

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Caracterización de dos poblaciones segregantes de Tomate de Árbol
(*Solanum betaceum*) mediante marcadores moleculares AFLP**

Lenin Esteban Leiva Vargas

Tesis de grado presentada como requisito para la
Obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Quito

Diciembre 2008

©Derechos de autor
Lenin Esteban Leiva Vargas
2008

DEDICATORIA

A Dios, por su guía y fuerza en los momentos más difíciles, a mis padres y hermano por su incondicional apoyo y valiosa ayuda a lo largo de mi carrera y crecimiento personal.

AGRADECIMIENTOS

Deseo en primer lugar agradecer al personal de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. A María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por sus valiosos aportes, fruto de su preparación profesional y vasta experiencia, que permitieron el desarrollo satisfactorio de este trabajo investigativo.

A todos los compañeros y amigos que trabajaron conmigo dentro del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Antonio Cabrera, Nicolás Bastidas, Andrea Arias, Pedro González, Nicolás Peñafiel, Betsabé Mantilla, Diana Ayala y Diana Trujillo.

A mis padres y hermano, quien con sus sabias palabras de aliento y motivación hicieron posible la culminación de este proyecto.

RESUMEN

El presente trabajo determina el nivel de diversidad genética entre dos poblaciones segregantes, producto de los cruces entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja X *S. uniloba*, y sus respectivos parentales. Estos cruces pretenden establecer si es posible que *S. uniloba* aporte la variabilidad genética necesaria a los híbridos de dichos cruces, para aumentar la posibilidad de que la característica de resistencia a la antracnosis se herede. La técnica utilizada para el desarrollo de esta investigación fue AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés).

Se recolectaron en total 23 muestras de plantas, de las cuales 10 provinieron de plantas del cruce *S. betaceum* var. amarilla X *S. uniloba*, 10 del cruce *S. betaceum* var. roja X *S. uniloba* y las 3 restantes provinieron de los parentales *S. betaceum* var. amarilla, *S. betaceum* var. roja y *S. uniloba*. A todas estas muestras se les extrajo ADN y se les aplicó la técnica AFLP, de la que se pudo analizar 7 combinaciones de primers para determinar su variabilidad genética. Los patrones de bandas obtenidos en el análisis de los AFLPs hacen presumir que las poblaciones estudiadas, o al menos ciertos individuos, no corresponden con la información provista por el INIAP sobre el registro de cruces. En general todos los loci amplificados mostraron un valor de polimorfismo del 46,2%. Se encontró variabilidad limitada entre los segregantes de *S. betaceum* var. amarilla y roja x *S. uniloba* con valores de similitud de hasta el 100% entre los mismos.

ABSTRACT

The present study determines the level of genetic diversity between two segregating populations, resulting from crosses between *S. betaceum* var. amarilla and *S. betaceum* var. roja X *S. uniloba* with their respective parentals. These crosses are intended to establish whether it is possible for *S. uniloba* to provide the genetic variability needed to these hybrids, in order to increase the possibility of inheritance of the anthracnose resistance characteristic. The technique used for this investigation was AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

A total of 23 plant samples were collected, 10 of which came from plants resulting from the crosses between *S. betaceum* var. amarilla X *S. uniloba*, 10 from the crosses between *S. betaceum* var. roja X *S. uniloba* and the remaining 3 from the parental *S. betaceum* var. amarilla, *S. betaceum* var. roja and *S. uniloba*. DNA was extracted from all these samples and the AFLP technique was used, from which 7 primer combinations were analyzed to determine genetic variability. The fingerprints obtained from the AFLP technique suggest that the segregating populations, or at least some of the samples, do not coincide with the data provided about the crosses between *S. betaceum* var. amarilla and *S. betaceum* var. roja x *S. uniloba*, which was given by INIAP. In general, all amplified loci showed a polymorphic value of 46.2%. There was limited genetic variability among segregants from *S. betaceum* var. amarilla and roja x *S. uniloba* crosses, with similarity values of up to 100% between them.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características generales del tomate de árbol	2
1.2. Importancia del tomate de árbol en la dieta humana	3
1.3. Importancia Económica del tomate de árbol en el Ecuador	3
1.4. Afecciones del cultivo	4
1.5. Marcadores moleculares	7
1.5.1. Breve descripción de técnicas y sus usos	7
1.6. Marcadores Moleculares AFLP	12
1.7. Comparación de la técnica de AFLP con RAPD, RFLP y SSR	13
1.8. Aplicaciones de los marcadores moleculares AFLP	14
2. OBJETIVO GENERAL	17
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. ÁREA DE ESTUDIO	19
6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	19
6.1. Material Vegetal	19

6.1.1. Extracción de ADN de los segregantes	19
6.1.2. Cuantificación de ADN	20
6.2. Kit de amplificación AFLP ® Invitrogen™	20
6.2.1. Restricción	20
6.2.2. Ligación de Adaptadores	20
6.2.3. Preamplificación	21
6.2.4. Amplificación Selectiva	21
6.3. Electroforesis en geles de agarosa	21
6.4. Electroforesis en geles de acrilamida	22
6.5. Tinción con plata	22
6.6. Análisis de resultados	23
7. METODOLOGÍA	23
7.1. Recolección de muestras foliares de segregantes y parentales	23
7.2. Extracción de ADN de muestras de tomate de árbol	24
7.3. Cuantificación del ADN extraído	25
7.4. Reacciones correspondientes de AFLP	26
7.4.1. Restricción	26
7.4.2. Ligación de adaptadores	26
7.4.3. Preamplificación	27
7.4.4. Amplificación Selectiva	27
7.5. Electroforesis en gel de Agarosa	27
7.6. Electroforesis en gel de Poliacrilamida	28
7.7. Tinción con plata	29
7.8. Selección de pares de primers	29
7.9. Análisis de datos	30
8. RESULTADOS	31
8.1. Extracción y cuantificación de ADN	31
8.2. Técnica AFLP	31
8.2.1. Restricción del ADN	31
8.2.2. Ligación de adaptadores a los fragmentos de ADN	31
8.2.3. Amplificación preselección	32

	x
8.2.4. Selección de primers	32
8.2.5 Amplificación selectiva	33
8.3 Nivel de polimorfismo	33
8.4. Análisis de Agrupamiento	35
8.5. Análisis de Bootstrap	39
8.6. Análisis de Componentes Principales (PCA)	41
9. DISCUSIÓN	44
9.1. Extracción de ADN	44
9.2. Evaluación de la Técnica AFLP	44
9.3. Diversidad Genética	45
9.4. Confiabilidad de los Agrupamientos	49
9.5 Análisis de dispersión	50
9.6. Análisis de segregantes	50
9.7. Herencia de la característica de resistencia a la antracnosis	52
10. CONCLUSIONES	52
11. RECOMENDACIONES	53
12. REFERENCIAS	55
13. TABLAS	62
Tabla 1. Muestras de segregantes de los cruces <i>S. uniloba</i> x <i>S. betaceum</i> var. amarilla y roja recolectadas de la granja experimental INIAP - Tumbaco.	62
Tabla 2. Matriz de datos binarios obtenidos con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC).	63
Tabla 3. Combinaciones de primers selectivos utilizados para caracterización de segregantes de tomate de árbol y datos de polimorfismo.	64
14. FIGURAS	64
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de ADN restringido y ligado a adaptadores.	65

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de ADN amplificado preselectivamente.	66
Figura 5. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de ADN de segregantes de tomate de árbol amplificado con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC)	67
Figura 7. Dendograma generado con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC), por NTSYS pc 2.11, UPGMA, usando el coeficiente de Jaccard	69
Figura 8. Dendograma generado con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard	70
Figura 9. Dendograma generado con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.	71
Figura 10. Dendograma generado con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.	72
Se observa la formación de 6 grupos, no fue posible establecer un patrón para la distribución de los segregantes en éstas asociaciones dado que dentro de éstos se puede encontrar individuos procedentes de cruces de S. uniloba x S. betaceum var. amarilla y S. uniloba x S. betaceum var. roja.	72
Figura 11. Dendograma generado con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.	73
Figura 12. Dendograma generado con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.	74
Figura 13. Dendograma obtenido de la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.	75
Figura 14. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC)	76
Figura 15. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG).	77
Figura 16. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT).	78
Figura 17. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC).	79
Figura 18. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG).	80
Figura 19. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG).	81
Figura 20. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA).	82

- Figura 21. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC). 83**
- Figura 22. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG). 84**
- Figura 23. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT). 85**
- Figura 24. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC). 86**
- Figura 25. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG). 87**
- Figura 26. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG). 88**
- Figura 27. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA). 89**
- Figura 28. Gel de poliacrilamida en el que se evidencia la ausencia de bandas en los padres y la presencia de la misma en los segregantes. 90**

1. Introducción

Los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) se encuentran a lo largo de la Sierra ecuatoriana, y con el paso del tiempo han probado tener un gran potencial comercial tanto para su consumo interno como externo (SICA, 2001). Este potencial económico ha despertado el interés de varios agricultores hacia este producto, fomentando así la investigación sobre el mismo en países vecinos como Colombia, y en otros más lejanos como Nueva Zelanda (SICA, 2004). En Colombia se conoce la especie *Solanum uniloba*, pariente cercano de *S. betaceum* y completamente compatible, la cual ha probado tener resistencia al ataque de la antracnosis, enfermedad que afecta en gran medida el cultivo de *S. betaceum* en el Ecuador. Por esta razón, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIAP junto con la Universidad San Francisco de Quito unieron esfuerzos por caracterizar dos poblaciones segregantes de cruces interespecíficos de *S. betaceum* var. amarilla y var. roja con *S. uniloba*, para determinar el nivel de aporte de *S. uniloba* a la variabilidad genética del tomate de árbol ecuatoriano, y la posibilidad de heredar la característica de resistencia a la antracnosis. Para realizar este análisis de variabilidad se utilizó marcadores moleculares AFLP por su capacidad de generar un gran número de bandas por cada combinación de primers.

1.1. Características generales del tomate de árbol

Estudios sobre el origen del tomate de árbol han establecido que éste proviene de la vertiente oriental de los Andes, comprendiendo específicamente a Colombia, Perú y Ecuador (SICA, 2001).

En cuanto a su morfología, se lo considera un arbusto semileñoso que puede alcanzar entre 2 y 3 metros de altura (Albornoz, 1989). Su fruto es de forma ovoidal, punteada en su extremo inferior y con un cáliz cónico (Bohs, 1989); está cubierto por una cáscara cerácea brillante que puede ser de color amarillo, anaranjado, morado o rojo, según su variedad.

Es una especie que crece en climas templados y fríos, manteniéndose en un rango desde los 13°C hasta los 24°C, siendo la óptima entre 16 °C y 19 °C. Una vez plantado, la producción comienza entre los 18 y 24 meses, y posteriormente se puede disponer del fruto cada 5 meses aproximadamente, reportándose una vida útil de la planta de 10 a 12 años (SICA, 2004).

Su polinización puede ser autogámica así como alogámica, ya que sus flores son abiertas y muy visitadas por abejas melíferas que buscan néctar y polen, razón por la cual se ha visto semillas híbridas de cruzamientos intervarietales en cultivos realizados en campos abiertos (Albornoz, 1989).

Puede propagarse por medio de semillas, y debido a su capacidad alogámica, en el Ecuador se ha obtenido plántulas genéticamente diferentes unas de otras, por lo que se puede concluir que mediante este medio, en el país no se mantiene un grado aceptable de pureza varietal (Albornoz, 1989).

1.2. Importancia del tomate de árbol en la dieta humana

El fruto del tomate de árbol tiene una alta concentración de vitamina C, al igual que de fitoquímicos tales como antocianinas, beta – carotenos, luteína, beta – cryptoxantina y zeaxantina, los cuales han sido asociados con efectos protectivos contra enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Meadows L., 2002). Además se ha podido encontrar cantidades modestas de fibra (Meadows L., 2002). Su alto contenido de pectina hace posible su utilización en mermeladas y jaleas, y además se ha visto que tiene cantidades altas de potasio y fósforo, minerales que no son abundantes en otros tipos de frutas (Bohs, 1989).

Todas estas características alimenticias del tomate de árbol y su agradable sabor han hecho que esta fruta sea considerada óptima para el consumo humano, ya sea en jugos, conservas, cocinada, fresca e incluso en cocina gourmet con fines palatables y hasta medicinales en Ecuador (SICA, 2001).

1.3. Importancia Económica del tomate de árbol en el Ecuador

En el Ecuador y otros países andinos como Colombia, Bolivia y Perú se cultiva el tomate de árbol con fines comerciales, aunque por las características del fruto y su aceptación en el mercado, Nueva Zelanda también lo ha sumado a su lista de cultivos de importancia (Bohs, 1994).

El tomate de árbol se cultiva en el Ecuador principalmente en los Valles Interandinos temperados con un área de aproximadamente 5000 hectáreas, un rendimiento entre 60 a 80 Ton/ha/año y es exportada principalmente a países como Holanda, Bélgica y Canadá (Cadena, 2000).

Según Cadena (2000), el Ecuador inicia el cultivo de esta especie en 1970, y desde esta fecha ha incrementado su área cosechada y su producción, de tal manera que para 1991 la superficie cultivada fue de 1.020 hectáreas y para 1998 de 2.287 hectáreas; mientras que la producción nacional en 1991 fue de 10.865 ton en comparación con la producción nacional para el año de 1998, que fue de 21.163 ton. Estos datos demuestran que en el período desde 1991 a 1998 la superficie cosechada y la producción se han duplicado.

Es importante mencionar que Colombia fue el primer país Sudamericano en exportar *Solanum betaceum* a Europa mientras que Ecuador abrió su mercado al exterior a finales de la década de los 80. Lastimosamente el Ecuador, debido a problemas con la homogenización del fruto en cuanto a su color y tamaño, la mosca de la fruta, y demás enfermedades, no ha logrado ampliar el mercado de exportación hasta el presente (SICA, 2001).

Los mercados que actualmente importan el tomate de árbol y que mantienen una demanda ascendente son: Estados Unidos, Bélgica, Canadá, Suecia, Suiza, Alemania, España, Finlandia, Dinamarca, Holanda y Reino Unido (Cadena, 2000).

1.4. Afecciones del cultivo

Dado que el tomate de árbol se ha convertido en Ecuador en un frutal muy apreciado y de notable rentabilidad, las áreas dedicadas a su cultivo se han incrementado desde la década de los 80, y con esto, han aparecido diferentes plagas y afecciones que causan detrimento de la productividad y el tiempo de vida de las plantas (Velasteguí, 1988).

Uno de los principales insectos plaga que afectan al tomate de árbol es el gusano alambre (*Coleoptera elateridae*), el cual causa daño en estado larvario. Se presenta de manera ocasional y ataca en su mayoría a plantas jóvenes o recién plantadas (Cadena, 2000).

Adicionalmente, se encuentra en el país afecciones importantes ocasionadas por insectos tales como el chinche de las flores y fruto (*Leptoglossus zonatus*), el pulgón (*Myzus sp.*, *Aphis sp.*), y el gusano trozador (*Spodoptera sp.*), las cuales también representan un inconveniente para los fruticultores (SICA, 2001).

Por otro lado, el ataque de nemátodos (*Meloidogyne spp.*) a las raíces del tomate de árbol es uno de los problemas más graves en el centro del Ecuador, y uno de los responsables más evidentes del deterioro de las plantaciones y su muerte, lo que afecta directamente al agricultor. Sin embargo, en Nueva Zelanda y en Colombia el efecto de este nematodo, no es acentuado ya que solo se presenta en huertos aislados y en pequeñas zonas (Velasteguí, 1988). Adicionalmente a esta afección, el SICA (2001) hace mención a *Tylenorrhynchus sp.* como un problema importante, especialmente en la provincia del Tungurahua.

Además, existen hongos que causan mucho daño a los cultivos de tomate de árbol en el Ecuador. Tal es el caso del Oidio, o también conocido con los nombres de: ceniza negra, blanco de niebla o mildiú polvoso; es ocasionado por *Oidium sp.*, que también es común en Colombia y Nueva Zelanda (Velasteguí, 1988). Los síntomas de esta afección son la aparición de manchas pequeñas, redondas con bordes irregulares y de color gris o negro en el haz y envés de las hojas. En ataques

severos éstas pueden deformarse, amarillarse y caer, e incluso los pecíolos y las puntas de las ramas pueden cubrirse de manchas negras y micelios blancos (Velasteguí, 1988).

Otro de los ataques fungales más comunes en las variedades de tomate de árbol sembradas en el Ecuador, especialmente en Tungurahua, que causan pérdidas en la producción de la fruta, es el producido por el hongo *Colletotrichum sp* (Albornoz, 1989; Velasteguí, 1988). Estos hongos son capaces de ocasionar masas pegajosas de conidias que se desarrollan en acérvulos. Los acérvulos son producidos frecuentemente en anillos concéntricos, especialmente en los frutos, causando lesiones ulcerosas con el centro deprimido, gris-ceniciento rodeado de bordes oscuros (Rondón J.G, 1999). Bajo condiciones de alta humedad y altas temperaturas los efectos de la antracnosis, su densidad poblacional y su expansión pueden verse incrementados. En Colombia se ha podido corroborar estos datos ya que Rondón (1999), en su trabajo investigativo pudo medir una mayor incidencia de los hongos en los frutos de tomate de árbol en las estaciones con mayor ocurrencia de lluvias, aunque no desaparece por completo en estaciones secas, además menciona que los frutos verdes y medianos son los más susceptibles a ese patógeno en comparación con los frutos morados y maduros.

Es importante señalar que éste hongo puede dispersarse entre los frutos y plantaciones por medio de las lluvias y los flujos de agua e incluso por insectos polinizadores y coleópteros (Velasteguí, 1988).

Actualmente la manera de combatir a este patógeno ha sido mediante podas y fungicidas, pero debido a sus altos costos y a la contaminación que produce se está

buscando otros mecanismos para solucionar este problema. Adicionalmente se ha encontrado especies silvestres que presentan una resistencia a este hongo en Colombia, como es el caso de *Solanum uniloba* (Comunicación personal INIAP, 2007).

1.5. Marcadores moleculares

1.5.1. Breve descripción de técnicas y sus usos

En un principio, cuando no se disponía de las técnicas modernas de biología molecular, la mayoría de estudios genéticos y de mejoramiento se realizaban a base de características morfológicas o fenotípicas, las cuales tienen muchas limitaciones, tal como la existencia de pocas diferencias entre plantas del mismo linaje, lo que disminuye notablemente la posibilidad de asociarlas con genes de interés agronómico o económico (Grattapaglia D., 2000), además su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos (Azofeifa A., 2006).

Posteriormente, dada la necesidad de contar con marcadores de calidad superior se desarrolló la tecnología de los marcadores moleculares con el descubrimiento de los marcadores isoenzimáticos. Los cuales se basan en el principio de que las isoenzimas son un grupo de varias formas de una misma enzima que se pueden encontrar en una misma especie como resultado de la presencia de más de un gen codificado para cada una de éstas enzimas (Grattapaglia D., 2000). Con esta técnica se aumentó el número de marcadores genéticos que se podían analizar e incluso se abrió la posibilidad de analizar cualquier especie de planta. Algunas ventajas que presentaron este tipo de marcadores fue su herencia codominante, su independencia del medio ambiente y que no interaccionan con otros marcadores (Nuez F., 2000).

A continuación aparecieron los marcadores moleculares de ADN, los cuales utilizan exclusivamente esta biomolécula para el análisis de un individuo o de poblaciones enteras (Azofeifa A., 2006). Estos pueden dividirse en dos grandes grupos, el primero consiste de aquellos que no utilizan la PCR (Polimerase Chain Reaction) para su desarrollo, tales como los RFLP; el segundo grupo está formado por aquellos marcadores que utilizan en su técnica primers arbitrarios o semiarbitrarios y la PCR como los RAPD's (Random Amplified Polimorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), entre otros (Azofeifa A., 2006).

