, así como el hallazgo de nuevos genes (Pérez *et al.*, 1997).

Los esfuerzos por describir la resistencia del tomate para la mayoría de sus patógenos, así como los tipos de herencia asociados a la misma, se iniciaron a comienzos de los años 40 con la intención de proteger y explotar la variabilidad de la resistencia a enfermedades dentro de los parientes silvestres del tomate; como es el caso de McGrath *et al.*, (1987) donde encontraron en *Lycopersicon pennelli* resistencia a la raza 1 y 2, sin embargo no a la raza 3. En el 2000 se hicieron trabajos en Brasil, donde buscaron materiales resistentes a la raza 2 de Fol, encontrando como materiales resistentes las variedades comerciales Río grande, H. seculus, H. Fundador y H. SM-16 (Domingos *et al.*, 2000). En este sentido, se ha definido la existencia de genes dominantes que confieran resistencia específica a varias de las principales enfermedades de esta hortaliza, por lo que se han incorporado a los cultivares e híbridos F₁ para conferirles resistencia (Alexander, 1963).

El mejoramiento del tomate cultivado con germoplasma silvestre empezó en los años treinta. La resistencia a enfermedades ha sido enfatizada empezando con resistencia a la marchites por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 reportado en 1940 por Bohn y Tacker, encontrando en *L. hirsutum*. Ellos encontraron también resistencia en PI179532 de *Lycopersicon pimpinellifolium* a la misma raza; esta resistencia era condicionada por un gen dominante simple. La raza 2 es virulenta en cultivares que son resistentes a la raza 1. La resistencia en ambas razas (1 y 2) fue identificada en PI126915 de *L. pimpinellifolium*.

La línea BHRS 2-3 de *L. esculentum* Mill es resistente a la raza 1 y 2 y se presume que también tiene resistencia a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Esta línea se desarrolló en la Estación de Investigación de Horticultura en Queensland, Australia y se liberó en 1987. La línea BHRS 2-3 fue derivada de retrocruzas de *L. pennelli* (PI 414773), la fuente de resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a la raza 3 está determinada por un gen dominante simple 1-3, confiriendo resistencia a la raza 3, y raza 2 es controlada por el gene 1-2 (McGrath, 1988).

Métodos de mejoramiento genético más utilizados para introducir resistencia a enfermedades en tomate.

Pérez *et al.*, (1997), consideran los métodos de Pedigrí, retrocruza, e hibridación, como los más usados en el mejoramiento de plantas; siendo la hibridación y la selección por pedigrí los comúnmente usados en tomate. La formación de cruza ha sido el método de opción para la transferencia de genes. En ciertas situaciones, una combinación de la selección por pedigrí y de hibridación ha sido útil para explotar las ventajas de cada método.

La retrocruza es un método ampliamente utilizado en los programas de mejoramiento, que es apropiado cuando existen variedades con buenas características agronómicas y estas se encuentren disponibles para ser incorporadas a otras variedades. Para tener éxito, estas características deberán estar presentes en progenitores compatibles, además de tener una

alta heredabilidad. Esta aplicación es útil para transferir genes de resistencia a enfermedades atribuida al uno o unos pocos genes mayores (Bailey, 1999).

La hibridación interespecífica del género *Lycopersicon* se ha utilizado principalmente entre las especies *L. esculentum* y *L. pimpinellifolium* ya que no presentan barreras para el intercambio de genes, ni para la producción de descendencia. Entre estas especies los genes se intercambian muy fácilmente, por lo que muchos investigadores llegan a considerar la especie *L. pimpinellifolium* como variedad de *L. esculentum*. La importancia de este híbrido interespecífico se debe a la transferencia de caracteres deseados de resistencia a enfermedades de *L. pimpinellifolium* a variedades hortícolas de *L. esculentum* (Pérez, *et al.*, 1997).

Fuentes de resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Un problema serio que puede existir en el uso de materiales silvestres de la misma o de diferente especie, en los programas de mejoramiento, es la presencia de barreras genéticas de incompatibilidad que pueden impedir hacer cruzamientos exitosos con las especies cultivada; por otro lado, al romper la barrera se puede presentar características indeseables que deben eliminarse en un programa de retrocruza a largo plazo. La mayor parte de la resistencia a enfermedades en tomate cultivado se deriva de especies silvestres (Rendón, 1996). Para Pérez, *et al.*, (1997), todas las variedades e híbridos para consumo fresco de mayor demanda, tienen resistencia a las razas 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Para el caso de la resistencia a la raza 3 de Fol, actualmente está incorporada en muy pocas variedades utilizadas en México. En el estado de Morelos se evaluaron fuentes de resistencia provenientes de Taiwán que habían sido colectadas en México. El tipo de resistencia es horizontal ya que aparentemente es de origen poligénico; de estos materiales se obtuvieron selecciones, y se inició un programa de mejoramiento en El Bajío (Oyervides, 1990). Resistencia reportada de *L. hirsutum* var. *ceraciforme*, se

ha introducido a través de retrocruzas para mejorar la calidad y tamaño del fruto sin perder resistencia a la enfermedad (Rendón, 1996).

Tipos de herencia para resistencia a patógenos.

Para determinar el tipo de herencia de la resistencia a una enfermedad, se requiere considerar variables que pueden tener una distribución continua como sería el caso de la resistencia horizontal o una distribución discreta como es el caso de la resistencia vertical. Las características continuas son llamadas también variables cuantitativas, las cuales tienen un amplio rango de variación, la que puede representarse a través de la curva de Gauss; por ejemplo, en flores, el color rosado puede mostrar todos los grados y tonos de diferencia entre el máximo, rojo puro, y el mínimo, blanco puro (Alexander, 1963). Razón por la cual ha sido necesario implementar para su evaluación, escalas continuas de medida. Estas variables presentan una distribución normal y regularmente son analizadas con herramientas genético estadísticas, como el diseño de cruzas dialélicas (Griffing, 1956) y el uso de medias generacionales (Hayman y Mather 1955; Hayman, 1958).

Por otro lado, las variables cualitativas son aquellas que no presentan una variación continua, ya que su respuesta se puede clasificar en categorías y/o atributos, por lo que solo pueden ser nominales u ordinales (Falconer, 2001). Los caracteres que varían cualitativamente, pueden estar presentes o ausentes, es decir, no presentan variaciones intermedias; así, el carácter “negro”, en las semillas está presente o no; y un fríjol, por ejemplo, sería blanco o negro; de ninguna forma habría semillas grises. La importancia de esto es que postulan la existencia de unidades discretas de herencia, y predicen con éxito la proporción de la descendencia que mostrará o no un carácter cualitativo (McDonald *et al.*, 1996). Cada una de esas unidades discretas se llamó gen o gene. El cromosoma tiene una sola copia de cada gene llamada alelo (Robinson, 1987).

Tipos de pruebas estadísticas para analizar variables discretas.

