

# INCORPORACIÓN DEL GEN *Mi* A VARIEDADES DE TOMATE MEDIANTE EL MARCADOR *Aps-1*<sup>1</sup>

Marta Álvarez✉, Regla M. Lara, J. Rodríguez, R. Fernández y J. Cuartero

**ABSTRACT.** Genetic resistance, together with the application of antinematode products and other methods of integrated fight, is the most recommended control choice. Many modern varieties and hybrids have introduced *Mi* gene, that confers incomplete resistance to several species from genus *Meloidogyne*. The National Institute of Agricultural Sciences (INCA), along with La Mayora-CSIC Experimental Station, has developed a breeding program, with the objective of introducing the *Mi* gene to a few tomato varieties with good acceptance by Cuban producers. The methodology used was marker-assisted selection by using *Aps-1*<sup>1</sup>, an isozyme marker that integrates the same linkage group as *Mi* gene. Codominant marker *Aps-1*<sup>1</sup> helps the indirect selection of nematode resistance, with no need of infesting the soil. The selection by *Aps-1*<sup>1</sup> during backcross and selfing process made between 1997 and 2003 enabled to obtain *Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>1</sup> lines. This paper reports the first results of incorporating *Mi* gene to tomato varieties Mariela, Amalia, Rome and Rilia as well as describes the methodology followed.

**Key words:** tomato, *Lycopersicon*, nematodes, *Meloidogyne*, molecular markers, selection, isoenzymes, genetic gain, acid phosphatase

**RESUMEN.** Frente a los nematodos del género *Meloidogyne* es la resistencia genética, junto a métodos de lucha integrada, la opción más recomendada para el tomate, por lo que los cultivares e híbridos modernos portan, en su mayoría, el gen *Mi*, que confiere resistencia no completa a varias especies del género *Meloidogyne*. El Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), con la colaboración de la Estación Experimental La Mayora-CSIC, España, ha desarrollado un programa de mejora genética, con el objetivo de incorporar el gen *Mi* a variedades de tomate con buena aceptación por los productores cubanos. La metodología empleada fue la de selección asistida por el marcador isoenzimático *Aps-1*<sup>1</sup>, que integra el grupo de ligamiento del gen *Mi*, cuya naturaleza codominante facilitó la selección indirecta de la resistencia, sin necesidad de infestar el suelo. La selección por el marcador *Aps-1*<sup>1</sup> se realizó durante todo el proceso de autofecundaciones y retrocruzamientos que se efectuaron entre 1997 y 2003, que posibilitó la obtención de líneas *Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>1</sup>. En el presente trabajo se describe la metodología que se siguió y se dan a conocer los primeros resultados de la incorporación del gen *Mi* a las variedades de tomate Mariela, Amalia, Rilia y Roma.

**Palabras clave:** tomate, *Lycopersicon*, nematodos, *Meloidogyne*, marcadores moleculares, selección, isoenzimas, fosfatasa ácida, mejora genética

## INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el mejoramiento genético de variedades se ha realizado mediante la selección del fenotipo y, aunque la selección indirecta por marcadores genéticos se ha utilizado en la mejora desde los primeros tiempos de la genética con marcadores de tipo morfológico, su aplicación sistemática comenzó con el empleo de las isoenzimas. Posteriormente, los marcadores moleculares de ADN han superado con creces las expectativas de hace algunos años, lo que ha impulsado la utilización de la selección indirecta de caracteres, principalmente los de herencia simple (1).

Dra.C. Marta Álvarez, Investigadora Titular; Ms.C. Regla M. Lara y J. Rodríguez, Especialistas del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700, Cuba; Dr. R. Fernández, Investigador y Dr. J. Cuartero, Investigador-Profesor del Departamento de Horticultura, Estación Experimental La Mayora, CSIC, España.

✉ malvarez@inca.edu.cu

Los marcadores moleculares asociados genéticamente a una característica específica son de particular interés en los programas de mejoramiento, debido a que permiten el rápido monitoreo de grandes números de plantas en una edad temprana del desarrollo (2). Otros hicieron referencia a una aplicación concreta de los marcadores moleculares en los programas de introgresión vía retrocruzamiento, donde los marcadores fuertemente ligados a los genes que se desean introducir son utilizados como monitores en las generaciones de retrocruzamiento (1).