Los primeros marcadores basados en la variabilidad del ADN fueron los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) que se desarrollaron a principios de la década de los 80 (Nuez f., 2000). Estos son capaces de detectar polimorfismos producidos al digerir ADN con enzimas de restricción.

Los RFLP se generan por rearrreglos o mutaciones que dan lugar a inserciones, deleciones o inversiones de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, lo que ocasiona que se formen varios fragmentos de diferente longitud entre distintos individuos, permitiendo así su identificación y diferenciación de otro (Azofeifa A., 2006).

La técnica consiste en fragmentar el ADN mediante enzimas de restricción, separación de los fragmentos por medio de electroforesis en geles de agarosa, transferencia a membranas de nylon o nitrocelulosa y finalmente la hibridación de estos fragmentos con secuencias homólogas de ADN marcadas radioactivamente o con compuestos que desencadenen una reacción de luminiscencia (Grattapaglia D, 2000).

Las ventajas que presenta el uso de RFLPs son que, por la naturaleza del ADN, es posible cubrir todo el genoma del individuo (Grattapaglia D., 2000) y se comportan como marcadores codominantes (Azofeifa A., 2006). Otra ventaja es que se pueden utilizar varias enzimas de restricción al mismo tiempo, las que combinadas con un número casi ilimitado de secuencias clonadas, pueden generar una gran cantidad de marcadores (Grattapaglia D., 2000).

En cuanto a las limitaciones de los RFLPs se argumenta que, por los varios pasos que requiere la intervención humana, es una técnica difícil de automatizar, además se debe disponer de una biblioteca de sondas antes de comenzar cualquier investigación, y finalmente se encuentra el alto costo que representa llevar a cabo esta técnica ya que se necesita de personal técnico con habilidades para la manipulación de ADN recombinante, y de instalaciones adecuadas para el uso y desecho de material radiactivo (Grattapaglia, 2000).

Con la implementación de técnicas de biología molecular nuevas, como el PCR, el horizonte de los marcadores moleculares se abrió a un gran número de posibilidades. Tal es el caso del nacimiento de un nuevo grupo de marcadores (aquellos que hacen uso de la técnica de PCR), donde se puede encontrar a los RAPDS (Random Amplified Polimorphic DNA), los cuales se basan en la amplificación por PCR del ADN genómico con la ayuda de un solo primer o cebador, el mismo que consta de aproximadamente 10 nucleótidos, de secuencia arbitraria (Nuez F., 2000). Mediante esta técnica se puede amplificar de manera randómica segmentos del genoma de un individuo en zonas en las que los primers se hibridan con el ADN a estudiar en ambas cadenas y en direcciones opuestas (Grattapaglia D., 2000).

Los marcadores RAPD tienen la característica de ser dominantes, lo que significa que solo un alelo por locus puede ser distinguido en la electroforesis por su presencia como banda (Azofeifa A., 2006), es decir, si se tiene una banda en el gel esta puede ser interpretada como proveniente de un genotipo homocigoto dominante o heterocigoto, mientras que los genotipos homocigotos recesivos son identificados como la ausencia de bandas.

Una de las ventajas de esta técnica es la cantidad de marcadores que se generan, y en comparación con los RFLP, los RAPD no necesitan de sondas para su análisis y la cantidad de ADN inicial que se requiere es mucho menor (Azofeifa A., 2006). En cuanto a las desventajas de los RAPD se puede mencionar la dificultad de reproducir los resultados obtenidos por los investigadores y la limitación de la capacidad de realizar análisis de los mismos marcadores en individuos genéticamente distantes, ya que aunque se utilice los mismos primers, no se asegura la amplificación de los fragmentos de ADN correspondientes a los mismos loci (Grattapaglia D., 2000).

Por otro lado se encuentran los marcadores basados en PCR de secuencias específicas, tales como los microsatélites, también conocidos como SSR (Simple Sequence Repeats) o STRs (Short Tandem Repeats). Estos marcadores fueron descritos por primera vez en 1982 por Hamada et al. (Nuez F., 2000) y se basan en experimentos de los años 80 donde se establece que los genomas de organismos eucariontes tienen diferentes clases de secuencias repetidas en altas cantidades (Grattapaglia D., 2000). Estas secuencias están formadas por sucesiones de 1 a 6 nucleótidos adyacentes repetidos a manera de tándem (Nuez F., 2000). Entre las

funciones que se les atribuye se incluye la regulación génica y la de actuar como señales para la conversión génica y la recombinación (Nuez F., 2000).

Es importante señalar que los segmentos amplificadas a partir de estos sitios son altamente polimórficos debido a la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos, dicho en otras palabras, cada segmento microsatélite tendrá una cantidad de pares de bases variable debido a inserciones o deleciones en la secuencia repetida, lo que los hace extensamente polimórficos (Grattapaglia D., 2000).

Una de las ventajas que ofrecen estos marcadores se encuentra en su expresión codominante y de multiallelismo, lo que los convierte en una herramienta muy poderosa para estudios de ligamiento, mapeo genético y para estudios genéticos de poblaciones (Grattapaglia D., 2000). Otra ventaja que presentan los microsatélites es que debido a que estas secuencias repetitivas son altamente conservadas entre especies relacionadas, permite su transferencia entre especies y hasta entre géneros (Grattapaglia D., 2000). Entre las desventajas que se pueden encontrar, figura la dificultad y cantidad de trabajo que requiere construir la biblioteca de fragmentos genómicos para el organismo a estudiar, la selección de los clones por medio de sondas sintéticas, la secuenciación de los clones positivos y finalmente la construcción del par de primers específicos para las secuencias flanqueantes de los microsatélites (Nuez F., 2000).

1.6. Marcadores Moleculares AFLP

Una de las técnicas más utilizada en estos días para la detección de polimorfismos de ADN son los AFLPs. Éstos fueron desarrollados en el año 1995 con la finalidad de obtener un gran número de marcadores moleculares distribuidos a lo largo de un genoma. Se basan en la combinación de dos técnicas, la digestión del ADN blanco con enzimas de restricción propia de los RFLPs, y la PCR, utilizando el fundamento de los marcadores RAPD (Azofeifa A., 2006; Nuez F., 2000).

Los marcadores moleculares AFLP consisten en la amplificación selectiva mediante PCR de fragmentos digeridos del ADN (Vos P., 1995). La técnica se la lleva a cabo en 4 pasos, el primero es la digestión del ADN a estudiar mediante 2 endonucleasas, una de corte frecuente (Mse I), con un sitio de restricción de 4 pb, y otra de corte no frecuente (Eco RI) con un sitio de restricción de 6 pb. El segundo paso consta de la ligación de adaptadores de doble cadena, diseñados para su unión específica con los extremos de los fragmentos de ADN, ya digeridos por las enzimas de restricción. Es importante mencionar que estos adaptadores sirven como sitio de reconocimiento para los primers empleados en la preamplificación, y que a su vez permitirán la amplificación de los fragmentos digeridos aún sin conocer su secuencia (Vos P. et al, 1995). El tercer paso consiste en una amplificación llamada preselectiva, en la que se utilizan primers correspondientes a los sitios de corte de las enzimas Mse I y EcoRI a los que se les ha añadido al azar un nucleótido selectivo en su extremo 3', con la finalidad de amplificar un subset de fragmentos digeridos equivalente a la cuarta parte del número total (Nuez F., 2000). Finalmente queda el cuarto paso, conocido como amplificación selectiva, en donde el producto de la PCR anterior vuelve a amplificarse, pero esta vez con cebadores a los que se les ha añadido 2 nucleótidos en

su extremo 3' a continuación del primer nucleótido selectivo para asegurar una amplificación mucho más específica (Azofeifa A., 2006). El producto de la amplificación selectiva se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y se tiñe con nitrato de plata para su posterior análisis.

Dentro de las ventajas que presenta esta técnica se encuentra la capacidad de obtener un número muy alto de fragmentos que se revelan en un solo gel, conocidos como fingerprints (Grattapaglia A., 2000). Además es considerado como un marcador muy reproducible por utilizar la técnica de la PCR (Nuez F., 2000). En cuanto a las limitaciones de esta técnica se tiene que es un marcador muy sensible a las condiciones bajo las que se trabaja, tales como la temperatura de los ciclos de la PCR, y la calidad y cantidad de ADN que se necesita para su desarrollo (Vos P. et al, 1995). Además es un marcador dominante y su realización es más compleja y cara que los RAPD o RFLP (Nuez F., 2000).

1.7 Comparación de la técnica de AFLP con RAPD, RFLP y SSR

Como se ha mencionado con anterioridad la ventaja más competitiva que aporta los marcadores AFLP es su gran capacidad para formar un alto número de fragmentos (bandas visibles en un gel) en un solo ensayo, en comparación con los SSR, RAPD y RFLP. Esta característica ha hecho que esta técnica sea utilizada ampliamente en estudios de diversidad genética, para la construcción de mapas genéticos (Vos P. et al, 1995) y para la identificación de marcadores moleculares ligados a una característica de interés (Blanco M. et al, 2005).

Por otro lado, se puede mencionar también que una de las ventajas que ofrecen los marcadores moleculares AFLP exclusivamente sobre los microsatélites, es que no necesitan de la información sobre la secuencia de las regiones flanqueantes de las secuencias repetitivas, ni de la elaboración de cebadores complementarios a estas secuencias para identificar polimorfismos (Grattapaglia A., 2000).

En cuanto a los marcadores RAPD, su desventaja más grande es la dificultad de reproducir los resultados obtenidos, ya que aunque se utilice los mismos primers, no se asegura la amplificación de los fragmentos de ADN correspondientes a los mismos loci en los diferentes estudios realizados (Grattapaglia D., 2000). Este problema no se presenta cuando se trabaja con marcadores AFLP, ya que su desarrollo se basa en la utilización de enzimas de restricción y la técnica de PCR, lo que permite obtener fragmentos de ADN amplificados con una alta especificidad, por lo que los mismos resultados pueden ser obtenidos sin importar que el análisis sea repetido por otro investigador si utiliza el mismo material y los mismos pares de primers.

Si se compara los marcadores AFLP con los RFLP se puede encontrar una ventaja importante de los AFLP ya que los resultados de las restricciones, ni en ningún paso de su desarrollo, se necesita la transferencia del producto a una matriz o su hibridación con sondas marcadas, por lo que se puede obtener resultados a un costo menor y sin la limitación de disponer de una biblioteca con sondas marcadas.

1.8. Aplicaciones de los marcadores moleculares AFLP

Debido a la versatilidad y el alto número de fragmentos proporcionados por el desarrollo de esta técnica, la utilización de AFLPs se ha aplicado en diversos análisis,

de los cuales se muestran brevemente 2 debido a la relación con la importancia del presente estudio. Tal es el caso de la identificación del gen de resistencia al PVX de la variedad de papa silvestre *Solanum commersonii* (Blanco M., 2005), donde después de seguir todas las instrucciones para generar los fragmentos, se los separa mediante electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6%. Posteriormente se los estudia identificando polimorfismos en el patrón de bandas amplificadas ligadas sólo al gen de resistencia, para lo que se utilizó el método de segregantes agrupados (BSA). Esta técnica consiste en comparar 2 grupos de muestras de ADN de individuos pertenecientes a una población, separados en este caso, por la presencia o ausencia de la característica de interés (Blanco M. et al, 2005).

Una vez encontrado el patrón de bandas que muestran polimorfismos y que parecen estar ligados al gen de importancia, se realiza una matriz que conste del nombre de cada individuo y una designación numérica para cada banda que permita saber si estaba presente o ausente en el gel (0 presencia, 1 ausencia y 2 no concluyente), a esta matriz se la ingresa en un software estadístico para analizarla con el fin de identificar el gen o grupo de genes que proporcionan la característica de resistencia o susceptibilidad a la planta, el mismo que posteriormente proveerá al investigador de grupos de ligamiento con los marcadores AFLP utilizados.

En esta investigación, se concluye que los marcadores moleculares AFLP presentaron gran confiabilidad, sensibilidad y permitieron encontrar marcadores extremadamente informativos por encontrarse cerca del locus de resistencia al PVX (Blanco M, 2005).

Otra de las aplicaciones de estos marcadores puede evidenciarse en estudios de diversidad genética, como el que se llevó a cabo en Uruguay, donde se planteó analizar las relaciones genéticas entre el arroz maleza y las variedades comerciales de 26 accesiones correspondientes a 6 cultivares, para tratar de encontrar una solución para el control de estas malezas en los campos uruguayos (Federici M., 2001).

En esta investigación se logró obtener distintos marcadores, los cuales después de ser procesados por programas informáticos dan a conocer 3 distintos agrupamientos de las muestras, los cuales son consistentes con sus características morfológicas más no con su localización (Federici M., 2001).

Como producto de este estudio se formuló una hipótesis correspondiente a la evolución del arroz maleza, la cual sugiere que en tiempos diferentes hubo una selección disruptiva para las características silvestres y características domésticas. Posteriormente el arroz maleza presente en los cultivares desarrolló dos estrategias para su supervivencia, la primera que consiste en imitar al cultivo comercial y la segunda de cruzarse con las variedades comerciales (Federici M., 2001).

Debido a las ventajas señaladas acerca de los marcadores moleculares AFLP en estudios de diversidad genética, se decidió utilizarlos en esta investigación para determinar si el producto de los cruces, realizados por el INIAP, entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja X *S. uniloba*, pueden aportar variabilidad genética a las plantas de tomate de árbol ecuatorianas, y con esto aumentar las

posibilidades de heredar la característica de resistencia a la antracnosis en variedades de tomate de árbol usadas a nivel nacional.

2. Objetivo General

- Caracterizar molecularmente las poblaciones segregantes provenientes de los cruces, realizados por el INIAP, entre *Solanum betaceum* var. amarilla y *Solanum betaceum* var. roja X *Solanum uniloba*, mediante marcadores moleculares AFLP.

3. Objetivos específicos

- Determinar la variabilidad genética de las poblaciones segregantes de los cruces realizados por el INIAP entre *Solanum betaceum* var. amarilla y *Solanum betaceum* var. roja X *Solanum uniloba*, mediante marcadores moleculares AFLP.
- Comprobar si los segregantes de los cruces entre *Solanum betaceum* var. amarilla y *Solanum betaceum* var. roja X *Solanum uniloba* hechos por el INIAP fueron realizados con los parentales registrados.

4. Justificación

La importancia de este estudio radica en que con las ventajas señaladas anteriormente acerca de los marcadores moleculares AFLP en estudios de diversidad genética, se puede determinar de manera efectiva si los parentales de los segregantes de los cruces entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja X

S. uniloba corresponden con aquellos registrados por el INIAP, para así determinar si esta fase del programa de fitomejoramiento del tomate de árbol ecuatoriano fue realizada con éxito. Otro aspecto que le suma importancia al presente estudio es que promueve la cooperación interinstitucional entre el INIAP y la Universidad San Francisco de Quito, siendo el INIAP el encargado de los estudios llevado a cabo con técnicas tradicionales y la universidad aquella que realiza los estudios moleculares.

Por otro lado, debido a la importancia económica del cultivo de tomate de árbol y su demanda tanto interna como externa, es necesario mejorar los cultivos. Evitar los daños que son causados por diferentes afecciones puede ampliar el mercado internacional del tomate de árbol. Uno de los problemas de especial atención es el causado por los hongos pertenecientes a *Colletotrichum sp.* ya que han sido un grave inconveniente en los cultivos de *S. betaceum* del país al causar serios detrimentos a la fruta y por ende a su comercialización a nivel internacional (Velasteguí J, 1988). Lastimosamente los métodos actuales para controlar esta afección, no son eficaces, por lo que se intenta producir variedades resistentes al ataque de la antracnosis. En el país las variedades de tomate de árbol han probado tener una variabilidad genética bastante estrecha (Ordoñez S., 2007; Peñafiel N., 2007; Chalampunte D., 2005; Tapia et al., 2006), por lo que ha sido necesario buscar fuentes alternas que aporten con diversidad genética a nuestros cultivos. Una solución puede ser *S. uniloba*, una especie silvestre, cercanamente emparentada a *S. betaceum*, que ha probado tener resistencia a la antracnosis. La importancia de este estudio radica en realizar estudios moleculares mediante marcadores AFLP a las plantas obtenidas de los cruces entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var.

roja X *S. uniloba* y a sus respectivos parentales para caracterizar a la población segregante y determinar su variabilidad genética, con el fin de determinar si este aporte de variabilidad genética aumenta la posibilidad de herencia de la característica de resistencia a la antracnosis por parte de los segregantes de los cruces de tomate de árbol amarillo y rojo X *S. uniloba*.

5. Área de estudio

La realización de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Cumbayá – Ecuador. La recolección de las muestras se realizó en la granja experimental del INIAP, en Tumbaco, Provincia de Pichincha.

6. Materiales, Reactivos y Equipos

6.1. Material Vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se recolectaron muestras de hojas jóvenes de segregantes provenientes del cruce entre *Solanum uniloba* x *Solanum betaceum* var. roja y var. amarilla de la granja experimental del INIAP localizados en Tumbaco, Provincia de Pichincha (Tabla 1).

6.1.1. Extracción de ADN de los segregantes

- CTAB 2X

- B – mercaptoetanol (10 μ l/ml de CTAB)
- Cloroformo / alcohol isoamílico 25:1
- Isopropanol
- Etanol al 70 %
- Buffer TE
- Agua destilada

6.1.2. Cuantificación de ADN

- Espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraespec 2000
- Celda de cuarzo
- Buffer TE 1X
- Agua destilada

6.2. Kit de amplificación AFLP [®] Invitrogen [™]

6.2.1. Restricción

- Buffer de reacción 5X
- Enzimas EcoRI/MseI
- Agua destilada
- Muestra de ADN a analizar (100 ng/ μ l)

6.2.2. Ligación de Adaptadores

- Soluciones de ligación y adaptadores
- Enzima T4 DNA Ligasa

- Producto de restricción
- Centrífuga Eppendorf 5415D

6.2.3. Preamplificación

- Mezcla de primers de Preamplificación
- Buffer para PCR 10X con Mg
- Taq polimerasa
- Muestra de ADN ligado
- Termociclador Biometra T personal

6.2.4. Amplificación Selectiva

- Primers para EcoRI
- Primers para MseI
- Buffer para PCR 10X con Mg
- Taq polimerasa
- Producto preamplificado diluido (1:50)
- Agua destilada estéril

6.3. Electroforesis en geles de agarosa

- Agarosa SEAKEM
- SiberSafe (1 µl de SiberSafe/10 ml de gel de agarosa)
- Cámara de electroforesis MaxciCell EC360M
- Cámara de fotografía digital Kodak DC290 Zoom

- Software Kodak 1D
- Fuente de poder EC – Apparatus Cooperation EC20607 Series 90

6.4. Electroforesis en geles de acrilamida

- Fuente de poder BIORAD *Powerpac HVTM*
- Cámara de electroforesis Vertical BIORAD *Sequi – Gen GT Sequencing cell*
- Poliacrilamida al 6%
- Persulfato de amonio al 1%
- TEMED
- Ladder 100bp Invitrogen
- Bluejuice
- Repel
- Bind Silane
- TBE 1X

6.5. Tinción con plata

6.5.1. Protocolo Benbouza et al. (2006)

6.5.1.1. Solución fijadora y de parada

- Ácido acético glacial 10 ml
- Etanol absoluto 200 ml
- Agua destilada 1800 ml

6.5.1.2. Solución de tinción

- Nitrato de plata 3 gr
- Formaldehído al 37% 3 ml
- Agua destilada 2000 ml

6.5.1.3. Solución de revelado

- Formaldehído al 37% 4 ml
- Hidróxido de sodio 30 gr
- Agua destilada 2000 ml

6.6. Análisis de resultados

- Programa informático NTSYSpc 2.11
- Programa informático Winboot

7. Metodología

7.1. Recolección de muestras foliares de segregantes y parentales

Las muestras de segregantes de tomate de árbol se recolectaron en la granja experimental INIAP – Tumbaco, Pichincha. Las plantas estaban rotuladas según el cruce del que provenían y un número de identificación. La distribución de las plantas en el campo estaba regida conforme a los cruces realizados, disponiéndose en distintas hileras las plantas provenientes del cruce *S. uniloba* X *S. betacea* var.

amarilla y *S. uniloba* X *S. betaceum* var. *rojo*. Los parentales *S. uniloba*, *S. betacea* var. *amarilla* y *S. betaceum* var. *rojo*. se encontraban también en la granja pero en una hilera independiente.