Para poder analizar variables discretas, existe la estadística no paramétrica entre las que se encuentran las pruebas de Ji cuadrada (χ^2) y de G . En ambos casos, los datos observados se comparan con los esperados, por lo que ambas calculan una expectativa teórica. La prueba G es un cociente de verosimilitud o prueba estadística de máxima verosimilitud, la cual también se conoce como prueba logarítmica de verosimilitud o prueba del cociente de verosimilitud, cuyo uso se ha venido extendiendo en situaciones en donde la prueba de χ^2 ha sido recomendada (Sokal y Rohlf, 1995). La bondad de ajuste e independencia de las tablas de contingencia de la prueba de χ^2 , son de hecho una aproximación a los cocientes del logaritmo de verosimilitud en los cuales está basada la prueba G . Sin embargo, la aproximación a la distribución teórica es mejor en la prueba G en comparación con la de χ^2 (Dunning, 1993 y McDonald *et al.*, 1996).

Metodología de la Prueba G .

La prueba estadística es calculada obteniendo un número observado (O), dividiéndolo entre el número esperado (E), para posteriormente calcular el logaritmo natural (\ln) de dicho cociente. El logaritmo natural de 1 es 0; si el número observado es mayor que el esperado, el $\ln(O/E)$ es positivo, mientras que si O es menor que E , $\ln(O/E)$ es negativo. Cada logaritmo es multiplicado por el número observado, posteriormente estos productos son sumados y multiplicados por dos. La prueba estadística es normalmente denominada prueba G , aunque a veces también es llamada una prueba logarítmica de verosimilitud o prueba del cociente de verosimilitud (Sokal y Rohlf, 1995). La fórmula es:

$$G = 2 * \sum(O * \ln(O/E))$$

III MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo del patógeno. Con el propósito de obtener una muestra representativa de los genes que condicionan la virulencia en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, hacia los genes para resistencia que llevan las variedades comerciales actualmente cultivadas, se visitaron diferentes lotes productores de tomate de la región tomatera de Culiacán, Sinaloa, para coleccionar plantas de tomate con los síntomas característicos de marchitez por *Fusarium*. Los lotes visitados fueron: Teresita, El Ranchito, Santa Helena y Casa Blanca, en los que se coleccionaron el 24 de marzo de 2003, en las variedades comerciales Floradade, H9478, Toro, Roma, Río grande y Valerie, (todos los materiales utilizados son resistentes a raza 2 y sólo Río grande y Toro a raza 2 y 3, con un nivel de incidencia de la enfermedad del 5% en todos los materiales evaluados); de los cuales se coleccionaron 102 muestras de tallos con los síntomas de la enfermedad (17 muestras por variedad) los cuales se colocaron en bolsas de plástico previamente identificadas y se transportaron en una hielera al laboratorio de Patosistemas Agrícolas del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Aislamiento, purificación y mantenimiento de los cultivos fúngicos. En el mes de mayo de 2003 se procedió a aislar, purificar, identificar morfológicamente (Barnet y Hunter, 1972) y mantener el hongo de Fol; esto se realizó haciendo cortes longitudinales de tallos con síntomas. Se tomaron porciones de tejido de aproximadamente 3 mm, los cuales se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las porciones del tejido se sembraron en PDA (Papa-dextrosa-agar) en cajas petri y se incubaron a 25° C durante 7 días; después se realizó una transferencia para obtener cultivos puros del hongo, los cuales se incrementaron para tener inóculo suficiente para los estudios posteriores.

Identificación de variabilidad genética de Fol por medios convencionales.

Siembra de cultivares diferenciales: Los genotipos que se utilizaron como cultivares diferenciales fueron Bonny Best, Manapal, Walter e I₃R₃ (sin genes de resistencia, resistente a raza 1, resistente a raza 2 y resistente a raza 3, respectivamente), los cuales fueron proporcionados por Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis. Estos materiales se sembraron el 15 mayo de 2004 en charolas de poliestireno de 200 cavidades conteniendo una mezcla de peat moss y suelo estéril, las cuales se regaron y fertilizaron de acuerdo a las recomendaciones técnicas del INIFAP (2005). Con la finalidad de asegurar las alo y autoinfecciones es conveniente aclarar que no se aplicó ningún producto químico para el control de Fol.

Inoculación de los cultivares diferenciales: Las plantas de los cultivares diferenciales, con un desarrollo de 15-25 días después de la siembra, se inocularon con una suspensión conidial de Fol de 10^7 ml l⁻¹ de cada una de los aislamientos con el propósito de inducir la enfermedad artificialmente, inoculando 4 plantas de cada material diferencial por cepa evaluada. De los 102 aislamientos que se trajeron de campo, se obtuvieron 29 cepas por sus diferencias morfológicas (color de cepa, textura del micelio y tipo de crecimiento, entre otros). Esta inoculación se hizo a través de la inmersión de raíces a las cuales previamente se les hicieron pequeñas heridas con una aguja hipodérmica. Inmediatamente se transplantaron en recipientes de unicel de ½ litro con suelo previamente desinfectado, depositando planta por recipiente. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de riego durante todo el período de evaluación, en condiciones de invernadero, con una temperatura ambiente aproximada de 25 ± 1 ° C y para la toma de datos se utilizaron 4 repeticiones de una planta en cada material.

Identificación de variabilidad genética de Fol por medios moleculares.

Extracción de ADN: Se realizó usando la técnica descrita por Bainbridge *et al.* (1990), la cual consistió en pesar 0.1 g de material, se pone la muestra en nitrógeno líquido por 10 min. y se macera; se agrega 1 ml de buffer de extracción bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), más 20 µl de albúmina sérica bovina al 20%. Se mezclan todos los compuestos, luego se sumerge por 20 min. en baño maría a 55 por 3° C. Se centrifuga la muestra 12000 rpm por 5 min. Se extrae el sobrenadante con una micropipeta, a este se le agrega un volumen 24:1 de cloroformo–alcohol isoamílico, se mezcla por 2 min. y se centrifuga a 12000 rpm por 10 min. La fase acuosa se le agrega 50 µl de acetato de amonio al 7.5 M y 800 µl de etanol frío al 96%. Se mezcla y se coloca en un congelador a -17° C por 60 min. Se vuelve a centrifugar a 12000 rpm. por 5 min. y se elimina el sobrenadante. Se lava la pastilla con etanol al 70% (v/v) y el ADN resultante se suspende en 80 µl de NaOH.

Determinación de la Integridad del ADN: Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observó en un transiluminador UV (TFX-40M) para observar la integridad del mismo.