La introgresión de genes asistida por marcadores está siendo empleada en los programas de mejora de numerosos cultivos (3). En relación con el tomate, hay numerosos genes que están siendo introducidos con selección asistida por marcadores de forma, que ya es una práctica rutinaria en la mayoría de los programas de mejora genética de este cultivo, fundamentalmente con marcadores de ADN (4).

Si bien los marcadores bioquímicos, como las isoenzimas, poseen numerosas ventajas, como la codominancia y el bajo costo relativo, el número de isoenzimas que se pueden estudiar en el reino vegetal no es suficiente para poder buscar marcadores para cualquier gen. No obstante, se conoce un buen número de casos en que sí se han logrado encontrar. Por ejemplo, en tomate, el locus *Mi* que controla la resistencia a nematodos está ligado al locus de *Aps-1* de fosfatasa ácida, y el de androsterilidad *Ms* lo está con *Prx-2*, una peroxidasa, lo que los ha hecho material de trabajo ideal por mucho tiempo (5).

En Cuba, la alta incidencia de nematodos en los suelos en el tomate sembrado en organopónicos y huertos urbanos es uno de los principales problemas de estas áreas. Entre los nematodos que afectan el cultivo se encuentran los que causan las agallas de la raíz, pertenecientes al género *Meloidogyne*, donde el control químico, además de ser muy costoso, tiene repercusiones ecológicas negativas sobre el suelo y es muy dañino para la salud del hombre. El Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV) recomienda, para estos casos, el manejo integrado, que contempla el uso de productos bionemáticos<sup>1</sup> y a la que la resistencia genética de las variedades pudiera incrementar su efectividad.

Las variedades de tomate cubanas para la explotación a cielo abierto son, en su mayoría, susceptibles a nematodos, por lo que el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), con la colaboración de la Estación Experimental La Mayora-CSIC, España, ha estado trabajando en la transferencia del gen *Mi* que confiere la resistencia a los nematodos (*Meloidogyne spp*), basada en la selección asistida por el marcador *Aps-1*<sup>1</sup> a variedades de tomate de aceptación por los productores (6). El objetivo del presente trabajo es dar a conocer la metodología empleada para la incorporación del gen *Mi* a las variedades de tomate Mariela, Amalia, Roma y Rilia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron seleccionados como progenitores susceptibles a nematodos las variedades Mariela, para consumo en fresco; Amalia, de doble propósito; Rilia y Roma para la industria (7) y como genotipos resistentes a nematodos las variedades o híbridos resistentes Garbo, Rambo, Cix-3779, 16 15 81, Kastalia, VFN 8, 37 85 06, Valentín, 38 85 03, Nemagama e Ipanema, a los que se les comprobó la presencia o no del marcador isoenzimático *Aps-1*<sup>1</sup> y del marcador REX-1, del tipo SCAR (Regiones Amplificadas de Secuencias Caracterizadas), este último con el propósito de corroborar la presencia del gen *Mi* en los genotipos que se escogieran como progenitores resistentes.

La presencia o no de los marcadores se determinó, en el caso del marcador *Aps-1*<sup>1</sup>, por análisis

electroforéticos de isoenzimas de fosfatasa ácida (APS) en hojas jóvenes de plantas individuales de tomate de aproximadamente 15 días de sembradas en bandejas de poliespuma o cepellones que contenían un sustrato compuesto por suelo Ferralítico Rojo compactado: materia orgánica:zeolita en proporción de 1:2:1, mantenidos en condiciones semicontroladas.

El material vegetal fue homogeneizado en frío con un buffer de extracción que contenía Tris-HCl 0.05 M, ácido cítrico 0.07 M, PEG al 1 %, PVP-40 al 8 % y 2-mercaptoetanol al 10 % en proporción de 40  $\mu$ L por cada hoja a macerar. El extracto crudo fue sometido a electroforesis vertical en un sistema de buffer discontinuo sobre gel de poliacrilamida, empleándose para ello un gel separador del 10 % con buffer Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8 y un gel concentrador al 4 % con buffer Tris-HCl 0,125 M, pH 6.8 (8).