Se recolectó entre 5 a 8 hojas grandes, verdes y jóvenes de cada planta, y se las ubicó en envolturas plásticas con su respectiva identificación dentro de un cooler con gel refrigerante para mantenerlas frías y prevenir la degradación del ADN hasta llevarlas al laboratorio de la Universidad San Francisco de Quito. (Tabla1).

7.2. Extracción de ADN de muestras de tomate de árbol

Se tomó pequeños segmentos de las hojas más grandes, jóvenes y verdes recolectadas con anterioridad en la granja experimental del INIAP – Tumbaco de 20 plantas de cruces entre *Solanum uniloba* X *Solanum betacea* var. *amarilla* y *Solanum uniloba* X *Solanum betaceum* var. *rojo* (10 segregantes del cruce *Solanum uniloba* x *Solanum betaceum* var. *roja* y 10 segregantes del cruce *Solanum uniloba* x *Solanum betaceum* var. *amarilla*), además de los parentales, y se las maceró en un mortero con 800 µl de CTAB y 10 µl de β – Mercaptoetanol hasta obtener una solución acuosa homogénea. Se transfirió esta a un tubo eppendorf de 1.5 ml rotulado apropiadamente y se la incubó a 62 °C por una hora agitándola cada 15 minutos.

Se añadió 500 µl de solución cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta formar una mezcla homogénea y se la dejó reposar por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 14000 RPM, se

transfirió con la ayuda de una micropipeta la fase acuosa transparente a otro tubo eppendorf rotulado y se añadió un volumen equivalente de isopropanol a 4 °C.

A continuación se invirtió el tubo varias veces hasta que se evidenció la presencia de ADN, se lo centrifugó por 3 minutos a 5000 RPM y se descartó el sobrenadante cuidando de que el pellet no se pierda en el descarte. Finalmente se lavó el ADN con 800 µl etanol al 70% agitando hasta lograr el desprendimiento del pellet del fondo del tubo, se removió el etanol con una micropipeta. Se dejó secar el ADN a temperatura ambiente hasta que el alcohol se evaporó y en último lugar se resuspendió el ADN en 100 µl de TE estéril.

7.3. Cuantificación del ADN extraído

El ADN extraído fue cuantificado con la ayuda del espectrofotómetro Pharmacia Biotech Electrospec 2000 a 260 nm, utilizando como blanco 3 ml de TE estéril y posteriormente midiendo la absorbancia añadiendo 5 µl de ADN de la muestra blanco a los 3 ml de TE en la celda de cuarzo. Se imprimió los resultados directamente del espectrofotómetro y de aquellos en que no fue posible, estos fueron anotados en el cuaderno de trabajo diario. Cabe resaltar que después de cada medición la celda fue limpiada con 1 ml de etanol y posteriormente con 1 ml de agua destilada y finalmente se la dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez medida la absorbancia de cada muestra se calculó la concentración de ADN según la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} * \frac{1}{FD} * 50 \text{ ng} / \mu\text{l} = [\text{ADN} \text{ ng} / \mu\text{l}]$$

Donde FD es el Factor de Dilución.

Es importante mencionar que después de haber hecho estos cálculos para todas las muestras, se realizó diluciones para tener concentraciones finales de 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

7.4. Reacciones correspondientes de AFLP

Para dichas reacciones se siguió el protocolo del kit de AFLPs con algunas modificaciones.

7.4.1. Restricción

Este proceso se realizó añadiendo en un tubo de 0,2 ml para cada muestra: 2,5 μl de buffer de reacción 5X, 1,2 μl de EcoRI/MseI, 3,8 μl de agua destilada y 5 μl de cada muestra de ADN (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Se centrifugó cada tubo por 3 segundos con el fin de que todos los reactivos caigan de las paredes, se los mezcló y se los llevó a una incubadora por 4 horas a 37 °C. Tras este proceso las muestras fueron llevadas a una congeladora inmediatamente para conservar el material genético.

7.4.2. Ligación de adaptadores

A cada una de las muestras previamente digeridas, se les añadió 12 μl de la solución de ligación de adaptadores y 0,65 μl de la enzima T4 ligasa. Posteriormente los tubos de reacción fueron centrifugados brevemente, por 3

segundos, y se los incubó a temperatura ambiente por 4 horas. A continuación las muestras fueron llevadas a la congeladora a -20 °C para conservar el ADN.

7.4.3. Preamplificación

Para cada muestra, en un tubo de 0,2 ml se adicionó 20 µl de la solución de mezcla de primers de preamplificación, 2,5 µl de buffer 10X para PCR con Mg, 0,6 µl de Taq polimerasa y 2,5 µl del producto de ADN digerido y ligado. El PCR para la preamplificación fue realizado según las indicaciones del manual del kit para AFLP de INVITROGEN. Finalmente al producto de la preamplificación se lo diluyó hasta alcanzar la proporción 1:50 con agua destilada estéril.

7.4.4. Amplificación Selectiva

Esta fase del proceso se caracterizó por la realización de 2 Master Mix. Para las 20 muestras analizadas, la Master Mix I constó de 10 µl de primer MseI (contiene dNTPs) y 90 µl de primer EcoRI. La Master Mix II estuvo compuesta de 156 µl de agua destilada, 40 µl de buffer 10X para PCR con Mg y 4 µl de Taq polimerasa. Posteriormente, en un tubo de 0,2 ml para cada muestra, se añadió 5 µl de la Master Mix I, 10 µl de la Master Mix II y 5 µl del producto preamplificado diluido (1:50). El programa de PCR utilizado fue el mismo especificado por el manual del kit de AFLP de INVITROGEN.

7.5. Electroforesis en gel de Agarosa

Con el fin de comprobar que cada una de las etapas de los AFLP fueron exitosas se realizó electroforesis en un gel de agarosa con el producto de cada una de las etapas de este proceso.

El gel fue preparado al 1,5 % de agarosa en buffer TBE 1X. Se lo calentó en un microondas hasta la ebullición, se esperó a que se enfríe hasta 40 °C, y se le añadió 10 µl de SybrSafe, se lo mezcló bien y finalmente se lo transfirió a la cámara de electroforesis donde se dejó que solidifique completamente.

Una vez solidificado el gel, se colocó 5 µl de la muestra de ADN previamente mezclada con 2 µl de Bluejuice en cada pocillo y se lo dejó correr por 45 minutos a 80 V. La foto del gel fue tomada con la cámara digital Kodak DC 290 Zoom.

7.6. Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Todos los productos de la amplificación selectiva fueron analizados en geles de poliacrilamida. Para la preparación de gel se utilizó 100 ml de poliacrilamida al 6%, 545 µl de persulfato de amonio y 109 µl de TEMED. Esta solución fue inyectada lentamente a una velocidad constante entre los vidrios de la cámara BIORAD previamente armada según lo indica el manual de la misma. Es importante señalar que tanto al vidrio donde se va a pegar el gel y su contrario fueron lavados con agua y detergente Alconnox, posteriormente limpiados con alcohol y finalmente cubiertos con Bind Xilane, en el caso del vidrio donde se va a pegar el gel, y con Repel, en el caso del vidrio contrario.

Después que la poliacrilamida se polimerizó se le adicionó aproximadamente 2 L de buffer TBE 1X a 50 °C, se ubicó el peine invertido en el frente de corrida y se limpió el exceso de urea que se depositaba en los pocillos. A continuación se cargó, pasando 1 pocillo, 3 µl de Bluejuice o de buffer de carga y se precurrió entre 15 a 30 minutos para comprobar que la calidad del gel fuera satisfactoria.

Una vez terminada la pre – corrida, se adicionó al producto final de la amplificación selectiva 5 µl de Bluejuice y se las desnaturalizó con la ayuda del termociclador TECHNE a 95 °C por 6 minutos. Finalmente se cargó estas muestras por separado en cada pocillo una vez que el exceso de urea había sido retirado de los mismos y se dejó correr por 2 horas y 45 minutos a 85 voltios a una temperatura entre 45 a 50 °C.

7.7. Tinción con plata

Para la tinción de los geles de acrilamida se siguió el protocolo establecido por Benbouza H., (2006).

7.8. Selección de pares de primers

Se probaron 10 combinaciones de primers en los 3 parentales descritos previamente. También se ensayaron 3 combinaciones de primers documentadas por Soledad Ordoñez (2007) en su tesis de grado de la Universidad San Francisco de Quito, donde también se trabajó con tomate de árbol. La calidad de cada combinación de cebadores se determinó observando el producto de la amplificación en un gel de poliacrilamida al 6%.

7.9. Análisis de datos

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN teñidos en el gel de poliacrilamida, se procedió a construir una matriz binaria de datos en el programa informático Excel de Microsoft. En ésta se registró aquellas bandas donde se pudo identificar claramente su presencia (1) o ausencia (0) para cada muestra en el gel (Tabla 2).

Para el análisis de datos se utilizó el programa informático NTSYSpc 2.11. En este programa, las matrices construidas en Excel, se analizaron y transformaron a matrices de similitud empleando el coeficiente de asociación de Jaccard.

A continuación, con las matrices de similitud obtenidas, se construyeron dendogramas para la mejor visualización de agrupamientos de los individuos; para lo que se utilizó la opción “clustering“ y dentro de ésta SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchial Nesting) y con éste finalmente se escogió la opción UPGMA y se pudo obtener los dendogramas de cada combinación de primers.

Para validar los resultados obtenidos en los dendogramas, se realizó un análisis bootstrap con la ayuda del programa informático Winboot. Se realizaron 400 permutaciones para tener un 95 % de confiabilidad en los resultados.

Por otro lado, se realizó un análisis de PCA (Principal Component Analysis) mediante el programa informático NTSYSpc 2.11 para determinar el patrón de agrupamiento de las muestras analizadas.

8. Resultados

8.1. Extracción y cuantificación de ADN

Se realizó la extracción y cuantificación del ADN de 23 muestras de hojas de plantas colectadas en la granja experimental INIAP - Tumbaco. La concentración de ADN variaba de 420 ng/μl a 2850 ng/μl por lo que fue necesario diluir las muestras para alcanzar una concentración de 100 ng/ml en un volumen total de 50 μl por muestra.. Esta concentración final se comprobó en un gel de agarosa al 1,5% como se puede ver en la Figura 1.

8.2. Técnica AFLP

8.2.1. Restricción del ADN

La digestión enzimática se realizó incubando 5 μl de ADN de cada muestra con dos endonucleasas, Eco RI y Mse I. El producto de la restricción de 10 muestras, luego de corrido en un gel de agarosa al 1,5 % (Figura 2), aparece como un barrido para cada muestra, lo que indica la fragmentación del ADN en una serie de tamaños.

8.2.2. Ligación de adaptadores a los fragmentos de ADN

Se agregó el volumen apropiado de adaptadores y ligasa (INVITROGEN) al producto de la digestión con endonucleasas. A continuación, se corrió en un gel de agarosa al 1,5% (Figura 3), para comprobar que el ADN estaba presente y

posiblemente los adaptadores habían ligado a los fragmentos. El éxito de la ligación fue corroborado mediante la amplificación preselectiva.

8.2.3. Amplificación preselectiva

Se utilizaron primers para EcoRI y Mse (INVITROGEN). El producto de este proceso fue comprobado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (Figura 4), donde se pudo ver que las 6 muestras tomadas al azar presentaban un barrido claro, lo que demuestra que los fragmentos de ADN amplificados tienen distintos tamaños y que la PCR fue realizada con éxito.

8.2.4. Selección de primers

Se probó 10 combinaciones de primers y se eligieron 7, las cuales fueron las que mejor resolución dieron en el gel de poliacrilamida al 6% utilizando la tinción con nitrato de plata descrito por Halima Benbouza et al. (2006) (Figura 6).

Cabe resaltar que las combinaciones de primers fueron probadas en los tres parentales: *S. uniloba*, *S. betaceum* var. roja y *S. betaceum* var. amarilla.

Las combinaciones de primers seleccionados fueron: 1 (M – CTC/E – AAG), 3 (M – CAC/E – ACA), 4 (M – CAG/E – AAC), 5 (M – CAC/E – AGC), 6 (M – CAC/E – AGG) (Tabla 3). Posteriormente se probaron 2 combinaciones de primers adicionales detallados en la investigación de Soledad Ordoñez en el año 2007, las cuales dieron un bandeo claro y bien distribuido, por lo que fueron seleccionadas para su utilización en esta investigación, estas combinaciones fueron: S1 (M – CAA/E – AAG) y S7 (M – CAA/E – ACT) (Tabla 3).

Es importante mencionar que la calidad de las bandas observadas pudo deberse a la tinción utilizada, ya que en algunos casos no existió el contraste adecuado de éstas con el fondo para poder identificar con claridad la presencia o ausencia de las mismas. Otra razón por la calidad de bandas observadas haya sido baja es debido a la cantidad de ADN presente en las muestras, ya que debido a que no se purificó el ADN extraído, al momento de cuantificarlo los valores pudieron corresponder al ADN presente y a las impurezas producto de la extracción. Lo que puede que no haya sido suficiente para realizarse la PCR con éxito y por lo tanto dio bandeados débiles en la electroforesis en los geles de acrilamida.

8.2.5 Amplificación selectiva

Los resultados de estas amplificaciones, realizadas con cada combinación de primers por separado, fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%. El bandeo o fingerprint pudo ser visualizado después de la tinción con nitrato de plata (Figura 5), y se pudo observar que las amplificaciones de todas las muestras fueron realizadas con éxito ya que las bandas se pudieron ver claramente, permitieron realizar la lectura del gel y posteriormente realizar la matriz binaria de datos.

8.3 Nivel de polimorfismo

El análisis de agrupamiento se realizó transformando la bandas observadas en los geles de poliacrilamida al 6% en matrices de datos binarios (1) para presencia

de bandas, (0) para la ausencia de bandas) en el programa informático Microsoft Excel como se muestra en la Tabla 2.

Un resumen sobre la cantidad de bandas observadas en el gel por cada combinación de primers y el nivel de polimorfismo se encuentra en la Tabla 3.

La combinación S1 (M – CAA/E – AAG) fue la que más bandas generó (41 bandas), con un 46,3% de polimorfismo. La segunda combinación que mostró un número elevado de bandas fue la del par de primers 3 (M – CAC/E – ACA), con la cual se obtuvieron 32 bandas, de las cuales el 62,5% (20 bandas) fueron polimórficas.

La combinación 4 (M – CAG/E – AAC), mostró 31 bandas, de los cuales el 32,3% fueron polimórficas, es decir 10 bandas mostraban diferencias entre los individuos estudiados. El par de primers 1 (M – CTC/E – AAG) y 6 (M – CAC/E – AGG) mostraron 26 bandas cada uno, pero la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG) presentó un 46,2% de polimorfismo (12 bandas) mientras que la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG) sólo un 30,8% (8 bandas).

Finalmente se encuentran las combinaciones de primers que presentaron menos bandas en el gel de poliacrilamida, tal es el caso de la combinación S7 (M – CAA/E – ACT) con 23 bandas de las cuales el 39,1% fueron polimórficas (9 marcadores) y la combinación 5 (M – CAC/E – AGC), con 16 bandas totales y un 75% de polimorfismo (12 marcadores).

Tomando en conjunto los 7 pares de primers utilizados en el estudio se obtuvieron un total de 195 bandas, de las cuales el 46,2% (90 bandas) fueron polimórficas.

8.4. Análisis de Agrupamiento

Para el análisis de agrupamiento se generó primero matrices de similitud utilizando el coeficiente de asociación de Jaccard con la ayuda del programa informático NTSYS 2.11. Posteriormente, a estas matrices se las representó gráficamente utilizando el mismo programa informático con la opción “Clustering” y SAHN y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) como se describe en la metodología. Se generó un dendograma para cada combinación de primers.

Con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC) se pudo evidenciar 5 agrupamientos entre los individuos estudiados (Figura 7). No se encontró ningún patrón de asociación entre los individuos por su color de fruto en los grupos 1, 2, 4 y 5, mientras que en el grupo 3 se encontraron agrupados 5 segregantes del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarillo. Cabe resaltar que casi la totalidad de la población descendiente de los cruces de *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarillo y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja se encuentran dispersos entre el espacio ocupado por los parentales excepto el segregante R5, el cual posee un coeficiente de similitud de 0,79 con *S. uniloba*, 0,92 con *S. betaceum* var. amarilla y 0,88 con *S. betaceum* var. roja.

En cuanto a la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), se obtuvo un dendograma en el que se muestra a *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja muy próximos el uno del otro con un coeficiente de similitud de 1, lo que indica en este caso que ambos parentales son casi iguales (Figura 8). Por otro lado también se puede evidenciar que *S. uniloba* se encuentra separada de los segregantes tanto como de los otros parentales, mostrando un 18% de distancia en relación a los parentales *S. betaceum* var. amarilla y var. roja. Otro dato interesante es que el individuo A5, proveniente del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla, se encuentra aislado del resto de las muestras, con el coeficiente de similitud más bajo respecto a sus parentales en comparación con los demás segregantes (0,66 con *S. uniloba*, 0,6 con *S. betaceum* var. amarilla, 0,6 con *S. betaceum* var. roja). Adicionalmente se puede ver la formación de 6 grupos distintos aunque sin ningún patrón de agrupamiento según el color de fruto. Finalmente, es importante mencionar que esta combinación de primers parece amplificar regiones del genoma comunes para todas las muestras ya que la mayoría presenta una similitud de 100% entre ellas.

En el caso de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT), se puede ver la formación de 5 grupos diferentes, dentro de los cuales se ve un patrón de asociación pero no el esperado, ya que existe en cada conjunto, segregantes del tomate de árbol amarillo y rojo (Figura 9). Sin embargo, se puede notar la tendencia, especialmente en los grupos 3 y 4, de asociar a los descendientes del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla en el grupo 3 y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja en el grupo 4. Adicionalmente, es importante señalar que los parentales

(variedad de tomate de árbol amarillo y rojo, así como *S. uniloba*) se encuentran dispersos a lo largo del dendograma, lo que contradice el precepto de que los segregantes deben encontrarse contenidos dentro de los parentales en este tipo de representaciones gráficas, tal como se evidenció en la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC).

En cuanto al dendograma obtenido por la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC) se puede ver la formación de 6 grupos diferentes (Figura 10). Nuevamente, no fue posible establecer un patrón para el agrupamiento de los segregantes ya que dentro de éstos se puede encontrar tanto individuos procedentes de cruces de *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja. Adicionalmente se puede evidenciar que el parental *S. uniloba* se encuentra aislado de todas las agrupaciones, mostrando un coeficiente de similitud de 0,73 con *S. betaceum* var. amarilla y 0,75 con *S. betaceum* var. roja. Es importante recalcar que con esta combinación de primers se obtuvo un 50% de polimorfismo entre las muestras.

En el dendograma obtenido por la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG), se puede observar la formación de 5 grupos (Figura 11). En éstos no se encuentra un patrón de asociación que agrupe a todos los segregantes según su cruce, a excepción del grupo 2 donde la mayoría de los segregantes de tomate de árbol rojo se encuentran agrupados. Los grupos 3 y 4 muestran una tendencia a agrupar los segregantes de tomate amarillo, aunque también se puede encontrar la presencia de un individuo proveniente del cruce de *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja. (R2) y el parental *S. betaceum* var. roja.