Amplificación de oligonucleotidos de Fol mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Con el ADN extraído, se realizó la técnica de PCR, la cual consistió en mezclar los reactivos necesarios para la reacción en el orden y las cantidades siguientes: 14.5 µl de agua destilada, desionizada y estéril; 2.5 µl de buffer de reacción 10X; 1 µl de solución de cloruro de magnesio; 0.5 µl de dNTP's; 2 µl de cada primer o iniciador, las cuales fueron: IGSF 5' CTG AAC GCC TCT AAG TCA G 3' e IGSR 5' AAT GAG CGA TTC GCA GTT TC 3' y 0.5 µl de la enzima taq polimerasa, y 5 µl del ADN extraído. El programa de amplificación usado fue: Un ciclo de 94° C por 4 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94 ° C, 1 minuto a 54° C y un minuto a 72° C; un ciclo de 72° C por 5 minutos; y por último un período de enfriamiento a 4° C, esperando una banda de 3000 pb.

Visualización de los productos amplificados de PCR: La amplificación del fragmento de ADN se visualizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, observando la banda en un transiluminador UV (TFX-40M).

PCR-RFLP's: El ADN amplificado por PCR fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI, DraI, SraI e Hinf. Usando la siguiente Metodología: En un tubo eppendorf se agregaron 15.5 µl de agua destilada desionizada estéril, 2 µl del buffer, 1.0 µl de albúmina sérica bovina, 0.5 µl de la enzima de restricción y 1.0 µl de ADN amplificado. Posteriormente se mezclan todos estos reactivos y los tubos se incuban a 37° C. Los fragmentos obtenidos se separan en un gel de agarosa al 2.5%. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó la fotografía. Se incluyó un marcador molecular de 1000 bp (Ladder Invitrogen) para estimar el tamaño de los fragmentos cortados.

Evaluación de variabilidad genética por medios convencionales y moleculares. La Identificación de razas de Fol de forma convencional, se realizó induciendo artificialmente la enfermedad en condiciones de invernadero, observando y registrando la respuesta de las plantas 30 días después de la inoculación; la evaluación se basó en la respuesta típica de resistencia vertical a través de la observación de síntomas (plantas sanas o enfermas), con lo que se lograron detectar las razas presentes en los lotes comerciales donde se realizó el muestreo (Ochoa y Danial, 1999). En el caso de la metodología por medios moleculares se hizo un análisis estadístico; con los fragmentos amplificados se elaboró una matriz de disimilaridad genética por apareamiento simple, asignando el dígito 1 para el fragmento presente y 0 para el ausente. El análisis fenético se realizó con el programa de análisis multivariado de taxonomía numérica (NTSYS-pc versión 2.3). La matriz de similitud se calculó con el coeficiente DICE (Luna, *et al.*, 2004).

Respuesta de diferentes cultivares y especies de *Lycopersicon* a la inoculación con las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) identificadas. Con el propósito de identificar algunas posibles fuentes de resistencia a las razas identificadas, se utilizaron 48 diferentes introducciones entre cultivares comerciales obsoletos, cultivares criollos y especies del género *Lycopersicon* procedentes del Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis (Cuadro 2). Considerando que el objetivo era encontrar algunos materiales que pudieran ser resistentes a las razas de Fol identificadas, se descartaron 21 introducciones por su susceptibilidad a las tres razas y solo se continuó el estudio con 27 materiales. De estos, 17 eran diferentes cultivares, tanto criollos como mejorados de *L. esculentum* y 10 correspondían a otras especies del mismo género. Estas accesiones se sembraron el 30 de abril de 2004 en charolas de poliestireno con 200 cavidades conteniendo peat moss como sustrato, las cuales se regaron y se fertilizaron de acuerdo a las recomendaciones técnicas (INIFAP; 2005); así mismo se procedió de la misma forma que en la siembra y desarrollo de los materiales diferenciales para asegurar la alo y autoinfección por Fol, este experimento se estableció en el invernadero No. 5 de la UAAAN.

Inoculación. Se inocularon las plantas de cada uno de los 27 materiales a evaluar con cada una de las razas de Fol identificadas. La inoculación se realizó 30 días después de la siembra mediante la inmersión del sistema radical en la suspensión de esporas (10^7 mL^{-1}), para enseguida transplantar una planta por recipiente de ½ litro de capacidad conteniendo una mezcla de suelo estéril y peat moss, de las cuales se utilizaron 4 repeticiones por material. El riego, fertilización y control de insectos se hicieron de acuerdo a las recomendaciones técnicas (INIFAP, 2005). Los síntomas de marchitamiento se presentaron 30 días después de la inoculación. La evaluación de la respuesta a la inoculación se hizo nuevamente con base en la presencia o ausencia de la enfermedad a los 30 días.

Cuadro 2. Cultivares y especies de *Lycopersicon* evaluadas por su reacción a las razas colectadas en Culiacán Sinaloa de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*

Cultivares y especies	Clave PCRG-UC ¹	Color fruto	Origen
<i>L. esculentum</i> Miller cv. prim.	LA395 (B4L6501)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller .cv. prim.	LA113 (91L5355)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA473 (90L3543)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA477 (86L9441)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA404 (90L335)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA134 (90L3516)	Rojo	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA126 (90L3515)	Rojo	Ecuador
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA1251 (90L3575)	Rojo	Ecuador
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim	LA409 (90L3536)	Rojo	Ecuador
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA1021 (84L6594-1,2)	Rojo	
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim	LA146 (91L5356)	Rojo	México
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA468 (83L4649)	Rojo	Chile
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA466 (83L4-48)	Rojo	Chile
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. prim.	LA358 (90L3531)	Rojo	Colombia
<i>L. esculentum</i> Miller cv. prim.	LA172 (84L6491-4)	Amarillo	Bolivia
<i>L. esculentum</i> Miller cv. prim	LA1162 (89L2530)	Rojo	
<i>L. esculentum</i> Miller cv. prim.	LA147 (90L3518)	Rojo	Honduras
<i>L. esculentum</i> Millar cv. edkawi	LA2711 (86L9489)	Rojo	Egipto
<i>L. esculentum</i> Miller cv. Malintkalol	LA3120 (91L5342)	Rojo	
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. 204	LA3130 (91L5425)	Rojo	USA
<i>L. esculentum</i> Miller cv. Motelle	LA2823 (87L0382)	Rojo	
<i>L. esculentum</i> Miller cv. Saladette	LA2662 (88L1368)	Rojo	
<i>L. esculentum</i> Miller cv Nagcarlang	LA2661 (85L8310)	Rojo	
<i>L. peruvianum humifusum</i> (L.) Mill	LA 385 (78L488) ²	Verde	Perú
<i>L. peruvianum</i> Miller	LA111 (84L27104) ²	Verde	Perú
<i>L. peruvianum</i> Miller	LA462(79L4445-4449) ²	Verde	Chile
<i>L. peruvianum glandulosa</i> (L.) Mill	LA1292 (91L5792) ²	Verde	Chile
<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller	LA722 (86L29486)	Rojo	Perú
<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller	LA2184 (87L0413)	Rojo	Perú
<i>L. chmielewskii</i> Rick, Kesicki, Fobes, Holle	LA2663 (85L8673-8676) ²	Verde	Perú
<i>L. chmielewskii</i> Rick, Kesicki, Fobes, Holle	LA1306 (87L0617) ²	Verde	Perú
<i>L. chesmanii</i> f. <i>minor</i> (L.) Riley	LA317 (82L2446) ²	Rojo	Ecuador
<i>L. chesmanii</i> f. <i>minor</i> (L.) Riley	LA1401 (85L8098) ²	Rojo	Ecuador
<i>L. chesmanii</i> f. <i>tipicum</i> (L.) Riley	LA166 (82L2523) ²	Rojo	Ecuador
<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy	LA716(86L9637) ²	Verde	Perú
<i>L. pennellii</i> var. <i>puberuleum</i> (Correll) D'Arcy	LA1926 (88L1763) ²	Verde	Perú
<i>L. parviflorum</i> Rick, Kesicki, Fobes, Holle	LA1326 (81L572) ²	Verde	Perú
<i>L. esc.</i> Miller var. <i>cerasiforme</i> (Dunal) A. Gray	LA1673 (83L4805)	Rojo	Perú
<i>L. hirsutum</i> f. <i>glabratum</i> Mull.	LA1223 (86L9840) ²	Verde	Ecuador
<i>L. hirsutum</i> Dunal	LA1353 (85L9839) ²	Verde	Perú
<i>L. chilense</i> Dunal	LA1958 (89L2835) ²	Verde	Perú
<i>L. chilense</i> Dunal	LA1959 (89L2836) ²	Verde	Perú
<i>L. chilense</i> Dunal	LA1972 (91L5855) ²	Verde	Perú
<i>L. chilense</i> Dunal	LA1963 (85L1851) ²	Verde	Perú
<i>L. chilense</i> Dunal	LA1965 (8517) ²	Verde	Perú
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. Manapal		Rojo	USA
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. Walter		Rojo	USA
<i>L. esculentum</i> Miller. cv. I ₃ R ₃		Rojo	USA
<i>L. esculentum</i> Mill. cv. Bonnie Best		Rojo	USA