El tampón de la cubeta utilizado fue Tris-glicina, pH 8.3 y el tiempo de corrida estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de bromofenol azul hasta aproximadamente 6 cm del inicio del gel separador a intensidad de corriente constante de 25 mAmp en cámara de electroforesis vertical *Mighty Small II Farmacia Biotech*.

La tinción isoenzimática se desarrolló de acuerdo con el procedimiento empleado para las APS: el gel se sumergió en una solución que contenía 10 mL de buffer tris-citrato 0.5M, pH 5.5 en volumen final de 50 mL de agua destilada; 100 mg de 2-naftil fosfato sodio (disueltos en cinco gotas de acetona) y 300 mg de Fast Black K Salt prograde. Los geles fueron colocados en agitación y oscuridad total durante dos horas a temperatura ambiente, hasta la aparición de bandas de color rojo marrón sobre un gel transparente<sup>2</sup>.

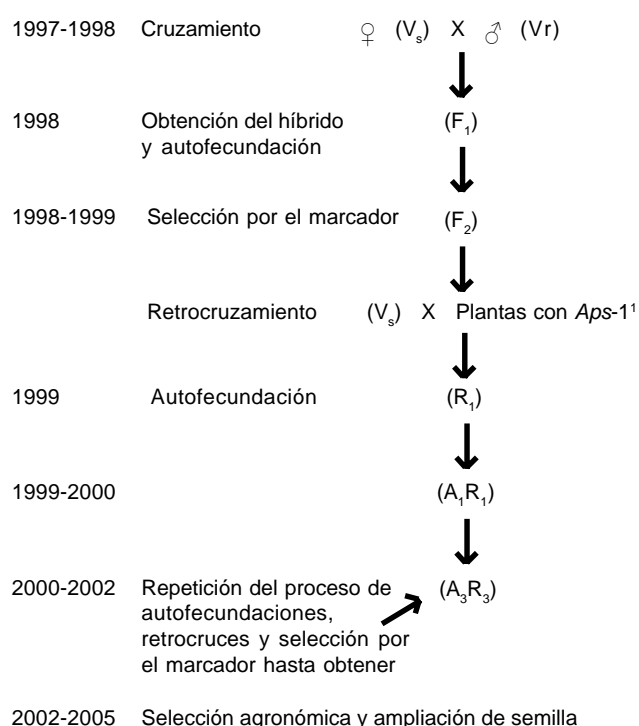
Las observaciones fueron realizadas sobre la base de los fenotipos enzimáticos de cada individuo, por la presencia o ausencia de las bandas e intensidad de tinción (9). En todos los casos se incorporó la muestra de un testigo resistente, la variedad VFN8 (*Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>1</sup>) y la variedad susceptible (*Aps-1*<sup>+</sup>/*Aps-1*<sup>+</sup>). La naturaleza codominante del marcador permitió distinguir el patrón isoenzimático del marcador en heterocigosis (*Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>+</sup>).

Además, se corroboró la presencia del marcador REX-1, de tipo SCAR "Sequence Characterised Amplified Region" (10), para confirmar la presencia del gen *Mi* en los genotipos. Luego de la extracción de ADN (11), se efectuó su amplificación basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores REX-F1: (5'-TCGGAGCCTTGGTCTGAATT-3') y REX-R2: (5'-GCCAGAGATGATTTCGTGAGA-3') y su posterior digestión con la endonucleasa *TaqI* en incubación a 65°C por tres horas como mínimo. Para analizar los productos PCR digeridos por la endonucleasa, se realizó una electroforesis horizontal de estos en gel de agarosa al 2 %, a una corrida de 60 a 80 mAmp de 7 a 8 cm; una vez finalizada, se procedió a la tinción del gel con bromuro de etidio y se observaron las bandas sobre un transiluminador de luz UV (10, 12).