Es interesante resaltar que este dendograma es muy similar al obtenido de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT). La formación de grupos en ambos casos es muy parecida, salvo por pequeñas excepciones. Es así que se puede encontrar al grupo 5 del dendograma de la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG) idéntico al grupo 2 del dendograma de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT). El grupo 2 del dendograma derivado de la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG) es muy parecido al grupo 4 del dendograma de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT) excepto por 2 muestras. De igual manera, el grupo 3 del dendograma de la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG) es muy parecido al grupo 3 del dendograma de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT) salvo por 3 muestras.

Finalmente, se tiene a los dendogramas derivados de las combinaciones de primers 1 (M – CTC/E – AAG) (Figura 12) y 3 (M – CAC/E – ACA) (Figura 13), los cuales resultaron ser poco útiles para la investigación ya que en éstos no se pudo analizar todas las muestras debido a la baja resolución de su patrón de bandas en el gel. Sin embargo, en ambos se encuentra a los parentales *S. betaceum* var. amarilla y roja asociados con un coeficiente de similitud de 1, lo que quiere decir que son casi idénticos. Por otro lado, el dendograma de la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG) muestra nuevamente al segregante A5 y a *S. uniloba* aislados del resto de muestras.

8.5. Análisis de Bootstrap

Con el fin de avalar los resultados obtenidos en los dendogramas descritos anteriormente, se realizó un análisis de Bootstrap con la ayuda del programa informático Winboot.

Con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC) se obtuvo valores del bootstrap que varían desde 95,0% hasta un 9,0% de certeza en la formación de los grupos (Figura 14). Un dato obtenido de este análisis estadístico que vale la pena recalcar es el de la agrupación de los parentales del tomate de árbol amarillo y rojo, el cual muestra uno de los valores más altos conseguidos en este ensayo con un 67%.

En cuanto a la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), se puede ver que los valores del bootstrap varían desde 100% hasta 36% de confianza en la formación de los grupos (Figura 15). Además, muestra que la agrupación entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja tiene un 100% de confianza al igual que la agrupación entre 2 de los segregantes del tomate de árbol amarillo (A19 y A4).

En el caso de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT), los valores del análisis bootstrap varían entre 79,3% y 18,3% de certeza en la formación de las agrupaciones (Figura 16). Es importante resaltar que en este caso se encuentran algunas variaciones en el esquema de los conglomerados obtenidos con el programa informático Winboot en comparación con los generados por el programa informático NTSYSpc 2.11 con la misma combinación de primers. El

caso más evidente es aquel donde se encuentra un valor de 40,8% de certeza en la agrupación de los parentales *S. betaceum* var. amarilla con *S. betaceum* var. roja; mientras que en el dendograma no se encuentra tal conglomerado (Figura 9).

Con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC) se puede ver que los valores del bootstrap varían desde 73,0% hasta 6,5% en la certeza de la formación de los grupos. Sin embargo, las distribuciones espaciales de los agrupamientos varían en comparación con aquellas obtenidas con el dendograma realizado de la misma combinación de primers (Figura 17).

En cuanto al análisis llevado a cabo con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG), se puede ver que los valores del análisis bootstrap varían entre 66,3% y 4,3% (Figura 18). Es importante mencionar que en este caso, las agrupaciones y ramificaciones que se obtuvieron mediante esta técnica son ligeramente diferentes a los obtenidos en los dendogramas generados por el programa NTSYSpc 2.11.

En cuanto a los valores de bootstrap de la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG), varían desde el 99,5% hasta 24,3% (Figura 19). Es importante mencionar que en este análisis no se incluyeron todas las muestras, ya que como se mencionó anteriormente el patrón de bandas de algunas muestras en el gel de poliacrilamida no fue claro. Sin embargo, el valor más alto obtenido corresponde a la agrupación de los parentales *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja (99,5%).

Finalmente en la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA), tampoco se encuentran analizadas todas las muestras. No obstante, los valores de bootstrap oscilan entre el 100% hasta 41% de certeza en la constitución de los grupos. Es importante notar que el valor máximo obtenido, también corresponde a la agrupación de los parentales *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja con un 100% (Figura 20).

8.6. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El gráfico del análisis de componentes principales para la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC), evidencia 7 agrupaciones y un individuo aislado (R2). No se encuentra un patrón claro de conglomeración, ya que segregantes del tomate de árbol amarillo, tanto como del rojo, se encuentran mezclados en todos los grupos excepto en el grupo 2 donde se puede encontrar a 2 individuos procedentes del cruce entre *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja (Figura 21).

En cuanto a la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), el análisis de PCA muestra 7 agrupaciones (Figura 22), las cuales evidencian un patrón de asociación en relación al color del fruto, excepto en un solo grupo (grupo 3) donde existen muestras de segregantes amarillos y rojos mezclados. Adicionalmente cabe resaltar que dentro de estas agrupaciones se encuentran los parentales *S. betaceum* var. roja y *S. betaceum* var. amarilla, tal y como se evidenció en el dendograma, que en si es muy similar a la representación gráfica de este análisis. Por otro lado es importante señalar que el parental *S. uniloba*, así como el segregante A5 y R2, se

encuentran aislados de las demás muestras, tal y como se pudo ver en el dendograma.

En el caso de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT), el PCA muestra 5 agrupaciones, las cuales no presentan una tendencia específica de agrupamiento, ya que dentro de éstos se pueden encontrar individuos descendientes de los cruces *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja, excepto en el grupo 4 donde se encuentran 2 segregantes del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla (Figura 23). Por otro lado es importante señalar que tanto *S. uniloba* como R12 y A4 se encuentran aisladas de todos los agrupamientos tal como se encontraba en el dendograma, a excepción de la muestra A4, la cual si formaba parte del grupo 2.

El gráfico del PCA para la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC), indica 8 grupos diferentes (Figura 24). Los grupos 2, 3, 4, 6, 7, y 8 muestran un patrón de conglomeración pues lo hacen según el color del fruto. El grupo 1 y 8 coinciden con el grupo 6 y 1 del dendograma respectivamente. Sin embargo cabe resaltar que el conglomerado 5 de la representación gráfica del PCA muestra a *S. uniloba* asociada al segregante A2, la cual no existe en el dendograma y donde además se muestra a dicho parental aislado, con un coeficiente de similitud de 0,69 respecto al segregante A2.

En la representación gráfica del PCA obtenida de la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG), se puede observar la formación de 4 grupos (Figura 25), los cuales siguen un patrón de conglomeración según el color del fruto salvo pequeñas

excepciones. En el grupo 1 se encuentran agrupados 3 segregantes del tomate de árbol amarillo con el parental rojo, que a su vez coincide con la agrupación 1 del dendograma correspondiente. Por otro lado, en el grupo 3 se encuentran 4 segregantes amarillos junto al parental *S. betaceum* var. amarillo y un segregante rojo, el cual coincide con el grupo 3 del dendograma exceptuando la presencia del híbrido R10. No obstante, en el grupo 4 se encuentran agrupados casi todos los descendientes del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja a excepción de R2 y R8 que reemplazan a R12 y R15 de dendograma. Finalmente es importante mencionar que en esta representación gráfica el parental *S. uniloba*, R12, R15 y A5 se encuentran aislados del resto de individuos como se había visto con anterioridad en algunos dendogramas y representaciones gráficas del PCA.

En último lugar se encuentran los PCAs de la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG) y 3 (M – CAC/E – ACA) (Figuras 26 y 27 respectivamente), los cuales no incluyen la totalidad de las muestras estudiadas. No obstante, en ambos análisis se puede observar que *S. uniloba* se encuentra aislada del resto de muestras al igual que los segregantes A5, R12 y A27, tal como se había visto en algunos PCAs y dendogramas ya descritos anteriormente. Finalmente, en estos 2 últimos gráficos se puede evidenciar que tampoco es posible establecer un patrón de agrupamiento entre los segregantes y parentales según su color de fruto.

9. Discusión

9.1. Extracción de ADN

El primer paso para un fingerprinting exitoso utilizando la técnica AFLP es la extracción de ADN. La calidad y pureza de esta biomolécula es crucial para la restricción y la ligación de adaptadores. Si el ADN contiene impurezas, la acción de las endonucleasas puede ser incompleta, generando así fingerprints parciales, con un patrón de bandas diferentes a aquellos de cuando se hace una digestión completa (Manual de instrucciones Kit AFLP, 2003; Vos et al., 1995), y por lo tanto no representan la real estructura genética del ADN bajo análisis.

En la presente investigación se pudo evidenciar que la calidad y pureza del ADN fueron adecuadas para la realización de la técnica de AFLP, puesto que se obtuvieron patrones de bandas comparables y de diferentes pesos aún sin haber utilizado métodos de purificación.

9.2. Evaluación de la Técnica AFLP

La elección de este tipo de marcadores moleculares para el presente estudio se hizo basado en la capacidad de éstos para cubrir el genoma del organismo a estudiar, y su robustez para la formación de extensos patrones de bandas (Grattapaglia D., 2000), lo que se evidenció en esta investigación, obteniéndose 195 bandas, 90 de las cuales fueron polimórficas. Estos números se asemejan mucho a los obtenidos en otros estudios de diversidad utilizando marcadores moleculares AFLP, como es el caso de la investigación llevada a cabo en Uruguay donde se

utilizaron muestras de 26 accesiones de plantas de arroz y 10 combinaciones de primers, los cuales produjeron 130 bandas de los cuales 71 eran polimórficas para el arroz maleza (Federici M., 2001).

9.3. Diversidad Genética

En el presente trabajo se pudo encontrar un promedio de 46% de polimorfismo con todas las combinaciones de primers utilizadas. Con los valores de similitud obtenidos mediante el coeficiente de Jaccard se muestra que la diversidad genética entre los individuos analizados es bastante reducida. De manera general, algunos de los segregantes estudiados y dos de sus parentales muestran una similitud de hasta un 100%, con excepción de *S. uniloba*, la cual se encuentra más alejada del resto por ser miembro de una especie distinta con valores desde 41 % hasta 95% de similitud con las demás muestras.

Mediante los dendogramas no fue posible encontrar un agrupamiento que permitiera diferenciar de manera sobresaliente a los segregantes por el cruce del que provenían. No obstante, se pudo evidenciar grupos en los que predominaban individuos provenientes de un cruce o del otro. Este patrón se pudo observar en el caso de las combinaciones de primers S1 (M – CAA/E – AAG), 6 (M – CAC/E – AGG) y S7 (M – CAA/E – ACT). Este hecho puede fundamentarse en que el tomate de árbol amarillo y rojo casi no muestran diferencias entre sí, y *S. uniloba* es común para los dos cruces, lo que no permite una distinción clara entre individuos provenientes de los cruces entre *S. uniloba* x *S. betaceum* var amarilla y *S. uniloba* x *S. betaceum* var roja con los marcadores utilizados en el análisis.

Como se mencionó anteriormente, mediante el coeficiente de Jaccard se obtuvieron valores de similitud genética entre *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja de 100% con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), 1 (M – CTC/E – AAG) y 3 (M – CAC/E – ACA). Con las demás combinaciones de primers se llegó a obtener valores de similitud entre 56% hasta 96%, lo cual indica que hay poca diversidad entre ambos parentales.

Los valores de similitud obtenidos en esta investigación concuerdan con los obtenidos en estudios de diversidad genética realizados previamente en tomate de árbol utilizando AFLPs (Ordoñez, 2007), SSRs (Tapia et al., 2006: citado por Peñafiel, 2007; Peñafiel, 2007) y RAPDS (Chalampunte, 2005), en los cuales la conclusión fue que la variabilidad genética en *S. betaceum* en el Ecuador es muy reducida. Tapia et al. (2006) utilizaron un set de primers SSR de papa para evaluar accesiones de tomate de árbol, y determinaron que la diversidad genética entre las accesiones estudiadas era mínima (Tapia et al., 2006: citado por Peñafiel, 2007).

Por otro lado Ordoñez (2007) analizó la diversidad genética entre 24 accesiones de tomate de árbol, y mediante marcadores moleculares AFLP encontró que la similitud genética entre las muestras era bastante alta, lo que impide una diferenciación clara entre las variedades de tomate de árbol.

Adicionalmente, Peñafiel (2007) con la utilización de SSRs, concluyó que no fue posible la diferenciación de las muestras analizadas ni por lugar de origen, ni por variedad.

Finalmente, Chalampunte (2005) en su estudio de caracterización de la colección de tomate de árbol del banco de germoplasma del INIAP del Ecuador, concluyó que la caracterización molecular empleando marcadores moleculares RAPDs arrojó valores de similitud en un rango de 80% a 100%. En su representación gráfica de las relaciones genéticas entre las muestras estudiadas tampoco se muestra un agrupamiento definido, ya que en un mismo conglomerado se pueden encontrar accesiones que son diferentes morfológicamente, por lo que para caracterizar el material del germoplasma se utilizaron características morfológicas.

El presente trabajo junto a los antes nombrados indican indiscutiblemente que hay una estrecha relación genética entre miembros de las variedades de tomate de árbol existentes en el país, y que los polimorfismos encontrados no son suficientes para agruparlos según su variedad.

Esta baja diversidad encontrada en el tomate de árbol puede explicarse por las prácticas de domesticación de las plantas. Se sabe hoy en día que una de las causas más comunes de erosión genética en plantas se debe al uso de pocas variedades, y en algunos casos solo de una, que muestran características benéficas o deseables para su consumo. De esta manera, si sólo se propagan líneas vegetales con dichas características por largos períodos de tiempo, se tiene como consecuencia el estrechamiento del acervo genético de la población (Gray A., 1996). Sin embargo, no se sabe con seguridad dónde se comenzó a cultivar el tomate de árbol ni cuándo. Según Heiser (1969) y Cárdenas (1969) (citados por Bohs, 1989), los nombres más comunes utilizados para identificar a *S. betaceum* se derivan del español o

portugués, en vez de los idiomas nativos, por lo que éste puede ser un indicador de su reciente domesticación.

Otra razón por la que se evidencia una diversidad genética baja en *S. betaceum* puede ser por el comportamiento reproductivo de la especie. Según Bohs (1989) y Albornoz (1989) su polinización puede ser autogámica o alogámica, siendo la primera una característica que se considera más evolucionada (Bohs, 1989). Si es que en el momento en el que se comenzó con la domesticación de *S. betaceum*, este comportamiento reproductivo fue priorizado por la planta para asegurar su supervivencia y la de su descendencia en los cultivares, el resultado podría ser en efecto la reducción de la diversidad genética de la misma, ya que los descendientes de estas autofecundaciones llevarían el mismo material genético que su progenitor.

Por otro lado, los dendogramas muestran que *S. uniloba* en la mayoría de los casos, se encuentra aislada de los demás individuos, pocas veces forma grupos, y cuando lo hace, éste también se aleja de los demás con un coeficiente de similitud que se halla por debajo de los encontrados en los demás conglomerados. Ésta información sugiere que debido a que *S. uniloba* constituye otra especie, su distanciamiento genético, en comparación con individuos de la especie *betaceum*, es mayor con valores desde 41 % de similitud.

Es importante en este punto enfatizar que *S. uniloba*, en los cruces con *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja aporta con material genético distinto, lo que a final de cuentas se traduce en diversidad. La compatibilidad de *S. uniloba*

con *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja se debería a que dicha especie pertenece a la misma familia y género que la especie *S. betaceum*.

9.4. Confiabilidad de los Agrupamientos

Para comprobar si los datos obtenidos de los dendogramas son correctos y si se utilizaron suficientes marcadores para el estudio, se llevó a cabo un análisis estadístico con el método bootstrap.

En general los datos indicaron que para el estudio se necesita un número más alto de marcadores, puesto que los valores de bootstrap no se mostraron muy altos en todas las combinaciones de primers. Algo que vale la pena recalcar es que en las combinaciones de primers S1 (M – CAA/E – AAG), 1 (M – CTC/E – AAG) y 3 (M – CAC/E – ACA) los valores de bootstrap para agrupamiento entre el parental *S. betaceum* var. roja y *S. betaceum* var. amarilla fueron de 99,5% y 100%, lo que corrobora los datos de los dendogramas y asegura, en cierto modo, que las dos variedades son extremadamente similares. Adicionalmente, con la utilización de este método estadístico se obtuvieron agrupaciones distintas a las mostradas por el método UPGMA en las combinaciones de primers S7 (M – CAA/E – ACT), 6 (M – CAC/E – AGG) y 5 (M – CAC/E – AGC), lo que confirmaría la falta de robustez de los agrupamientos en cuestión, lo que se solucionaría con un mayor número de marcadores o incrementando la población a analizar (Warburtun M et al., 2002).

9.5 Análisis de dispersión

De acuerdo al análisis PCA se puede observar que en general las agrupaciones se dan indistintamente entre individuos resultantes de los cruces de tomate de árbol rojo y amarillo x *S. uniloba*, lo que nuevamente corrobora los resultados de los dendogramas. La poca variabilidad existente entre *S. betaceum* var. roja y *S. betaceum* var. amarilla hace difícil diferenciar a los segregantes por su cruce de origen con los marcadores AFLP. Sin embargo, el análisis de PCA correspondiente a la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC), permite separar a los segregantes según el color de su fruto con excepción de los grupos 1 y 2 en los que se encuentra un miembro diferente a los que predominan el conglomerado. Nuevamente, como se había evidenciado en los dendogramas, en casi la totalidad de las representaciones gráficas de los PCA, *S. uniloba* se encuentra aislada del resto de muestras, lo que demuestra una vez más el distanciamiento genético que tiene ésta especie frente a *S. betaceum*, alcanzando valores de hasta 59 % de distancia.

9.6. Análisis de segregantes

De los dendogramas obtenidos, aquel proveniente de la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC) fue el único en mostrar un patrón de agrupamiento en el que los segregantes, excepto uno, se encuentran contenidos dentro del espacio conformado por los dos parentales. Dicho resultado es propio de una segregación mendeliana, lastimosamente esta distribución no fue encontrada en ningún otro dendograma obtenido en la presente investigación. Cabe resaltar que a pesar de que

esta representación gráfica agrupa a los segregantes entre el espacio generado por los parentales, no lo hace según el color de su fruto, originando así grupos y subgrupos representados tanto por segregantes del cruce *S. uniloba* x tomate de árbol amarillo como el rojo.

Por otro lado vale la pena resaltar que el parental *S. uniloba* se encuentra siempre formando los grupos más externos de los dendogramas, lo que puede dar a entender que en efecto podría formar parte de uno de los parentales de los cruces analizados. Sin embargo, al analizar los geles obtenidos con las combinaciones de todos los primers, se evidenció que existieron algunas bandas, en promedio una por gel, que estuvieron presentes en los segregantes y no lo estuvieron en sus parentales (Figura 28), lo que sugeriría que los cruces documentados no corresponden a las muestras estudiadas al no seguir las leyes de la herencia propuestos por Mendel.

Teniendo en cuenta este análisis, los resultados de los dendogramas donde se muestran agrupaciones con los segregantes y los supuestos parentales mezclados, corroboran la idea mencionada anteriormente, de que los cruces pudieron estar mal registrados. Adicionalmente, se debe señalar que otra razón por la cual se pudieron haber obtenido estos resultados, es por la lectura del gel de poliacrilamida al 6% resultante de la electroforesis de los productos de las amplificaciones selectivas, ya que el método de tinción, en algunos casos, no permitió un buen contraste entre el patrón de bandas producido y el fondo, razón por la cual se pudieron dar errores en las lecturas.