¹ Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis. ² Polinización controlada

Herencia de la Resistencia a la raza 3 de Fol.

Con base en la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad en los materiales evaluados, se hipotetizó que la resistencia debía estar controlada por genes mayores, por lo que para determinar su herencia consideró se cruzaron tres materiales resistentes y tres susceptibles a la raza 3 de Fol, como progenitores hembras y machos, respectivamente; lo anterior, con la finalidad de obtener las respectivas poblaciones segregantes F_2 que se utilizaron en este estudio. Los materiales genéticos empleados fueron: *Lycopersicon esculentum* cv. motelle LA.2823 (87L0382) se cruzó con *Lycopersicon esculentum* cv. prim LA.473 (90L3543); *Lycopersicon peruvianum* LA. 462 (79L4445-4449) con *Lycopersicon esculentum* cv. prim. LA.1162 (89L2530) y *Lycopersicon pimpinellifolium* LA.2184 (87L0413) con *Lycopersicon esculentum* cv. prim. LA.34C (90L3516); los cuales serán denominados como: a, b, c, d, e y f, respectivamente. Las generaciones F_1 y F_2 se obtuvieron cruzando los materiales resistentes por los materiales susceptibles y autofecundando las plantas F_1 para obtener las correspondientes semillas F_2 respectivamente.

Inoculación de las generaciones F_2 . Una vez obtenidas las semillas F_2 de las cruas de los materiales resistentes por susceptibles a la raza 3, se sembraron simultáneamente con las semillas de la generación F_1 de los mismos cruzamientos. Las plantas así obtenidas, se inocularon a los 20 días después de la siembra, utilizando una suspensión conidial de la raza 3 de Fol con una concentración de 10^7 ml l^{-1} , en la cual se realizó una inmersión de raíces, las que previamente se les hicieron pequeñas heridas con una aguja hipodérmica. Inmediatamente se transplantaron en recipientes de uniel de $\frac{1}{2}$ litro con suelo desinfectado. En este procedimiento se emplearon en 100 plantas de cada uno de los materiales, las cuales se mantuvieron bajo condiciones de riego durante el experimento. La temperatura ambiente del invernadero fue de $25 \pm 1^\circ$ C. La respuesta a la inoculación se hizo a los 30 días después de la inoculación. El manejo estadístico de los resultados se hizo a través de la prueba G , con la cual se uso un valor observado (O), dividiéndolo entre uno esperado (E), para posteriormente calcular el logaritmo natural (ln) de dicho cociente. Cada

logaritmo es multiplicado por el número observado, posteriormente estos productos son sumados y multiplicados por dos. Para determinar la estadística de la prueba G se empleó el software propuesto por (McDonald *et al.*, 1996).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variabilidad genética mediante cultivares diferenciales.

Al observar la respuesta de los materiales diferenciales a la inoculación con los aislamientos de Fol colectados, se detectó la presencia de las tres razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en los lotes muestreados en Culiacán, Sinaloa (Cuadro 3). De todos los aislamientos obtenidos, el 24 % corresponde a la raza 1, 14% a la raza 2 y 62% a la raza 3. Fuentes (1969) estudiando la incidencia de la marchitez por *Fusarium* en los campos productores de tomate en Culiacán, Sinaloa, encontró que el hongo causante de la enfermedad estaba ampliamente distribuido. En 1972 se describe la presencia de solo las razas 1 y 2 en la misma región, siendo la variedad Walter resistente a la raza 2 y por consiguiente la más ampliamente cultivada (Ramírez y Galindo 1972). Las proporciones de las tres razas encontradas probablemente es debida a que en la actualidad existe una mayor disponibilidad de variedades resistentes a las razas 1 y 2; las cuales evolutivamente aparecieron primero que la raza 3. En cuanto a las variedades resistentes a la raza 3 que hay comercialmente, se deduce que como están creciendo las poblaciones del patógeno van a llegar en un momento determinado a ser ineficientes en campo para dicha enfermedad. Estos resultados coinciden con lo reportado por McGrath (1988), quien reportó la presencia de las tres razas (1, 2 y 3) de Fol, en Estados Unidos, de las cuales en ese tiempo las dos primeras estaban ampliamente distribuidas en las regiones tomateras, por lo que actualmente existen cultivares mejorados con resistencia a las tres razas. Aunado a esto esta lo reportado por Reis, *et al.*, (2005), donde indica la presencia de la raza 3 de Fol en lotes tomateros en Brasil, encontrando menos incidencia de esta raza, comparada con las otras dos razas.

Cuadro 3.- Cepas identificadas morfológicamente de Fol inoculadas en los diferentes materiales diferenciales de las razas de este hongo, por localidad.