<sup>1</sup>(Fernández, comunicación personal, 2003)

<sup>2</sup>(Fernández-Muñoz, comunicación personal, 1997)

Para incorporar el gen *Mi* a cultivares comerciales de tomate, se efectuaron cuatro cruzamientos en la campaña de invierno de 1997: Mariela x Rambo, Amalia x VFN-8, Roma x Ipanema y Rilia x Nemagama. El procedimiento de selección a partir de la generación  $F_2$  y hasta la obtención de líneas homocigóticas en la campaña de 2002, se muestra en la Figura 1 y consistió en una combinación de la selección asistida por el marcador de fosfatasa ácida *Aps-1*<sup>1</sup>, retrocruzamientos con la variedad susceptible y autofecundaciones, para facilitar la selección por el marcador, hasta obtener tres retrocruzamientos y tres autofecundaciones ( $A_3R_3$ ). En cada campaña se seleccionaron las plantas que tuvieran el marcador en homocigosis (plantas *Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>1</sup>) y/o en heterocigosis (plantas *Aps-1*<sup>1</sup>/*Aps-1*<sup>+</sup>).



**Figura 1. Esquema de selección asistida por el marcador *Aps 1*<sup>1</sup> en el tomate**

Una vez obtenidas las primeras líneas derivadas del cruce con la variedad Mariela (líneas 100, 101, 111, 119, 163, 164 y 169), se evaluó su respuesta de resistencia o susceptibilidad en suelo infestado con nematodos. Para la mencionada prueba, se emplearon como controles susceptibles las variedades Mariela y Rutgers (*mi/mi*) y como control resistente el híbrido resistente (*Mi/mi*) Early Nemapríde. Las semillas de cada línea y controles se pusieron a germinar en cinco alvéolos (de 100 cm<sup>3</sup> de volumen) en bandejas rellenas de turba. Las plántulas se mantuvieron en cámara de condiciones controladas 16 horas luz día, 25°C día, 20°C noche. Las inoculaciones se realizaron en la misma bandeja de germinación, cuando las plántulas tenían 15 días. Cada alvéolo se inoculó con 2 300 huevos de *Meloidogyne* spp. Para determinar

la respuesta de las líneas, se observó la presencia-ausencia de agallas en las raíces a los 75 días después de la inoculación, así como en las plantas adultas que se desarrollaron a partir del trasplante a suelo infestado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se muestran los resultados de la presencia de los marcadores REX-1 y *Aps-1*<sup>1</sup> en las variedades e híbridos candidatos a ser los progenitores resistentes a nematodos. Se observó que la totalidad de las variedades tuvieron el marcador REX-1; en cambio, no todas tuvieron el marcador *Aps-1*<sup>1</sup>, por ejemplo, las variedades Garbo, 16 15 81 y 37 85 06. Estos resultados están de acuerdo con otros, en los que REX-1 está más cercano al gen *Mi* que *Aps-1* (13). Es tanto más fiable un marcador cuanto mayor sea su proximidad con el carácter en cuestión, en el caso del gen *Mi*, que se cuenta con dos marcadores, sería más fiable el marcador REX-1, por estar más cercano. Sin embargo, en muchos programas se emplea aún el marcador isoenzimático *Aps-1*, por ser mucho más barato y asequible su identificación (5).

**Tabla I. Resultados del análisis de marcadores REX-1 y *Aps-1*<sup>1</sup> en variedades e híbridos de tomate resistentes a nematodos**

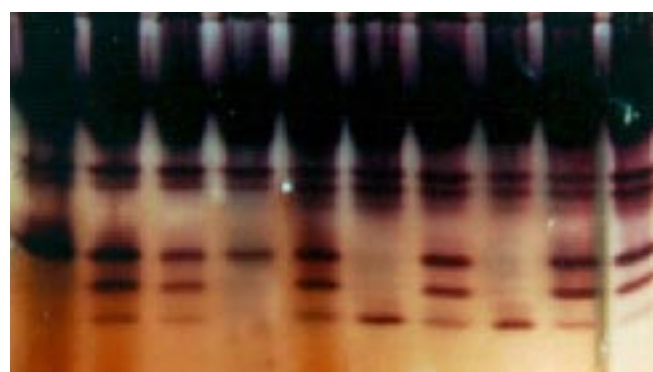
Híbridos y variedades	<i>Mi</i>	REX-1	<i>Aps-1</i> <sup>1</sup>
Clx 3779	X	X	X
Garbo	X	X	
Kastalia	X	X	X
16 15 81	X	X	
Ipanema	X	X	X
Nemagama	X	X	X
Valentín	X	X	X
37 85 06	X	X	
38 85 03	X	X	X
Rambo	X	X	X
VFN-8	X	X	X