9.7. Herencia de la característica de resistencia a la antracnosis

Mediante comunicaciones personales con investigadores del INIAP – Tumbaco se conoció que la planta *S. uniloba* era portadora de la característica de resistencia a la antracnosis. Las muestras utilizadas en este estudio son los segregantes del cruce de ésta con variedades comerciales de tomate de árbol rojo y amarillo y se esperaba que uno o más de éstos hubieran heredado la característica de interés. Sin embargo, durante el desarrollo de esta investigación no se encontró un patrón de bandas que asocie a las plantas que han probado en fase de laboratorio su resistencia a dicha enfermedad. Unas de las razones para explicar este acontecimiento puede ser el haber cometido un error involuntario en el rotulado de las plantas, o el no haber identificado con claridad a los parentales y a sus respectivos segregantes en el estudio, o que los marcadores utilizados no alcanzaron la región del genoma asociada con la resistencia.

10. Conclusiones

La presente investigación permite concluir que la variabilidad genética entre plantas de tomate de árbol amarillo y rojo en el Ecuador es extremadamente reducida, mostrando valores de similitud muy cercanos al 100%, lo que causa problemas al tratar de identificar correctamente a sus respectivos segregantes.

Algunos patrones de bandas pertenecientes a los segregantes no aparecieron en los parentales, haciendo presumir que las poblaciones estudiadas, o al menos ciertos individuos, no corresponden con la información provista por el INIAP sobre el registro de cruces. Otro factor que pudo influir en este sentido es la calidad de bandas en el gel, ya que en ciertos casos el método de tinción no ayudó a distinguir satisfactoriamente las bandas con el fondo del gel, lo que dificultaba su lectura.

Debido a las razones antes nombradas, y a que la información de los segregantes resistentes a la antracnosis provista por el INIAP, no concordó con ningún patrón de bandas obtenido en este estudio, tampoco fue posible determinar si alguno de los individuos adquirió dicha característica del parental *S. uniloba*.

11. Recomendaciones

Se recomienda como primer paso asegurarse de que la calidad de ADN y su concentración sea la óptima antes de llevar a cabo la técnica de AFLPs, ya que como se discutió con anterioridad, este paso es crítico para la obtención de un fingerprint de calidad.

El método de tinción utilizado (Benbouza et al., 2006) debería mejorarse, especialmente para aumentar el contraste existente entre las bandas y el fondo, para de esta manera facilitar y evitar errores en la lectura del gel.

Para asegurar que el ADN utilizado en este tipo de análisis sea puro y de calidad, se sugiere utilizar kits comerciales para la purificación de esta biomolécula después del proceso de extracción.

En cuanto al programa de fitomejoramiento del cultivo, se recomienda utilizar individuos de los que se conozca su procedencia con toda seguridad para poder llevar a cabo análisis de identificación de marcadores moleculares ligados a una característica de interés.

Finalmente, se sugiere para posteriores estudios de diversidad genética, la utilización de varios marcadores moleculares para mejorar la confiabilidad de los resultados, especialmente si se quiere clasificar o encontrar diferencias genéticas en individuos de diferentes variedades de *S. betaceum*.

12. Referencias

1. Albornoz G. "El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt.) en el Ecuador". Universidad Central del Ecuador-Fundagro, Quito (1992).
2. Albornoz G. "Normas para el Cultivo de Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) en el Ecuador". Universidad Central del Ecuador, Quito (1989).
3. Atankiewicz, M, G. Gadamski, S. Gawronsi. "Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of Triazine-Resistant and Triazine-Susceptible Biotypes of *Solanum Nigrum* - Analysis Using RAPD Markers." European Weed Research Society 41(2001): 287-300.
4. Azofeifa-Delgado A. "Revisión Bibliográfica: Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico". Agronomía Mesoamericana 17: 221-242. (2006)
5. Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. & Mergeai, G. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels." Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77-81. (2006).
6. Bernardello, Luis, Charles Heiser, Marianela Piazzano. "Karyotypic Studies in *Solanum* Section *Lasiocarpa* (Solanaceae)." American Journal of Botany 81(1994): 95-103
7. Blanca J.M., Prohens J., Anderson G., Cañizares J., Nuez F., Zuriaga E., "AFLP and DNA Sequence variation in an Andean Domesticated, Pepino (*Solanum muricatum*, *Solanaceae*): Implications for Evolution and Domestication". American Journal of Botany. 94(7): 1219-1229. (2007).

8. Blanco M., Valverde R. "Análisis de Segregantes Agrupados (BSA) para la Detección de AFLPS Ligados al Gen de Resistencia al PVX en *Solanum commersonii*." Agronomía costarricense vol 29:002 45-55. (2005).
9. Blanco, Monica, R. Valverde. "Identificación y Mapeo de AFLP Ligados al Gen de Resistencia al PVX en *Solanum Comersonii*." Agronomía Costarricense 29(2005): 57-71.
10. Blanco, Monica, Roberto Valverde. "ANÁLISIS DE SEGREGANTES AGRUPADOS (BSA) PARA LA DETECCIÓN DE AFLPS LIGADOS AL GEN DE RESISTENCIA A PVX EN *Solanum commersonii*." Agronomía Costarricense 29(2005): 45-55.
11. Bohs, Lynn. "Cyphomandra (Solanaceae)." Flora Neotropica 63(1994): 1-175.
12. Bohs, Lynn. "Ethnobotany of the Genus *Cyphomandra* (Solanaceae)." Economic Botany 43(1989): 143-163.
13. Bohs, Lynn. "Major clades in *Solanum* based on ndhF Sequence Data ." Monographs in Systematic Botany 104(2005): 27-50.
14. Bohs, Lynn. "Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. Taxon" 44(1995): 583-587.
15. Bohs, Lynn. "Crossing Studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and Their Systematic and Evolutionary Significance". American Journal of Botany 78(1991): 1683-1693.
16. Caballero, Armando, Humberto Quesada and Emilio Rolán-Alvarez. "Impact of Amplified Fragment Length Polymorphism Size Homoplasy on the Estimation of Population Genetic Diversity and the Detection of Selective Loci." Genetics Society of A 179(2008): 539-554.

17. Cadena, Esteban. "Estudio de Prefactibilidad para el Tomate de Árbol." SICA-
Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador (2001)
18. Chalampunte, Doris, Priscila Prado. "Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) del banco de germoplasma del INIAP, Ecuador". Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de Ingeniera Agrónoma de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra. Ibarra-Ecuador (2005).
19. Charlesworth, Deborah. "Effects of Inbreeding on the Genetic Diversity of Populations." The Royal Society 358(2003): 1051-1070.
20. Faleiro, Alessandra, Fabio Faleiro, Uilson Lopes, Gilson Melo, Wilson Monteiro, Milton Yamada, Rita Bahia, Ronan Correa. "Variability in Cacao Selected by Producers for Resistance to Witches' Broom Based on Microsatellite Markers." Crop Breeding and Applied Biotechnology 4(2004): 290-297.
21. Ferreira, M., D. Gratapaglia. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: EMBRAPA, 1998.
22. Fukunaga, Kenji, Jason Hill, Yves Vigouroux, Yoshihiro Matsuoka, Jesus Sanchez G., Kejun Liu, Edward S. Buckler and John Doebley. "Genetic Diversity and Population Structure of Teosinte." Genetics Society of America 169(2005): 2241–2254.
23. Gray, Alan. "Genetic Diversity and Its Conservation in Natural Populations of Plants." Biodiversity Letters 3(1996): 71-80.
24. Jover, Maria, Lucas del Castillo, Manuel García, Juan Segura. "RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA ASSESSMENT OF DIVERSITY IN

- WESTERN MEDITERRANEAN POPULATIONS OF THE SEAGRASS POSIDONIA OCEANICA." American Journal of Botany 90(2003): 364–369.
25. Kelly, James, Lucía Afanado, Seott Haley & Phillip Miklas. "USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO DEL FRIJOL." AGRONOMÍA MESOAMERICANA 5(1994): 1-7.
26. Krishna, Girish, Jinfa Zhang, Mark Burow, Roy Pittman, Stanko Delikostadinov, Yingzhi Lu, Naveen Puppala. "Genetic Diversity Analysis in Valencia Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Using Microsatellite Markers." Cellular & Molecular Biology Letters 9(2004): 685-697.
27. Levin, Rachael, Nicole Myers, Lynn Bohs. "Phylogenetic Relationship Among the "Spiny Solanums" (*Solanum* Subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae)." American Journal of Botany 93(2006): 157-169.
28. MAG-IICA, "Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación: tomate de árbol." 2001 11 Nov 2008 <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/rproductos/tomate_arbol_mag.pdf>.
29. Meadows, L.R.. "Growing Tamarillo Relatives in the New Zealand Home Garden." (15)2002 223-228. Visitado el 8 Nov 2008. <http://www.naturalhub.com/grow_fruit_type_tamarillo_relative_new_zealand.htm>.
30. Nuez, F., J. M. Carrillo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Editorial Universidad Politécnica de Valencia, 2000

31. Ordóñez, Soledad. Diferenciación de variedades en cultivos de tomate de árbol, *Solanum betaceum*, mediante la técnica molecular de AFLP. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de B.S. en Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador (2007).
32. Palacios, Jordi. "IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN ASISTIDA EN LA MEJORA GENÉTICA DE LA JUDÍA DEL GANXET MONTCAU." Escola Superior de Agricultura-Barcelona (2007).
33. Peñafiel, Nicolás. "Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatelitales." Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de B.S. en Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador (2007).
34. Proaño, Doris. "Caracterización y selección de segregantes de cruzamientos interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), y atributos agronómicos deseables evaluados en las provincias de Pichincha y Tungurahua". Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de título de Ingeniera Agrónoma de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Cotopaxi-Ecuador (2008).
35. Rondón, Esteban. "ESTUDIO BIOLÓGICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz), DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betacea*, (Cav) Sendt), Y GENERACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA SU MANEJO INTEGRADO EN COLOMBIA." Programa Nacional Manejo Integrado de Plagas. (s.f.).

36. SICA (s.f.). "TECNOLOGIA DEL CULTIVO DE TOMATE DE ARBOL." SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROPECUARIA del MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DEL ECUADOR. Ministerio De Agricultura y Ganadería del Ecuador. 11 Nov 2008. http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/tecnologia_%20cultivo.htm
37. Tapia, C., E. Zambrano & E. Morillo. "Tomate de árbol (*Cyphomanra betacea* Sendt.), frutal promisorio para la diversificación del agro andino". Informe de Proyecto ejecutado por INIAP/DENAREF. (2006).
38. Torres, A, A. Arias, V. Arahana, M. Torres. "Preliminary Assessment of Genetic Diversity and Phenetic Relations for Section *Lasiocarpa* by Means of Heterologous SSR Markers." Crop Science 48(2008): 01-09.
39. Tremetsberger, Karin, Tod F. Stuessy, Yan-Ping Guo, Carlos M. Baeza, Hanna Weiss, Rosabelle M. Samuel. "Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Variation within and among Populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean Southern South America." International Association for Plant Taxonomy 52(2003): 237-245.
40. Varshney, Rajeev, Andreas Graner, Mark Sorrells. "Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications." Trends in Biotechnology 23(2005): 48-55.
41. Velastegui, Ramiro . Principales Enfermedades del Tomate de Arbol. 01. Ambato: Universidad Tecnica de Ambato, 1988.
42. Vos, Pieter, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and

Marc Zabeau. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Research 23(1995): 4407-4414.

43. Whalen, Michael, Elizabeth Caruso. "Phylogeny in Solanum sect. Lasiocarpa (Solanaceae): Congruence of Morphological and Molecular Data." Systematic Botany 8(1983): 369-380.

44. Williams, John, Anne R.Kubelik, Kenneth J.Livak, J.Antoni Rafalski and Scott V.Tingey. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." Nucleic Acids Research 18(1990): 6531-6535.

13. Tablas

Tabla 1. Muestras de segregantes de los cruces *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla y roja recolectadas de la granja experimental INIAP - Tumbaco.

Codificación	Nombre Original	Cruce
A	Uni R12	Parental (<i>S. uniloba</i>)
B	Tomate Amarillo	Parental (<i>S. betaceum</i>)
C	Tomate Rojo	Parental (<i>S. betaceum</i>)
1	A5	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
2	R12	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
3	A19	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
4	A4	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
5	A27	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
6	R9	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
7	A11	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
8	R5	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
9	R2	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
10	R15	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
11	A2	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
12	A7	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
13	A13	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
14	A17	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
15	A20	<i>S. betaceum</i> (Amarillo) X <i>S. uniloba</i>
16	R1	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
17	R6	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
18	R7	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
19	R8	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>
20	R10	<i>S. betaceum</i> (Rojo) X <i>S. uniloba</i>

Tabla 2. Matriz de datos binarios obtenidos con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC).

Banda	Parentales			Segregantes																			
	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1

Tabla 3. Combinaciones de primers selectivos utilizados para caracterización de segregantes de tomate de árbol y datos de polimorfismo.

Código	Primers selectivos	No. de bandas producidas	No. de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
1	M-CTC/E-AAG	26	8	30,8%
3	M-CAC/E-ACA	32	20	62,5%
4	M-CAG/E-AAC	31	10	32,3%
5	M-CAC/E-AGC	16	12	75%
6	M-CAC/E-AGG	26	12	46,2%
S1	M-CAA/E-AAG	41	19	46,3%
S7	M-CAA/E-ACT	23	9	39,1%

14. Figuras



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de ADN extraído de muestras de los segregantes de tomate de árbol y sus parentales.

Las letras A B y C corresponden a los parentales, mientras que los números del 1 al 20 corresponden a la codificación del laboratorio para los segregantes, según se muestra en la Tabla 1.

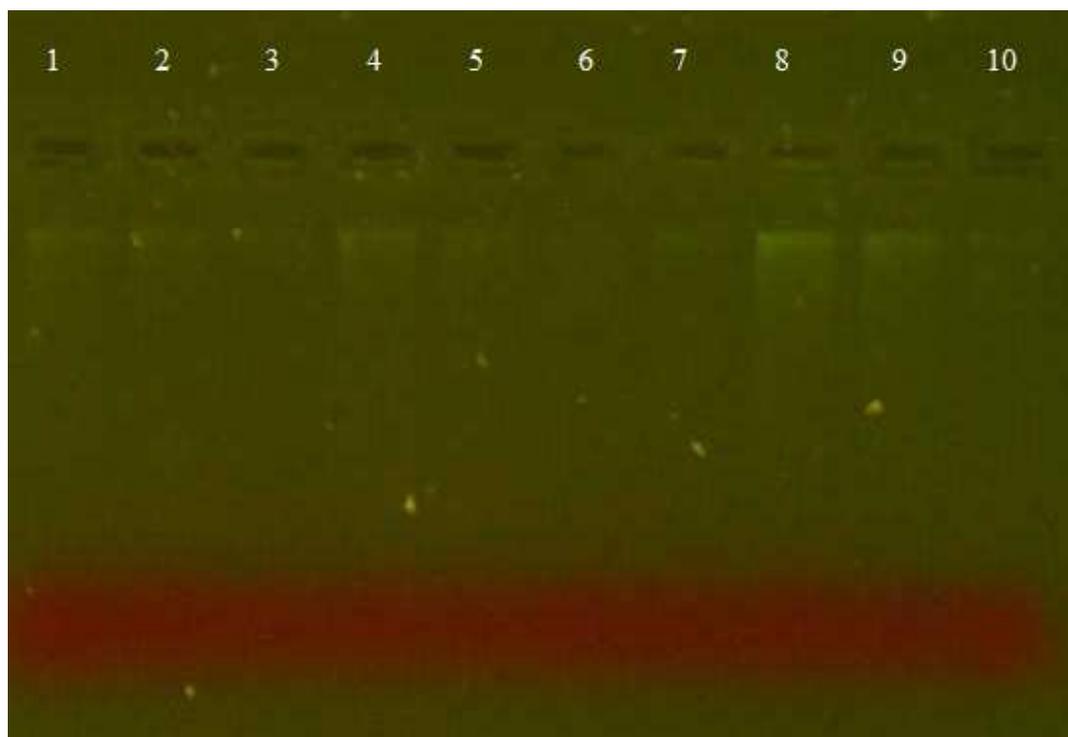


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de ADN de segregantes tomate de árbol restringido con EcoRI/MseI.

El ADN forma un barrido en el gel, lo que indica una gran concentración de ADN fragmentado de diferentes tamaños. Los números corresponden a la codificación de las muestras detallada en la Tabla 1.

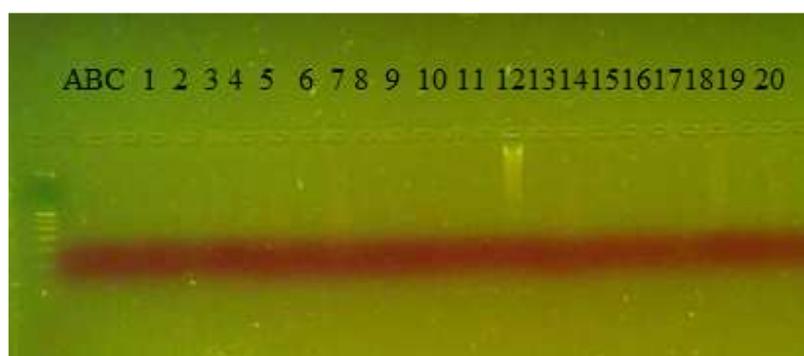


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de ADN restringido y ligado a adaptadores.

Se observa un barrido de ADN de las muestras, lo que indica una gran cantidad de ADN fragmentado y posiblemente ligado con los adaptadores. Los números y las letras corresponden a la codificación de las muestras en la Tabla 1.

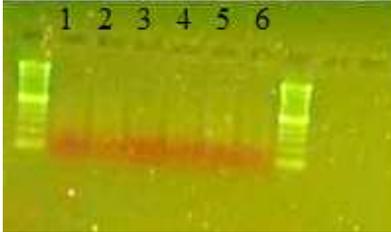


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de ADN amplificado preselectivamente.

El bandeo tenue muestra el producto de amplificación de los fragmentos de ADN que fueron reconocidos por los cebadores con el nucleótido adicionado en su extremo 3'. Los números corresponden a la codificación de las muestras detalladas en la Tabla 1.

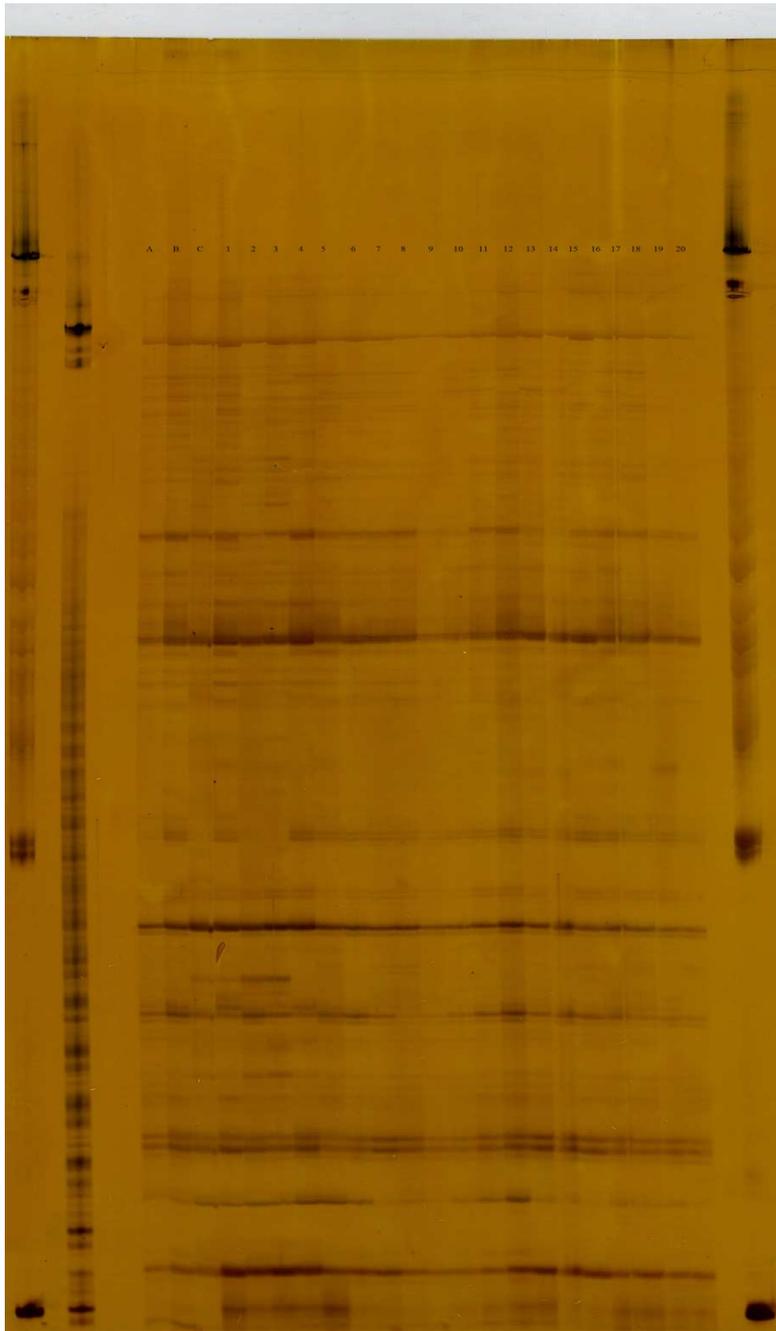


Figura 5. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de ADN de segregantes de tomate de árbol amplificado con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC)

Las letras A, B y C corresponden a los parentales, mientras que los números del 1 al 20 corresponden a los individuos segregantes de los cruces de *S. betaceum* var. amarilla y roja X *S. uniloba*, tal como se detalla en la Tabla 1.

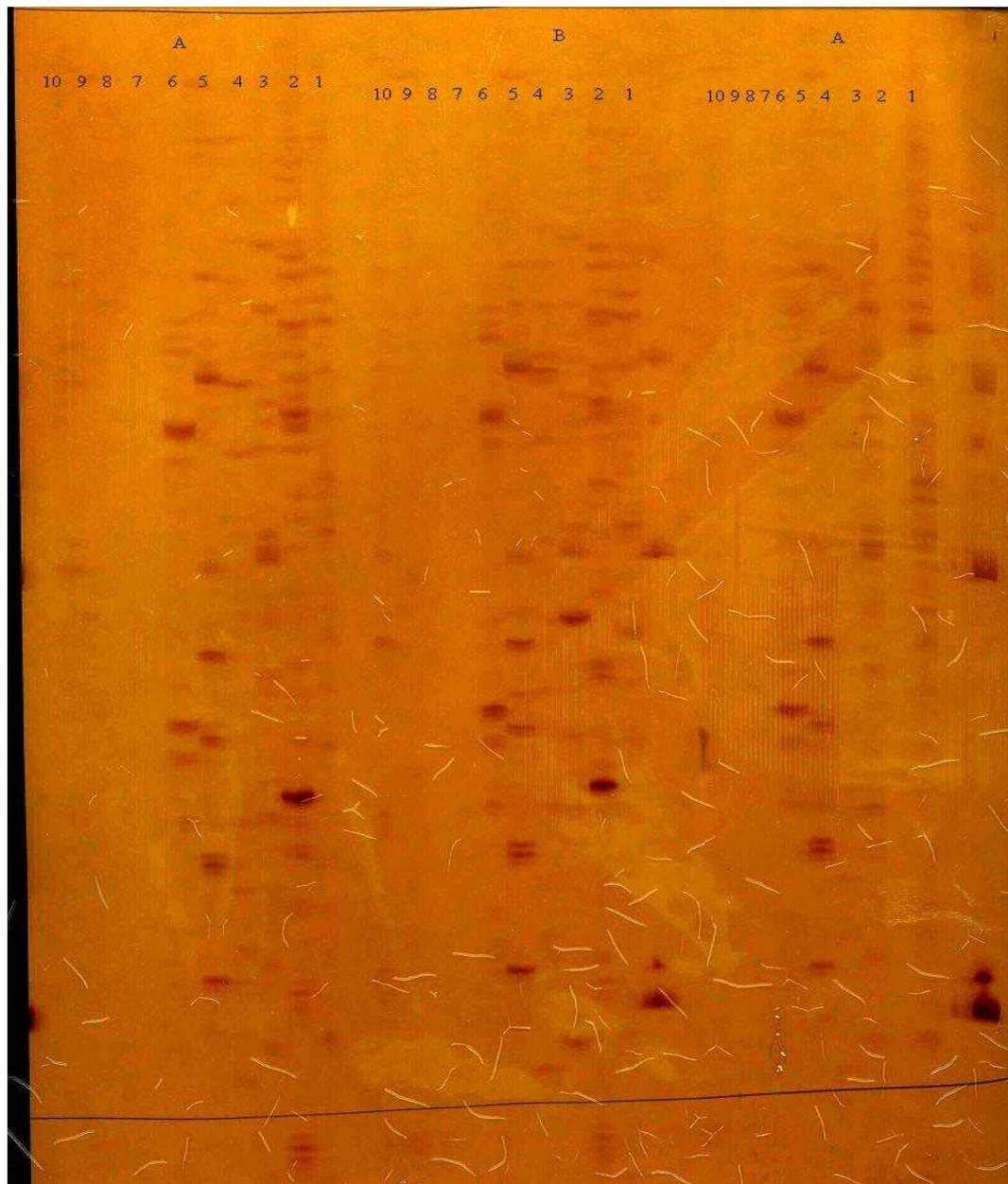


Figura 6. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% para selección de primers

Se observa el producto de amplificación usando 10 combinaciones de primers y ADN de los 3 parentales analizados: Uni R12 (A), Amarillo (B) y Rojo (C). Sólo las 6 primeras combinaciones de primers: 1(M-CTC/E-AAG), 2(M-CAT/E-ACA), 3 (M-CAC/E-ACA), 4 (M-CAG/E-AAC), 5 (M-CAC/E-AGC), 6 (M-CAC/E-AGG), generan producto amplificado.

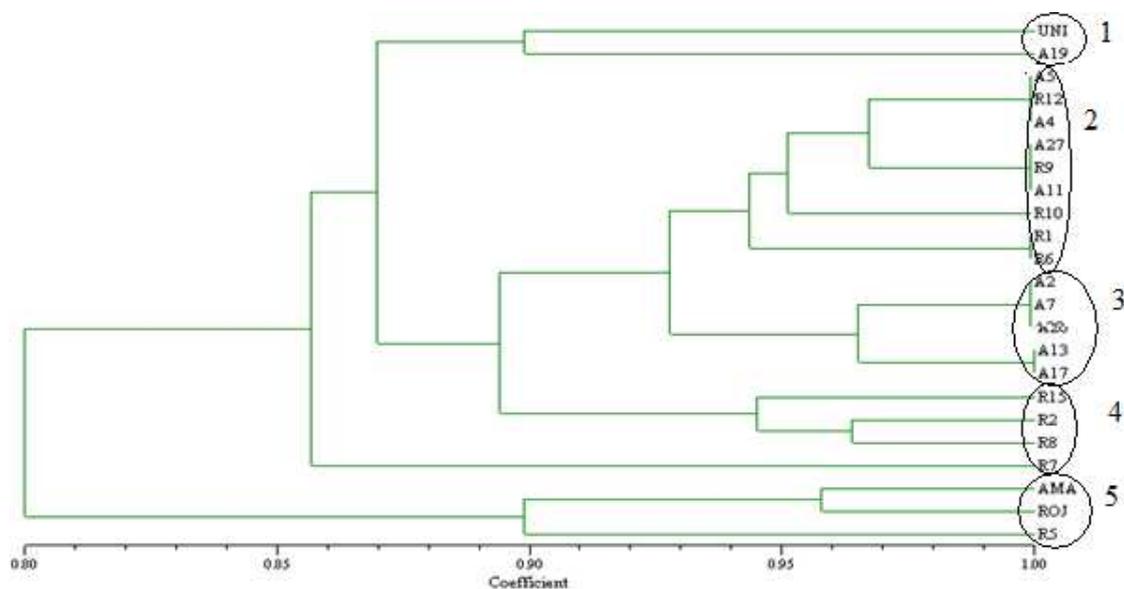


Figura 7. Dendrograma generado con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC), por NTSYS pc 2.11, UPGMA, usando el coeficiente de Jaccard

Se observa 5 agrupaciones. No se encuentra ningún patrón de asociación entre los individuos por su cruce en los grupos 1, 2, 4, y 5, pero si en el grupo 3. Casi la totalidad de los segregantes se encuentran contenidos en el espacio dispuesto entre los parentales excepto R5.

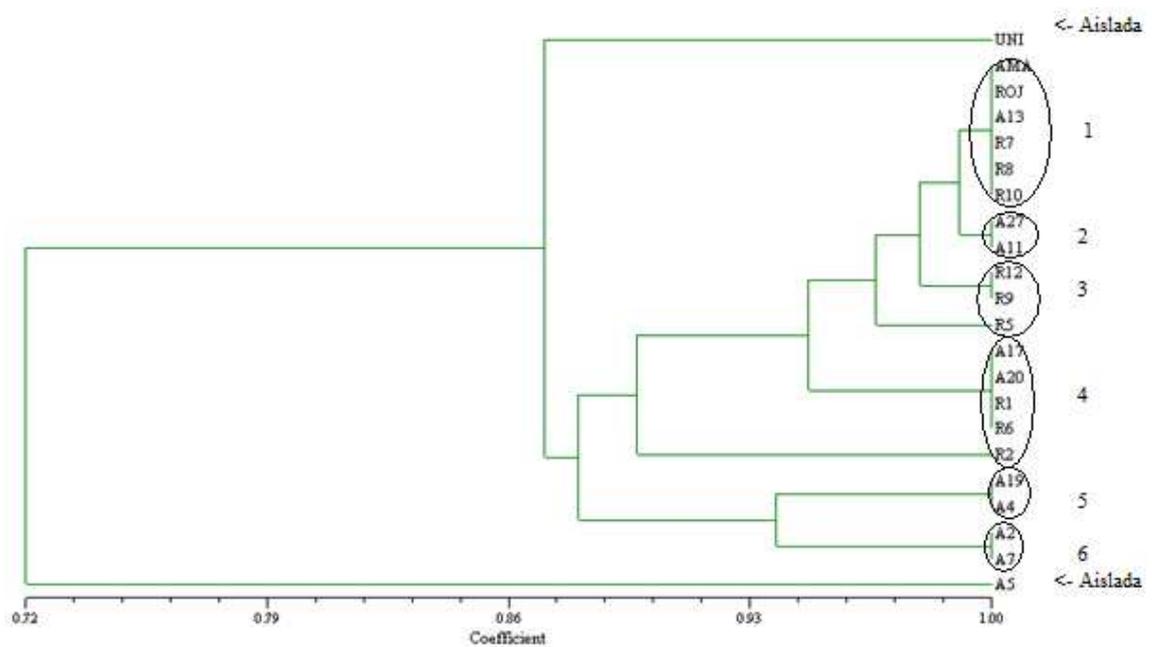


Figura 8. Dendrograma generado con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard

Se observa a parentales *S. betaceum* var. amarilla y *S. betaceum* var. roja muy próximos el uno del otro con un coeficiente de similitud de 1. *S. uniloba* se encuentra separado de los otros parentales y el segregante A5 se encuentra aislado del resto de las muestras.

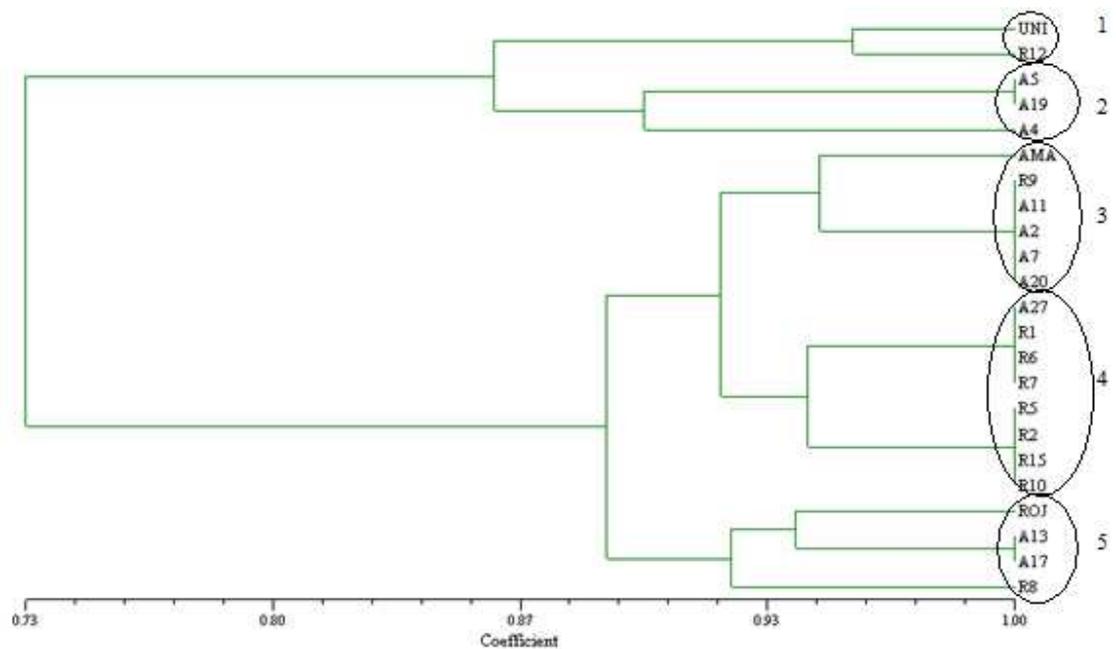


Figura 9. Dendrograma generado con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.

Se observa la formación de 5 grupos. No se puede encontrar un patrón de asociamiento dentro de éstos aunque hay una tendencia en los grupos 3 y 4 de asociar a los descendientes del cruce *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja, respectivamente.

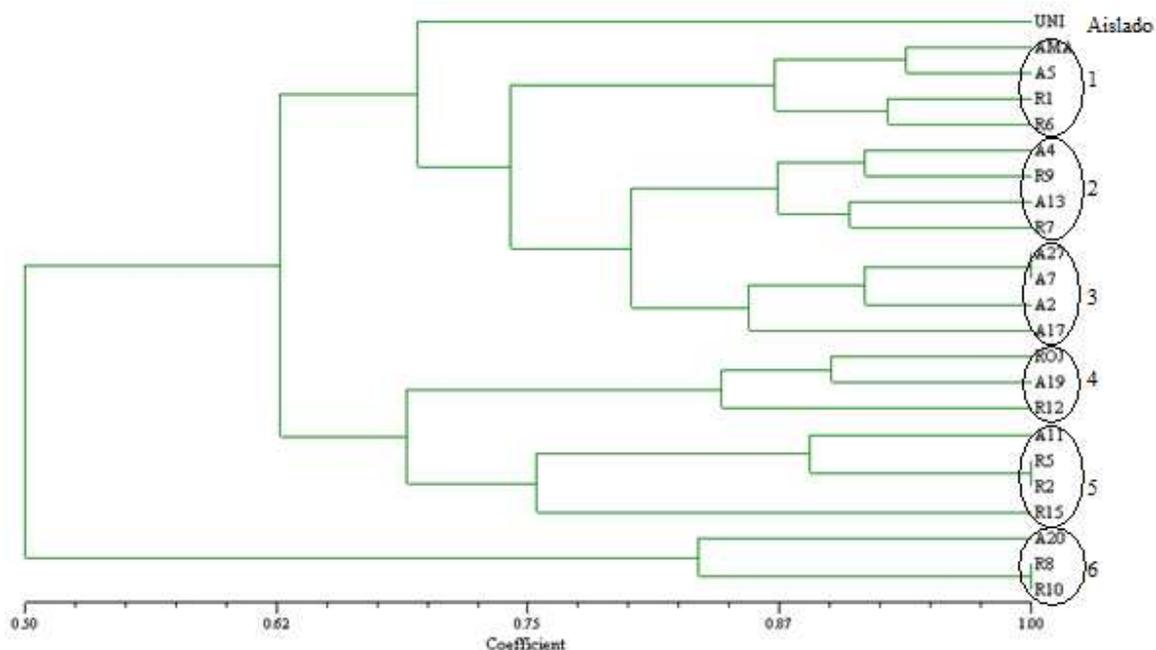


Figura 10. Dendrograma generado con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.

Se observa la formación de 6 grupos, no fue posible establecer un patrón para la distribución de los segregantes en éstas asociaciones dado que dentro de éstos se puede encontrar individuos procedentes de cruces de *S. uniloba* x *S. betaceum* var. amarilla y *S. uniloba* x *S. betaceum* var. roja.

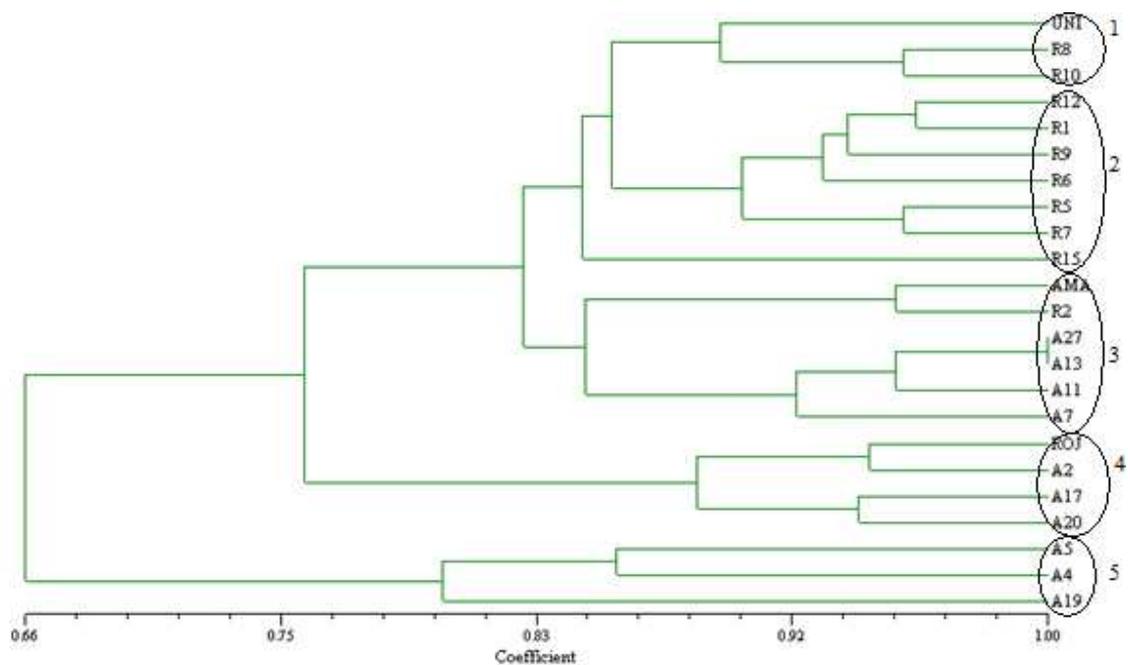


Figura 11. Dendrograma generado con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.

Se ve la formación de 5 grupos, no se encuentra un patrón de asociación completo a excepción del grupo 2 donde la mayoría de segregantes del tomate de árbol rojo se encuentran agrupados. Nótese que este dendrograma coincide mucho con el de la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT).

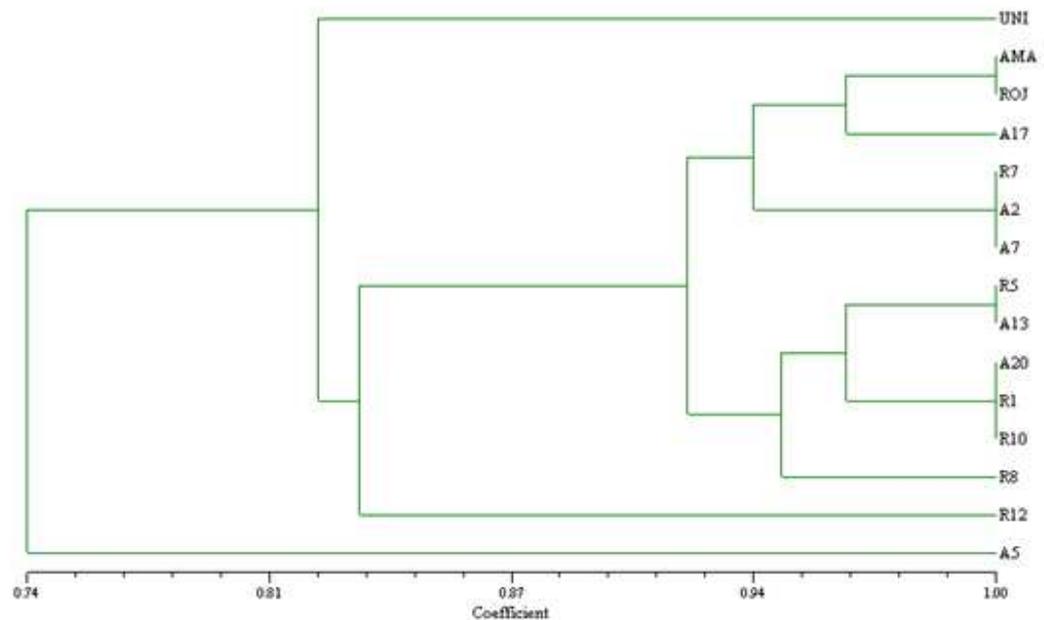


Figura 12. Dendrograma generado con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.

Se observa que los parentales tomate de árbol amarillo y rojo muestran similitud de 100%, al igual que R7, A2 y A7, R5 y A13 y A20, R1 y R10. *S. uniloba* se encuentra aislada del resto de muestras con un coeficiente de similitud de 82%.

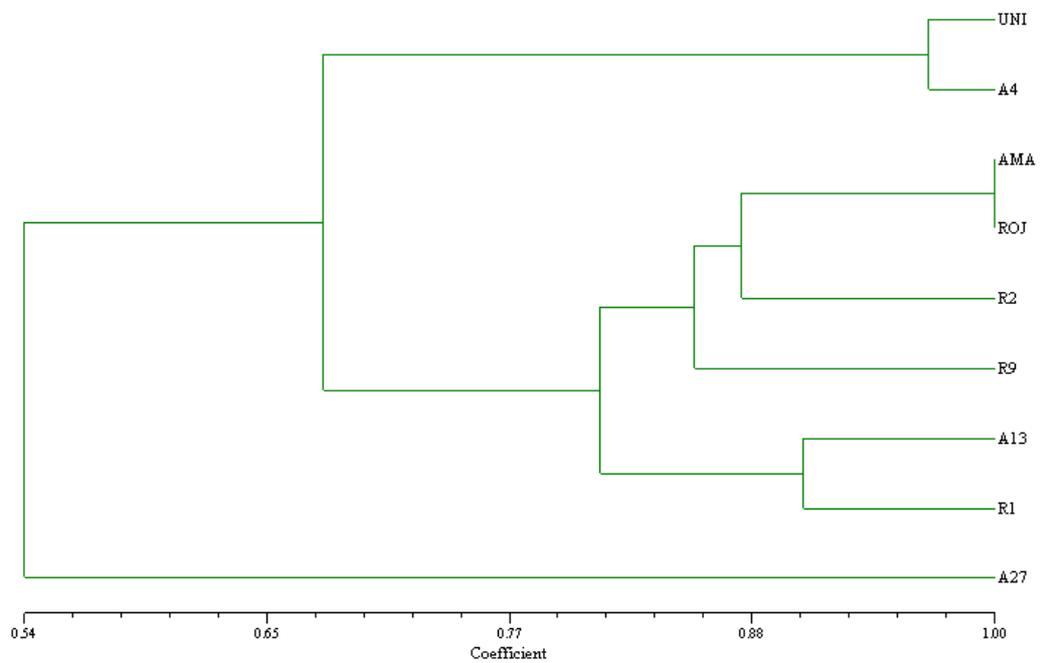


Figura 13. Dendrograma obtenido de la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA), y usando el programa NTSYS pc 2.11, UPGMA, con el coeficiente de Jaccard.

Se observa a *S. betaceum* var. amarilla y roja asociados con un coeficiente de similitud de 1.

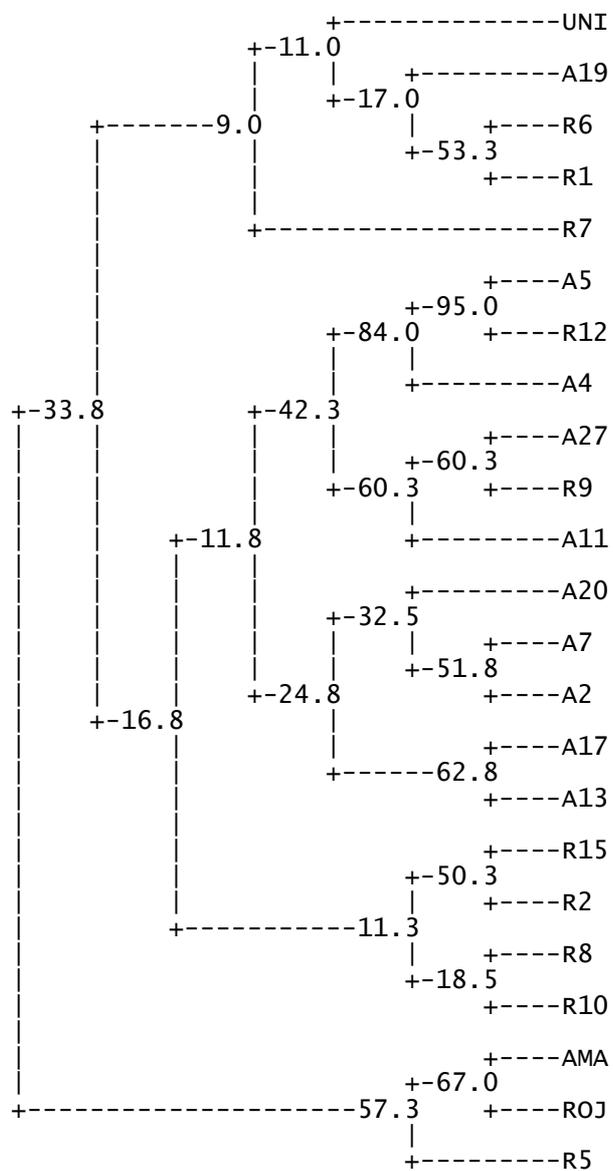


Figura 14. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC)

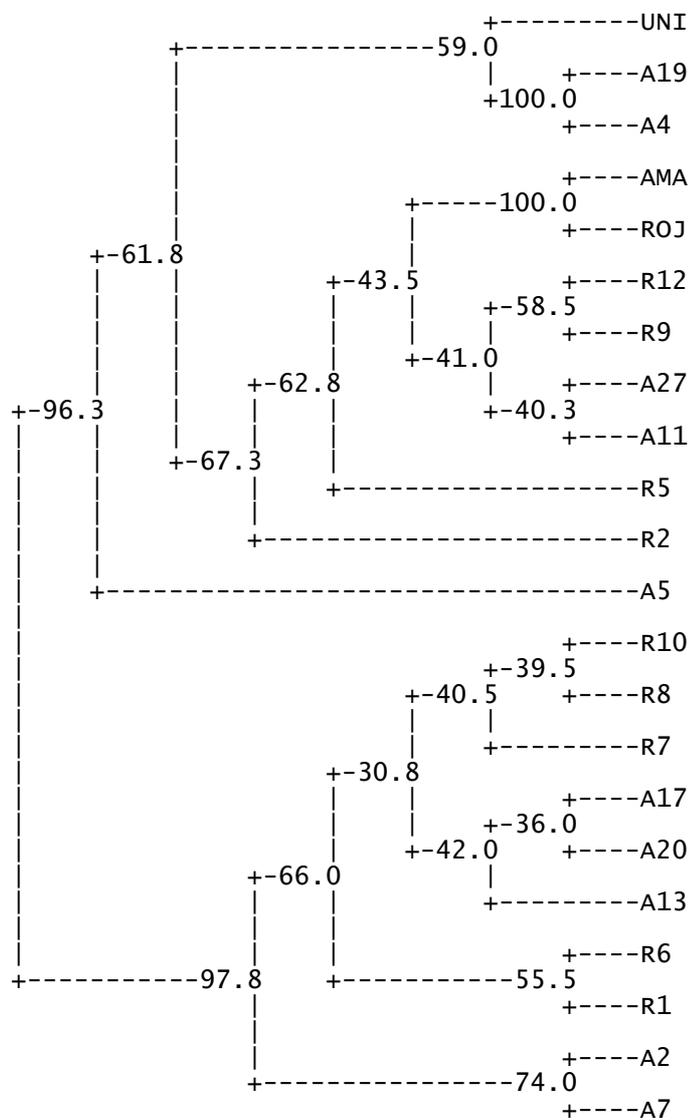


Figura 15. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG).

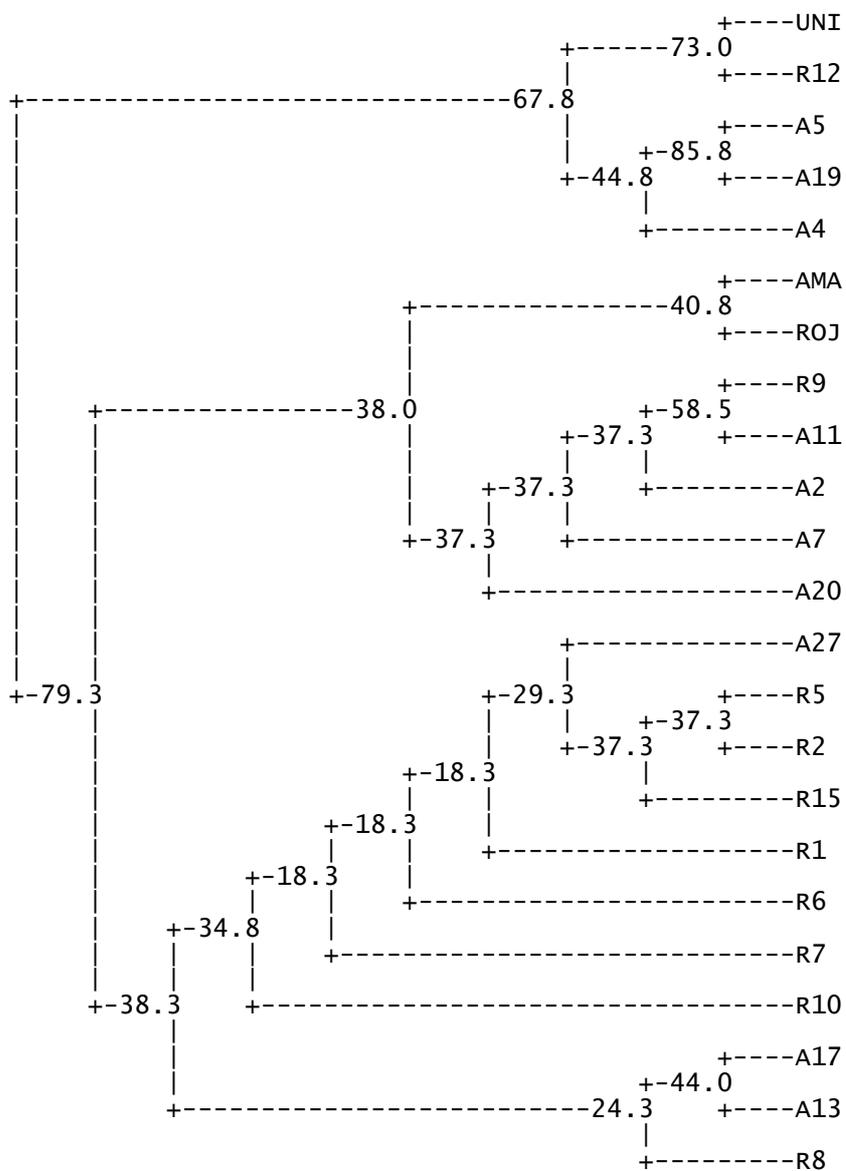


Figura 16. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT).

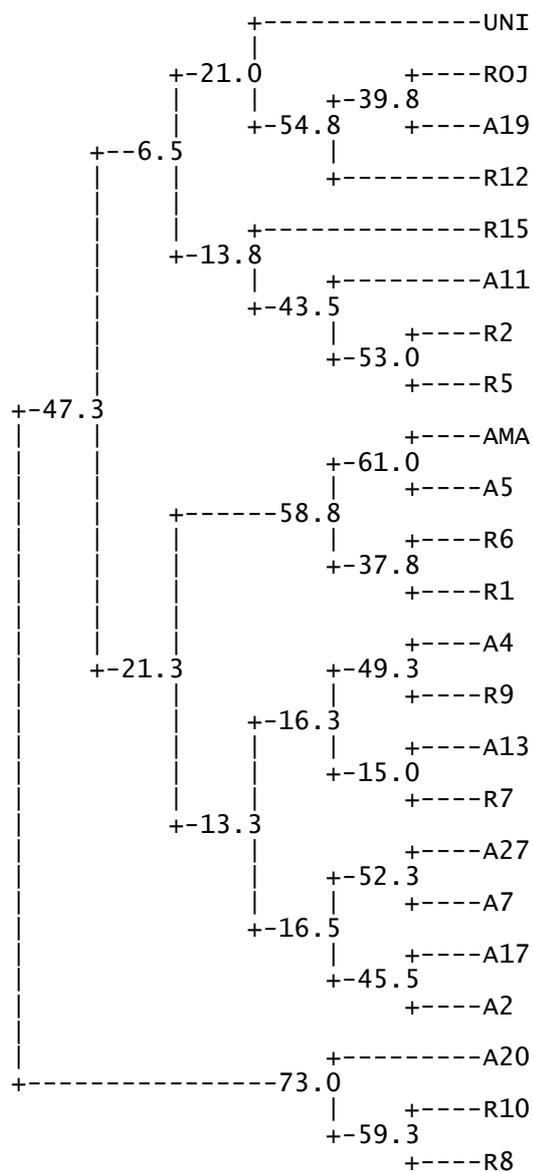


Figura 17. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC).

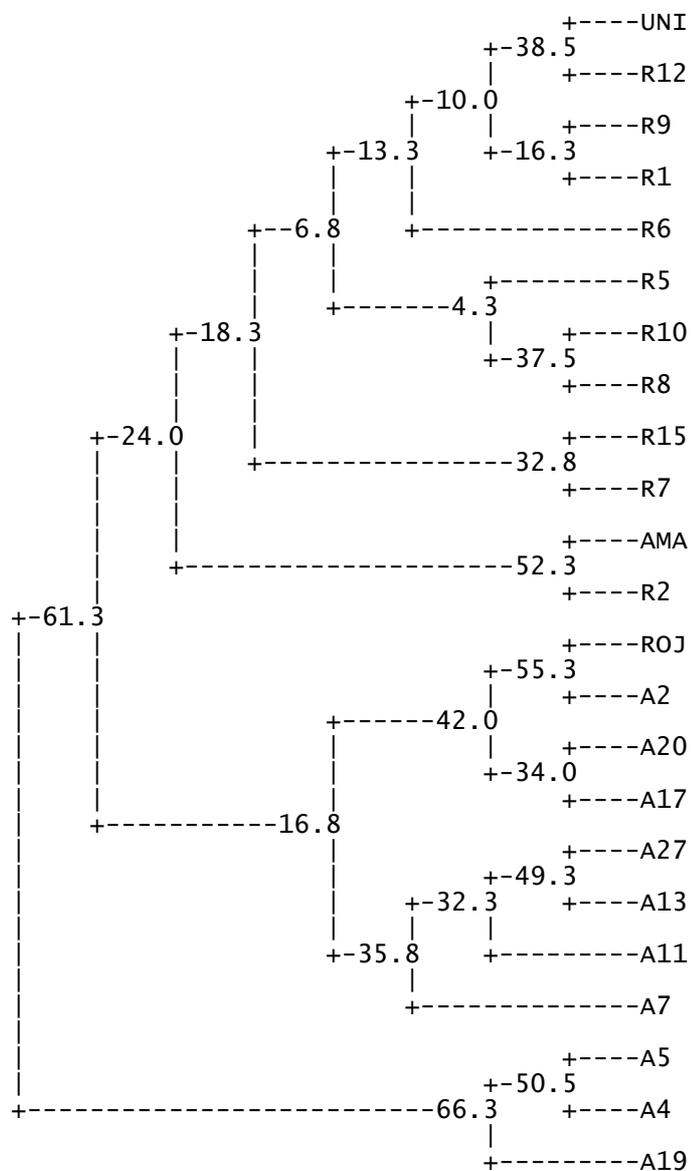


Figura 18. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG).

Nótese que los grupos formados por este análisis difieren de aquellos formados en los dendogramas

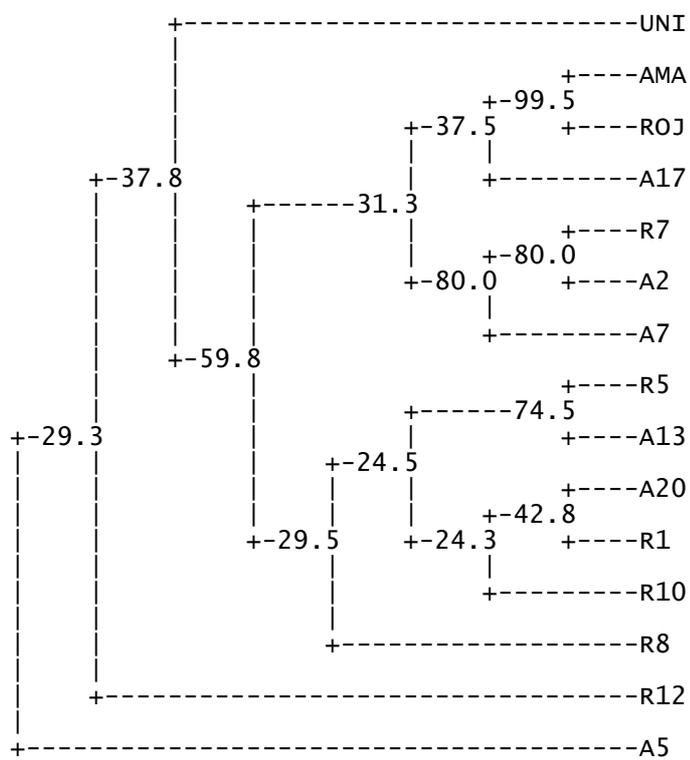


Figura 19. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG).

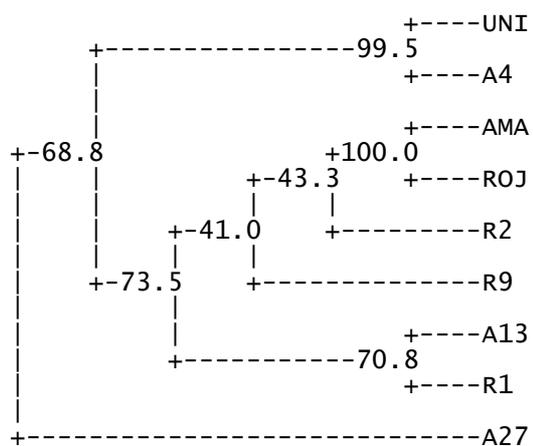


Figura 20. Análisis de bootstrap para los agrupamientos con la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA).

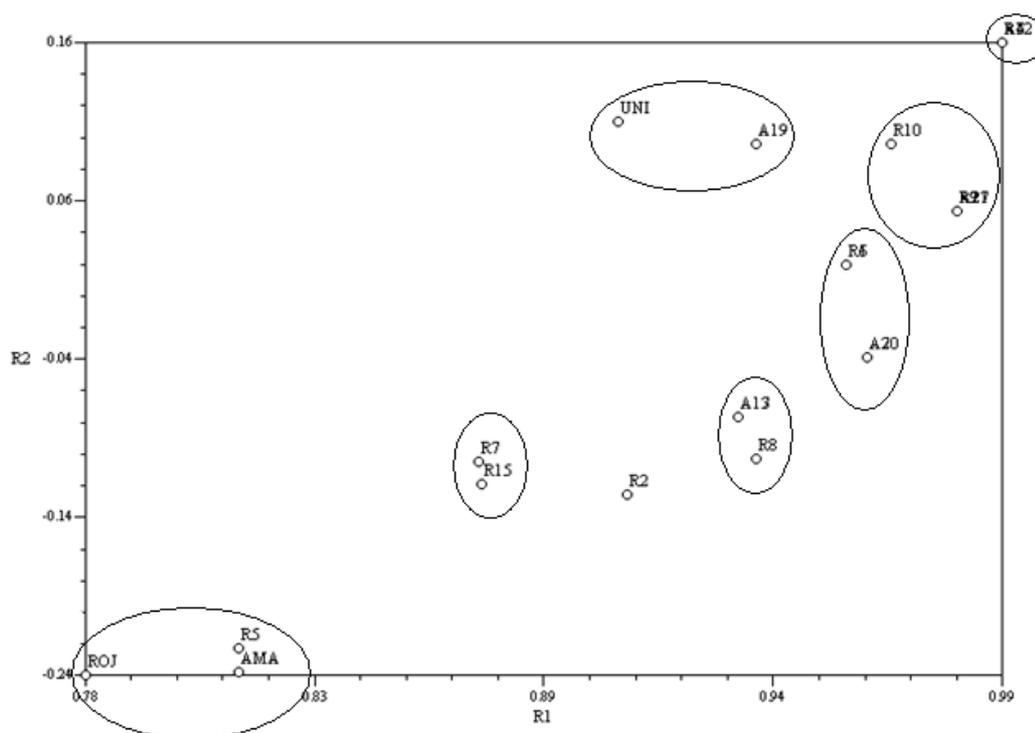


Figura 21. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 4 (M – CAG/E – AAC).

Se observa la formación de 7 grupos. No se encuentra un patrón para las conglomeraciones ya que los segregantes de los diferentes cruces se encuentran mezclados en todos los grupos excepto en el grupo 2.

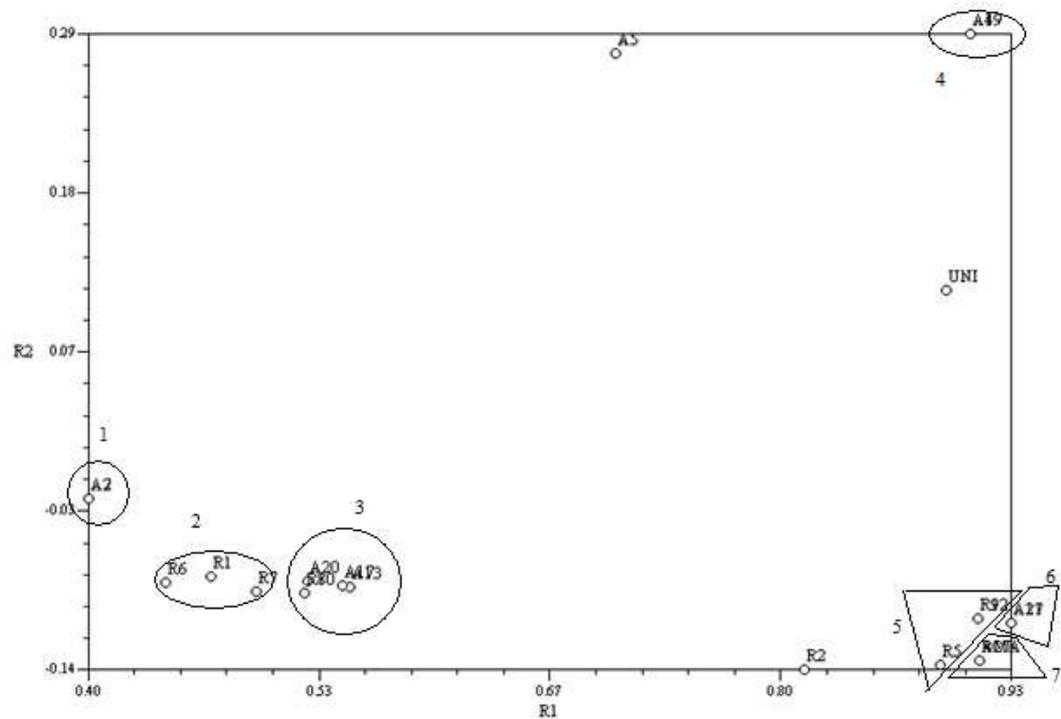


Figura 22. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers S1 (M – CAA/E – AAG).

Se ve la formación de 7 grupos los cuales muestran un patrón de asociación en relación al color del fruto excepto al grupo 3.

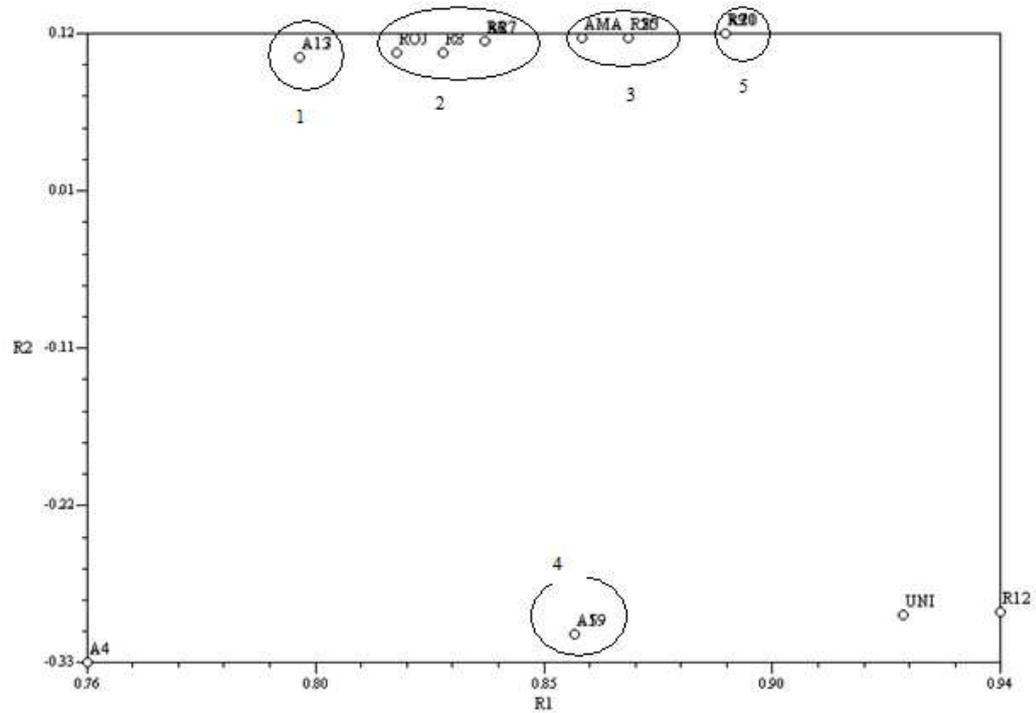


Figura 23. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers S7 (M – CAA/E – ACT).

Se observa la formación de 5 grupos los cuales no muestran un patrón de asociación en relación al cruce del que provienen excepto por el grupo 4. *S. uniloba*, R12 y A4 se encuentran aisladas de todos los agrupamientos, tal como se vio en el dendrograma respectivo.

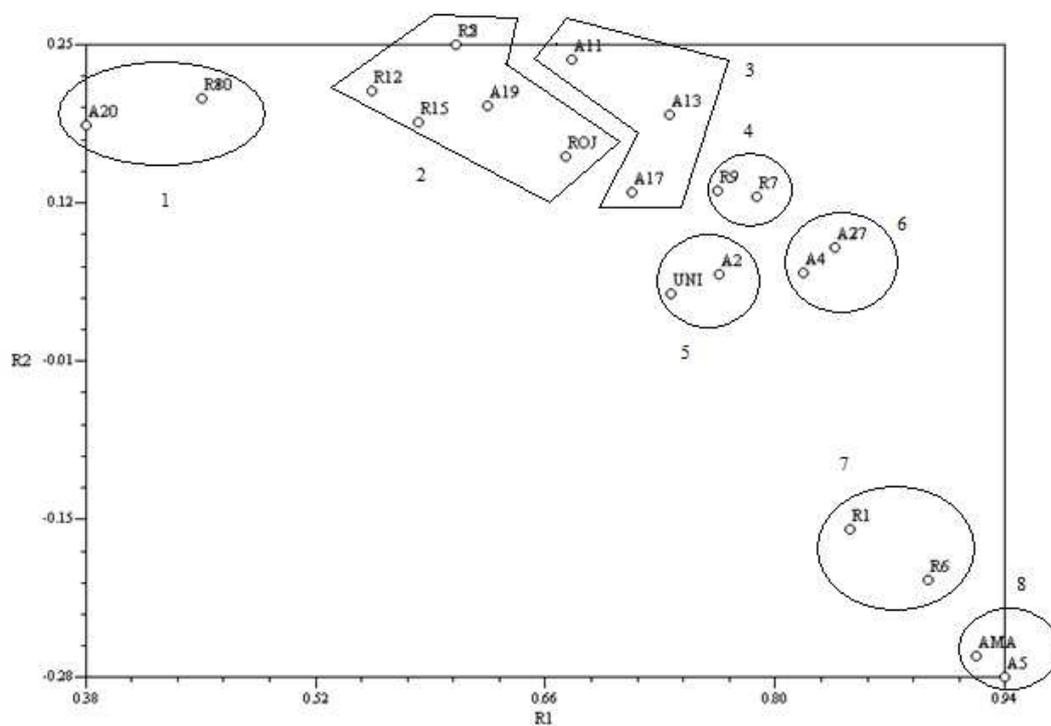


Figura 24. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 5 (M – CAC/E – AGC).

Se ve la formación de 8 grupos diferentes en los que los grupos 2, 3, 4, 6, 7 y 8 muestran un patrón de conglomeración pues lo hacen según el color del fruto.

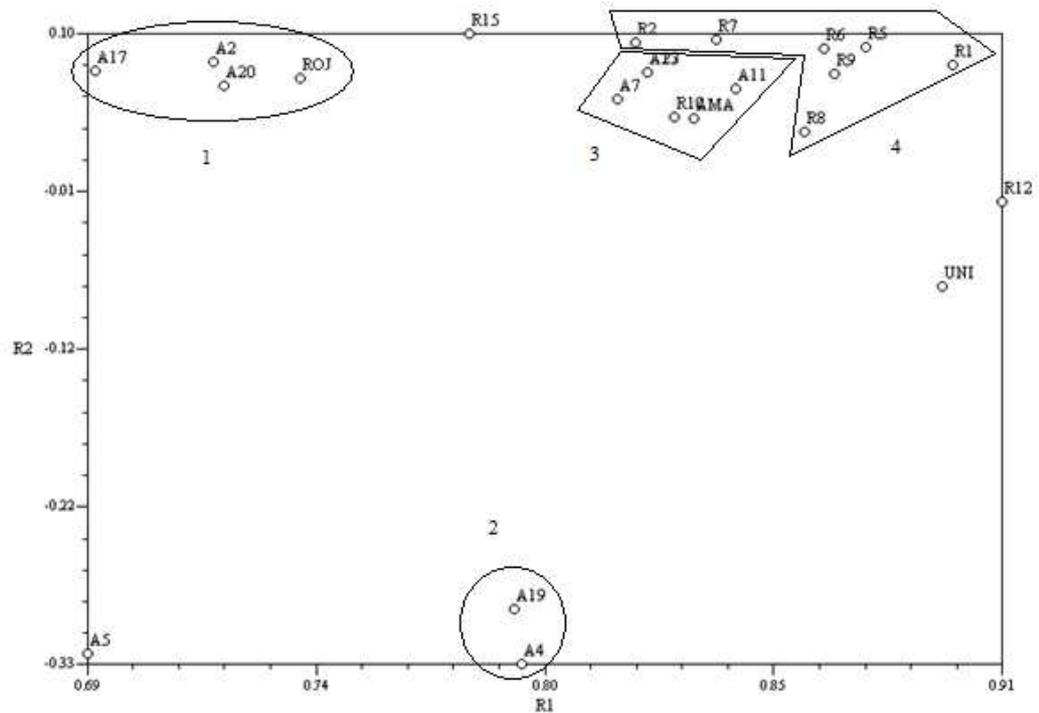


Figura 25. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 6 (M – CAC/E – AGG).

Se observa la formación de 4 grupos, los que siguen un patrón de conglomeración según su cruce salvo pocas excepciones. *S. uniloba*, R12, R15 y A5 se encuentran aislados del resto de individuos como ya se había visto en algunas representaciones gráficas del PCA.

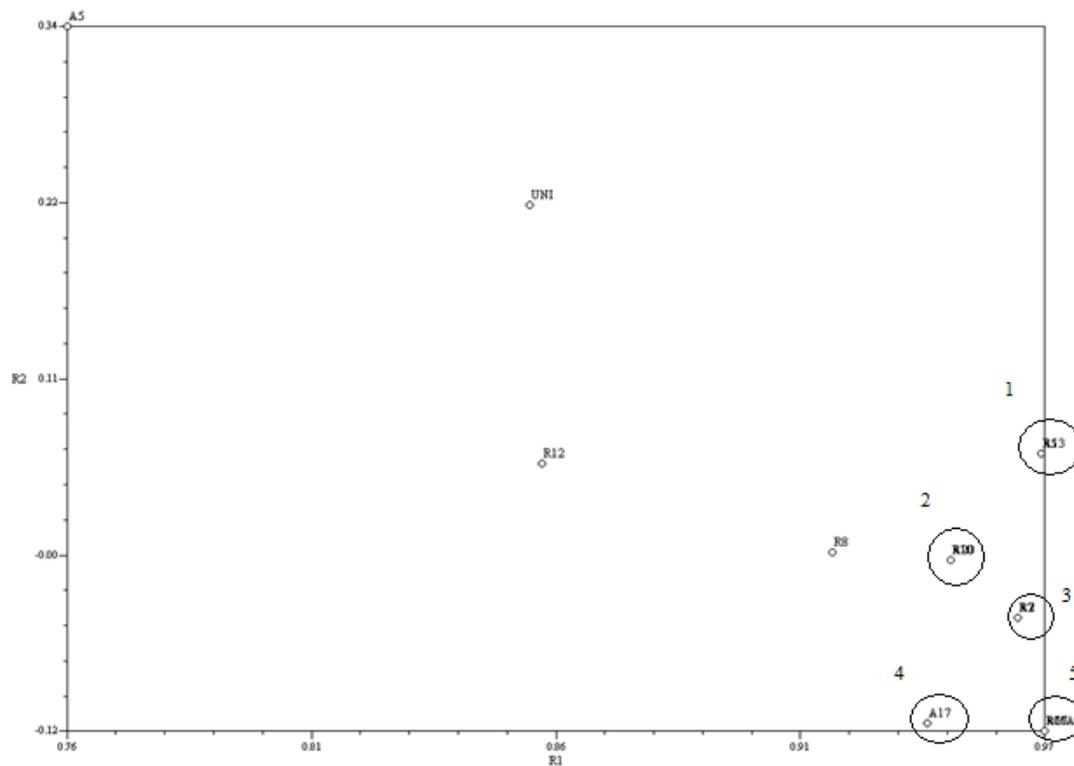


Figura 26. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 1 (M – CTC/E – AAG).

Se ve que *S. uniloba* se encuentra aislada del resto de muestras al igual que los segregantes A5, R12 y R8. No se muestra un patrón de conglomeración.

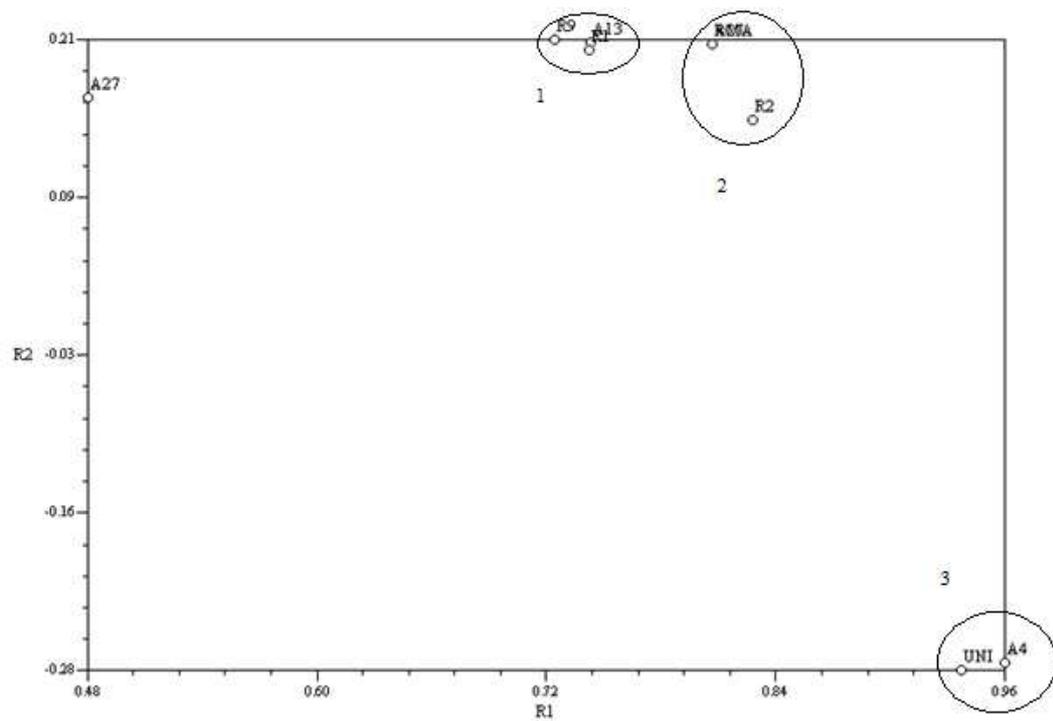


Figura 27. Análisis de PCA de los segregantes con la combinación de primers 3 (M – CAC/E – ACA).

Se observa que *S. uniloba* se encuentra aislada del resto de muestras al igual que los segregantes A4, y A27. No se muestra un patrón de conglomeración.

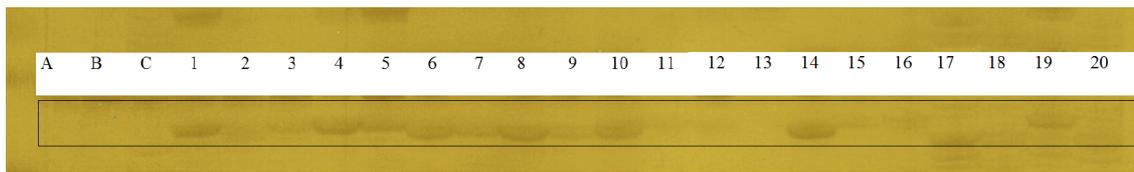


Figura 28. Gel de poliacrilamida en el que se evidencia la ausencia de bandas en los padres y la presencia de la misma en los segregantes.

La ausencia de la banda que presentan los segregantes sugiere que las plantas clasificadas como parentales no corresponden con genotipo de los segregantes. Las letras y los números del corresponden a los códigos detallados en la Tabla 1.