CEPAS	MATERIALES DIFERENCIALES				RAZA	LOCALIDAD
	BONNY BEST	MANAPAL	WALTER	I ₃ R ₃		
1	S	S	S	R	3	Teresita
2	S	S	R	S	2	Teresita
3	S	S	S	R	3	Teresita
4	S	S	S	R	3	Teresita
5	S	S	S	R	3	Teresita
6	S	R	S	S	1	Teresita
7	S	S	S	R	3	Teresita
8	S	R	S	S	1	Teresita
9	S	S	S	R	3	El ranchito
10	S	R	S	S	1	El ranchito
11	S	S	S	R	3	El ranchito
12	S	S	S	R	3	El ranchito
13	S	S	S	R	3	El ranchito
14	S	S	R	S	2	El ranchito
15	S	R	S	S	1	El ranchito
16	S	S	S	R	3	Santa Elena
17	S	R	S	S	1	Santa Elena
18	S	S	S	R	3	Santa Elena
19	S	R	S	S	1	Santa Elena
20	S	S	S	R	3	Santa Elena
21	S	S	R	S	2	Santa Elena
22	S	S	S	R	3	Santa Elena
23	S	S	R	S	2	Casa Blanca
24	S	S	S	R	3	Casa Blanca
25	S	S	S	R	3	Casa Blanca
26	S	S	S	R	3	Casa Blanca
27	S	S	S	R	3	Casa Blanca
28	S	R	S	S	1	Casa Blanca
29	S	S	S	R	3	Casa Blanca

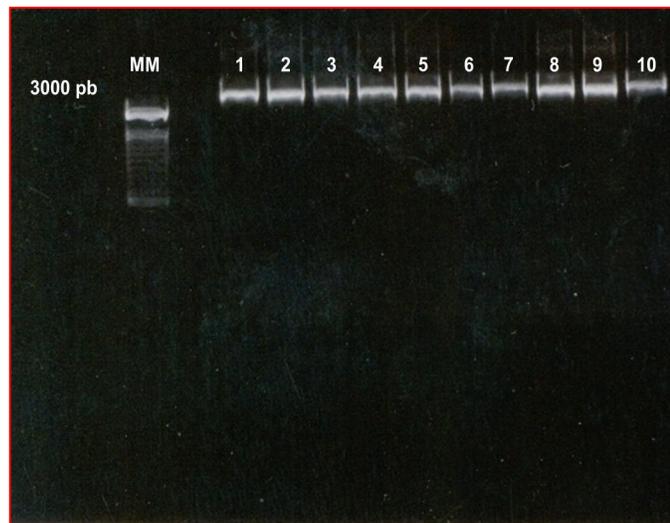
A la fecha en México, se presenta un panorama distinto respecto a esta enfermedad, ya que hay reportes donde se indica la presencia de la raza 3. Al respecto, Valenzuela *et al.*, (1996), reportan la presencia de esta en lotes comerciales de tomate en Culiacán Sinaloa, al igual que Cai *et al.*, (2003).

Por lo anterior el riesgo económico en la región tomatera de Sinaloa es relativamente alto para la raza 1, porque probablemente el uso de variedades comerciales resistentes a la raza 1 se ha reducido, lo que ha permitido que el control de esta raza a través de la resistencia gen a gen

este disminuyendo. Con respecto a la raza 2 el control que ejerce actualmente la resistencia vertical esta siendo efectivo, ya que la mayoría de las variedades comerciales disponibles en el mercado tienen genes de resistencia a dicha raza. Sin embargo para la raza 3 que tiene poco tiempo de ser descubierta su presencia en México, existen pocas variedades comerciales con genes de resistencia a la misma, además de existir pocos estudios respecto a las posibles fuentes de resistencia; razón por la cual representa el mayor riesgo potencial para la producción de esta especie en nuestro país.

Variabilidad genética por medios moleculares.

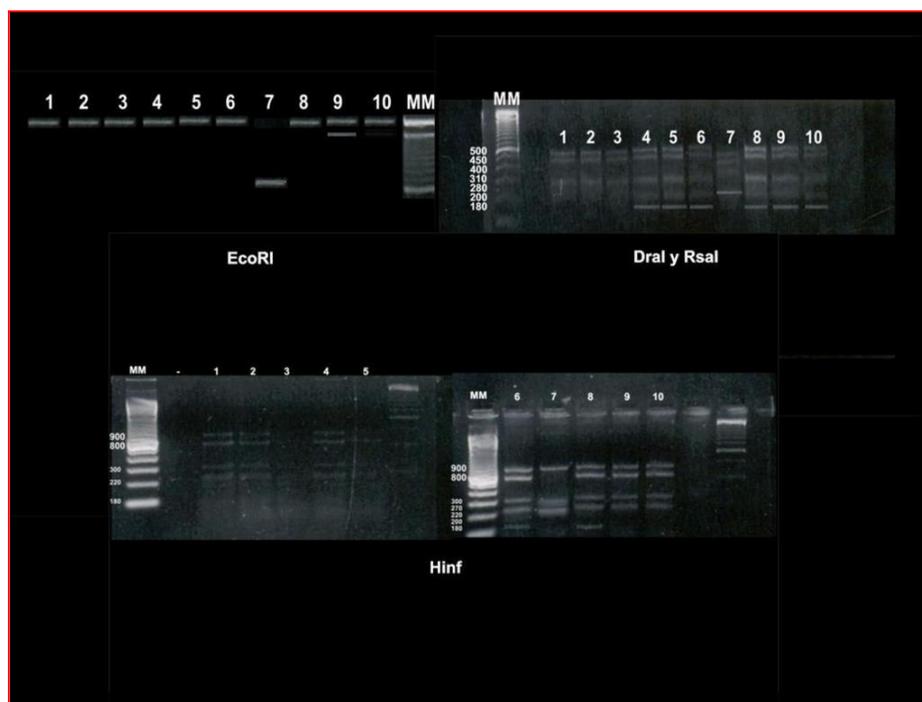
Amplificación de secuencias específicas de Fol mediante PCR: Los resultados de este trabajo nos indica que en todos los aislados se amplificó una banda de 3000 pb usando los iniciadores IGSF e IGSR como se observa en la siguiente fotografía.



Fotografía 1.- Resultados de la amplificación de secuencias específicas de Fol con primer IGSF e IGSR. MM= marcador de peso molecular; Carril 9: Raza 1; Carril 7: Raza 2 y Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10: Raza 3.