La región del cromosoma 6 donde se encuentran los loci *Mi* y *Aps-1* es una zona de recombinación reprimida, lo que ha dado lugar a que ese gran bloque de ligamiento introgresado se herede como una unidad. No obstante, se han podido obtener algunas líneas con una pequeña zona introgresada que tiene incluido el gen *Mi*, aprovechando la ocurrencia de las escasas recombinaciones que han tenido lugar en la mencionada zona, de las que debieron ser derivadas las variedades resistentes Garbo, 16 15 81 y 37 85 06, aquí analizadas (14, 15).

Se seleccionaron como progenitores resistentes aquellos genotipos que tuvieran el marcador *Aps-1*<sup>1</sup>, por ser este el que se empleará en la selección asistida y que tuvieran, además, semejanzas agronómicas con los progenitores susceptibles, ya que esto posibilita efectuar un menor número de retrocruzamientos. Para el caso de las variedades de consumo en fresco, se escogió el híbrido Rambo (*Mi/mi*; *Aps-1*<sup>(1/+)</sup>; REX-1, 560 760 y 160 pb) y la variedad VFN-8 (*Mi/Mi*; *Aps-1*<sup>(1/1)</sup>; REX-1 de 560 y 160 pb), y para las variedades de industria se eligieron Ipanema y Nemagama (*Mi/Mi*; *Aps-1*<sup>(1/1)</sup>; REX-1 de 560 y 160 pb).

El esquema de selección que se siguió se describe en la Figura 1, el cual estuvo basado en la selección por el marcador isoenzimático *Aps-1*<sup>1</sup> a partir de las poblaciones segregantes F<sub>2</sub>. En esta primera etapa se evaluó la proporción esperada de homocigóticos para el marcador, cumpliéndose en el caso de Mariela x Rambo la proporción de 1:1 para *Aps*<sup>-(1/+)</sup>: *Aps*<sup>-(+/+)</sup>, ya que el progenitor resistente Rambo es un híbrido (*Aps*<sup>-(1/+)</sup>) y para el resto de los cruzamientos, donde los progenitores resistentes eran homocigóticos, se observó la proporción 1:2:1 para *APS*<sup>-(1/1)</sup>:2 *Aps*<sup>-(1/+)</sup>:*Aps*<sup>-(+/+)</sup>.

La expresión de codominancia de *Aps-1* se puede apreciar en la Figura 2, en que se muestra el perfil electroforético de las fosfatasas ácidas (APS). Las APS en el tomate muestran un patrón de seis bandas de isoenzimas bien definido, una de estas es la zona de APS-1, la de mayor movilidad electroforética, donde se puede apreciar la expresión fenotípica del alelo *Aps-1*<sup>1</sup>, introgresado de *L. peruvianum* y el alelo *Aps-1*<sup>+</sup>, característico de *L. esculentum*. Al analizar la figura, se distingue claramente el fenotipo homocigótico (*Aps 1*<sup>(1/1)</sup>), que es típico de la variedad resistente VFN8, por presentar una sola banda a 0.7 cm de alta actividad de tinción isoenzimática (*Aps-1*<sup>1</sup>), del fenotipo heterocigótico (*Aps-1*<sup>(1/+)</sup>) que presenta tres bandas, una banda de alta actividad de tinción que se corresponde con la banda del marcador *Aps 1*<sup>1</sup>, una nueva banda de posición media y una tercera banda que se corresponde con el fenotipo isoenzimático *Aps 1*<sup>+</sup>, típico de las variedades susceptibles.



↑  
*Aps 1*<sup>(1/1)</sup>  
Resistente  
homocigótico

↑  
*Aps 1*<sup>(1/+)</sup>  
Resistente  
heterocigótico

↑  
*Aps 1*<sup>(+/+)</sup>  
Susceptible

**Figura 2. Gel de poliacrilamida con tinción de fosfatasas ácidas en que se muestra la codominancia del marcador *Aps-1***

A partir de las plantas F<sub>2</sub> seleccionadas por el marcador, se realizaron tres retrocruces con el progenitor susceptible, con la finalidad de incorporar características agronómicas de este, alternando con autofecundaciones que garantizaran la homocigosis esperada para el marcador, lo que dio lugar a que luego de tres retrocruzamientos y tres autofecundaciones, se identi-

caran líneas con determinado grado de semejanza con la variedad susceptible y de genotipo *Aps 1*<sup>(1/1)</sup> / *Aps 1*<sup>(1/1)</sup>, como son: siete líneas derivadas del cruce Mariela x Rambo, ocho líneas del cruce Amalia x VFN8, cinco líneas Rilia x Ipanema y tres líneas Roma x Nemagema.

La resistencia genética a ciertas plagas y enfermedades es el medio más eficaz, y en ocasiones el único utilizable económicamente, para el cultivo del tomate para conserva. De ahí el interés de incorporar el máximo número de resistencias genéticas a las variedades más utilizadas. Las resistencias que presentan mayor interés son las que se refieren a los parásitos del suelo, como *Verticillium*, *Fusarium* y nematodos (16).

La selección para resistencia a nematodos o a los patógenos del suelo suele ser difícil y poco eficaz, por lo que el empleo del MAS en este tipo de resistencias adquiere mayor relevancia, al no tener que manejar suelo infestado para chequear las progenies, lo cual es tedioso y ofrece poca precisión de los ensayos, además de la contaminación no deseada. En el caso en que el gen de resistencia sea de dominancia completa, como es el gen *Mi*, se hace necesario en el método clásico de selección directa por la resistencia, incorporar pruebas de progenies para distinguir los genotipos homocigóticos (*Mi/Mi*) de los genotipos heterocigóticos (*Mi/mi*), lo cual incrementa el trabajo y hace mucho más largo el proceso de obtención de líneas resistentes, lo que se evita por la aplicación de MAS.

Las primeras líneas que se obtuvieron fueron derivadas del cruce Mariela x Rambo, con fenotipo *Aps 1*<sup>(1/1)</sup>, y fueron sometidas a las pruebas de tolerancia ante los nematodos. Los resultados, según se aprecia en la Tabla II, demuestran que el 100 % de las líneas evaluadas y supuestamente resistentes, en efecto, mostraron resistencia, por lo que se asume que en el proceso de obtención de estas no tuvo lugar ninguna recombinación en la zona de ADN comprendida entre el gen *Mi* y *Aps-1*. Este tipo de prueba es decisiva y se considera un reto, ya que la selección fue practicada sin que hubiese inoculación del patógeno, por lo que los resultados obtenidos en condiciones de inoculación artificial con nematodos, constituyen una prueba de la efectividad de la selección indirecta practicada mediante el marcador en este programa.

**Tabla II. Resultados de la prueba de resistencia a nematodos (*Meloidogyne spp.*) en las líneas obtenidas del cruce Mariela x Rambo**

Varietal o línea	Agallas en raíz	Fenotipo
Mariela	sí	S
Early Nemapride	no	R
Rutgers	sí	S
Línea 100	no	R
Línea 101	no	R
Línea 111	no	R
Línea 119	no	R
Línea 163	no	R
Línea 164	no	R
Línea 169	no	R

S: fenotipo susceptible; R: fenotipo resistente

En estudios realizados para la incorporación y evaluación de la resistencia a la raza 2 del género *Meloidogyne*, en variedades susceptibles de tomate mediante el marcador molecular REX-1, se ha demostrado que existe una clara correlación entre los métodos de selección tradicionales y el empleo de marcadores por MAS para el mejoramiento en la resistencia a nematodos del género *Meloidogyne* (15).

Asimismo, se han realizado bioensayos por parte del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV), donde se incluyó la variedad Eliana, creada a partir de la línea 100 del cruce Mariela x Rambo, junto a productos bionemáticos obtenidos en la mencionada institución, y donde se obtuvieron resultados muy alentadores en el control de la plaga.

El desarrollo obtenido en los últimos años denota que en el mejoramiento de plantas el paradigma ha cambiado: de la selección de fenotipos a la selección de genes, ya sea directa o indirectamente. En el futuro cercano, el mejorador de plantas tratará de optimizar el uso de la variación genética en la naturaleza, integrando de conjunto en un mismo genotipo aquellos alelos que maximicen el rendimiento, la resistencia a enfermedades, estrés, etc. (3). El incremento de la aplicación de MAS en los programas de mejora actuales de forma rutinaria corrobora este planteamiento.

Se puede concluir que la metodología de selección asistida por el marcador *Aps-1*<sup>1</sup> aplicada en el cultivo del tomate fue efectiva, pues permitió seleccionar genotipos resistentes a los nematodos del género *Meloidogyne*, obteniéndose en una primera fase 7 líneas a partir del cruce Mariela x Rambo, ocho líneas derivadas del cruce Amalia x VFN-8, tres de Roma x Ipanema y cinco de Rilia x Nemagema. Actualmente estas líneas están en fase de ampliación de semillas, para ser valoradas agrónomicamente y evaluadas en condiciones de producción en suelo infestado con nematodos como parte de la lucha integrada.

## REFERENCIAS

1. Nuez, F. y Carrillo, J. M. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, Valencia:Universidad Politécnica de Valencia, 2000, 579 p.
2. Cornide, M. T. /et al./ Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana:Editorial Félix Varela, 2002. 367 p.
3. Koornneef, M. y Stam, P. Changing paradigms in plant breeding. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, p. 156-159.
4. Foolad, M.; Sharma, A. Status of MAS En: Tomato breeding in the US and elsewhere. Plant & Animal Genomes XIII Conference, January 15-19, 2005, Town & Country Convention Center, San Diego, CA. Consultado (15-8-2006). Disponible en: <[http://www.intl-pag.org/13/abstracts/PAG13\\_W223.html](http://www.intl-pag.org/13/abstracts/PAG13_W223.html)>.
5. Cubero, J. I. Introducción a la mejora genética vegetal, Madrid:Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 567 p.
6. Álvarez, M. /et al./ Incorporación del gen *Mi* a variedades cubanas de tomate mediante el marcador *Aps-1*<sup>1</sup>. En resúmenes Congreso del INCA (13:2002:La Habana), 2002.
7. Álvarez, M.; Moya, C.; Florido, M. y Plana, D. Resultados de la mejora genética del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y su incidencia en la producción hortícola de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p 63-70.
8. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
9. Brewbaker, J. L. y Hasegawa, P. M. Polymorphisms of the major peroxidase of maize. Isozyme III. *Developmental Biology*, London: Academic press, 1975. 15 p.
10. Williamson, V. M.; Ho, J. Y.; Wu, F. F.; Miller, N. y Kaloshian, I. A PCR- based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, vol. 87, p. 757-763.
11. Dellaporta, S. L.; Wood, J. y Hicks, J. B. A plant DNA micropreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1983, vol. 1, p. 19-21.
12. Williamson, V. M.; Lambert, K. N. y Ho, J. Y. Root knot nematode resistance in tomato. En: *Molecular Biology of Tomato*, 1993.
13. Messeguer, R.; Ganai, M.; Vicente, M.C. de; Young, N. D.; Bolkan, H. y Tanksley, S. D. High-resolution RFLP map around the root-knot nematode resistant gene (*Mi*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 1991, vol. 82, p. 529-530.
14. Ho, J. Y.; Weider, Ma H. M.; Wordragen, M. F. van; Lambert, K. N.; Koornneef, M.; Zabel, P. y Williamson, V. M. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant J.*, 1992, vol. 2, p. 971-982.
15. Devran, Z. y Elekcioğlu, I. H. The screening of F<sub>2</sub> plants for the root- knot nematode resistance gene *Mi* by PCR. *TURK. J. Agric. For.*, 2004, vol. 28, p. 253-257.
16. Prado Ruiz-Santaella, J. L. de. *Vida Rural*, 2002, no. 148.

Recibido: 25 de noviembre de 2005

Aceptado: 17 de octubre de 2006