Variabilidad mediante RFLP's: Mediante la técnica utilizada y con los resultados obtenidos en este trabajo se puede deducir que no existe gran variabilidad genética entre los aislamiento, ya que como se observa en la fotografía 2 y usando las enzimas EcoRI, RsaI, DraI y Hinf, la mayoría de las

bandas se encuentran en todos los aislamientos exceptuando el aislamiento 7, por lo tanto no se consideró necesario el presentar un dendograma. Sin embargo en la misma fotografía, sí observamos marcas moleculares que nos permiten diferenciar con certeza cada una de las 3 razas; esto significa que la procedencia de la raza 3 tiene un origen común o se deriva de la raza 2 y la 2 de la 1 como lo señala Cai *et al.*, 2003, en el estudio con IGS RFPLs, donde secuenció muestras de Fol de diferentes lugares, incluyendo México, e indica que las colectas obtenidas del experimento sugieren que la raza 3 es originaria de la población o de la raza 2. Esto indica que uno o pocos genes están involucrados en la especificidad del hospedero, es decir, se llevó a cabo una selección natural o inducida del patógeno para generar la nueva raza y esto puede ser factible que pueda volver a ocurrir.



Fotografía 2.- Resultados de la amplificación de secuencias específicas de Fol con las enzimas 3 restricción. MM= marcador de peso molecular; Carriles del 1 al 10: razas de Fol

El presente estudio puede ayudar a secuenciar las bandas que nos marcan diferencias; además de diseñar iniciadores o primers específicos para cada una de las razas, por lo tanto posteriormente se podrán identificar por PCR sin necesidad de diferenciales, lo que podría ayudar al fitomejoramiento para que esto sea más rápido y con un mayor número de aislados posibles.

Materiales resistentes a las 3 razas de Fol

Todos los genotipos evaluados resultaron susceptibles a la raza 1, 16 resistentes a la raza 2 y solo 4 resistentes a la raza 3 (3); los materiales resistentes a la raza 3 fueron: *L. esc. cv. motelle* LA.2823 (87L0382); *L. peruvianum* f. *glandulosa* LA.1292 (91L5792); *L. pimpinellifolium* LA.722 (86L9486); *L. pimpinellifolium* LA.2184 (87L0413). Como lo reportó Bohn y Tucker (1940) y Wilson, *et al.*, (2001), quienes encontraron genes de resistencia a la raza 1 y 2 en una accesión (PI126915) de *L. pimpinellifolium*, sin embargo no se había reportado la resistencia para la raza 3 de Fol. McGrath (1988), Van der Hoorn *et al.*, 2001 y Reis, *et al.*, (2005), indican que los materiales silvestres (PI 414773 de *L. peruvianum*) tienen genes de resistencia a la raza 3 de Fol.

Cuadro 4. Respuesta de 27 genotipos de *Lycopersicon* a las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Fol), colectadas en Culiacán Sinaloa.

GENOTIPO	RAZA			CLASIFICACIÓN
	1	2	3	
<i>L. esc.</i> cv. prim LA.473 (90L3543)*	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.477 (86L9441) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim LA.404 (90L335) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA .34C (90L3516) *	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.126 (90L3515) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.409 (90L3536) *	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim LA.1021 (84L6594-1,2) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim LA.146 (91L5356) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.468 (83L4649) *	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.358 (90L3531) *	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.172 (84L6491-1,4) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.1162 (89L2530) *	S	S	S	Susceptible
<i>L. esc.</i> cv. prim. LA.147 (90L3518) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. edkawi LA.2711 (86L9489) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. malintkalol LA.3120 (91L5342) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. 204e LA.3130 (91L5425) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. esc.</i> cv. motelle LA.2823 (87L0382) *	S	S	R	Resis. raza 3
<i>L. esc.</i> cv. saladette LA.2662 (88L1368) *	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. peruvianum</i> LA. 462 (79L4445-4449)**	S	S	R	Resis. raza 3
<i>L. peruvianum</i> f. glandulosa LA.1292 (91L5792)	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. pimpinellifolium</i> LA.722 (86L9486)	S	S	R	Resis. raza 3
<i>L. pimpinellifolium</i> LA.2184 (87L0413)	S	S	R	Resis. raza 3
<i>L. chmielewskii</i> LA.2663 (85L8673-8676)**	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. chmielewskii</i> LA.1306 (87L0617)**	S	S	S	Susceptible
<i>L. cheesmanii</i> f. minor LA.317 (82L2446)	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. chilense</i> . LA.1958 (89L2835)**	S	R	S	Resis. raza 2
<i>L. chilense</i> LA.1959 (89L2836)**	S	R	S	Resis. raza 2

* Material seleccionado a través de la formación de familias de autohermanos

** Material seleccionado a través de selección masal

Herencia de la resistencia a la raza 3 en los materiales de *Lycopersicon* resistentes.

En el Cuadro 5, se presentan las proporciones fenotípicas de las generaciones F₂ de las cruzas de los progenitores resistentes por susceptibles, para la respuesta a la inoculación con la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Se observa que los genotipos *Lycopersicon esculentum* cv. motelle LA.2823 (87L0382); *Lycopersicon peruvianum* LA. 462 (79L4445-4449) y *Lycopersicon pimpinellifolium* LA.2184 (87L0413), presentaron genes de resistencia vertical a la raza 3, cada una de las cuales están representadas por los tres progenitores hembra.

Cuadro 5.- Prueba G de frecuencias genéticas de los materiales evaluados de 3 especies de *Lycopersicon* resistentes a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Pro g	Respuesta	Cruza	Prop	Obs	Esp	G. I.	G	Prob Tab
a	Resistente	1(a x b)	3:1	160	150	1	2.80	0.09
b	Susceptible			40	50			
c	Resistente	2(c x d)	3:1	155	150	1	0.68	0.40
d	Susceptible			45	50			
e	Resistente	3(d x e)	3:1	149	157	1	1.35	0.24
f	Susceptible			51	43			

Prog= Progenitores; Prop= Proporciones; Obs= Observados; Esp= Esperados; G.I= Grados de libertad. Nivel de significancia = 0.05

Para el caso de la primera población segregante F₂, se encontró que la variedad motelle de la especie *esculentum* debe ser considerada como una importante fuente de resistencia a esta enfermedad, ya que además tendría características deseables para el mercado. En este sentido, McGrath (1988), encontró que una línea de *L. esculentum* (BHRS 2-3) presentó resistencia a la raza 1, 2 y 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, además de que dicha resistencia está determinada por un gen dominante simple; sin embargo, la desventaja que tenía esta línea es que no daba un buen rendimiento, por lo cual no se siguió trabajando por dicha situación. Recientemente se han hecho estudios al respecto por Wilson, *et al.*, (2001), donde corrobora lo realizado por McGrath, pues encontró en sus trabajos que esta especie tiene resistencia a enfermedades como es la causada por Fol.

Las frecuencias genéticas 3:1 de las plantas de la generación F₂ de la cruce *Lycopersicon esculentum* cv. motelle LA.2823 (87L0382) con *Lycopersicon esculentum* cv. prim LA.473 (90L3543) y *Lycopersicon peruvianum* LA. 462 (79L4445-4449) con *Lycopersicon esculentum*. cv. prim. LA.1162 (89L2530), fue similar a la anterior, ya que en ambos casos el valor

G (2.8 y 0.68 respectivamente) tienen una $p \geq 0.05$, por lo que presentan una herencia mendeliana simple. Sin embargo, en este caso es importante señalar que la especie *peruvianum*, además de haber presentado genes de resistencia vertical a la raza 3, también presentó genes de resistencia a la raza 2 (datos sin publicar), por lo que esta especie representa una buena opción para los programas de mejoramiento genético del tomate. Al respecto, Rick (1990), ya la había descrito como una fuente de variabilidad genética con genes mayores de resistencia a diferentes enfermedades, entre las que destaca Fol.

La tercera población segregante también presentó una proporción mendeliana determinada por genes mayores de resistencia a la raza 3, de herencia simple y al igual que en el caso de la primera población segregante también se han reportado en estudios previos la presencia de genes de resistencia vertical para la raza 1 (Bohn y Tucker 1940). En este caso se presentó la mayor probabilidad numérica ($p = 01.35$) del valor G , para las proporciones de fenotipos segregantes en la F_2 .

V CONCLUSIONES

Las razas 1, 2 y 3 de Fol se encuentran presentes en lotes comerciales muestreados del Valle de Culiacán, Sinaloa. Debido a la existencia de las 3 razas de Fol es urgente incorporar materiales que tengan resistencia a la raza 3 (62% incidencia), ya que los cultivares comerciales evaluados en este estudio sólo presentan resistencia a las dos primeras razas (1 y 2), de dicho hongo.

A través de medios moleculares se determino que no existe variabilidad entre las cepas evaluadas, sin embargo hay diferencias genéticas que permiten diferenciar las razas presentes. Por lo tanto con esta información se pueden secuenciar las bandas que marcan diferencias entre cepas y se pueden diseñar iniciadores o primers específicos para cada una de las razas.

Es recomendable elaborar un plan integral para el control a las 3 razas e inducir así la reducción de la enfermedad, ya sea a través de la resistencia vertical, con piramidación de genes o con un programa de mejoramiento en resistencia horizontal o ambas. En este plan podrían integrarse accesiones silvestres con resistencia a dichas razas de Fol, esto debido a que existe germoplasma evaluado con genes de resistencia a dicha enfermedad, lo cual es particularmente importante actualmente para la resistencia a la raza 3.

La resistencia vertical a la raza 3 se observó en las poblaciones segregantes F_2 , ya que las proporciones observadas son típicas de una herencia genética mendeliana, ajustándose a una relación 3:1 entre genotipos resistentes y susceptibles. La especie *esculentum* debe ser considerada como una importante fuente de resistencia a esta enfermedad, ya que además tendría características deseables para el mercado.

VI RESUMEN

En el presente trabajo se inocularon 29 aislamientos monospóricos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), en materiales diferenciales para observar su variabilidad genética (Bonny Best, Manapal, Walter e I₃R₃), con una suspensión conidial (10^7 ml l⁻¹). Se extrajo ADN, el cual se amplificó usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias espaciadoras intergénicas con los iniciadores IGSF 5' CTG AAC GCC TCT AAG TCA G 3' e IGSR 5' AAT GAG CGA TTC GCA GTT TC 3'; y se realizó un análisis del patrón de bandas generada por la técnica de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFPLs), usando las enzimas de restricción: EcoRI, RsaI, DraI e Hinf. Se utilizaron 27 accesiones de diferentes especies del género *Lycopersicon* para buscar fuentes de resistencia procedentes del Conservation Genetic Resources Program of University of California, Davis; las cuales se inocularon y se evaluaron de la misma forma que con los materiales diferenciales. Se utilizaron poblaciones segregantes F₂ producto del entrecruzamiento de progenitores tolerantes y susceptibles a la raza 3 de Fol. La evaluación por medios convencionales se basó en la respuesta típica de resistencia vertical a través de la observación de síntomas (plantas sanas o enfermas); en la metodología por medios moleculares se hizo un análisis estadístico (matriz de disimilitud genética por apareamiento simple); el análisis fenético se realizó con el programa de análisis multivariado de taxonomía numérica (NTSYS-pc versión 2.3); la matriz de similitud se calculó con el coeficiente DICE. Para definir el tipo de herencia se utilizó la prueba G y para calcular los valores de dicha prueba, se empleó un software (McDonald *et al.*, 1996). Se detectó la presencia de tres razas de Fol. en los lotes muestreados en Culiacán, Sinaloa; el 24 % corresponde a la raza 1, 14% a la raza 2 y 62% a la raza 3. A través de medios moleculares, no existe variabilidad entre las cepas evaluadas; sin embargo, hay diferencias genéticas que permiten diferenciar las razas presentes. De los genotipos evaluados con posibles fuentes de resistencia todos fueron susceptibles a la raza 1, 16 resistentes a la raza 2 y 4 resistentes a la raza 3, siendo *L. esc. cv. motelle*; *Lycopersicon peruvianum* y *Lycopersicon pimpinellifolium*. Al evaluar el tipo de herencia se observó

que las especies *esculentum*, *peruvianum* y *pimpinellifolium* presentaron genes de resistencia vertical a la raza 3. Las frecuencias genéticas 3:1 de plantas (resistentes y susceptibles) en las poblaciones segregantes, fueron similares, ya que en todos los casos el valor G (2.8, 0.68 y 1.35, respectivamente) tienen una $p \geq 0.05$, indicando una herencia mendeliana simple.

VII LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 2004., Fitopatología., 2ª Ed., Ed. Limusa., México., 524-529, 635-648 pp.
- Alcazar E.J.T. 1991. Genetic Resources of Tomatoes and Wild Relatives. International Board Plant Genetic Resources, Rome.
- Alexander, L.J. 1963. Transfer of a dominant type of resistance to the four known Ohio pathogenic strains of TMV from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum*. Phytopathology 53, 869.
- Bailey, D.M. 1999. Manual of Cultivated Plant, 2nd Ed. Macmillan Co. New York.
- Bainbridge, B.W., Spreadbury, C.L., Scalise, F.G., y Cohen, J. 1990. improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. Microbiology Letter 66:113-118.
- Barnet, H.L. Y Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minnesota. U.S.A. 241 págs.
- Becerra, V. V. y Paredes, A. C. M., 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agric. Tec., 3(60):270-281.ISSN 0365-2807.
- Bhon, G.W. y C.M. Tucker. 1940. Studies on Fusarium wilt of the Tomato. I Immanitu in *Lycopersicon pimpinellifolium* and its Inheritance in Hibrids. Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 311.
- Blancard, D. 1997. A Colour Atlas of Tomato Diseases. Observation, Identification and. Control. First Edition, John Wiley and Sons. New York, USA. 212 p.
- Booth, C. 1971. The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Bost, S. C. 2001. First report of Fusarium oxysporum f sp. Lycopersici race 3 on tomato in Tennessee. Plant Dis. 85:802
- Cai, G., Gale, I. R., Scheider, R. W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K., S., and Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f sp. *Lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93: 1014 – 1022.

- Chellemi, D. O., Dankers, H. A., y Crosier, B. 1992. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in northwest Florida and Georgia. Plant Dis. 76:861
- Davis, R. M., Kimble, K. A. y Farrar, J. J. 1998. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* identified in California. Plant Dis. 72:453.
- Davies, HV. 2000. Advances in potato improvement through genetic engineering. *In*. Plant genetic engineering: Towards the third millenium. Arenciba, AD editor. Elsevier. Amsterdam. pp: 1-6.
- Dreher, K., Morris M., Khairallah M., Ribaut J-M, Pandey S. and Srinivasan G. 2000. Is marker-assisted selection cost effective compared to conventional plant breeding methods? The case of quality protein maize. Fourth Annual Conference of the International Consortium on Agricultural Biotechnology. The Economics of Agricultural Biotechnology. Ravello, Italia.
- Domingos, E.G.T, Martins, B.E y Michereff, J.S., 2000. Avaliacao de cultivares de tomateiro para resistencia a raza 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Summa Phytopathologica 4 (26) 416-421 p.
- Dunning, T.E. 1993. Accurate Methods for the Statistics of Surprise and Coincidence. Computational Linguistics, Volume 19, issue 1.
- Falconer, D.S, y Mackay, T.F.C. 2001. Introducción a la Genética Cuantitativa., 1ª Ed., Ed. Limusa.
- Fernández V. A. 2001. Introducción a la Fitopatología. INTA. B. Aires. Argentina. 435-440 p.
- Garcés, de G. E., Orozco, de A. M., Bautista, R. G., Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum*. El hongo que nos falta conocer. Acta Biológica Colombiana, 6(1) 1-2 p.
- Gebhardt, C. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual Review of Phytopathology 39:79-102.
- Gelape, F. F., Santos, V. W., Antonio, R. V., Xavier, C. R., Alves, M. M. y Foncalves, B. F. 2000. RAPDs markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. Genetics and Molecular Biology 23:2339-402
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aus. J. Biol. Sci. 9: 463-493.
- Hayman, B.I. y Mather, K. 1955. The description of genic interaction in continuous variation. Biometrics 11: 69 – 82.

- Hayman, B.I. 1958. The separation of epistasis from additive and dominance variation in generation means. *Heredity* 12: 371 – 390.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2005. Manejo Integrado del Cultivo del Jitomate en el Estado de San Luis Potosí. Folleto Técnico No. 22., Fundación Produce., 3-5 p.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Argentina. 152 p.
- Luna, P.A., Silva, R.H., Marbán, M.N y Valadez, M.E. 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K Sato mediante PCR-RAPD's en el bajío, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(1):44-51 pp.
- McDonald, J.H., Verrelli, B.C. y Geyer, L.B. 1996. Lack of geographic variation in anonymous nuclear polymorphisms in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1114-1118.
- McGrath, D.J. Gillespie, D y Vawdrey L. 1987. Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Aust. J. Agric. Res.* 38, 729-733 p.
- McGrath, D.J. 1988. BHRS 2-3 *Fusarium* Wilt-Resistant Tomato. *HortScience* 23(6):1093-1094
- Michelmore R. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Ann. Rev. Phytopathology* 15: 393-427.
- Nuez, F. y Carrillo, J. M. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia.
- Ochoa, J. y Danial, D. 1999. Manejo de patógenos especializados en el mejoramiento genético de plantas para resistencia a enfermedades. In: Curso sobre aspectos técnicos en el manejo de los patosistemas de cultivos altos. Ed. Limusa. México D.F.17-31 p.
- Oyervides, C. M. S., 1999. Producción y Exportación de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el Período de 1995 1998. M. L. Buenavista, Saltillo Coahuila México. Ed. Limusa, 39 p.
- Peralta, I.E. & D.M. Spooner. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45-54.

- Pérez, G. M., Márquez, S.F. y Peña, L .A. 1997. Mejoramiento Genético de Hortalizas. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Edo de México. México.
- Phillips, 2003. Políticas, reglamentos nacionales y normas internacionales sobre los alimentos modificados genéticamente. Políticas sobre biotecnología y recursos genéticos. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias Ed. IFPRI, USA, 20-32 pp.
- Qaim, M 1998. Transgenic virus resistant potatoes in México: potentials socioeconomic implications of south-north biotechnology transfer. *ISAAA Briefs No. 7*. Ithaca, NY. 48 p.
- Reis, A., Costa, H., Boiteux, L.S. y Lopes, C.A. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatol. Bras.* 30(4): 426-428 pp.
- Rendón P. E. 1996. Primer Taller sobre Enfermedades de Hortalizas México-Estados Unidos, del 15 al 16 de Diciembre de 1986. SARH, CAADES (Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa), Universidad de California (USA). Sinaloa, México. 88-100 pp.
- Rick, C.M. 1986. Germplasm Resources in the Wild Tomato Species. Symposium on Tomato Production on Arid Land. Abstract ISHS Acta Horticulturae 190. Editrs A.S. El-Beltagy, A.R. Persson. Vol. 1 No. 72 Cairo, Egypt.
- Rick, C. M., 1990., Perspectives from plant genetics: The Tomato Genetics Stock Center. Genetic Resources at Risk; Scientific Issues, Technologies, and Funding Policies. Report N0. 5. Published by Genetic resources Conservation Program. Division of Agriculture and Natural Resources University of California
- Robinson, R. A. 1987. Manejo del Hospedero en Patosistemas Agrícolas., 1ª Ed. En español., Colegio de Posgraduados., Montecillo, Edo de México., 29-37 pp.
- Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Imprenta Universitaria de la Universidad de Chapingo, Estado de México. 188 p.
- SAGARPA. 2005. Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. 9 p
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1995). Biometry: The principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. New York: Freeman. ISBN 0-7167-2411-1.
- Stakman, E.C. y Harrar, J. G. 1958. Principles of Plant Pathology. The Ronald Press. New York.

- Tigchelaar, E.C. 1986. Tomato Breeding. Breeding Vegetable Crops. (Edited by Mark J. Bassett). Vegetable Crops Department. University of Florida. AVI Publishing Company. Gainesville.
- Valadez, L. A. 1996. Producción de Hortalizas. Editorial UTEHA México, DF. 287 p.
- Valenzuela Ureta, J.G., Lawn, D.A., Heisey, R.F., y Guzmán Z.V. 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in México. Plant Dis. 80: 105.
- Van der Hoorn RAL, De Wit PJGM, Joosten MHAJ (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* 7: 67-71.
- Wilson IW, Schiff CL, Hughes DE, Somerville SC (2001). Quantitative trait loci analysis of powdery mildew resistance in the *Arabidopsis thaliana* accession Kashmir-1. *Genetics* 158: 1301-1309.
- Xiangning, C., Zehnbaauer, B., Gnirke, A y Kwok P. Y. 1997. Fluorescent energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic.