

**Universidad San Francisco de Quito  
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO FINAL

**Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum  
betaceum* Cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por  
medio de marcadores microsatélites.**

Nicolás Peñafiel Loaiza

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Directora de Proyecto

.....

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité

.....

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité

.....

Hugo Valdebenito, Ph.D.

Miembro del Comité

.....

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de

Ciencias Biológicas y Ambientales

.....

Quito, diciembre de 2007

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatélites.**

Nicolás Peñafiel Loaiza

Proyecto Final presentado como requisito para la obtención del título de  
B.S. en Biotecnología y en Ecología Aplicada

Quito, Diciembre de 2007

DERECHOS DE AUTOR

©Derechos Reservados

Nicolás Peñafiel Loaiza

2007

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Espumoso, que fue el único que estuvo constantemente a mi lado mientras esta tesis era redactada.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a María de Lourdes Torres por la confianza y la paciencia depositadas en mí, y a todas las personas que fueron parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal mientras realizaba este proyecto, en especial a Venancio Arahana, Andrés Torres, Andrea Arias, Pedro González, Soledad Ordóñez y Nicolás Bastidas.

Un agradecimiento profundo a mis papás por haber estado siempre dispuestos a apoyarme con los recursos que hubiesen sido necesarios para sacar adelante el proyecto.

Quiero también reconocer y agradecer la importante e incondicional ayuda de varias personas: Teresa Ojeda (Teya), quien me ayudó en el proceso de extracción de semillas; Mónica Reinoso (Monito), que estuvo conmigo en la recolección de frutos y para prestarme siempre su atención; Mariana Peñafiel, quien me ayudó en la recolección de muestras en Tungurahua; el señor Patricio de la Torre del Ministerio de Agricultura, cuya amabilidad fue una agradable sorpresa dentro del ambiente ministerial; y a Cynthia Zorrilla, del CIP en Lima, cuya asistencia técnica fue de gran valor para sacar adelante el proyecto.

## RESUMEN

El presente trabajo determina el nivel de diversidad genética en varios cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de las provincias de Imbabura, Tungurahua y Pichincha, mediante el uso de marcadores microsatélites. Conjuntamente, se evalúa el nivel de transferibilidad al tomate de árbol, de 53 pares de primers microsatélites desarrollados originalmente para papa (*Solanum tuberosum*).

Fueron visitadas un total de 18 plantaciones, en las cuales se colectaron accesiones de 50 individuos en total, que fueron clasificados de acuerdo a las siguientes variedades: amarillo común, amarillo gigante, amarillo bola, morado común, morado gigante y morado bola.

El porcentaje de pares de primers que amplificaron con éxito en las muestras de tomate de árbol fue de 28.3 %. En general, los loci amplificados mostraron un patrón monomórfico, constituyendo la presencia de individuos heterocigotos la única forma de polimorfismo. El número de primers polimórficos fue 4 de 53, lo que representa el 7.5%. El valor PIC para cada par de primers varió entre 0.077 y 0.514. En solo 5 de los 11 loci utilizados para el análisis se observaron individuos heterocigotos. El porcentaje de individuos heterocigotos para estos loci varió entre 4 y 98 %. La incidencia de alelos nulos en cada locus varió entre un mínimo de 0% y un máximo de 38% de los individuos. El acervo genético de las accesiones analizadas parece ser estrecho y homogéneo. Se detectaron valores altos de similitud genética entre las accesiones (80 - 100%), usando el coeficiente de Jaccard. El método de agrupamiento UPGMA demostró que las accesiones no se asociaban ni por lugar de origen, ni por variedad.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos en estudios anteriores. El bajo porcentaje de transferencia de primers indica que las secuencias que flanquean a los microsatélites no se han conservado en el proceso de especiación de la papa y el tomate de árbol. La reducida diversidad genética en los cultivos de tomate de árbol podría explicarse por un relativamente reciente proceso de domesticación de la especie, y por una conjunción de factores geográficos/ecológicos, fenológicos y culturales que fomentan la homogenización genética entre y dentro de los cultivos.

## ABSTRACT

The present work establishes the genetic diversity of cultivated tamarillo (*Solanum betaceum*) among various orchards of Imbabura, Tungurahua and Pichincha using SSR markers. The success of cross-species amplification in tamarillo of 53 SSR primer pairs originally developed in potato (*Solanum tuberosum*) was also evaluated.

A total of 18 orchards were sampled and accessions of 50 individuals were selected for the analysis. All the accessions were classified as belonging to one of the following varieties: amarillo común, amarillo gigante, amarillo bola, morado común, morado gigante and morado bola.

The percentage of primer pairs that successfully amplified for the tamarillo was 28.3%. As a general feature, those loci that did amplify showed a monomorphic pattern. The only evidence of polymorphism appeared as heterozygous individuals. The number of polymorphic primers was 4 out of 53, which represents 7.5%. The PIC value for each of the primer pairs varied between 0.077 and 0.514. Heterozygous individuals were reported for only 5 of the 11 primers used in the analysis. The percentage of heterozygous individuals for each of these loci oscillated between 4 and 98 %. The occurrence of null alleles for each locus varied between a minimum of 0% and a maximum of 38% of the accessions. The genetic pool of the sample seem to be narrow and homogeneous. By using the Jaccard coefficient, high values of genetic similarity among the accessions were recorded (80-100%). The UPGMA clustering method revealed a clustering pattern that did not respond neither to accession origin, nor to any morphological feature.

The results presented here correspond well with those of previous works. The low percentage of cross-amplification implies that the flanking regions of the potato are no conserved in the tamarillo. The reduced genetic diversity found to occur in the cultivated tamarillo could be explained by a relatively recent domestication process of this species and by a conjunction of geographical/ecological, phenological and cultural factors that enhance the homogenization within and among cultivated populations.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DERECHOS DE AUTOR .....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1. MARCADORES MOLECULARES .....	10
1.2. MICROSATÉLITES .....	12
1.2.1. <i>Características de los microsatélites</i> .....	15
1.2.2. <i>Comparación con otros marcadores moleculares</i> .....	17
1.2.3. <i>Aplicabilidad de los microsatélites</i> .....	18
1.3. IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA .....	20
1.3.1. <i>Biodiversidad y conservación</i> .....	20
1.3.2. <i>Fitomejoramiento</i> .....	22
1.4. EL TOMATE DE ÁRBOL .....	23
1.4.1. <i>Características generales</i> .....	23
1.4.2. <i>Producción de tomate de árbol</i> .....	25
<b>2. justificación .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Objetivo general .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Objetivos específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>5. ÁREA DE TRABAJO.....</b>	<b>32</b>
<b>6. MATERIALES .....</b>	<b>32</b>
6.1. CULTIVO IN VITRO .....	32
6.1.1. <i>Esterilización de semillas y cultivo</i> .....	32
6.2. EXTRACCIÓN DE ADN .....	33
6.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN .....	33
6.4. PCR .....	33
6.5. ELECTROFORESIS EN AGAROSA .....	34
6.6. ELECTROFORESIS EN ACRILAMIDA .....	34
6.7. TINCIÓN CON PLATA .....	35
<b>7. MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
7.1. MUESTREO .....	35
7.2. GERMINACIÓN IN VITRO Y OBTENCIÓN DE HOJAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN .....	36
7.3. EXTRACCIÓN DE ADN .....	37
7.4. CUANTIFICACIÓN Y DILUCIÓN DEL ADN .....	38
7.5. PCR .....	38
7.6. ELECTROFORESIS EN AGAROSA .....	39
7.7. ELECTROFORESIS EN ACRILAMIDA .....	39
7.8. TINCIÓN .....	39
7.9. ANÁLISIS DE DATOS .....	40
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
8.1. PROTOCOLO .....	41
8.2. TRANSFERIBILIDAD DEL SET DE PRIMERS .....	41
8.3. VARIABILIDAD GENÉTICA.....	43

<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
9.1. TRANSFERIBILIDAD DE PRIMERS.....	44
9.2. DIVERSIDAD GENÉTICA .....	49
9.3. CLASIFICACIÓN DE LAS VARIEDADES .....	53
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>11. Recomendaciones .....</b>	<b>55</b>
11.1. EN CUANTO AL PROTOCOLO .....	55
11.2. EN CUANTO AL FITOMEJORAMIENTO DEL CULTIVO.....	56
<b>12. Referencias.....</b>	<b>57</b>
<b>13. TABLAS.....</b>	<b>71</b>
<b>14. FIGURAS.....</b>	<b>86</b>
<b>14. ANEXOS .....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

<b>Tabla 1.</b> Variedades de tomate de árbol descritas por diversas fuentes. ....	71
<b>Tabla 2.</b> Sitios de colección de las accesiones de tomate de árbol.....	72
<b>Tabla 3.</b> Descripción de las características del fruto usadas para la clasificación de variedades en el presente estudio. ....	73
<b>Tabla 4.</b> Accesiones de tomate de árbol utilizadas en este estudio, agrupadas por provincia de origen y la variedad a la que pertenecen. ....	73
<b>Tabla 5.</b> Accesiones de tomate de árbol analizadas y agrupadas por la variedad a la que pertenecen.....	74
<b>Tabla 6.</b> Reactivos y volúmenes utilizados para la amplificación por PCR de los SSRs. ....	75
<b>Tabla 7.</b> Programa de PCR usado para la amplificación de los loci microsatélites. La temperatura de annealing ( <i>T</i> ) varía para cada par de primers (ver Tabla 8). ....	75
<b>Tabla 8.</b> Características de los pares de primers usados para el análisis de las accesiones de tomate de árbol. ....	76
<b>Tabla 9.</b> Protocolo de tinción con plata de los geles de acrilamida.....	77
<b>Tabla 10.</b> Valores de similitud genética entre todas las accesiones obtenidos utilizando el coeficiente de Jaccard y agrupados por lugar de origen y por variedad de las muestras de tomate de árbol. ....	77
<b>Tabla 11.</b> Promedio, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los valores de similitud genética obtenidos con el coeficiente de Jaccard y agrupados por variedades y lugar de origen de las accesiones de tomate de árbol.....	84
<b>Tabla 12.</b> Ejemplos de transferencia de primers SSR en plantas, con el número de loci amplificados (A), el número de loci polimórficos (P) y el número total de loci muestreados (n). ....	85
<b>Figura 1.</b> Vista externa del fruto y corte transversal de cada una de las variedades propuestas para el tomate de árbol en este estudio.....	86
<b>Figura 2.</b> Geles de acrilamida en los que se muestra la separación por electroforesis de productos de amplificación por PCR de algunos de los pares de primers usados en el estudio para analizar las accesiones de tomate de árbol.....	89
<b>Figura 3.</b> Dendrograma generado por el método UPGMA, usando el coeficiente de similitud de Jaccard, a partir de los patrones de bandas generadas por 11 pares de primers de SSRs en 50 accesiones de tomate de árbol.....	92
<b>Anexo 1.</b> Comparación de características entre los marcadores moleculares más populares..	93
<b>Anexo 2.</b> Plagas y enfermedades que afectan al tomate de árbol y su tratamiento. ....	93

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Marcadores moleculares

En los últimos 30 años, se ha producido un extenso desarrollo en el campo de los marcadores moleculares, las herramientas genómicas que permiten analizar desde diversos ángulos y para múltiples fines el ADN. Varían ellos desde la forma en que funcionan hasta su poder informativo y sus aplicaciones. Se define a un marcador molecular como “cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético” (Nuez y Carrillo 2000).

Antes del advenimiento de los marcadores moleculares, los únicos marcadores disponibles para estudios de genética y para mejoramiento eran los marcadores morfológicos, que presentan severas limitaciones en sus posibilidades de aplicación. Un marcador morfológico es cualquier fenotipo, generalmente de fácil identificación visual, cuya expresión esté ligada a un gen de interés. El principal limitante de este tipo de marcadores es la dificultad para identificar su relación a genes de importancia económica (Ferreira y Gratapaglia 1998). Además, la expresión de los marcadores morfológicos, especialmente en plantas, puede depender de factores ambientales o fenológicos, y su evaluación con frecuencia solo es posible a nivel de todo el organismo y cuando éste llega a estado adulto (Azofeifa-Delgado 2006). Por el contrario, los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, esto es que las sustituciones alélicas no tienen otros efectos fenotípicos, son insensibles al ambiente, y si éste tiene alguna influencia (proteínas), ésta es de tipo cuantitativo mas no cualitativo (Nuez y Carrillo 2000); presentan mayor polimorfismo, pueden aplicarse desde muy temprano en el desarrollo de las plántulas y en cualquier tipo de material vegetal , además de que no dependen de la época del año en que se realice el análisis y están libres de efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado 2006, Ferreira y Gratapaglia 1998).

Los marcadores moleculares pueden ser aplicados en una serie de campos que incluye desde la conservación de los recursos genéticos hasta la mejora de variedades de importancia comercial (Nuez y Carrillo 2000). Han ayudado en la elaboración de colecciones núcleo ex situ a partir de poblaciones, identificando genotipos representativos que incluyan alelos diferenciados para cada población (Lanteri y Barcaccia 2006, Segarra-Moragués et al. 2005). Estas colecciones núcleo proveen una introducción para posteriores estudios de diversidad de las poblaciones in situ y son una fuente potencial para la identificación de genotipos de interés para programas de mejoramiento de los cultivos (Lanteri y Barcaccia 2006).

Más aún, el uso de este tipo de análisis moleculares hace posible la elucidación de las dinámicas del flujo génico entre poblaciones y el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas, que a su vez ayuda a resolver preguntas taxonómicas y evolutivas (De Vicente et al. 2006). Han servido para identificar áreas de origen y patrones de domesticación de los cultivos (Sanjur et al. 2002), y en cuanto se refiere al mejoramiento en plantas de interés comercial, los marcadores moleculares son de utilidad en la introgresión de genes, el desarrollo de líneas puras, la identificación varietal, entre otras aplicaciones (Nuez y Carrillo 2000).

Dentro de los marcadores moleculares se suele hacer una distinción entre aquellos que utilizan proteínas (isoenzimas) y aquellos basados en el ADN. Los marcadores bioquímicos (proteínas) se limitan a un grupo de enzimas funcionales y su polimorfismo se restringe a variaciones en la secuencia de los genes que codifican para tales proteínas; por el contrario, el polimorfismo en los marcadores de ADN puede ocurrir en cualquier parte del genoma, tanto en secciones codificantes como no-codificantes y tanto en elementos simples como repetitivos del ADN (Bachmann 1994).

Existe diferencia en el número de loci que analizan los distintos marcadores, lo que les confiere diferentes características. Los marcadores que analizan un solo locus por vez (SSR,

RFLP) se caracterizan usualmente por ser co-dominantes (pueden diferenciar a individuos homocigotos de los heterocigotos) y proveen datos más robustos y comparables que los marcadores dominantes (AFLP, RAPD), cuyo complejo patrón multilocus limita hasta cierto punto su comparabilidad entre estudios (Lanteri y Barcaccia 2006).

Los marcadores de ADN pueden ser agrupados en tres categorías por su modo de operación: I. los que no utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como los RFLPs; II. aquellos que se valen del PCR y que utilizan además primers no específicos, como los RAPDs y; III. Los marcadores genéticos que utilizan PCR y que requieren primers específicos (Azofeifa-Delgado 2006). Dentro de este último grupo se encuentran los microsatélites. Los métodos basados en PCR requieren mucho menos ADN y por lo tanto son generalmente preferidos (Bachmann 1994).

Ante la multitud de tipos marcadores disponibles en la actualidad, la decisión de cuál de ellos es el más apropiado para cierto estudio en particular no siempre es fácil. Son varios los parámetros a considerar y generalmente el uso de una combinación de técnicas resulta ser la manera más adecuada de obtener la información requerida (Lanteri & Barcaccia). El sujeto de análisis también debe ser considerado al momento de elegir, porque ciertos tipos de marcadores han resultado de utilidad en unas especies, pero no en otras (Gupta et al. 1999).

## **1.2. Microsatélites**

Reportados por primera vez por Hamada et al. (1982), los microsatélites o SSRs, por sus siglas en inglés, son un tipo de marcador molecular que aprovecha la existencia de secuencias repetitivas de nucleótidos distribuidas aleatoriamente a lo largo de todo el genoma. En realidad el término “microsatélite” se refiere a esas secuencias específicas de ADN, solamente que se usa por extensión para designar a toda la técnica que involucra a estas secuencias. Un microsatélite es uno o varios conjuntos de 1 a 4 pares de bases adyacentes, denominados también como motivos, que se repiten uno al lado del otro 2 o más veces (Powell et al. 1996).

Generalmente las repeticiones de dinucleótidos (GT, AT, GA, etc.) son más comunes, que las repeticiones de tri- o tetranucleótidos (McPherson et al. 1992). Hace ya más de dos décadas se descubrió y quedó bien establecido que los SSRs estaban bien representados en toda la gama de organismos eucariotas (Hamada et al. 1982, Tautz y Renz 1984). Estas secuencias repetitivas se pueden encontrar incluso en el material genético de los cloroplastos y son análogas a las presentes en el genoma nuclear, solamente que están compuestos, de manera característica, por motivos mononucleótidos (Bryan et al. 1999). Las secuencias de los microsátélites de estos organelos (cpSSRs) son más conservadas que aquellas presentes en el ADN nuclear, debido a una menor tasa de mutación (Provan et al. 1999) y presentan un nivel de polimorfismo mayor que el de otros marcadores aplicados en cloroplastos (Provan et al. 2001).

Los motivos microsátélites varían en abundancia entre los diferentes organismos. Así, mientras que  $(CA)_n$  es uno de los motivos más frecuentes en humanos y algunos mamíferos y menos abundantes en plantas, lo contrario sucede con el motivo  $(AT)_n$ . Los trinucleótidos que ocurren con mayor frecuencia en plantas son  $(AAG)_n$  y  $(AAT)_n$  (Gupta et al. 1996, Powell et al. 1996). Se ha estimado que aproximadamente una secuencia mayor a los 20 bps ocurre cada 33 Kb en los genomas nucleares de las plantas (Powell et al. 1996). El número de repeticiones del motivo puede variar dando lugar a diferentes alelos, por ejemplo:  $(GA)_8$  y  $(GA)_9$  son dos alelos del mismo microsátélite. De hecho, existe por lo general una relación directamente proporcional entre la longitud del microsátélite y la cantidad de alelos detectados: a mayor número de repeticiones del motivo del microsátélite, mayor es el número de alelos encontrados (Gupta et al. 1996, FitzSimmons et al. 1995). En humanos, se ha encontrado que un número de repeticiones menor a 12 usualmente coincide con niveles muy bajos de polimorfismo (Gupta et al. 1996). A pesar de esto, en plantas, algunos microsátélites pueden llegar a ser tanto o más variables e informativos que aquellos con repeticiones más largas

(Peakall et al. 1998). En ocasiones el número de repeticiones de un motivo microsatélite llega a ser tan grande que el tamaño de los alelos puede superar las 300 bps (Kubis et al. 1998).

Las secuencias microsatélites pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a la forma en que los motivos se repiten: perfectos (sin interrupción), por ejemplo  $(GT)_n$ ; imperfectos (interrumpidos por secuencias que no se repiten), como  $(GT)_n$ -GGT- $(GT)_m$ ; y compuestos (motivos que se repiten de forma adyacente), por ejemplo  $(GT)_n(AT)_m$  (McPherson et al. 1992, Gupta et al. 1996).

Los primers son secuencias de ADN complementarias a aquellas que flanquean los microsatélites y permiten así su ubicación dentro del genoma. En los extremos 3' del microsatélite se hallan secuencias de ADN conservadas específicas para cada uno de ellos. De este modo, para la amplificación exitosa de cada microsatélite se necesita en realidad de un par de primers, llamados R y F (reverse y forward, en inglés), que se unan de manera específica cada uno a una de las dos regiones aledañas al microsatélite – cada una de estas en el extremo 3' de cada cadena del ADN. Para la técnica de los SSRs tienen que diseñarse secuencias de nucleótidos complementarias a las anteriores, que a modo de sondas detecten la ubicación de los microsatélites en la cadena de ADN (Gupta et al. 1996). Es tan inusual que secuencias de una longitud de entre 20 y 30 nucleótidos aparezcan independientemente por azar, que el diseño de primers de esa longitud asegura que el ADN amplificado durante el PCR a partir de ellos corresponda a las regiones específicas que se quiere analizar y no a otras secuencias arbitrarias (Bachmann 1994).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permite hacer detectable y hasta visible la presencia de secuencias microsatélites dentro del ADN. El PCR crea copias de ADN, pero centrándose en regiones de interés, en este caso las regiones SSRs. La presencia de los primers permite esta amplificación selectiva del genoma. La técnica de PCR consiste en la ejecución repetida de un ciclo que, mediante cambios de temperatura,

permite: 1) la desnaturalización de la cadena de ADN (~95 °C), 2) la unión (o annealing) de los primers a sus secuencias complementarias en la cadena denaturada (37-60 °C, dependiendo del contenido de GC), y 3) la síntesis de nuevas cadenas de ADN (elongación), a partir de la región de los primers gracias a la acción la enzima ADN polimerasa (72 °C) (McPherson et al. 1992, Nicholl 2002). El resultado del PCR es una gran cantidad de copias de las secuencias microsatélites, que puede ser detectada visualmente mediante electroforesis en gel. Esta técnica permite la separación de cadenas de ADN por su peso molecular, usando un campo eléctrico. Las secuencias de ADN sometidas a electroforesis migran a través de una matriz tridimensional que puede estar formada por diversos compuestos como la agarosa o la acrilamida (Nuez y Carrillo 2000).

La adición de bromuro de etidio en la preparación de geles de agarosa permite detectar cantidades tan pequeñas como 1-5 ng de ADN (Nicholl 2002). Sin embargo, la electroforesis en geles de acrilamida y su tinción con plata es preferida porque es una técnica hasta cinco veces más sensible y menos tóxica y ha demostrado tener un alto grado de confiabilidad (Yábar 2003, Caetano-Anollés y Gresshoff 1994).

### **1.2.1. Características de los microsatélites**

Las secuencias microsatélites pueden considerarse como un gen cualquiera, esto es, que cuentan con un par de copias en un organismo diploide, para el cual éste puede ser hetero- u homocigoto (Sunnucks 2000). Los alelos de un organismo que fuera heterocigoto para una secuencia microsatélite diferirían solamente en el número de repeticiones del motivo de dicho microsatélite; las secuencias blanco de los primers que permiten identificar tal microsatélite serían las mismas para todos los alelos (Gupta et al. 1996). En un gel de electroforesis los alelos de un mismo locus microsatélite se evidencian como dos bandas de distintos peso molecular, estando el número máximo de bandas determinado por la ploidía del organismo. De esta manera, un análisis con SSRs, de una muestra de cierta población permite fácilmente

saber el número de alelos y el nivel de heterocigocidad de esa muestra para cada locus microsatélite analizado.

El papel que cumplen los SSRs dentro del genoma es aún sujeto de debate. A pesar de que se considera comúnmente a los microsatélites como marcadores genéticos neutros desde el punto de vista evolutivo, varias son las funciones se especulan sobre la presencia de estas secuencias (revisado en Li et al. 2002): organización cromosomal (al menos en ciertos taxones específicos), participación en la estructura secundaria del ADN, por su capacidad de formar múltiples estructuras de “asa”, que estarían también comprometidas en la regulación de la expresión génica. Una mayor densidad de secuencias microsatélites en las regiones cercanas al extremo 5' de genes en plantas también se ha asociado con una posible implicación en la regulación de la transcripción de dichos genes (Fujimori et al. 2003).

El valor de los microsatélites reside en su condición altamente polimórfica, su naturaleza codominante, su abundancia dentro del genoma, su detección sencilla por PCR, cobertura extensa del genoma y su requerimiento de una pequeña cantidad de ADN para el análisis (Powell et al 1996, Ferreira y Gratapaglia 1998). Una de las fortalezas de esta técnica es que los loci microsatélites pueden llegar a ser altamente polimórficos entre especies, y aún más importante, entre individuos y poblaciones de una misma especie (Gupta et al. 1996). En particular, resultan de gran utilidad para especies poco polimórficas, como lo son comúnmente las plantas autógamas, para las cuales la probabilidad de encontrar otros marcadores polimórficos de calidad es baja (Nuez y Carrillo 2000). Además, estos marcadores pueden ser fácilmente distribuidos entre diferentes laboratorios a través de las secuencias de los primers, lo que permite adicionalmente un alto grado de comparabilidad entre resultados (Powell et al 1996).

Por sus características, los SSRs son marcadores genéticos poderosos, por lo que sus limitaciones no se relacionan con su capacidad de brindar información, sino con cuestiones

prácticas. La primera de ellas y a la que generalmente se alude primero tiene que ver con el laborioso y relativamente costoso proceso de desarrollo que conllevan, aunque la paulatina disminución de costos y simplificación de los métodos de desarrollo han fomentado la aparición de cada vez más microsatélites específicos para más especies (Nuez y Carrillo 2000). Los SSRs realizan un análisis de un locus por vez, lo cual los pone en desventaja ante otros marcadores como los AFLPs por ejemplo, que con una misma combinación de primers producen un espectro de análisis multilocus. Esto cobra relevancia en especial cuando se considera que en un mismo gel de electroforesis de AFLPs se puede evidenciar el polimorfismo de una multitud de locus, mientras que en uno de microsatélites solamente se expresa el de un solo locus (Sunnucks 2000). Esto obviamente implica una mayor cantidad de recursos. El grado de transferibilidad entre especies de los marcadores SSR puede presentar una desventaja en algunos casos porque su espectro de aplicabilidad suele limitarse a grupos de especies muy cercanas (Nuez y Carrillo 2000).

### **1.2.2. Comparación con otros marcadores moleculares**

Existe una diversidad de estudios enfocados en comparar de manera práctica las virtudes y falencias entre los distintos tipos de marcadores moleculares. En el Anexo 1 se resumen las características principales de los tipos de marcadores moleculares más populares.

Ross et al. (1999) concluyen en su estudio que los microsatélites fueron los marcadores más efectivos para detectar la estructura genética en poblaciones de hormigas, al compararlos con otras 5 clases de marcadores moleculares. En un estudio comparativo para detectar variabilidad genética en el maíz, García et al. (2004) encontraron que, frente a otros marcadores genéticos (RFLPs, RAPDs y AFLPs), los SSRs ofrecían el segundo mayor contenido de información de polimorfismo (PIC) – que es un índice de polimorfismo de un marcador – y el cálculo de distancia genética obtenida con esta clase de marcador concordaba con el de los otros marcadores. Los autores concluían que a pesar que los microsatélites

demonstraron ser una herramienta de alto poder informativo, habría sido necesario analizar un mayor número de loci para que los resultados obtenidos fueran significativos. Esto resultaría en un incremento en los costos iniciales pues significaría el desarrollo de un mayor número de primers. Lanteri y Barcaccia (2006) encontraron que los estimados de diversidad genética arrojados por un set de 32 loci microsatélites y siete combinaciones de primers AFLP fueron congruentes.

Los SSRs tradicionalmente han mostrado un mayor nivel de polimorfismo frente a otros marcadores basados en PCR (Milbourne et al. 1997) y en general frente a la mayoría de marcadores moleculares (Nybom 2004). Sin embargo, marcadores como los AFLPs, que tienen la capacidad de analizar simultáneamente un mayor número de bandas por muestras, exhiben mayor índice de diversidad o Índice de Marcador.

Los SSRs no son adecuados para estudios de relaciones genéticas aunque quizás esto dependa del número de loci microsatélites que se usa (Russell 1997) que suele ser bajo – promedio de 8 por estudio (Nybom 2004). Los estimados de similaridad genética obtenidos usando SSRs siempre han sido más bajos que al usar otros marcadores (Russell et al. 1997).

Los sistemas multilocus son técnicamente más prácticos pero albergan algunas desventajas. Por un lado, no pueden brindar información sobre nivel de heterocigocidad, lo que puede limitar sus aplicaciones. Además, una proporción importante de la variación detectada por estos métodos podría ser no heredable y aún peor, no derivada del organismo. Por último, como consecuencia de la visualización simultánea de una multitud de marcadores (múltiples bandas en un mismo gel), los patrones producidos por sistemas multilocus difícilmente pueden ser comparados con exactitud entre diferentes ensayos (Sunnucks 2000).

### **1.2.3. Aplicabilidad de los microsatélites**

En las plantas, los microsatélites son ubicuos y evolucionan rápidamente por lo que son valiosos como marcadores moleculares y para “fingerprinting” (Kubis et al. 1998). Es por esto

que su uso en plantas se halla de igual manera muy difundido, en una multitud de especies de importancia económica como frutales (ver Azofeifa-Delgado 2006, para una revisión; Perera et al. 2001), arroz (Zeng et al. 2004), papa (Sukhotu et al. 2005, Raker y Spooner 2002), camote (Zhang et al. 2000), caña de azúcar (Cordeiro et al. 2003), rosa (Baydar et al. 2004), soya (Choi et al. 1999), trigo (Gupta et al. 1999), maíz (Lanteri & Barcaccia 2006) entre muchas otras, así como especies en vías de extinción (Segarra-Moragues et al. 2005). En animales, los microsatélites son uno de los marcadores moleculares de mayor preferencia para análisis de variabilidad genética en animales de granja (Simianer 2006) y su aplicación en animales silvestres también es bastante común especialmente cuando se trata de especies amenazadas (por ejemplo, Martínez-Cruz et al. 2002, Waits et al. 2007, Jehle & Arntzen 2002).

En plantas, los microsatélites han sido aplicados de diversas maneras y con diversos fines, desde el fitomejoramiento hasta la evaluación de poblaciones orientada a la conservación. Dentro del análisis de la estructura poblacional han sido de ayuda para la evaluación de la diversidad genética intra- e interpoblacional, tanto en especies silvestres, cultivos e incluso bancos de germoplasma. La naturaleza codominante de los SSRs permite su aplicación para determinar niveles de hibridación dentro de los individuos de una especie (Provan et al. 1996 citado en Powell et al. 1996, Xu et al. 2004). Otros rasgos poblacionales como el flujo genético y el origen y centros de diversidad (Pillon et al. 2006) han sido develados gracias al uso de marcadores microsatélites. El carácter hipervariable de los SSRs permite discriminar eficazmente entre individuos estrechamente relacionados (Powell et al. 1996), lo cual es de utilidad para la identificación de cultivares. Se han identificado en varias especies cultivadas secuencias microsatélites ligadas a genes que confieren características de interés comercial (Zeng et al. 2004), lo que ha sido aplicado a la selección asistida por marcadores (MAS por

sus siglas en inglés) (Roy et al. 2006) y en la construcción de mapas de ligamiento, sobre todo en cultivos mejor conocidos (Nuez y Carrillo 2000).

El proceso de desarrollo de los microsatélites constituye la principal desventaja de esta técnica pues ha resultado laborioso y relativamente caro en comparación con otros marcadores. El mayor reto consiste en identificar los microsatélites dentro del genoma. Su búsqueda se puede realizar a través de la secuenciación del ADN o mediante la creación de bibliotecas genómicas. Sin embargo, ambos métodos suponen una inversión adicional de recursos y son relativamente pocas las especies vegetales para las que se ha generado bases de datos con secuencias genéticas. Una vez que se han localizado los microsatélites dentro del genoma, se identifican las secuencias que los flanquean, que servirán para la construcción de primers, y finalmente es necesario un fase de experimentación para corroborar tanto la amplificación exitosa de los microsatélites, como que éstos sean polimórficos (Nuez y Carrillo 2000, Ferreira y Gratapaglia 1998).

### **1.3. Importancia de la diversidad genética**

#### **1.3.1. Biodiversidad y conservación**

El papel de la diversidad genética como el ingrediente sustancial para la evolución es indiscutible. La necesidad de cuantificar y de conservar la biodiversidad en general y la biodiversidad de los recursos agropecuarios en particular, se hizo explícita y fue reconocida a través de la ratificación de muchos países del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB 1992).

Se ha reconocido que las variedades vegetales desarrolladas local y tradicionalmente, constituyen el material cultivado con la mayor diversidad genética y con la mejor adaptación al ambiente particular en el que crecen. Desafortunadamente, algunas de estas variedades se han perdido ante la difusión de sistemas de producción intensivos, basados en el monocultivo,

que promueven el uso de cultivares comerciales de reducida diversidad genética. Muchas de las variedades locales han desaparecido antes de que pudieran haber sido reconocidas y aprovechadas como fuentes importantes de germoplasma (Lanteri & Barcaccia).

La definición de estrategias de conservación de germoplasma depende del conocimiento de la localización, distribución y extensión de la diversidad genética. Tal conocimiento permite tomar decisiones sobre cuáles poblaciones tomar en cuenta (para un programa *ex situ*) o en cuáles poner mayor énfasis para proteger esas poblaciones *in situ* (Vicente et al. 2006).

La conservación de la diversidad genética está directamente relacionada con el tema de seguridad alimentaria. Esto se puso de manifiesto dentro del Tratado Internacional sobre los Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, que reconoce que los recursos fitogenéticos son fundamentales para la alimentación mundial porque son la materia prima a partir de la cual agricultores y científicos pueden promover la calidad y la productividad de los cultivos, de modo que se pueda enfrentar el reto de alimentar a una población siempre creciente (ITPGR 2001). La Región Andina ha sido contemplada como una región clave para cumplir con estos objetivos, pues es centro de origen y diversidad de un significativo número de especies importantes (entre ellas el tomate de árbol) y potencialmente claves para la seguridad alimentaria, incluso a nivel mundial (Silva s.f.). La limitada diversidad genética de las plantas cultivadas las hace especialmente vulnerables a la propagación rápida de plagas y enfermedades (Tanksley y McCouch 1997), poniendo en riesgo la fuente de alimentación de muchas personas que dependen de esos cultivos, como ha sucedido ya en el pasado (Ochoa 2000, Tanksley y McCouch 1997).

La introducción de nuevos cultivos en el mercado mundial es de interés tanto para consumidores como para productores, pues ofrece múltiples ventajas desde diversos puntos de vista para el sector productivo y el ambiente, y la investigación destinada a la exploración y mejoramiento de nuevos cultivos es un negocio rentable, como lo demostró ser la

introducción y producción de tomate de árbol y de kiwi (*Actinidia* spp.) en Nueva Zelanda (Prohens et al. 2003).

### **1.3.2. Fitomejoramiento**

Si bien es importante preservar la diversidad de los recursos fitogenéticos, porque constituye la base de todos los cultivos que sostienen la alimentación mundial, también es cierto que es pertinente aprovechar todo el conocimiento fruto de ese esfuerzo de conservación, para el mejoramiento de esos mismos cultivos. Se estima que cerca de la mitad del incremento total en la producción de los cultivos logrado durante los últimos 50 años se debe al mejoramiento genético de los cultivos, siendo la otra mitad resultado del avance en las técnicas de cultivo (Suslow et al. 2002).

Actualmente, el papel de la biodiversidad en el mejoramiento de los cultivos cobra importancia también porque es del acervo genético conformado por variedades, poblaciones silvestres y especies relacionadas de una planta, que se seleccionan las características que se desean introducir en las especies cultivadas. La hibridación mediante cruces inter- e intra-específicos ha sido empleada para la introducción de genes de interés en cultivares de muchos cultivos (Ashraf y Ahmad 1999). La introgresión (transferencia de un gen o carácter de un individuo a otro por retrocruces repetidos con el mismo parental) de genes en variedades domesticadas, provenientes de especies silvestres relacionadas, ha sido aprovechada sobre todo para conferir algún tipo de resistencia. La identificación del así llamado “vigor híbrido”, ayudó a los agricultores a conseguir cultivos más productivos y uniformes (Suslow et al. 2002).

Aunque, en general, el proceso de selección artificial llevado a cabo para mejorar los cultivos ha conducido al estrechamiento progresivo de la base genética la diversidad de los mismos, ésta no tiene que ser la tónica necesariamente. Los mismos programas de mejoramiento pueden ser modificados para incluir especies silvestres, variedades y cultivares exóticos para,

a través de cruces introgresivos, introducir nuevo material genético en las poblaciones de los cultivares modernos. De este modo, es posible una alta producción en los cultivos sin disminuir peligrosamente su acervo genético (Reif et al. 2005).

## **1.4. El tomate de árbol**

### **1.4.1. Características generales**

En el ámbito de la agricultura, los Andes tropicales son de especial importancia por constituir un centro importante de diversidad y de origen de una gran variedad de cultivos que encierran un potencial nutritivo y económico en la mayoría de los casos, apenas explotados (Jacobsen et al. 2003, Tapia s.f., NRC 1989). Dentro de las plantas de interés comercial, la familia de las Solanáceas cobra una relevancia especial porque en la Región Andina se ha diversificado en multitud de especies, como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*S. lycopersicon*), el pimiento (*Capsicum spp.*), la berenjena (*S. melongena*), el tabaco (*N. tabacum*) y el tomate de árbol, entre otras que han sido aprovechadas por el hombre desde hace mucho tiempo (SOL 2004, NRC 1989).

Es ya reconocido el potencial económico del cultivo de tomate de árbol, así como sus limitaciones (FAO 1992, NRC 1989). El tomate de árbol se cultiva por sus frutos. Éstos se usan crudos o cocinados en la preparación de jugos, dulces e incluso salsa de ají (Bohs 1989). El tomate de árbol es una buena fuente de pro-vitamina A (caroteno), vitaminas B<sub>6</sub>, C, E y de hierro (NRC 1989).

*Solanum betaceum* proviene de la Región Andina, en donde existe una larga tradición de su cultivo (Bohs 1989). Se acepta la región del sur de Bolivia y el noroccidente de Argentina como su centro de origen por la ocurrencia de poblaciones silvestres en esta zona (Meadows 2002). A pesar de su procedencia, el mayor productor de esta fruta es Nueva Zelanda, donde su cultivo ha sido popular desde hace más de 60 años, hasta tal punto que la denominación de

“tamarillo”, acuñada en ese país, es el nombre con el que se lo conoce a nivel internacional (NRC 1989).

*Solanum betaceum* es un árbol pequeño de 2-3 m de alto, perenne, de tallo único, ramificado a la altura de 1-1.5 m (FAO 1992). Sus flores son pentámeras, radialmente simétricas y hermafroditas. Su diámetro es cercano a los 25 mm, y sus pétalos varían en color entre blanco y rosa pálido, algunas veces con manchas moradas. Aunque es posible la autofecundación en las flores, parece ser que el mecanismo más importante de fertilización es la polinización mediada por abejas y moscardones (Lewis y Cosidine 1999). La planta tiene un período de vida de 3-4 años, iniciándose la floración entre 8 y 10 meses después de la siembra en terreno definitivo y manteniéndose continua a lo largo del año (FAO 1992).

Este cultivo se presenta en los Andes entre los 1800 m y los 2800 m de altitud donde la temperatura promedio anual varíe entre 13 y 24 °C (SICA s.f.). En el Ecuador por lo tanto, es posible encontrarlo a lo largo de toda la Sierra desde Carchi hasta Loja (MAG 2001) sobre todo en los valles interandinos temperados (Cadena 2001). Las provincias con mayor representatividad en el cultivo de tomate de árbol son Tungurahua, Imbabura y Pichincha, aunque también hay una producción importante en Azuay y Chimborazo (Cadena 2001).

El fruto puede variar considerablemente en su tamaño y aspecto: la piel es usualmente roja pero oscila entre amarilla hasta púrpura, a veces con rayas longitudinales oscuras; el color del mesocarpo varía entre amarillo cremoso a naranja pálido; el mucílago que rodea a las semillas puede ser amarillento o morado oscuro; y la forma puede ser desde redonda hasta “puntuña” (Bohs 1989). Este grado de variabilidad en las características morfológicas es predecible en especies sujetas a selección humana por sus frutos (Bohs 1989), y sin duda crea dificultades para establecer cultivares definidos.

No existe un consenso en cuanto a las variedades existentes del tomate de árbol y las mismas dependen del país de producción. Así, mientras en Colombia (el mayor productor americano

de esta fruta) se distinguen tres tipos, a nivel internacional son reconocidos varios cultivares, algunos de ellos desarrollados en países fuera del área andina, especialmente Nueva Zelanda (MAG 2001). Para el Ecuador, Albornoz (1992) describe con detalle cinco variedades cultivadas. Morales (2001) sin embargo, en su diagnóstico del cultivo del tomate de árbol, registra seis variedades, clasificación que coincide con la propuesta en este estudio a excepción de la variedad “criollo”. Esta similitud se explica porque en ambas investigaciones se consultó a los propios agricultores sobre la variedad cultivada en su plantación, es decir se aplicó la nomenclatura manejada entre ellos. Además, el ámbito geográfico que cubrieron los dos estudios coincide; quizás en otras regiones del país la clasificación de variedades para el tomate de árbol sea diferente. Todas las variedades mencionadas constan en la Tabla 1.

#### **1.4.2. Producción de tomate de árbol**

La producción de tomate de árbol ha tenido históricamente severas limitaciones tanto por la manera en que se manejan los cultivos como por las características de la planta (FAO 1992). Aún en cultivares seleccionados suele presentarse inestabilidad en las características del fruto, por lo cual, no puede asegurarse una producción uniforme en tamaño, color o acidez lote tras lote, año tras año. Es frecuente además, la aparición de pequeñas calcificaciones en el fruto, que si bien no representan un problema cuando se utiliza el fruto fresco (porque estos “cálculos” aparecen en las capas más externas), sí presentan una desventaja para productos en los que se procesa el fruto completo (NRC 1989). En los países andinos no ha existido una caracterización clara y estandarizada de las variedades del tomate de árbol. A esto se suma una ausencia de técnicas de cultivo a nivel comercial (técnicas de poda y regeneración de plantas) y un cultivo restringido en extensión, muchas veces incluso limitado al huerto familiar (FAO 1992). Quizás el mayor inconveniente sea la vulnerabilidad ante una multitud de plagas (insectos y nemátodos) y enfermedades (virus, hongos y bacterias) (NRC 1989, Barghchi 1997) (Anexo 2). El grado de susceptibilidad depende sin embargo de la densidad

de la plantación y del área geográfica donde se encuentra el cultivo (Bohs 1989). Paradójicamente, el tomate de árbol parece mostrar resistencia al virus del mosaico del tabaco, un virus que afecta a varias solanáceas, entre ellas, la papa, el tomate y el tabaco. Probablemente se podría encontrar en el tomate de árbol una fuente de resistencia contra esta enfermedad (NRC 1989).

Hace ya muchos años (NRC 1989) se reconocía que el tomate de árbol producido en los países andinos estaba lejos de cumplir los estándares que lo harían un producto con calidad de exportación. Muy poco ha cambiado en lo que respecta al Ecuador: no existe pureza varietal en las plantaciones (existe mucha variabilidad en las características del fruto y hay mezcla de cultivares en un mismo cultivo), ni material vegetal (semillas, frutos o plántulas) certificado libre de virus o que garantice una productividad estable o la propagación de líneas puras (Morales 2001). La variabilidad en la calidad de la fruta, que no siempre cumple con los parámetros de tamaño y color adecuados, junto con las pérdidas provocadas por la diseminación de enfermedades (propiciadas por la introducción de plantas sin certificación y por malas prácticas de cultivo), han hecho mella en la producción de tomate de árbol (MAG 2001). De hecho, una parte del tomate de árbol que se consume en el país proviene de Colombia, país que tiene en el Ecuador a su principal importador de esta fruta (Lascano s.f.). La exportación de tomate de árbol en el Ecuador durante el período 1990 – 2007 ha sido inestable con dramáticas caídas en los volúmenes exportados en varias ocasiones (fuente Ecuadorexporta). Aunque en esta variabilidad inciden de manera directa circunstancias sociales, políticas y económicas, es indudable que la calidad del producto ha sido un factor determinante (Lascano s.f.).

Es clara la necesidad de emprender algunas líneas de acción y sobre todo de investigación que apunten a solucionar los problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo de tomate de árbol y que ayuden a aliviar la carga ambiental que éste supone (NRC 1989, FAO 1992). FAO (1992)

recomienda específicamente para este cultivo llevar a cabo investigaciones que permitan esclarecer la amplitud de la variabilidad que se observa a nivel morfológico y las relaciones genéticas con especies silvestres relacionadas, así como la experimentación con técnicas que conduzcan a incrementar la producción en los cultivos. Se ha reconocido también la necesidad de crear una colección de germoplasma dentro de la cual se pueda identificar material con características superiores para emprender programas de fitomejoramiento enfocados en la consecución de líneas puras y cultivares resistentes a enfermedades y a factores ambientales (NRC 1989). La creación de híbridos se ha explotado tradicionalmente con éxito para este último propósito, aunque para el caso del tomate de árbol parece haber sustanciales barreras genéticas para la hibridización interespecífica (NRC 1989, Pringle y Murray 1991b).

Se han explorado varios acercamientos con el fin de mejorar el cultivo. La termoterapia *in vitro* (incubación de retoños a altas temperaturas) ha demostrado que puede conseguir plantas libres de virus (Barghchi 1997). Se ha probado que la transformación genética de plantas de tomate de árbol es posible. Esto permitiría potencialmente la introducción de genes para mejorar la calidad de la fruta o de resistencia contra factores tanto bióticos como abióticos, en especial para generar resistencia contra enfermedades como aquellas causadas por virus (Atkinson et al. 1993). En el Ecuador se ha tomado la iniciativa de crear un banco de germoplasma de tomate de árbol (Gavilanes 1992). Además, se ha buscado de manera aislada resistencia a nemátodos del género *Meloidogyne* con un éxito moderado (Pazmiño 1987, 1992) que no ha trascendido la frontera de la experimentación. Se ha evaluado también, con resultados positivos, el injerto de tomate de árbol en especies resistentes a nemátodos, como *Nicotiana glauca*, pero esta técnica resulta demasiado laboriosa para cultivos extensos (Herrera 1998).

El presente trabajo busca determinar el grado de diversidad genética en los cultivos de tomate de árbol de tres provincias del Ecuador mediante el uso de marcadores microsatélites. Las provincias de Imbabura, Tungurahua y Pichincha fueron seleccionadas para la recolección de accesiones porque actualmente son, junto con Azuay, las que mayor producción de tomate de árbol registran, y las que tradicionalmente han sido importantes en la producción de la fruta. Los microsatélites son marcadores moleculares con un alto nivel de polimorfismo, que pueden brindar abundante información sobre la estructura poblacional de una especie, siempre y cuando se trabaje con un número adecuado de ellos. Por esta razón y con el objetivo adicional de determinar hasta qué punto es posible transferir con éxito primers desarrollados en otra especie para el análisis en el tomate de árbol, la funcionalidad de 53 pares de primers de papa (*Solanum tuberosum*) fue puesta a prueba en el presente estudio.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Como se ha explicado anteriormente, el tomate de árbol es un fruto con un potencial comercial todavía no aprovechado en su máxima capacidad en el Ecuador. Esto se debe a dos problemas principales: la falta de pureza varietal en los cultivos y el ataque de plagas y enfermedades, que afectan la producción. Sobre este último tema parece que el acercamiento tradicional – el uso de agroquímicos – a parte de no erradicar el problema por completo, parece generar problemas ambientales y de salud en los agricultores. Ante la difusión generalizada de nemátodos en las plantaciones, la aplicación de nematicidas de alta toxicidad se ha hecho popular (MAG 2001).

A pesar del uso generalizado de agroquímicos en las plantaciones de tomate de árbol, los resultados, en el caso de algunas enfermedades como la antracnosis, considerada por los agricultores como una de las tres enfermedades más importantes en el cultivo de esta fruta, distan de ser satisfactorios (Morales 2001).

Adicionalmente, existe un inapropiado uso de pesticidas en los cultivos: son inadecuadas las dosis, las mezclas y el número de aplicaciones; es muy difundida la práctica de combinar productos con el mismo ingrediente activo pero diferente nombre comercial. Además la aplicación de estos agroquímicos representa un riesgo para la salud del agricultor, aumentan los costos de producción y afectan el ambiente (Morales 2001).

La aplicación de un programa de fitomejoramiento elevaría el estándar de las plantaciones, lo que a su vez mejoraría la calidad del producto y disminuiría el impacto que las técnicas actuales y tradicionales tienen sobre el ambiente. Para la formulación de un programa de mejoramiento efectivo, es fundamental tener conocimiento de la amplitud y la naturaleza de diversidad genética dentro del cultivo. Esta información es particularmente útil para la caracterización de cultivares y de accesiones individuales así como una guía para la selección de parentales para proyectos de hibridación

La variación genética “es la materia prima con la que se desarrollan nuevas variedades. Sin ella no hay mejora genética” (Nuez y Carrillo 2000). Mientras más amplia sea la variabilidad genética de una población, mayores son las opciones para que ésta enfrente con éxito los desafíos bióticos o abióticos en el futuro. Todas las plantas domesticadas y sus diferentes cultivares, que constituyen la base de nuestra agricultura, han surgido de la modificación genética de sus parientes silvestres como resultado de un proceso de selección gradual de miles de años. La diversidad genética ofrece así, mayores posibilidades de mejorar los cultivos (Tanksley y McCouch 1997).

Los cruces interespecíficos han sido una de las maneras más populares para lograr mejoramiento genético y muchas veces se han obtenido híbridos exitosos que incorporan en el cultivo que se intenta mejorar, caracteres de importancia comercial adquiridos de especies cercanas silvestres. A pesar de que se han reconocido caracteres que podrían ser de utilidad comercial en especies cercanas al tomate de árbol (Pringle y Murray 1991b), los cruces

interespecíficos con estas especies en general son inviables. Los experimentos demuestran que son pocas las especies con las que *S. betaceum* puede cruzarse exitosamente y producir híbridos que produzcan semillas; además estos cruces nunca son recíprocos (Bohs 1991, Pringle y Murray 1991b).

Adicional y desafortunadamente, en ninguna de las especies que puede hibridarse con el tomate de árbol se ha reportado alguna característica de mayor importancia que pueda conferir alguna ventaja para el cultivo del tomate de árbol (Pringle y Murray 1991b). Por otro lado, los híbridos F1 reportados por Bohs (1991) mostraban una reducción en la estabilidad del polen y la producción de semillas y su viabilidad fue baja comparada con la de los parentales y con los retrocruces. Esta incompatibilidad interespecífica hace que la búsqueda de resistencia a enfermedades y plagas en el tomate de árbol en individuos o poblaciones de la misma especie cobre una mayor importancia.

La presente investigación, al intentar determinar el grado y la forma en que se distribuye la variabilidad genética dentro de los cultivos del tomate de árbol, constituye una directriz hacia futuros estudios moleculares o programas de mejoramiento o de conservación para esta especie y sus variedades. La comprensión de la forma en que se distribuye la diversidad genética en los cultivos permite evitar su erosión genética y es fundamental en la formulación de estrategias encaminadas a ampliar la base genética de los mismos. El estudio genético de las poblaciones cultivadas del tomate de árbol es un primer paso para emprender un programa de fitomejoramiento. Uno de los objetivos de esta investigación consiste en poder identificar molecularmente las diferentes variedades de tomate de árbol. Tal caracterización molecular permite escoger de manera más eficiente y directa los genotipos – ligados a características morfológicas o de resistencia a factores bióticos o abióticos – que se desean introducir en el cultivo. Un producto mejorado facilita su comercialización al incrementar su competitividad en el mercado.

Es también desde el punto de vista metodológico que cobra valor este estudio. Por un lado, permitió comparar los resultados obtenidos por Ordoñez (2007), quien en una investigación paralela a la presente determinó el grado de variabilidad genética entre variedades del tomate de árbol usando AFLPs. Tal comparación permite evaluar el grado de eficacia entre las dos técnicas y ayuda a complementar la información que se tiene sobre este cultivo. Por otro lado, el presente proyecto también determina la efectividad con la que es posible transferir al tomate de árbol un set de primers diseñados para distinguir entre variedades de papa. Dado que es una práctica común en estudios que utilizan SSRs adoptar primers de especies cercanas, los ensayos de transferibilidad realizados aportan datos valiosos sobre los límites de la misma para futuros estudios.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el grado de variabilidad genética que existe en los cultivos de tomate de árbol de tres provincias del Ecuador.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el porcentaje de transferibilidad de 53 pares de primers de papa (*Solanum tuberosum*) al tomate de árbol.
- Determinar el nivel de heterocigocidad en las accesiones de tomate de árbol incluidas en el estudio.
- Establecer un protocolo para el análisis de variabilidad genética en el tomate de árbol mediante microsatélites.
- Evaluar el nivel de correspondencia entre la clasificación morfológica de variedades y su caracterización molecular.

- Comparar los resultados obtenidos en este estudio con los datos arrojados por un análisis similar en el tomate de árbol con AFLPs conducido paralelamente al presente estudio , en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.

## **5. ÁREA DE TRABAJO**

El cultivo in vitro y el análisis molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, con sede en Cumbayá, Ecuador.

## **6. MATERIALES**

Todo el material vegetal fue colectado en varias plantaciones de tomate de árbol seleccionadas al azar en Imbabura, Tungurahua y Pichincha (Tabla 2).

### **6.1. Cultivo in vitro**

- Cámara de flujo Labconco
- Frascos de vidrio de boca ancha, con tapa, de apx. 400 cm<sup>3</sup>
- Medio MS modificado (30 g agarosa/L ; 8 g agar/L)
- Etanol al 96%

#### **6.1.1. Esterilización de semillas y cultivo**

- Agua destilada estéril
- Etanol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 2.5%
- Tween 20
- Cernidor

## 6.2. Extracción de ADN

- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- CTAB 2X
- $\beta$ -mercaptoetanol
- Cama de arena
- Centrífuga Eppendorf 5415D
- Isopropanol
- Cloroformo/alcohol isoamílico 25:1
- Solución de etanol al 76%/NH<sub>4</sub>OAc 10 mM
- TE (Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) estéril

## 6.3. Cuantificación de ADN

- Espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraspec 2000
- Celda de cuarzo
- Agua destilada
- TE

## 6.4. PCR

- Tubos eppendorf de 0.2 mL
- Termociclador Techne TC-142
- Taq DNA Polimerasa 5 U/uL de Invitrogen
- Buffer para PCR sin Mg 10X de Invitrogen
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM de Invitrogen
- Agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas de GIBCO

- Solución dNTPs 20 mM (a partir de soluciones stock Invitrogen 100 mM de cada uno de los deoxynucleótidos)
- Set de primers donados por el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima, Perú

### **6.5. Electroforesis en agarosa**

- Agarosa de grado analítico Seakem
- TBE 1X (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM)
- Cámara de electroforesis MaxciCell EC360M
- Bromuro de etidio
- Cámara de fotos digital Kodak *DC 290 Zoom*
- Software Kodak 1D
- Fuente de luz UV
- Buffer de carga 6X (formamida, 940 uL/mL; EDTA 0.2M, 50 uL/mL; azul de bromofenol, 0.5 mg/mL)
- Ladder de 100 bp

### **6.6. Electroforesis en acrilamida**

- Acrilamida Invitrogen
- Bis-acrilamida Invitrogen
- TBE 10X
- Urea de grado analítico
- Persulfato de amonio al 10%
- TEMED (N-tetramethylethilenediamine)
- Cámara Vertical de electroforesis BIORAD Sequi-Gen GT
- Fuente de poder BIORAD PowerPac HV

- Bind-Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane)
- “Lluviex”, repelente de lluvia, de *Simoniz*
- Solución de etanol 96%/ac. Acético 0.5%
- Etanol al 70%
- Marcador de peso de 100 bp
- Buffer de carga 6X

### **6.7. Tinción con plata**

- Solución de etanol al 10% y ácido acético al 0.5%
- Solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (1.5g/L)
- Formaldehído al 37%
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) (15g/L)
- Agua destilada
- Transiluminador

## **7. MÉTODOS**

### **7.1. Muestreo**

Un total de 106 accesiones de tomate de árbol fue colectado en 18 parcelas de cultivo en las provincias de Imbabura, Tungurahua y Pichincha. Se visitó seis cultivos por provincia y en cada uno de ellos se recolectó hojas jóvenes y un fruto maduro de por lo menos cinco plantas cuyos frutos presentaran rasgos morfológicos diferentes y/o interesantes (Tabla 2).

El fruto de cada accesión (fruto entero y corte transversal) fue fotografiado (Figura 1) para determinar la variedad de cada muestra, y sus semillas fueron extraídas y guardadas para su posterior siembra in vitro.

Para diferenciar a cada individuo, a todas las muestras se les asignó un código de tres caracteres. El primero de ellos denota la provincia a la que pertenecen: Imbabura (I), Tungurahua (T) o Pichincha (P). El segundo corresponde al número de localidad en que la muestra fue colectada. La última letra de la codificación sirve para distinguir a los individuos dentro de una misma plantación. Así el código P7a corresponde al primer individuo de la plantación del señor Simón Ojeda, en Cayambe, Pichincha (Tabla 2).

La clasificación por variedades usada en este estudio surgió a partir de la nomenclatura usada por los agricultores de las plantaciones de tomate de árbol visitadas. En los cultivos, los frutos eran distinguidos tanto por la forma como por el color del mucílago. Así, el fruto podía ser gigante, común (o puntón) o redondo (o bola); y el color del endocarpo, amarillo o morado. Todas las combinaciones entre estos dos grupos de características fueron observadas en algún momento de la recolección, por lo que se clasificó a todas las accesiones como pertenecientes a una de un total de seis variedades: Amarillo gigante (AG), Amarillo común (AC), Amarillo bola (AB), Morado gigante (MG), Morado común (MC) y Morado bola (MB) (Figura 1). Las características de cada variedad se detallan en la Tabla 3 y las accesiones agrupadas por provincia de origen y por variedad se encuentran listadas en las Tablas 4 y 5 respectivamente.

## **7.2. Germinación in vitro y obtención de hojas para la extracción de ADN**

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar.

Las semillas de tomate de árbol, extraídas previamente de los frutos colectados, fueron sumergidas en alcohol al 70% y después de 3 minutos se las lavó con agua destilada estéril. Luego fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% con 4 gotas de tween 20 durante 20 minutos. A continuación, las semillas fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril. Con pinzas estériles, las semillas se sembraron colocándolas sobre la superficie del medio de cultivo MS (Morashige y Skoog 1962) modificado: 30 g de agarosa y

8 g de agar por litro. Se sembró un promedio de 15 semillas por frasco. La boca del frasco fue cubierta con dos capas de plástico adherente.

Los frascos fueron llevados al cuarto de cultivo, bajo un fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, a temperatura ambiente.

Luego de un tiempo promedio de un mes las plántulas obtenidas fueron subcultivadas en medio MS (con las mismas modificaciones descritas anteriormente) y sus hojas fueron mantenidas en refrigeración a -20 °C hasta su utilización en la extracción de ADN.

### **7.3. Extracción de ADN**

El ADN de cada muestra se extrajo a partir de hojas jóvenes de plantas cultivadas *in vitro* mediante el método modificado de Shagai-Marroof (1984). Dentro de la sorbona y en un mortero, fueron trituradas, en una solución de CTAB 2x (800 uL) y  $\beta$ -mercaptoetanol (8 uL) cinco hojas de tomate de árbol. El extracto fue vertido en un tubo eppendorff de 1.5 mL y sometido a una temperatura de 62 °C en una cama de arena durante 1 hora, agitando el tubo cada 15 minutos.

Se añadió 500 uL de una solución 24:1 cloroformo/alcohol isoamílico y se agitó el tubo hasta lograr una mezcla homogénea. Se dejó reposar la mezcla durante 20 minutos, luego de los cuales fue sometido a centrifugación a 13 000 rpm por 20 minutos.

La centrifugación separó la mezcla en tres fases, de las cuales se extrajo y traspasó a un tubo nuevo solamente la fase superior. Se añadió a ésta 800 uL de isopropanol y se mezcló suavemente. El pellet de ADN precipitado fue aislado y lavado en 800 uL de acetato de amonio 10 mM/etanol al 96%. Luego de extraer el acetato de amonio del tubo con una pipeta, se hizo un lavado final del ADN con etanol al 70%. Se removió el etanol del tubo y se dejó secar el pellet dentro de la cámara de flujo laminar, después de lo cual, fue resuspendido en TE estéril 1X y conservado a -20 °C hasta su utilización.

#### 7.4. Cuantificación y dilución del ADN

La cuantificación de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraspec 2000. Se realizó una dilución de 5 uL de TE en 3 mL de agua destilada y su valor de absorbancia a 260 nm se usó como referencia para la cuantificación de las muestras. Para calcular la concentración de ADN en cada muestra se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (ng/uL)} = A \times 50 \text{ ng/uL} \times F,$$

donde A es el valor de absorbancia determinado por el espectrofotómetro y F es el factor de dilución de la muestra, que se calcula dividiendo el volumen en el que es diluída la muestra (3000 uL) entre el volumen de la muestra (5 uL); en este caso el factor de dilución fue de 600. Para cada muestra se prepararon 200 uL de una dilución de 20 ng/uL de ADN. Las diluciones se realizaron con TE estéril y fueron mantenidas a -20 °C. Las extracciones originales de ADN fueron guardadas en caso de que fuera necesario realizar diluciones adicionales.

#### 7.5. PCR

Los reactivos listados en la Tabla 6 fueron mezclados en tubos eppendorf de 0.2 mL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Techne TC-142. El programa de PCR utilizado (Tabla 7) consistió en una fase de denaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de amplificación y una fase de elongación final de 5 minutos a 72 °C. Cada ciclo consistió de tres partes: denaturalización a 94 °C por 1 min, annealing (diferente temperatura para cada par de primers, ver Tabla 8), durante 2 min, y una fase de elongación a 72 °C por 1.5 min. Una vez finalizado el programa de PCR, los tubos fueron centrifugados durante 8 segundos para recoger cualquier producto que pudiera haber quedado en las paredes de los tubos. Finalmente, éstos fueron guardados a -20 °C.

## **7.6. Electroforesis en agarosa**

Para una evaluación preliminar, el producto del PCR fue corrido en geles de agarosa al 1% (m/v) con una concentración de bromuro de etidio de 1 uL/mL de gel. Al producto de cada reacción de PCR (10 uL) se añadió 3 uL de buffer de carga 6X. En cada gel se incluyó 2 uL de ladder 100 bp para confirmar el peso de banda esperado para cada primer. Se corrió la electroforesis a 80 V durante por lo menos 2 horas. El resultado de la electroforesis se observó con luz UV.

## **7.7. Electroforesis en acrilamida**

Debido al poder resolutivo superior de los geles de poliacrilamida, éstos fueron usados posteriormente para el análisis definitivo. Se siguió un protocolo modificado a partir del descrito por el CIP (2000). Se preparó 100 mL de una solución de acrilamida al 6% (acrilamida : bis-acrilamida, 19:1), urea 5 M. Se añadió 545 uL de persulfato de amonio al 10% y 109 uL de TEMED. La mezcla se vertió inmediatamente entre los vidrios de la cámara. El tamaño del gel fue 38 x 50 cm, y su grosor de 0.4 mm. Se pre-corrió el gel a 85 W durante un máximo de 30 minutos. La corrida del gel se realizó a 85 W, con una temperatura máxima de 50 °C, durante tres horas. El tamaño de las bandas fue determinado por comparación con el marcador de 100 bps.

## **7.8. Tinción**

La tinción de los geles de acrilamida se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Benbouza et al. (2006). Luego de terminada la electroforesis se sumergió el gel en una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0.5% durante 5 minutos, para el proceso de fijación. Para la tinción, se sumergió el gel en una solución de nitrato de plata (1.5 g/L), a la que se añadió 1.5 mL de formaldehído al 37% por cada litro de solución. La tinción se llevó a cabo en la obscuridad, durante 6-7 minutos y con agitación constante. Después se trasapó el

gel a otra bandeja para su inmersión en agua destilada por 15 segundos. A continuación, se reveló el gel usando una solución de hidróxido de sodio (15 g/L), con 2 mL de formaldehído al 37 % por cada litro de solución. El revelado se efectuó en la oscuridad y con agitación constante hasta que se observaron las bandas en el gel. Para evitar que el gel se sobreexpusiera se lo sumergió en la misma solución fijadora durante un par de minutos. Los resultados fueron observados con la ayuda de un trans-iluminador de luz blanca. Los pasos de la tinción se resumen en la Tabla 9.

### **7.9. Análisis de datos**

A partir de los patrones de bandas obtenidos con los geles de acrilamida se elaboró una matriz binaria que registrara la ausencia o presencia de amplificación en cada una de las muestras con cada uno de los primers. Para el análisis de los datos se usó el programa NTSYSpc 2.11. Usando el coeficiente de Jaccard se generó una matriz de similitud entre todas las accesiones, comparadas de dos en dos. Esta matriz fue usada para, mediante el método de agrupamiento UPGMA, producir un dendrograma.

El Contenido de Información Polimórfica (PIC por sus siglas en inglés) fue calculado para cada par de primers con la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2,$$

donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ .

Se evaluó el nivel de heterocigosis determinando el porcentaje de individuos heterocigotos para cada locus. De igual manera, se calculó la incidencia de alelos nulos para locus en forma de porcentaje.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Protocolo**

El uso de material vegetal cultivado in vitro para la extracción de ADN permitió obtener material genético de calidad evidentemente superior a la del ADN proveniente de material vegetal colectado en el campo.

Las condiciones y el programa de PCR permitieron la amplificación exitosa de regiones microsatélites con los pares de primers seleccionados. Para algunos de los primers, la temperatura de annealing tuvo que ser modificada (Tabla 8) para obtener mayor producto.

Los procedimientos de electroforesis y tinción demostraron también ser efectivos y confiables para la detección de las secuencias microsatélites en tomate de árbol. Con el protocolo de tinción usado, los geles de acrilamida adquirieron una tonalidad amarilla, que sin embargo, no obstaculizó la lectura de los resultados.

La calidad del producto de PCR varió entre los distintos pares de primers, siendo la intensidad y el grosor de las bandas mayores en algunos. Esto sin embargo, tiene que ver con la aplicabilidad de dichos pares de primers en el tomate de árbol y no con el protocolo en sí.

### **8.2. Transferibilidad del set de primers**

Se probaron 53 pares de primers en las muestras colectadas. De estos, 33 (apx. 62%) mostraron algún producto de amplificación. De entre estos 33, más del 50% presentaba patrones de amplificación inespecífica, en la mayoría de los casos con productos de muy elevado peso molecular. Solamente 15 de esos 33 pares de primers (45.5 %; 28.3 % del total de 53) produjeron bandas de microsatélite. Los “primers” S051 (STM1016) y S081 (STM1104) amplificaron las regiones microsatélites exitosamente hasta que el stock de primers fue renovado; de ahí en adelante no mostraron productos de amplificación por lo que se asumió que hubo algún error de manejo cuando se prepararon las nuevas alícuotas. Por esta

razón no fueron de utilidad y no fueron incluidos en el análisis definitivo de las accesiones. Los “primers” S196 (STG0018) y S207 (STG0032) también produjeron un patrón de SSRs pero fueron excluidos del análisis por motivos ajenos a su desempeño o a la investigación. Por estas razones, solo 11 pares de primers, de entre los 15 originalmente seleccionados, fueron usados en el análisis de las muestras (Tabla 8).

De entre los pares de primers utilizados, merece especial atención el producto obtenido con el “primer” S114 (STM5114). En la papa, este “primer” produjo amplificación en un solo locus. Por el contrario, para todas las muestras de tomate de árbol usadas en este estudio se obtuvieron dos productos que distaban entre sí por 110 bp, lo que indica la presencia del mismo microsatélite en dos posiciones del genoma. Sin embargo, por motivos prácticos, y debido a que los dos loci amplificaron de manera monomórfica para todas las accesiones, se consideró los dos alelos como variaciones del mismo locus.

La calidad del producto de amplificación varió entre los distintos primers (Figura 2). En aquellos primers que produjeron un producto más definido (bandas más intensas y gruesas) la proporción de alelos nulos fue marcadamente menor que en aquellos que produjeron bandas más discretas. En los casos en los que se detectó heterocigotos, casi siempre el alelo de menor peso molecular fue siempre más tenue que el otro.

Algunos de los microsatélites estuvieron fuera del rango de peso detectado en papa por el CIP (Tabla 8); los primers S036, S114 y S140 produjeron alelos que excedían por mucho este rango (65, 105 y 25 bps respectivamente), mientras que los primers S188, S209, S228 y S231 amplificaron alelos que superaban aquel rango por un corto margen (entre 2 y 8 bps). En general, los loci amplificados mostraron un patrón monomórfico, constituyendo la presencia de individuos heterocigotos la única forma de polimorfismo (Figura 2) de modo que no hubo más que dos alelos por locus. El número de primers polimórficos fue 4 de 53, lo que representa el 7.5%. El valor PIC para cada par de primers varió entre 0.077 y 0.514 (Tabla 8).

La incidencia de alelos nulos en cada locus varió también considerablemente entre un mínimo de 0 y un máximo de 38% de los individuos (Tabla 8).

### **8.3. Variabilidad genética**

El acervo genético de las accesiones analizadas parece ser estrecho y homogéneo. Se detectaron valores altos de similitud genética entre las accesiones (80 - 100%) (Figura 3). Los valores de similitud genética entre todas las accesiones se presentan en la Tabla 10. El promedio de similitud genética fue similar entre provincias: 89% para Imbabura, 87% para Tungurahua y 83% para Pichincha. Se evaluó también el valor promedio de similitud agrupando a las muestras de acuerdo a sus características (Tabla 11). Entre los frutos de las variedades Bola este valor fue de 87%; entre los de las variedades Gigante, de 89%; y entre los de las variedades Común, de 83%. También se compararon los valores de similitud genética entre todas las accesiones de variedad Amarillo y variedad Morado. El valor promedio para las variedades Amarillo y Morado fue de 86% y 84%, respectivamente.

El dendrograma (Figura 3) mostró 23 genotipos distintos entre las 50 accesiones. Se formaron seis grupos, identificados con letras (desde A hasta F) (Figura 3), de accesiones con genotipos idénticos entre ellas. Ninguno de estos grupos está formado enteramente por individuos de una misma variedad, o que tengan alguna característica (forma del fruto o color del mucílago) en común, a excepción del grupo F, cuyos integrantes, todos son del tipo Común. Dentro de estos grupos, solamente E y F contienen individuos de una sola provincia: Pichincha y Tungurahua, respectivamente; el resto agrupa a individuos con el mismo genotipo pero de diferente origen.

A nivel global, se distinguen 4 grandes agrupaciones, designadas con números en la Figura 3, y dos accesiones ampliamente separadas del resto: I1a y P7b, ambas de la variedad Morado. De igual manera que sucedió con los grupos de genotipos idénticos, en que ninguna de las características de las accesiones determinó el tipo de agrupamiento observado, en general no

se discierne ningún patrón de agrupamiento en estos 4 grandes grupos, a excepción del grupo 4, que comprende únicamente individuos de Tungurahua y pertenecientes a la variedad Común. En los grupos 1, 3 y 4 las proporciones entre individuos Amarillos y Morados es de o es cercana a 50/50. En el grupo 2 esta proporción es diferente con un 70% de individuos Amarillos. En los grupos 1 y 2 están bien representadas las variedades Gigante, Común y Bola, mientras que en los grupos 3 y 4, predomina la variedad Común.

En todos los casos en los que aparecieron individuos heterocigotos, se contó con homocigotos de uno de los alelos solamente. En solo 5 de los 11 loci amplificados se observaron individuos heterocigotos. El porcentaje de individuos heterocigotos para estos loci varió entre 4 y 98 %.

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1. Transferibilidad de primers**

El desarrollo de nuevos primers siempre involucra un insumo de recursos y tiempo, que puede estar más allá de las posibilidades de algunos laboratorios. En los casos en los que no se puede disponer de primers desarrollados específicamente para la especie de estudio es frecuente recurrir al uso de primers diseñados a partir de taxa cercanos (Kyndt et al. 2006, Shepherd et al. 2002).

El uso de loci microsatélites entre taxa depende de la conservación de las secuencias a las que se unen los primers y en el mantenimiento, durante largos períodos evolutivos, de secuencias microsatélites lo suficientemente largas como para generar polimorfismo (Weber 1990, citado en FritzSimmons et al. 1995, Powell et al. 1996). Los SSRs pueden ser modificados o perderse entre géneros aunque las regiones que los flanquean se conserven y lo contrario también es cierto: las secuencias que reconocen los primers pueden no conservarse pero los microsatélites sí (Westman y Kresovich 1998). Sin embargo, la utilidad de la amplificación entre especies depende no del porcentaje de primers que pueden ser transferidos, sino de la

cantidad de polimorfismo que estos muestren (Peakall et al. 1998). En este sentido, los resultados obtenidos en esta investigación al amplificar loci microsatélites en el tomate de árbol a partir de primers diseñados en papa no fueron los esperados.

El éxito en la transferibilidad de primers varía dependiendo en gran medida del grado en que estén relacionadas las especies involucradas (Tabla 12). De manera general, en plantas la amplificación exitosa y útil entre especies parece limitarse a congéneres, lo contrario que sucede con animales, en los que se ha reportado transferencia entre taxa evolutivamente muy distantes (FritzSimmons et al. 1995, Peakall et al. 1998). Así, en las plantas, se reportan niveles medios a altos (50-100%) de transferibilidad de primers a especies del mismo género, pero no todos ellos son polimórficos (20-100%) (revisado en Peakall et al. 1998). Aún cuando un mismo set de primers se evalúa en especies cercanas del mismo género, tanto el número de primers que amplifican, como el porcentaje de éstos que muestra polimorfismo varía considerablemente entre dichas especies (Kyndt et al. 2006, Westman y Kresovich 1998). La amplificación aún entre géneros estrechamente relacionados generalmente es mucho menor que entre especies del mismo género (revisado en Peakall et al. 1998, Kyndt et al. 2006). De esta manera, en plantas parece ser que la distancia genética y evolutiva existente entre dos especies puede reflejarse en la cantidad de loci que pueden ser amplificados con éxito (Shepherd et al. 2002), disminuyendo la claridad y el porcentaje de microsatélites amplificados a medida que aumenta la distancia genética (Kyndt et al. 2006), aún entre especies del mismo género (Escribano et al. 2004).

Peakall et al. (1998) encontraron que la transferencia de primers entre especies solo rindió marcadores informativos a nivel de tribu. En las especies pertenecientes a otras tribus, la amplificación de estos primers no produjo loci polimórficos. Aunque esta observación no es en lo absoluto una regla, puede servir de guía para la aplicación de set de primers entre especies. Para el caso que compete a este estudio, la relación entre la papa y el tomate de

árbol debe ser considerada. Las dos especies comparten el mismo género, aunque no ha sido así siempre; el tomate de árbol pasó del género *Cyphomandra* a *Solanum* hace más de una década (Bohs 1995). Dentro del género *Solanum* las dos especies han sido separadas en clados, secciones (*Pachyphylla* para el tomate de árbol y *Petota* para la papa) y subgéneros distintos (*Cyphomandra* y *Potatoe*, respectivamente) (Bohs 2005). Sin embargo, la amplificación aún entre distintos géneros en algunos casos ha arrojado un mayor porcentaje de loci polimórficos que el obtenido en este estudio (7.5%); el porcentaje de loci informativos reportado aquí es inusualmente bajo para primers transferidos dentro del mismo género (Tabla 12). Kyndt et al. (2006) indica que es de esperar un alto porcentaje de transferibilidad entre especies dentro del mismo género, cuando la especiación dentro de ese género ha sido reciente, como sucede con *Vasconcellea*. Quizás sea éste un buen indicador del éxito en la transferencia de primers entre especies vegetales, siendo más difícil conseguir una amplificación adecuada y polimórfica a medida que la divergencia evolutiva entre las especies sea mayor. En este respecto, no se cuenta con datos que relacionen a las especies involucradas en este estudio. Sin embargo, ha quedado claro que dentro de la familia Solanaceae, el (ex) género *Cyphomandra* se encuentra más estrechamente relacionado al género *Solanum* (Bohs 1989), lo que conduce a pensar que la distancia evolutiva entre la papa y el tomate de árbol no es la responsable para el marcado monomorfismo observado en estos ensayos.

La hibridación con sondas específicas y la secuenciación de los productos de amplificación han permitido conocer la verdadera identidad de las secuencias amplificadas por primers transferidos entre taxa (Peakall et al. 1998, Westman y Kresovich 1998). Los resultados sugieren tener precaución al interpretar los productos de tales amplificaciones por varias razones. La homoplasia suele ser un fenómeno que puede ser fácilmente pasado por alto: productos del mismo tamaño pueden encerrar estructuras distintas tanto en las secuencias del microsatélite, como en las secuencias que las flanquean, lo que puede llevar a

malinterpretaciones en la evaluación de relaciones genéticas (Peakall 1998). Por otro lado, mutaciones y rearrreglos genómicos y duplicaciones de los loci microsatélites o de las secuencias complementarias a los primers pueden resultar en productos que en realidad no contienen repeticiones, múltiples productos (fenómeno de múltiples bandas inespecíficas) o en secuencias presentes en el genoma pero no amplificadas; entre otros problemas. Por estas razones ni el tamaño del producto, ni la variación en su longitud aseguran que el producto de la amplificación contenga secuencias repetitivas (Westman y Kresovich 1998). Ante esta evidencia se torna difícil asegurar la exactitud de ésta o cualquier otra investigación que incluya SSRs transferidos de otras especies y que no compruebe la identidad de los productos amplificados.

En este estudio, varios pares de primers, que no fueron considerados para el análisis definitivo, mostraron un patrón de bandas inespecíficas entre las cuales pudo haber estado enmascarado un verdadero SSR. En los 11 loci cuya amplificación se consideró exitosa, se observó productos que, o bien estaban dentro del rango de peso esperado, o que lo excedían por un margen admisible. La naturaleza predominantemente monomórfica que mostraron los microsatélites en este estudio podría llevar a la sospecha sobre si en realidad las regiones amplificadas se tratan de secuencias repetidas, debido a su esperada hipervariabilidad. Sin embargo, tal patrón de uniformidad en todos los primers supera la posibilidad de una coincidencia, porque entonces, debería haber sucedido una sustitución de la secuencia repetitiva por otra no variable para todos los primers. Más aún, se ha comprobado que los productos monomórficos sí contienen SSRs (Broun y Tanksley 1996 citado por Westman y Kresovich 1998). Por último, el nivel de diversidad genética es congruente con los valores arrojados (73 – 100% de similaridad genética) por marcadores AFLPs (Ordoñez 2007), lo que hace pensar que para el caso del tomate de árbol, la amplificación de microsatélites de *S. tuberosum* sí refleja la diversidad genética del cultivo. Adicionalmente, la ausencia de

polimorfismo en ciertos loci que han sido transferidos entre especies se ha relacionado con la disminución en la longitud de las secuencias repetidas y con la sustitución de bases dentro de ellas (FritzSimmons et al. 1995).

Se ha reportado que el tamaño del genoma tiene incidencia en la eficiencia de la amplificación de los loci microsatélites. La tendencia es que mientras más grande es el genoma de una especie, mayor es la proporción de primers que no logran producir una amplificación exitosa del ADN durante el PCR (Garner 2002). Los genomas del tomate de árbol y de sus especies relacionadas sobresalen por su tamaño: incluso el menor de ellos tiene más ADN que otro taxón de igual número cromosómico (24) dentro de las solanáceas (Pringle y Murray 1991). Garner (2002) propone que el tamaño del genoma influye en el desempeño de la amplificación de microsatélites de dos formas: 1) el incremento en tamaño del genoma sirve como un factor de dilución para la proporción de secuencias que reconocen los primers dentro de todo el ADN, y 2) al haber mayor cantidad de ADN las probabilidades de que haya secuencias no-específicas para los primers se multiplican, disminuyendo así la cantidad de primer disponible para una amplificación exitosa de los loci microsatélites. No deja de ser una incógnita intrigante la posibilidad de que el tamaño llamativamente mayor del genoma del tomate de árbol (al menos para las solanáceas), contribuya para el bajo porcentaje de transferibilidad de los primers de papa observado en este estudio.

En los estudios en los que se transfieren primers entre especies, generalmente una combinación de parámetros es requerida para aceptar como exitosa la amplificación: intensidad de las bandas, rango de peso de los productos, desviación del rango del tamaño de los alelos en la especie original y replicabilidad de la amplificación (Peakall et al. 1998, Westman y Kresovich 1998). Los primers que fueron finalmente seleccionados para el análisis de diversidad genética en tomate de árbol produjeron alelos que cumplieron con estos requisitos porque el tamaño de todos ellos fue menor a las 400 bp, la definición de las bandas

en la mayoría de los productos fue moderada o superior, el tamaño de los productos se encontraba dentro o se encontraba por no más de 105 bp fuera del rango de referencia producido en papa y, finalmente, la amplificación se produjo en más del 80% de las muestras, para todos los primers, todas las veces que fue necesario repetir un ensayo.

El número de loci finalmente analizados (11) es superior al promedio (8) que se maneja comúnmente en los estudios de variabilidad genética intraespecífica en plantas usando microsatélites (Nybom 2004). Sin embargo, es recomendable incrementar el número de primers, para incluir al menos un locus por cromosoma y así tener una mejor cobertura del genoma (Ghislain et al. 2004).

## **9.2. Diversidad genética**

Los valores de distancia genética obtenidos con el coeficiente de Jaccard muestran que la variabilidad genética dentro de las poblaciones de tomate de árbol cultivado en las tres provincias muestreadas es reducida. A grosso modo, las accesiones de tomate de árbol son semejantes entre sí en un 80 – 100%. No fue evidente ningún tipo de diferenciación ni por lugar de origen, ni por variedad de las muestras (Tabla 11). En el dendrograma elaborado tampoco hubo un patrón de agrupamiento que respondiera a dichas variables.

Un patrón de diversidad genética reducida se suele asociar con algún suceso debido al cual el número de individuos de una población disminuyó, reduciendo así también la variedad de genotipos o alelos presentes en esa población. Esta ha sido la regla para las especies vegetales que han sido sujeto de domesticación: a través de la propagación selectiva de líneas vegetales con caracteres deseados, las especies cultivadas han sido sometidas a sucesivos cuellos de botella, que han estrechado el acervo genético de las poblaciones subsiguientes (Tanksley y McCouch 1997, Reif et al. 2005). Esto se ha evidenciado en una reducción de la variación genética tanto en genomas nucleares como en el ADN de los organelos (Xu y Gai 2003).

Son comunes los estudios en los que se cuantifica esta reducción, que varía mucho entre especies y se debe a varias y distintas razones (Miller y Schaal 2006, Zhou et al. 2005 Baydar et al. 2004). En algunos casos (Miller y Schaal 2006, De Vicente et al 2006), las poblaciones mantenidas a nivel de huertos familiares, jardines y cercas vivas muestran un nivel de variabilidad genética muy cercano al de las poblaciones silvestres, por lo que esas formas de cultivo podrían representar una fuente de variación genética cada vez más importante para la especie, a medida que el cultivo intensivo y a larga escala se extiende y las poblaciones tiendan a disminuir (Miller y Schaal 2006).

De lo que se conoce, se han realizado dos estudios orientados a describir el grado de diversidad genética del tomate de árbol cultivado. Mientras en el uno se utilizaron AFLPs (Ordoñez 2007), en el otro la herramienta fueron los SSRs (Tapia et al. 2006). Ambas investigaciones, ejecutadas casi paralelamente al presente estudio, concluyeron que la variabilidad genética en *S. betaceum* en el Ecuador es estrecha. Tapia et al. (2006) utilizaron el mismo set de primers de papa para evaluar accesiones de tomate de árbol y especies relacionadas. Los resultados obtenidos son, hasta cierto punto, congruentes con los de este estudio. Ellos sin embargo, determinaron que la diferenciación genética entre las accesiones era casi nula. En este trabajo, por el contrario, a pesar de haber obtenido valores de similitud genética altos, se consiguió un mayor grado de diferenciación entre accesiones como lo muestra la Figura 3.

Ordoñez (2007) en su estudio analizó la diversidad genética entre 24 accesiones de tomate de árbol que también están incluidas en la presente investigación. El análisis con marcadores AFLPs arrojó valores de similitud genética entre las accesiones de tomate equiparables a los obtenidos aquí. En su estudio, elabora un fenograma utilizando el coeficiente de Dice y agrupando a las muestras mediante el método UPGMA y concluye que existe una ligera y poco clara diferenciación entre los genotipos de las variedades Morado y Amarillo.

Se ha relacionado el grado de diversidad genética con el comportamiento reproductivo de las especies (González-Astorga y Castillo-Campos 2004). *S. betaceum*, a diferencia de la mayoría de especies relacionadas (perteneciente anteriormente al género *Cyphomandra*), es auto-compatible, característica que se considera más evolucionada y que se originó de una condición de auto-incompatibilidad (Bohs 1989). La auto-compatibilidad en el tomate de árbol se debe seguramente a su domesticación y pudo haber sido seleccionada positivamente para promover su establecimiento fuera de su área de origen, donde no es posible la exogamia con con-específicos. La auto-fecundación pudo haber sido favorecida para asegurar la uniformidad genética en el cultivo o para lograr un incremento en la producción, característica que fue probablemente reforzada por la selección humana (Bohs 1991). Sin embargo, la polinización abierta parece ser un medio más eficaz que la polinización artificial cruzada o la auto-polinización para la producción de frutos en el tomate de árbol. Aún más, *S. betaceum* no ha desarrollado caracteres propios de plantas predominantemente autógamas, lo que apunta a que en el tomate de árbol, aunque es perfectamente posible la autofecundación, predomina la exogamia a través de la polinización mediada por insectos (Bohs 1991, Lewis y Considine 1999).

El mayor grado de variabilidad genética encontrado en otros cultivos y especialmente dentro de otras solanáceas cultivadas parece estar relacionado también con el proceso de domesticación al que han estado sometidas. La reducción de diversidad genética en las variedades de los cultivos en comparación con las especies silvestres se ha observado en casos como el trigo (*Triticum aestivum*), debido a una domesticación relativamente reciente, una población fundadora presumiblemente pequeña y una selección intensiva de caracteres de importancia agronómica a largo plazo, todo esto provocando un severo cuello de botella en la población cultivada (Reif et al. 2005). Aunque no queda claro todavía dónde ni cuando se empezó a cultivar el tomate de árbol en Sudamérica, parece ser que su domesticación es más

bien relativamente reciente (Bohs 1989). Se ha relacionado el incremento en el tamaño del genoma con procesos de domesticación y de selección artificial (Pringle & Murray 1991). El proceso de domesticación del tomate ha sido reciente, lo que podría evidenciarse en el hecho de que individuos poliploides de *S. betaceum* pueden encontrarse en las plantaciones en una frecuencia de tan solo 0.25% (Pringle & Murray 1991, 1992). Los frutos de plantas poliploides son conocidos como “tomatillos” en el campo y son considerablemente menores en tamaño a los frutos comunes. En este estudio fueron encontrados algunos de estos individuos mezclados entre las plantas de los cultivos visitados. Lamentablemente, no pudieron ser incluidos en el análisis porque las pocas semillas que contenían los frutos no germinaron *in vitro* y no se pudo extraer el ADN de esas accesiones.

Resultados similares con una reducida diversidad genética se han reportado para sandía (Levi et al. 2001), presumiblemente debido al uso de un relativamente bajo número de plantas en los primeros estadios de la domesticación de este cultivo fuera de su área de origen (Navot y Zamir 1987, citado en Levi et al. 2001).

El factor geográfico puede jugar también un papel determinante en los patrones de diversidad genética. En algunos casos (Xu y Gai 2003), el origen de una población ha dejado huella en su ADN, a través de la adaptación a un ambiente en particular, un patrón genómico que la diferencia de otras poblaciones. Para ciertas especies vegetales, el aislamiento geográfico producido por la fragmentación del hábitat ha propiciado la diferenciación genética entre poblaciones, diferenciación que ha sido reforzada por la floración asincrónica entre esas poblaciones (González-Astorga y Castillo-Campos 2004). En este sentido, las características geográficas donde se da el cultivo del tomate de árbol y la fenología de la planta parecen contribuir a que todas las poblaciones en el Ecuador sean homogéneas entre sí. El tomate de árbol en nuestro país se siembra en un continuo en todas las provincias de la Sierra, de modo que quizás la división en poblaciones por provincia o localidad sea un artificio porque en

realidad las plantaciones de todo el Ecuador podrían constituir genéticamente una sola población. Las condiciones climáticas en las que se produce este cultivo no difieren mayormente entre sí, por lo que no se ha producido una adaptación local a un ambiente específico. Esto, sumado a la naturaleza exogámica y a la propagación del mismo tipo de semillas y/o plantas a varias partes del país, que, se sabe, ha ayudado también a la difusión de enfermedades (Lascano s.f.), contribuiría a la homogeneización del acervo genético dentro del tomate de árbol cultivado.

A pesar de observarse una limitada variabilidad genética en el tomate de árbol cultivado, existe una gran variación morfológica en el fruto. Un fenómeno análogo detectado entre cultivares de sandía (Levi et al. 2001) y en rosa (Baydar et al. 2004) parece deberse a que la mayoría de características que distinguen a los cultivares son caracteres cualitativos determinados por una o pocas mutaciones que no pudieron ser detectadas por el método empleado para el análisis. Este tipo de plasticidad fenotípica también ocurre en especies del género *Panax*; las dos formas de la especie *P. stipuleanatus* no pudieron ser distinguidas a nivel genético a pesar de que pueden ser fácilmente diferenciadas por la morfología de sus hojas. Se conjetura que esa característica es controlada por unos pocos genes, no detectados por los marcadores moleculares, y por lo tanto no es un buen indicador de diversidad genética o taxonomía (Zhou et al. 2005). Hasta qué punto estos escenarios se corresponden con la situación del tomate de árbol es incierto.

### **9.3. Clasificación de las variedades**

Aunque la clasificación de variedades usada haya surgido de las designaciones que los agricultores tenían para los productos de sus propios cultivos, y a pesar de que coincide con la propuesta por Morales (2001), podría resultar hasta cierto punto artificial porque dicha clasificación solamente considera color del mucílago y forma del fruto a grandes rasgos.

Quizás otros parámetros como palatabilidad, número de semillas, composición química o características físicas de la planta deberían ser tomados en cuenta. El uso de la clasificación adoptada en este estudio es válido porque uno de los objetivos de esta investigación fue determinar si la categorización que se hace a nivel del campo concuerda con una diferenciación genética.

## 10. CONCLUSIONES

De acuerdo a esta investigación se concluye que existe una base estrecha de diversidad genética dentro de los cultivos de tomate de árbol en el Ecuador. Algunos son los posibles factores contribuyentes para tal fenómeno. Por un lado, parece ser que como muchas especies vegetales cultivadas, *S. betaceum* fue establecida como un cultivo a partir de una población relativamente pequeña, produciéndose así un cuello de botella poblacional. El proceso de domesticación en esta especie parece ser relativamente reciente, lo que se evidencia en la baja frecuencia de individuos poliploides. Esto quizás no ha permitido que se desarrollen genotipos diferenciados adaptados a condiciones geográficas o climáticas especiales. Es presumible que las mismas condiciones geográficas de la Sierra del Ecuador, en donde se produce esta fruta, no propicien tal diferenciación porque son homogéneas. La uniformidad genética reportada también se relaciona con el sistema reproducción de la planta, que parece estar volcado hacia la exogamia mediada por insectos, a pesar de que la auto-fecundación es posible.

Es en cierta medida sorprendente el bajo nivel de transferencia de primers obtenido, dado que la relación entre la papa y el tomate de árbol no es tan distante, como entre otras especies en otros ensayos, en los que contrariamente la amplificación aún entre distintos géneros produjo un mayor número de productos polimórficos. Para el caso del tomate de árbol, el tamaño de su genoma, extraordinariamente mayor, pudo haber influido en ese resultado. A pesar de este

inconveniente, los resultados generales son congruentes con los producidos por estudios análogos en los que se usaron los mismos marcadores y AFLPs.

## **11. RECOMENDACIONES**

### **11.1. En cuanto al protocolo**

- La extracción de ADN de material vegetal cultivado *in vitro* resultó en muestras de ADN notablemente más limpias que aquellas extraídas de hojas de plantas cultivadas *in vivo*. Esto hace justificable y recomendable la inversión de tiempo necesaria para la siembra *in vitro* de semillas. Sin embargo, el cultivo de semillas *in vitro* limitó hasta cierto punto el tipo de accesiones que se pudo incluir en el análisis. Así, los individuos poliploides (tomatillos) y algunas accesiones de especies cercanas al tomate de árbol quedaron fuera del análisis porque el material genético extraído en primera instancia estaba impregnado con gran cantidad de impurezas. Más importante aún, no se pudo cultivar *in vitro* esos individuos, en el primer caso por contar los frutos con un limitado (o incluso nulo) número de semillas, y todas ellas estériles; y en el segundo por no disponer de frutos para extraer las semillas. A pesar de que la técnica de microsatélites no requiere de ADN de gran calidad, la presencia de impurezas en las muestras de ADN podría afectar la amplificación por PCR. Debido a que las hojas del tomate de árbol son ricas en compuestos fenólicos (Pringle y Murray 1991) y con miras a superar los problemas antes mencionados, sería apropiado adoptar un protocolo de extracción de ADN como el propuesto por Shiran y Mahmood (s.f.), que es una modificación del método del CTAB para plantas que producen metabolitos secundarios.

## 11.2. En cuanto al fitomejoramiento del cultivo

- El análisis de variabilidad genética debería extenderse a especies cercanas poniendo especial énfasis en aquellas que pueden formar híbridos viables con el tomate de árbol.
- Los estudios de diversidad genética deberían ampliarse para incluir poblaciones geográficamente más separadas porque se esperaría una mayor diferenciación genética. Esto implicaría un muestreo a un nivel mayor, en el que se comparen poblaciones de diferentes países o regiones.
- Sería recomendable complementar la búsqueda de resistencia con el conocimiento de campo que tienen los agricultores. El saber empírico de quienes están día a día en contacto con el cultivo puede abrir nuevas líneas de investigación. Un ejemplo es la posible resistencia a plagas en variedad morada aducida por algunos agricultores (Morales 2001).
- En ocasiones en las que los marcadores SSR mostraron un polimorfismo limitado (Lanteri & Barcaccia) se utilizó otros marcadores (AFLP y RAPD) para diferenciar poblaciones. Una combinación de técnicas es lo más adecuado. Tal combinación podría incluir también cpSSRs, que, dada la característica haploide del genoma de los cloroplastos y el modo uniparental de herencia de éstos, son buenos para detectar cuellos de botella y deriva génica así como el flujo de polen dentro de las poblaciones. Primers de este tipo desarrollados para *N. tabacum* han tenido éxito amplificando en otras solanáceas (Provan et al. 2001).
- Otra línea que vaya en búsqueda del mejoramiento del tomate de árbol podría incluir la investigación con plantas poliploides. En este caso debería darse un proceso de mejoramiento en el que se seleccione las plantas buscando un incremento en el tamaño y la fertilidad del fruto (Pringle y Murray 1992).

- Las observaciones hechas por Peakall et al. (1998) y Westman y Kresovich (1998) demuestran que los productos de amplificación entre especies no siempre revelan el verdadero patrón microsatélite en la especie de transferencia. Es por esto que cuando tal procedimiento se lleve a cabo es altamente aconsejable acompañar el análisis con la identificación de las secuencias de los productos amplificados, ya sea mediante secuenciación o hibridación con sondas.

## 12. REFERENCIAS

1. ALBORNOZ, G. (1992). El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt.) en el Ecuador. Universidad Central del Ecuador-Fundagro, Quito.
2. ASHRAF, M & AHMAD, S. (1999). Exploitation of intra-specific genetic variation for improvement of salt (NaCl) tolerance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Brief Report. *Hereditas* **131**: 253-256.
3. ATKINSON, R., EAGLES, M., FORSTER, R. & GARDNER, R. (1993). Genetic transformation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo) en *Biotechnology in agriculture and forestry, plant protoplasts and genetic engineering VI*, Vol. 29. Heidelberg, New York.
4. AZOFEIFA-DELGADO, A. (2006). Revisión Bibliográfica: Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* **17**(2): 221-242.
5. BACHMANN, K. (1994). Tanksley Review No. 63: Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.* **126**: 403-418.
6. BARGHCHI, M. (1997). *In vitro* regeneration of tamarillo [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.], plant improvement and virus elimination, en: MR. Davey, PG Alderson, KC Lowe, JB Power (Eds), *Tree Biotechnology: Towards the Millennium*, Nottingham University Press.

7. BAYDAR, N.G., BAYDAR H., DEBENER, T. (2004). Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *Journal of Biotechnology* **111**: 263-267.
8. BENBOUZA, H., JACQUEMIN, J.M., BAUDOIN, J.P. & MERGEAI, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10** (2): 77-81.
9. BHAT, K.V. (s.f.). DNA fingerprinting techniques and cultivar identification.  
Disponible en  
<http://www.iasri.res.in/iasriwebsite/DESIGNOFEXPAPPLICATION/Electronic-Book/module5/28DNA-Fingerprinting.pdf>.
10. BOHS, L. (1989). Ethnobotany of the Genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany*, **43**(2): 143-163.
11. BOHS. L. (1991). Crossing Studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and Their Systematic and Evolutionary Significance. *American Journal of Botany* **78**(12): 1683-1693.
12. BOHS, L. (1995). Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. *Taxon*, **44**(4): 583-587.
13. BOHS, L. (2005). Major clades in *Solanum* based on ndhF sequence data. *Monographs in Systematic Botany*, **104**: 27-50.
14. BROUN, P. & TANKSLEY, S.D. (1996) Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol Gen Genet* **250** : 39-49
15. BRYAN, G.J., McNICOLL, J., RAMSAY, G., MEYER, R.C., De JONG, W.S. (1999). Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theor Appl Genet* **99**: 859-867.

16. CADENA, E. (2001). Estudio de Prefactibilidad para el Tomate de Árbol. SICA- Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/agronegocios>
17. CAETANO-ANOLLÉS, G Y GRESSHOFF, P. (1994). Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. *Promega Notes Magazine* **45**: 13 – 20.
18. CDB – CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA. (1992). Disponible en [www.cbd.int](http://www.cbd.int)
19. CHOI, I.Y., KANG, J.H., SONG, H.S. & KIM, N.S. (1999). Genetic diversity measured by simple sequence repeat variations among the wild soybean, *Glycine soja*, collected along the riverside of five major rivers in Korea. *Genes Genet. Syst.* **74**: 169-177
20. CIP – CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. (2000). *Molecular Biology Laboratory Protocols: Plant Genotyping*. Ma. del R. Herrera, M. Ghislain, D. Zhang (eds.), Crop Improvement and Genetic Resources Department Training Manual. Tercera edición, Lima, Perú.
21. CORDEIRO, G.M., PAN, Y.B. & HENRY, R.J. (2003). Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* **165**: 181-189.
22. CRFG – CALIFORNIA RARE FRUIT GROWERS. (1996). Tamarillo fruit facts. Consultado en <http://www.crfg.org/pubs/ff/tamarillo.html>
23. DE VICENTE, C., GUZMÁN, F.A., ENGELS, J. & RAO, V.R. (2006). Genetic characterization and its use in decision-making for the conservation of crop germplasm en *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*, Ruane, J. & Sonnino, A. (eds.), FAO, Roma, Italia.

24. SICA. (s.f.). Tomate de Árbol –Ficha Técnica del Proyecto SICA-Banco Mundial.
- Disponible en:
- <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/principal.htm>
25. ESCRIBANO, P., VIRUEL, M.A. & HORMAZA, J.I. (2004). Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae), Primer Note. *Molecular Ecology Notes* **4**: 746–748.
26. FAO. (1992). Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Colección FAO: producción y protección vegetal Nº 26. Roma, Italia.
27. FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, Brasília, DF.
28. FITZSIMMONS, N.N., MORITZ, C. & MOORE, S.S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol* **12**(3): 432-440.
29. FUJIMORI, S., WASHIO, T., HIGO, K., OHTOMO, Y., MURAKAMI, K., MATSUBARA, K., KAWAI, J., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y., KIKUCHI, S. & TOMITA, M. (2005). A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Letters* **554**: 17-22.
30. GARCÍA, A., BENCHIMOL, L.L., BARBOSA, A., GERALDI, I.O., SOUZA, C.Jr. & DE SOUZA, A. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* **27** (4): 579-588.
31. GARNER, T.W.J. (2002). Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *Genome* **45**: 212-215.

32. GAVILANES, I. (1992). Recolección germoplásmica y establecimiento de la colección viva de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) en Ecuador. Tesis para título de Ingeniero en Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador, Quito.
33. GHISLAIN, M., SPOONER, D.M., RODRÍGUEZ, F., VILLAMÓN, F., NÚÑEZ, J., VÁSQUEZ, C., WAUGH, R. & BONIERBALE, M. (2004). Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet* **108**: 881-890.
34. GONZÁLEZ-ASTORGA, J. & CASTILLO-CAMPOS, G. (2004). Genetic Variability of the Narrow Endemic Tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos & Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a Tropical Forest of Mexico. *Annals of Botany* **93**: 521-528.
35. GUPTA, P.K., BALYAN, H.S., SHARMA, P.C. & RAMESH, B. (1996). Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*, **70**: 45-54.
36. GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C. & RAMESH, B. (1999). Review: Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* **118**: 369-390.
37. HAMADA, H., PETRINO, M.G. & KAKUNAGA, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6465-6469.
38. HERRERA, J. (1998). Evaluación de tres métodos de injertación de dos variedades de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Cav. Send.) en Ecuador. Tesis para título de Ingeniero en Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador, Quito.

39. ITPGR – INTERNATIONAL TREATY ON PLANT GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE. (2001). Disponible en <http://www.fao.org/AG/cgrfa/>
40. JACOBSEN, S.E., MUJICA, A. & ORTIZ, R. (2003). La Importancia de los Cultivos Andinos. *Fermentum* **13**(36): 14-24. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/proyecto/163nze/documentos/productos/4.pdf>
41. JEHLE, R. & ARNTZEN, J.W. (2002). Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal* **12**: 1-9.
42. KUBIS, S., SCHMIDT, T. & HESLOP-HARRISON, J.S. (1998). Repetitive DNA elements as a major element of plant genomes. *Annals of Botany* **82** (Supplement A): 45-55.
43. KYNDT, T., VAN DROOGENBROECK, B., HAEGEMAN, A., ROLDÁN-RUIZ, I. & GHEYSEN, G. (2006). Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and related genera and their use in germplasm classification. *Genome* **49**: 786-798.
44. LANTERI, S & BARCACCIA, G. (2006). Molecular marker based analysis for crop germplasm preservation *en The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*, Ruane, J. & Sonnino, A. (eds.), FAO, Roma, Italia.
45. LASCANO, V.(s.f.). Estudio de competitividad del tomate de árbol. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/frutas/tomate%20arbol/Estudio%20de%20Competitividad%20Tomate%20de%20Arbol.pdf>
46. LEVI, A., THOMAS, C.E., WHENER, T.C. & ZHANG, X. (2001). Low genetic diversity indicates the need to broaden the genetic base of cultivated watermelon. *HortScience* **36** (6): 1096-1101.

47. LEWIS, D.H. & CONSIDINE, J.A. (1999). Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) 1. Floral biology. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **27**: 101-112.
48. LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., BEILES, A. & NEVO, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**: 2453-2465.
49. MAG – MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DEL ECUADOR. (2001). Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación: tomate de árbol. Disponible en [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/tomate\\_arbol\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/tomate_arbol_mag.pdf).
50. MARTÍNEZ-CRUZ, B. DAVID, V.A., GODOY, J.A., NEGRO, J.J., O'BRIEN, S.J. & JOHNSON, W.E. (2002). Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species, Primer Note. *Molecular Ecology Notes* **2**: 323-326.
51. MCPHERSON, M.J., OLIVER, R.J. & GURR, S.J. (1992) The polymerase chain reaction *en* *Molecular plant pathology: a practical approach*, Vol. I. Oxford University Press.
52. MEADOWS, L.R. (2002). Rare *Cyphomandra* germplasm in New Zealand: an endangered resource and its importance. Consultado en [http://www.naturalhub.com/grow\\_fruit\\_type\\_tamarillo\\_relative\\_new\\_zealand.htm](http://www.naturalhub.com/grow_fruit_type_tamarillo_relative_new_zealand.htm)
53. MILBOURNE, D., MEYER, R., BRADSHAW, J.E., BAIRD, E., BONAR, N., PROVAN, J., POWELL, W. & WAUGH, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* **3**: 127-136.

54. MILLER, A.J. & SCHAAL, B.A. (2006). Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* **15**: 1467-1480.
55. MONTOYA, J.E., ESCOBAR, R.H. & DEBOUCK, D.G. (s.f.). Development of a freezing methodology in liquid nitrogen of tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) seeds. Disponible en:  
<http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/pdf/texto.pdf>
56. MORALES, J.O. (2001). Diagnóstico agro-socio-económico del cultivo de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt.) en cuatro provincias de la sierra ecuatoriana (Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Azuay). Tesis de grado previa a la obtención de título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad Central del Ecuador, Quito.
57. MURASHIGE, T Y SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**: 473-497
58. NAVOT, N. & ZAMIR, D. (1987). Isozyme and seed protein phylogeny of the genus *Citrullus* (Cucurbitaceae). *Plant Syst. Evol.* **156**: 61-67.
59. NICHOLL, D. (2002). An introduction to genetic engineering. Segunda Edición. Cambridge University Press, Cambridge, RU.
60. NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1989). Lost crops of the Incas. National Academy Press, Washington, DC.
61. NUEZ, F. & CARRILLO, J.M. Editores. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
62. NYBOM, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143-1155.
63. NZTGA – NEW ZEALAND TAMARILLO GROWERS ASSOCIATION. (2006). Tamarillo varieties. Consultado en <http://www.tamarillo.com/Tamarillo>

64. OCHOA, C. (2002). Un Don Universal en *La Papa, Tesoro de los Andes – De la Agricultura a la Cultura*, Graves, C. (Ed.). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
65. ORDÓÑEZ, S. (2007). 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.
66. PAZMIÑO, C. (1987) Evaluación de la resistencia a *Meloidogyne incognita* en ecotipos cultivados y silvestres de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). Tesis para la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador, Quito.
67. PAZMIÑO, C. (1992). Resistencia de ocho entradas de tomate de árbol silvestre a *Meloidogyne sp.* Tesis para título de Ingeniero en Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador, Quito.
68. PEAKALL, R., GILMORE, S., KEYS, W., MORGANTE, M. & RAFALSKI, A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol Evol* **15**(10): 1275-1287.
69. PERERA, L., RUSSELL, J.R., PROVAN, J. & POWELL, W. (2001). Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica*, form *typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica* **122**: 381-389.
70. PILLON, Y., FAY, M.F., SHIPUNOV, A.B. & CHASE, M.W. (2006). Species diversity versus phylogenetic diversity: A practical study in the taxonomically difficult genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae). *Biological Conservation* **129**: 4-13.

71. POWELL, W., MACHRAY, G.C. & PROVAN, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **1**(7): 215-222.
72. PRINGLE, G.J. & MURRAY, B.G. (1991). Karyotype Diversity and Nuclear DNA Variation in *Cyphomandra* en Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution; ed. Hawkes, Lester, Nee & Estrada; Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London.
73. PRINGLE, G.J. & MURRAY, B.G. (1991b). Interspecific hybridization involving the tamarillo *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **19**: 103-111.
74. PRINGLE, G.J. & MURRAY, B.G. (1992). Polyploidy and Aneuploidy in the Tamarillo *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). I. Spontaneous Polyploidy and Features of the Euploids. *Plant Breeding* **108**: 132-138.
75. PROHENS, J., RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. & NUEZ, F. (2003). New crops: an alternative for the development of horticulture. *Food, Agriculture & Environment* **1**(1): 75-79.
76. PROVAN, J. , SORANZO, N., WILSON, N.J., GOLDSTEIN, D.B. & POWELL, W. (1999). A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* **153**: 943-947.
77. PROVAN, J., KUMAR, A., SHEPHERD, L., POWELL, W. & WAUGH, R. (1996). Analysis of intra-specific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum*) using simple sequence repeats. *Plan Cell Rep.* **16**: 196-199.
78. PROVAN, J., POWELL, W. & HOLLINGSWORTH, P.M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **16**(3): 142-147.

79. RAKER, C.M. & SPOONER, D.M. (2002). Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. *Crop Science* **42**: 1451-1458.
80. REIF, J.C., ZHANG, P., DREISIGACKER, S., WARBURTON, M.L., VAN GINKEL, M., HOISINGTON, D., BOHN, M. & MELCHINGER, A.E. (2005). *Theor Appl Genet* **110**: 859-864.
81. ROSS, K.G., SHOEMAKER, D.D., KRIEGER, M.J., DEHEER, C.J. & KELLER, L. (1999). Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Mol. Biol. Evol.* **16** (4): 525-543.
82. ROY, J.K., BANDOPADHYAY, R., RUSTGI, S., BALYAN, H.S. & GUPTA, P.K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Science* **90** (5): 683-689.
83. RUSSELL, J.R., FULLER, J.D., MACAULAY, M., HATZ, B.G., JAHOR, A., POWELL, W. & WAUGH, R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet.* **95**: 714-722.
84. SAGHAI MAROOF, M.A., K.M. SOLIMA, R.A. JORGENSON AND R.W. ALLARD. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Nac. Acad. Sci. USA* **81**: 8014-8018.
85. SANJUR, O.I., PIPERNO, D.R., ANDRES, T.C. & WESSEL-BEAVER, L. (2002). Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *PNAS* **99** (1): 535-540.

86. SEGARRA-MORAGUES, J.G., IRIONDO, J.M. & CATALÁN, P. (2005). Genetic fingerprinting of germplasm accessions as an aid for species conservation: a case study with *Borderea chouardii* (Dioscoraceae), one of the most critically endangered Iberian plants. *Annals of Botany* **96**: 1283-1292.
87. SHEPHERD, M., CROSS, M. MAGUIRE, T.L., DIETERS, M.J., WILLIAMS, C.G. & HENRY, R.J. (2002). Transpecific microsatellites for hard pines. *Theor Appl Genet* **104**: 819-827.
88. SHIRAN, B. & MAHMOOD, S.M. (s.f.). A modified CTAB method for isolation of DNA from mint plants (*Mentha* spp)
89. SILVA, M.A. (s.f.). El rol de los cultivos marginales en la seguridad alimentaria local de la Región Andina y su potencial contribución a nivel mundial a través de la biotecnología. Disponible en:  
[http://cehap.bellinux.net/IMG/pdf/Cultivos\\_marginales.pdf](http://cehap.bellinux.net/IMG/pdf/Cultivos_marginales.pdf).
90. SIMIANER, H. (2006). Use of molecular markers and other information for sampling germplasm to create an animal gene bank en *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources.*, Ruane, J. & Sonnino, A. (eds.), FAO, Roma, Italia.
91. SOL – The International Solanaceae Genome Project. (2004). SOL: Systems Approach to Diversity and Adaptation-Draft 2.0. Disponible en:  
<http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project/> .
92. SUKHOTU, T., KAMIJIMA, O. & HOSAKA, K. (2005). Genetic diversity of the Andean tetraploid cultivated potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes) evaluated by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome* **48**: 55-64.
93. SUNNUCKS, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *TREE* **15**(5): 199-203.

94. SUSLOW, T.V., THOMAS, B.R. & BRAFORD, K.J. (2002). Biotechnology Provides New Tools for Plant Breeding; *Publicación 8043 de Agricultural Biotechnology California Series*. Producido por Seed Biotechnology Center, UC Davis/Biotechnology Workgroup of the UC Division of Agriculture and Natural Resources, University of California at Davis. Disponible en <http://anrcatalog.ucdavis.edu>.
95. TANKSLEY, S.D. & McCOUCH, S.R. (1997). Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild. *Science* **277**: 1063-1066.
96. TAPIA, C., ZAMBRANO, E. & MORILLO, E. (2006). Tomate de árbol (*Cyphomanra betacea* Sendt.), frutal promisorio para la diversificación del agro andino. Informe de Proyecto ejecutado por INIAP/DENAREF.
97. TAPIA, M.E. (s.f.). The role of under-utilized plant species with regard to increased food security and improved health of poor people, in mountain regions. IIAP/PNUD, Perú. Disponible en [http://www.underutilized-species.org/Documents/PUBLICATIONS/m\\_t.pdf](http://www.underutilized-species.org/Documents/PUBLICATIONS/m_t.pdf)
98. TAUTZ, D. & RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl.Acids Res.* **12**: 4127-4138.
99. VELASTEGUI, J.R. (1988). Enfermedades del tomate de árbol. Publicación Técnica de la Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
100. WAITS, L.P. BUCKLEY-BEASON, V.A., JOHNSON, W.E., ONORATO, D. & MACCARTHY, T. (2007). A select panel of polymorphic microsatellite loci for individual identification of snow leopards (*Panthera uncia*). *Molecular Ecology Notes* **7**(2): 311- 314.
101. WEBER. J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* **7**: 524-530.

102. WESTMAN, A.L. & KRESOVICH, S. (1998). The potential for cross-taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas. *Theor Appl Genet* **96**: 272-281.
103. XU, D.H. & GAI, J.Y. (2003). Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. *Plant Breeding* **123**: 503-506.
104. XU, S.-X, LIU, J. and LIU, G.S. (2004). The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize. *Hereditas* **141**: 207-215.
105. YÁBAR, C.A. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN, Serie de Normas Técnicas No. 38. Instituto Nacional De Salud (INS), Lima, Perú.
106. ZENG, L., KWON, T.R., LIU, X., WILSON, C., GRIEVE, C.M. & GREGORIO, C.B. (2004). Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oriza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils. *Plant Science* **166**: 1275-1285.
107. ZHANG, D.P., CARBAJULCA, D., OJEDA, L., ROSSEL, G., MILLA, S., HERRERA, C. & GHISLAIN, M. (2000). Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America, CIP Program Report 1999-2000.
108. ZHOU, S.L., XIONG, G.M., LI, Z.Y. & WEN, J. (2005). Loss of genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* F H Chen as evidenced by ITS sequence and AFLP polymorphism: a comparative study with *P. stipuleanatus* H T Tsai et K M Feng. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**(1): 107-115.

### 13. TABLAS

**Tabla 1.** Variedades de tomate de árbol descritas por diversas fuentes.

<b>Lugar</b>	<b>Variedades</b>	<b>Fuente</b>
Colombia	1. Común, 2. Mora, 3. Amarillo	Montoya et al. S.f.
Internacional	1. Ecuadorian Orange, 2. Goldmine, 3. Inca Gold, 4. Oratia Red, 5. Rothamer, 6. Ruby Red, 7. Solid Gold, 8. Yellow, entre otras (ver NZTGA 2006)	CRFG 1996, NZTGA 2006
Ecuador	a) 1. Amarillo o Inca Gold, 2. Negro o tomate de altura, 3. Puntón, 4. Redondo, y 5. Rojo o mora b) 1. Amarillo puntón 2. Amarillo redondo 3. Amarillo gigante 4. Mora común 5. Mora gigante 6. Criollo	a) Albornoz 1992; b) Morales 2001
Presente estudio	1. Morado Gigante 2. Amarillo Gigante 3. Morado Común 4. Amarillo Común 5. Morado Bola (o redondo) 6. Amarillo Bola (o redondo)	Términos que se manejan en los cultivos visitados.

**Tabla 2.** Sitios de colección de las accesiones de tomate de árbol en este estudio.

<b>Provincia (No. de muestras)</b>	<b>Localidad</b>		<b>Superficie</b>	<b>No. Muestras</b>	<b>Dueño ó Administrador</b>
Imbabura (33)	1	Carabuela, Otavalo	1 ha.	5	Carlos Guandinango
	2	Carabuela, Otavalo	1.5 ha	6	Segundo Ramírez
	3	Agualongo, Atuntaqui	3 ha	7	Vladimir Pita
	4	Atuntaqui, Atuntaqui	1.5 ha	5	Julio Armas
	5	Chaltura, Antonio Ante	0.5 ha	5	n/d
	6	Chaltura, Antonio Ante	2 ha	5	Jimmy Jaramillo
Tungurahua (38)	1	La Libertad, Pelileo	0.5 ha	6	Alfredo Rivera
	2	La Libertad, Pelileo	1 ha	6	Teresa Villagrán
	3	Valle Hermoso, Pelileo	800 m <sup>2</sup>	6	Abelardo Ojeda
	4	Artesón, Pelileo	250 m <sup>2</sup>	7	Abelardo Ojeda
	5	El Obraje, Pelileo	600 m <sup>2</sup>	6	n/d
	6	García Moreno, Pelileo	450 m <sup>2</sup>	7	Carlos Suárez
Pichincha (35)	1	San José de Puembo, Quito	0.5 ha	5	Jorge Garzón
	2	San José de Puembo, Quito	40 000 m <sup>2</sup>	7	Jorge Vásquez
	3	Yaruquí,	3000 m <sup>2</sup>	5	Manuel Acuña
	4	San Agustín	2000 m <sup>2</sup>	5	Víctor Córdor
	6	Entrada a Getsemaní	4000 m <sup>2</sup>	5	Berta Domínguez
	7	Sector Merapec, Cayambe	2 ha	8	Simón Ojeda

**Tabla 3.** Descripción de las características del fruto usadas para la clasificación de variedades en el presente estudio.

<b>Forma del fruto</b>	<b>Color endocarpo</b>
Gigante: fruto de mayor tamaño que los otros, tanto a lo largo como a lo ancho. El largo generalmente supera los 8 cm.	Morado: mucílago de color morado oscuro
Común: fruto de tamaño mediano, más largo que ancho y generalmente con el ápice pronunciado.	Amarillo: mucílago de este color.
Bola: fruto de tamaño mediano, de forma redonda, sin ápice o éste muy redondeado.	

**Tabla 4.** Acciones de tomate de árbol utilizadas en este estudio, agrupadas por provincia de origen y la variedad a la que pertenecen.

	<b>Imbabura</b>		<b>Tungurahua</b>		<b>Pichincha</b>	
	<b>Muestra</b>	<b>Variedad</b>	<b>Muestra</b>	<b>Variedad</b>	<b>Muestra</b>	<b>Variedad</b>
<b>1</b>	I1a	MG	T1a	MC	P1a	AB
<b>2</b>	I1b	AG	T1b	MC	P1d	AC
<b>3</b>	I1d	MG	T1c	MG	P2a	AB
<b>4</b>	I1e	MC	T1f	MG	P2d	AB?
<b>5</b>	I2b	AG	T2a	AB	P2k	MC
<b>6</b>	I2d	AC	T2b	MG	P3b	AB
<b>7</b>	I3a	AG	T2e	MG	P3d	AC
<b>8</b>	I3g	AB	T3b	MG	P4b	MB
<b>9</b>	I4a	AG	T3c	MC	P4d	AC
<b>10</b>	I4d	AB	T3d	AG	P6a	AG
<b>11</b>	I5b	AG	T3e	MB	P6e	AC
<b>12</b>	I5e	AC	T3f	MC	P7b	MC
<b>13</b>	I6d	AC	T4b	MG	P7c	MC
<b>14</b>			T4c	MG	P7d	MB
<b>15</b>			T4f	MC	P7e	MB
<b>16</b>			T5a	AB	P7g	MB
<b>17</b>			T5c	AC	P7h	MC
<b>18</b>			T5e	AC		
<b>19</b>			T6a	AG		
<b>20</b>			T6g	MB		

Para una explicación del código usado para la identificación de las acciones remitirse al texto, sección Muestreo (página 36).

**Tabla 5.** Accesiones de tomate de árbol analizadas y agrupadas por la variedad a la que pertenecen.

	<b>Amarillo Común</b>	<b>Amarillo Gigante</b>	<b>Amarillo Bola</b>
<b>1</b>	I2d	I1b	I3g
<b>2</b>	I5e	I2b	I4d
<b>3</b>	I6d	I3a	T2a
<b>4</b>	T5c	I4a	T5a
<b>5</b>	T5e	I5b	P1a
<b>6</b>	P1d	T3d	P2a
<b>7</b>	P3d	T6a	P2d
<b>8</b>	P4d	P6a	P3b
<b>9</b>	P6e		
<b>Total amarillos: 25</b>			
	<b>Morado Común</b>	<b>Morado Gigante</b>	<b>Morado Bola</b>
<b>1</b>	I1e	I1a	T3e
<b>2</b>	T1a	I1d	T6g
<b>3</b>	T1b	T1c	P4b
<b>4</b>	T3c	T1f	P7d
<b>5</b>	T3f	T2b	P7e
<b>6</b>	T4f	T2e	P7g
<b>7</b>	P2k	T3b	
<b>8</b>	P7b	T4b	
<b>9</b>	P7c	T4c	
<b>10</b>	P7h		
<b>Total morados: 25</b>			
<b>Totales forma</b>	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>12</b>

Para una explicación del código usado para la identificación de las accesiones remitirse al texto, sección Muestreo (página 36).

**Tabla 6.** Reactivos y volúmenes utilizados para la amplificación por PCR de los SSRs.

Reactivo	Concentración	Volumen
Buffer para PCR	10X	1.0 uL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.3 uL
dNTPs (100 mM c/u)	20 mM	0.1 uL
Primer	10 uM	0.4 uL
Taq (1-2 U por reacción)		0.2 uL
ADN	5 ng/uL	2.0 uL
Agua		6.0 uL
Total		10.0 uL

**Tabla 7.** Programa de PCR usado para la amplificación de los loci microsatélites. La temperatura de annealing ( $T$ ) varía para cada par de primers (ver Tabla 8).

Paso	Temperatura	Duración
Denaturalización inicial	94 °C	3 min
30 ciclos de amplificación		
Denaturalización	94 °C	1 min
Annealing	$T$ °C	2 min
Elongación	72 °C	1.5 min
Elongación final	72 °C	5 min

**Tabla 8.** Características de los pares de primers usados para el análisis de las accesiones de tomate de árbol.

Código Primer	Nombre Primer <sup>a</sup>	Secuencias del primer (5'-3')	Motivo microsatélite	Peso molecular (bp) <sup>b</sup>	Temperatura annealing (°C) <sup>c</sup>	Cromosoma <sup>d</sup>	PIC <sup>e</sup>	% Individuos heterocigotos	Incidencia de alelos nulos (%)
S036	STM1053	TCTCCCCATCTTAATGTTTC CAACACAGCATSCAGATCATC	(TA) <sub>4</sub> (ATC) <sub>5</sub>	~ 249 (168-184)	53 (53)	III	0.211	-	12
S089	STM3012	CAACTCAAACCAGAAGGCAAAA GAGAAATGGGCACAAAAAACA	(CT) <sub>4</sub> , (CT) <sub>8</sub>	~ 186 (153-213)	57 (57)	IX	0.147	-	8
S114	STM5114	AATGGCTCTCTCTGTATGCT GCTGTCCCAACTATCTTTGA	(ACC) <sub>7</sub>	a: ~183 b: ~ 293 (288-308)	57 (57)	II	0.5	98	0
S140	STM5140	GCTATTGTTGCAGATAATACG GCCATGCACTAATCTTTGATTC	(AAT) <sub>9</sub>	a: ~ 177 b: ~ 175 (~200)	50 (57)	IV	0.255	32	0
S182	STG0004	TGAAAGCCAATCTCACTGGA TATAATTGGCTTGCGAGTGC	(GT) <sub>6</sub>	~ 199 (~200)	55 (55)	XI	0.18	-	10
S188	STG0010	CGATCTCTGCTTTGCAGGTA GTTCATCACTACCGCCGACT	(TG) <sub>6</sub>	~ 173 (150-170)	54 (55)	III	0.32	-	20
S208	STG0033	GCTCATTTGACTGCTAAACCC GAAAGAATTGTGCCGTCGAT	(CGG) <sub>6</sub>	~ 157 (148-162)	55 (55)	II	0.077	-	4
S209	STI0001	CAGCAAAATCAGAACCCGAT GGATCATCAAATTCACCGCT	(ATT) <sub>n</sub>	a: ~ 187 b: ~ 181 (186-208)	55 (55)	IV	0.078	4	2
S221	STI0023	GCGAATGACAGGACAAGAGG TGCCACTGCTACCATAACCA	(CAG) <sub>n</sub>	a: ~ 187 b: ~ 184 (130-205)	50 (60)	X	0.449	68	0
S228	STI0035	ACCTTTGAGGAATTGCAGGA CATTGAAGGAGTTCCAGTCC	(TTC) <sub>n</sub>	a y b : < 100 (102- 115)	50 (57)	-	0.514	6	38
S231	STI0038	CCAAATGAGGCTAAGGGTGA GGCCAAGAAAATCAAGAACG	(CTG) <sub>n</sub>	~ 102 (110-115)	50 (58)	V	0.241	-	14

<sup>a</sup> Este el nombre con el que se conoce el primer a nivel internacional, mientras que el código es el nombre que se le fue asignado para esta investigación

<sup>b</sup> El primer número es el peso aproximado del microsatélite conforme se determinó en este estudio; entre paréntesis consta el rango de peso esperado establecido en papa; las letras designan los distintos alelos.

<sup>c</sup> El primer número corresponde a la temperatura usada en este estudio; el segundo, entre paréntesis, es la temperatura de annealing recomendada para papa.

<sup>d</sup> El número corresponde al cromosoma de papa. Se asume que el cromosoma en el que se encuentra cada microsatélite se corresponde en el tomate de árbol.

<sup>e</sup> Para el cálculo del PIC se consideraron también los alelos nulos.

**Tabla 9.** Protocolo de tinción con plata de los geles de acrilamida.

Paso	Solución	Tiempo	Observaciones
Fijación	Etanol absoluto al 10%, Ácido acético al 0.5%	5 min.	10 usos.
Tinción	Nitrato de plata (1.5 g/L), formaldehído 37% (1.5 mL/L)	6-7 min.	En obscuridad. Agitación constante.
Lavado	Agua destilada	15 s.	
Revelado	Hidróxido de sodio (15 g/L), formaldehído 37% (2 mL/L),	3-5 min.	Realizar en la obscuridad. 4 usos.
Parada	Solución de fijación	2 min.	

**Tabla 10.** Valores de similitud genética entre todas las accesiones utilizando el coeficiente de Jaccard y agrupados por lugar de origen y por variedad de las muestras de tomate de árbol.

Se indican el respectivo tamaño de la muestra (n), promedio (P), desviación estándar (SD) y valor mínimo (M).

a) Comparación de valores entre todas las muestras de Imbabura. n = 13, P = 0.89, SD = 0.098, M = 0.64

	I1a	I1d	I1e	I3g	I3a	I4a	I2b	I1b	I2d	I4d	I5b	I5e	I6d
I1a	1,00												
I1d	0,82	1,00											
I1e	0,75	1,00	1,00										
I3g	0,75	1,00	1,00	1,00									
I3a	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00								
I4a	0,67	0,92	0,92	0,92	0,92	1,00							
I2b	0,82	1,00	0,92	0,92	0,92	0,85	1,00						
I1b	0,67	0,92	0,92	0,92	0,92	1,00	0,85	1,00					
I2d	0,73	0,92	0,92	0,92	0,92	0,83	1,00	0,83	1,00				
I4d	0,78	0,90	0,82	0,82	0,82	0,82	1,00	0,82	1,00	1,00			
I5b	0,64	0,86	0,87	0,87	0,87	0,80	0,92	0,80	0,92	0,83	1,00		
I5e	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,86	0,92	0,86	1,00	0,91	1,00	1,00	
I6d	0,80	0,83	0,77	0,77	0,77	0,83	0,83	0,83	0,75	0,80	0,67	0,71	1,00

b) Comparación de valores entre todas las muestras de Tungurahua.  $n = 20$ ,  $P = 0.87$ ,  $SD = 0.090$ ,  $M = 0.64$

	T2b	T4c	T3e	T6g	T5a	T3d	T5c	T6a	T5e	T1a	T1b	T1f	T2e	T3b	T1c	T3c	T3f	T4b	T4f	T2a
T2b	1,00																			
T4c	1,00	1,00																		
T3e	1,00	1,00	1,00																	
T6g	1,00	1,00	1,00	1,00																
T5a	0,83	0,83	0,83	0,83	1,00															
T3d	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	1,00														
T5c	0,83	0,83	0,83	0,83	0,82	0,75	1,00													
T6a	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	0,83	0,91	1,00												
T5e	0,83	0,83	0,83	0,83	0,82	0,75	1,00	0,91	1,00											
T1a	0,82	0,82	0,82	0,82	0,80	0,80	1,00	0,90	1,00	1,00										
T1b	0,75	0,75	0,75	0,75	0,80	0,73	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00									
T1f	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	0,92	0,83	0,92	0,83	0,82	0,75	1,00								
T2e	0,93	0,93	0,93	0,93	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,82	0,75	0,93	1,00							
T3b	0,86	0,86	0,86	0,86	0,69	0,77	0,83	0,77	0,83	0,90	0,82	0,86	0,93	1,00						
T1c	0,86	0,86	0,86	0,86	0,69	0,77	0,69	0,77	0,69	0,82	0,75	0,86	0,93	0,86	1,00					
T3c	0,93	0,93	0,93	0,93	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00				
T3f	0,93	0,93	0,93	0,93	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00	1,00			
T4b	0,86	0,86	0,86	0,86	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,90	0,82	0,86	0,93	0,86	0,86	0,93	0,93	1,00		
T4f	0,79	0,79	0,79	0,79	0,75	0,69	0,75	0,83	0,75	0,82	0,82	0,79	0,86	0,79	0,92	0,86	0,86	0,79	1,00	
T2a	1,00	1,00	1,00	1,00	0,89	1,00	0,78	0,89	0,78	0,86	0,75	1,00	1,00	0,64	0,89	1,00	1,00	1,00	0,78	1,00

c) Comparación de valores entre todas las muestras de Pichincha.  $n = 17$ ,  $P = 0.83$ ,  $SD = 0.111$ ,  $M = 0.50$

	<b>P2k</b>	<b>P4b</b>	<b>P7g</b>	<b>P7b</b>	<b>P7c</b>	<b>P1a</b>	<b>P3b</b>	<b>P1d</b>	<b>P3d</b>	<b>P7d</b>	<b>P7e</b>	<b>P7h</b>	<b>P2a</b>	<b>P6a</b>	<b>P6e</b>	<b>P4d</b>	<b>P2d</b>
<b>P2k</b>	1,00																
<b>P4b</b>	0,83	1,00															
<b>P7g</b>	0,85	0,83	1,00														
<b>P7b</b>	0,67	0,73	0,75	1,00													
<b>P7c</b>	0,83	0,82	0,92	0,82	1,00												
<b>P1a</b>	0,91	0,82	0,91	0,64	0,82	1,00											
<b>P3b</b>	0,83	0,82	0,92	0,67	0,83	0,82	1,00										
<b>P1d</b>	0,85	0,83	1,00	0,75	0,92	0,91	0,92	1,00									
<b>P3d</b>	0,83	0,82	0,92	0,82	1,00	0,82	0,83	0,92	1,00								
<b>P7d</b>	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,77	0,79	0,86	0,79	1,00							
<b>P7e</b>	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,77	0,79	0,86	0,79	1,00	1,00						
<b>P7h</b>	0,71	0,57	0,71	0,50	0,64	0,75	0,64	0,71	0,64	0,86	0,86	1,00					
<b>P2a</b>	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,77	0,79	0,86	0,79	0,87	0,87	0,73	1,00				
<b>P6a</b>	0,77	0,75	0,92	0,67	0,83	0,82	0,83	0,92	0,83	0,92	0,92	0,77	1,00	1,00			
<b>P6e</b>	0,71	0,69	0,85	0,75	0,92	0,75	0,77	0,85	0,92	0,86	0,86	0,71	0,86	0,92	1,00		
<b>P4d</b>	0,79	0,77	0,92	0,69	0,85	0,83	0,85	0,92	0,85	0,93	0,93	0,79	0,93	1,00	0,92	1,00	
<b>P2d</b>	0,73	0,60	0,73	0,53	0,67	0,77	0,67	0,73	0,67	0,87	0,87	0,86	0,87	0,85	0,73	0,80	1,00

d) Comparación de valores entre todas las muestras de la variedad Morado. n = 25, P = 0.84, SD = 0.114, M = 0.50

	I1a	I1d	I1e	T2b	T4c	T3e	T6g	P2k	P4b	P7g	P7b	P7c	T1a	T1b	T1f	T2e	T3b	T1c	T3c	T3f	T4b	T4f	P7d	P7e	P7h
I1a	1,00																								
I1d	0,82	1,00																							
I1e	0,75	1,00	1,00																						
T2b	0,75	1,00	1,00	1,00																					
T4c	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00																				
T3e	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00																			
T6g	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00																		
P2k	0,58	0,77	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	1,00																	
P4b	0,64	0,75	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,83	1,00																
P7g	0,67	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,85	0,83	1,00															
P7b	0,80	0,67	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,67	0,73	0,75	1,00														
P7c	0,73	0,83	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,83	0,82	0,92	0,82	1,00													
T1a	0,78	0,90	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	0,67	0,64	0,82	0,64	0,82	1,00												
T1b	0,70	0,82	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,67	0,64	0,82	0,64	0,82	1,00	1,00											
T1f	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,77	0,92	0,69	0,85	0,82	0,75	1,00										
T2e	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,82	0,75	0,93	1,00									
T3b	0,62	0,85	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,67	0,64	0,79	0,57	0,71	0,90	0,82	0,86	0,93	1,00								
T1c	0,75	0,85	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,67	0,64	0,79	0,69	0,85	0,82	0,75	0,86	0,93	0,86	1,00							
T3c	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00						
T3f	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00	1,00					
T4b	0,75	0,92	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,67	0,64	0,79	0,57	0,71	0,90	0,82	0,86	0,93	0,86	0,86	0,93	0,93	1,00				
T4f	0,67	0,77	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,71	0,69	0,85	0,75	0,92	0,82	0,82	0,79	0,86	0,79	0,92	0,86	0,86	0,79	1,00			
P7d	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00	1,00	0,93	0,86	1,00		
P7e	0,69	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,73	0,71	0,86	0,64	0,79	0,82	0,75	0,93	1,00	0,93	0,93	1,00	1,00	0,93	0,86	1,00	1,00	
P7h	0,54	0,77	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,71	0,57	0,71	0,50	0,64	0,80	0,73	0,79	0,86	0,92	0,79	0,86	0,86	0,79	0,71	0,86	0,86	1,00

e) Comparación de valores entre todas las muestras de la variedad Amarillo. n = 25, P = 0.86, SD = 0.089, M = 0.60.

	I3g	I3a	I4a	T5a	T3d	T5c	T6a	T5e	P1a	P3b	P1d	P3d	I2b	I1b	I2d	I4d	I5b	I5e	I6d	T2a	P2a	P6a	P6e	P4d	P2d
I3g	1,00																								
I3a	1,00	1,00																							
I4a	0,92	0,92	1,00																						
T5a	0,83	0,83	0,91	1,00																					
T3d	0,92	0,92	0,83	0,91	1,00																				
T5c	0,83	0,83	0,91	0,82	0,75	1,00																			
T6a	0,92	0,92	1,00	0,91	0,83	0,91	1,00																		
T5e	0,83	0,83	0,91	0,82	0,75	1,00	0,91	1,00																	
P1a	0,83	0,83	0,91	0,90	0,82	0,80	0,90	0,80	1,00																
P3b	0,85	0,85	0,92	0,82	0,75	0,82	0,91	0,82	0,82	1,00															
P1d	0,92	0,92	1,00	0,91	0,83	0,91	1,00	0,91	0,91	0,92	1,00														
P3d	0,85	0,85	0,92	0,82	0,75	0,82	0,91	0,82	0,82	0,83	0,92	1,00													
I2b	0,92	0,92	0,85	0,83	0,92	0,83	0,92	0,83	0,75	0,77	0,85	0,77	1,00												
I1b	0,92	0,92	1,00	0,91	0,83	0,91	1,00	0,91	0,91	0,92	1,00	0,92	0,85	1,00											
I2d	0,92	0,92	0,83	0,83	0,92	0,75	0,83	0,75	0,75	0,75	0,83	0,75	1,00	0,83	1,00										
I4d	0,82	0,82	0,82	0,90	0,90	0,80	0,90	0,80	0,73	0,73	0,82	0,73	1,00	0,82	1,00	1,00									
I5b	0,87	0,87	0,80	0,71	0,79	0,71	0,79	0,71	0,71	0,73	0,80	0,73	0,92	0,80	0,92	0,83	1,00								
I5e	0,93	0,93	0,86	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,77	0,79	0,86	0,79	0,92	0,86	1,00	0,91	1,00	1,00							
I6d	0,77	0,77	0,83	0,82	0,75	0,82	0,91	0,82	0,73	0,75	0,83	0,91	0,83	0,83	0,75	0,80	0,67	0,71	1,00						
T2a	1,00	1,00	0,89	0,89	1,00	0,78	0,89	0,78	0,78	0,78	0,89	0,78	1,00	0,89	1,00	1,00	0,90	1,00	0,78	1,00					
P2a	0,93	0,93	0,86	0,77	0,85	0,77	0,85	0,77	0,77	0,79	0,86	0,79	0,92	0,86	0,85	0,75	0,93	0,93	0,71	0,90	1,00				
P6a	1,00	1,00	0,92	0,83	0,92	0,83	0,92	0,83	0,82	0,83	0,92	0,83	1,00	0,92	0,92	0,90	0,92	0,92	0,83	1,00	1,00	1,00			
P6e	0,92	0,92	0,85	0,75	0,83	0,75	0,83	0,75	0,75	0,77	0,85	0,92	0,85	0,85	0,83	0,73	0,80	0,86	0,83	0,89	0,86	0,92	1,00		
P4d	1,00	1,00	0,92	0,83	0,92	0,83	0,92	0,83	0,83	0,85	0,92	0,85	0,92	0,92	0,92	0,82	0,87	0,93	0,77	1,00	0,93	1,00	0,92	1,00	
P2d	0,80	0,80	0,73	0,64	0,71	0,64	0,71	0,64	0,77	0,67	0,73	0,67	0,85	0,73	0,85	0,75	0,93	0,93	0,60	0,80	0,87	0,85	0,73	0,80	1,00

f) Comparación de valores entre todas las muestras de la variedad Común.  $n = 19$ ,  $P = 0.83$ ,  $SD = 0.109$ ,  $M = 0.50$ .

	I1e	T5c	T5e	P2k	P7b	P7c	P1d	P3d	T1a	T1b	T3c	T3f	T4f	P7h	I2d	I5e	I6d	P6e	P4d
I1e	1,00																		
T5c	0,83	1,00																	
T5e	0,83	1,00	1,00																
P2k	0,79	0,75	0,75	1,00															
P7b	0,69	0,64	0,64	0,67	1,00														
P7c	0,85	0,82	0,82	0,83	0,82	1,00													
P1d	0,92	0,91	0,91	0,85	0,75	0,92	1,00												
P3d	0,85	0,82	0,82	0,83	0,82	1,00	0,92	1,00											
T1a	0,82	1,00	1,00	0,67	0,64	0,82	0,82	0,82	1,00										
T1b	0,75	1,00	1,00	0,67	0,64	0,82	0,82	0,82	1,00	1,00									
T3c	0,93	0,77	0,77	0,73	0,64	0,79	0,86	0,79	0,82	0,75	1,00								
T3f	0,93	0,77	0,77	0,73	0,64	0,79	0,86	0,79	0,82	0,75	1,00	1,00							
T4f	0,79	0,75	0,75	0,71	0,75	0,92	0,85	0,92	0,82	0,82	0,86	0,86	1,00						
P7h	0,79	0,75	0,75	0,71	0,50	0,64	0,71	0,64	0,80	0,73	0,86	0,86	0,71	1,00					
I2d	0,92	0,75	0,75	0,69	0,58	0,75	0,83	0,75	0,89	0,80	1,00	1,00	0,83	0,83	1,00				
I5e	0,93	0,77	0,77	0,73	0,64	0,79	0,86	0,79	0,82	0,75	1,00	1,00	0,86	0,86	1,00	1,00			
I6d	0,77	0,82	0,82	0,69	0,73	0,91	0,83	0,91	0,90	0,90	0,71	0,71	0,83	0,57	0,75	0,71	1,00		
P6e	0,92	0,75	0,75	0,71	0,75	0,92	0,85	0,92	0,82	0,75	0,86	0,86	0,85	0,71	0,83	0,86	0,83	1,00	
P4d	1,00	0,83	0,83	0,79	0,69	0,85	0,92	0,85	0,82	0,75	0,93	0,93	0,79	0,79	0,92	0,93	0,77	0,92	1,00

g) Comparación de valores entre todas las muestras de la variedad Gigante. n = 17, P = 0.89, SD = 0.088, M = 0.62.

	I1a	I1d	I3a	I4a	T2b	T4c	T3d	T6a	T1f	T2e	T3b	T1c	T4b	I2b	I1b	I5b	P6a
I1a	1,00																
I1d	0,82	1,00															
I3a	0,75	1,00	1,00														
I4a	0,67	0,92	0,92	1,00													
T2b	0,75	1,00	1,00	0,92	1,00												
T4c	0,75	1,00	1,00	0,92	1,00	1,00											
T3d	0,73	0,92	0,92	0,83	0,92	0,92	1,00										
T6a	0,73	0,92	0,92	1,00	0,92	0,92	0,83	1,00									
T1f	0,75	1,00	1,00	0,92	1,00	1,00	0,92	0,92	1,00								
T2e	0,69	0,92	0,93	0,86	0,93	0,93	0,85	0,85	0,93	1,00							
T3b	0,62	0,85	0,86	0,79	0,86	0,86	0,77	0,77	0,86	0,93	1,00						
T1c	0,75	0,85	0,86	0,79	0,86	0,86	0,77	0,77	0,86	0,93	0,86	1,00					
T4b	0,75	0,92	0,86	0,79	0,86	0,86	0,85	0,85	0,86	0,93	0,86	0,86	1,00				
I2b	0,82	1,00	0,92	0,85	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,85	1,00	1,00			
I1b	0,67	0,92	0,92	1,00	0,92	0,92	0,83	1,00	0,92	0,86	0,85	0,79	0,79	0,85	1,00		
I5b	0,64	0,86	0,87	0,80	0,87	0,87	0,79	0,79	0,87	0,93	0,82	0,87	0,87	0,92	0,80	1,00	
P6a	0,82	1,00	1,00	0,92	1,00	1,00	0,92	0,92	1,00	0,92	0,80	0,85	0,92	1,00	0,92	0,92	1,00

h) Comparación de valores entre todas las muestras de la variedad Bola.  $n = 12$ ,  $P = 0.87$ ,  $SD = 0.098$ ,  $M = 0.60$ .

	I3g	T3e	T6g	T5a	P4b	P7g	P1a	P3b	P7d	P7e	T2a	P2a	P2d
I3g	1,00												
T3e	1,00	1,00											
T6g	1,00	1,00	1,00										
T5a	0,83	0,83	0,83	1,00									
P4b	0,77	0,77	0,77	0,90	1,00								
P7g	0,92	0,92	0,92	0,91	0,83	1,00							
P1a	0,83	0,83	0,83	0,90	0,82	0,91	1,00						
P3b	0,85	0,85	0,85	0,82	0,82	0,92	0,82	1,00					
P7d	0,93	0,93	0,93	0,77	0,71	0,86	0,77	0,79	1,00				
P7e	0,93	0,93	0,93	0,77	0,71	0,86	0,77	0,79	1,00	1,00			
T2a	1,00	1,00	1,00	0,89	0,80	0,89	0,78	0,78	1,00	1,00	1,00		
P2a	0,93	0,93	0,93	0,77	0,71	0,86	0,77	0,79	0,87	0,87	0,90	1,00	
P2d	0,80	0,80	0,80	0,64	0,60	0,73	0,77	0,67	0,87	0,87	0,80	0,87	1,00

**Tabla 11.** Promedio, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los valores de similitud genética obtenidos con el coeficiente de Jaccard y agrupados por variedades y lugar de origen de las accesiones de tomate de árbol.

Criterio de agrupación	Promedio	Desviación estándar	Máximo	Mínimo
Lugar de origen				
Imbabura	0,8855	0,0988	1,000	0,6429
Tungurahua	0,8738	0,0904	1,000	0,6429
Pichincha	0,8253	0,1109	1,000	0,5000
Variedades				
Amarillos	0,8634	0,0888	1,000	0,6000
Morados	0,8392	0,1142	1,000	0,5000
Comunes	0,8303	0,1089	1,000	0,5000
Gigantes	0,8910	0,0883	1,000	0,6154
Bola	0,8712	0,0980	1,000	0,6000

**Tabla 12.** Ejemplos de transferencia de primers SSR en plantas, con el número de loci amplificados (A), el número de loci polimórficos (P) y el número total de loci muestreados (n).

Fuente de SSRs	Transferidos a:	A (%)	P (%)*	n	Referencia
<i>Glycine max</i> (soya)	<i>G. microphylla</i>	19 (61)	n.d.	31	Peakall et al. 1998
	<i>G. clandestina</i>	19 (61)	17 (55)	20	
	<i>G. falcata</i>	15 (48)	n.d.		
	<i>Kennedia rubicunda</i>	3 (15)	1 (5)		
	<i>Vicia faba</i>	1 (5)	0		
	<i>Vigna unguiculata</i>	4 (20)	1 (5)		
<i>Vasconcellea x heilbornii</i> (babaco)	<i>V. chilensis</i>	6 (67)	2 (22)	9	Kyndt et al. 2006
	<i>V. monoica</i>	7 (78)	3 (33)		
	<i>V. stipulata</i>	9 (100)	7 (78)		
	<i>V. quecifolia</i>	6 (67)	1 (11)		
	<i>V. parviflora</i>	7 (78)	4 (44)		
	<i>Jacaratia digitata</i>	6 (67)	0		
	<i>Carica papaya</i>	5 (56)	1 (11)		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Brassica napus</i>	15 (88)	8 (47)	17	Westman y Kresovich 1998
	<i>B. rapa</i>	16 (94)	7 (41)		
	<i>B. carinata</i>	17 (100)	1 (5.8)		
	<i>B. nigra</i>	16 (94)	10 (59)		
<i>Pinus radiata</i> y <i>P. taeda</i>	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> y <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	29 (58)	23 (46)	50	Sheperd et al. 2002
<i>Annona cherimola</i> (chirimoya)	<i>A. squamosa</i>	14 (93)	n.d.	15	Escribano et al. 2004
	<i>Rollinia emarginata</i>	12 (80)	n.d.		
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>S. betaceum</i>	15 (28)	4 (7.5)	53	Presente estudio

Modificado a partir de Peakall et al. 1998.

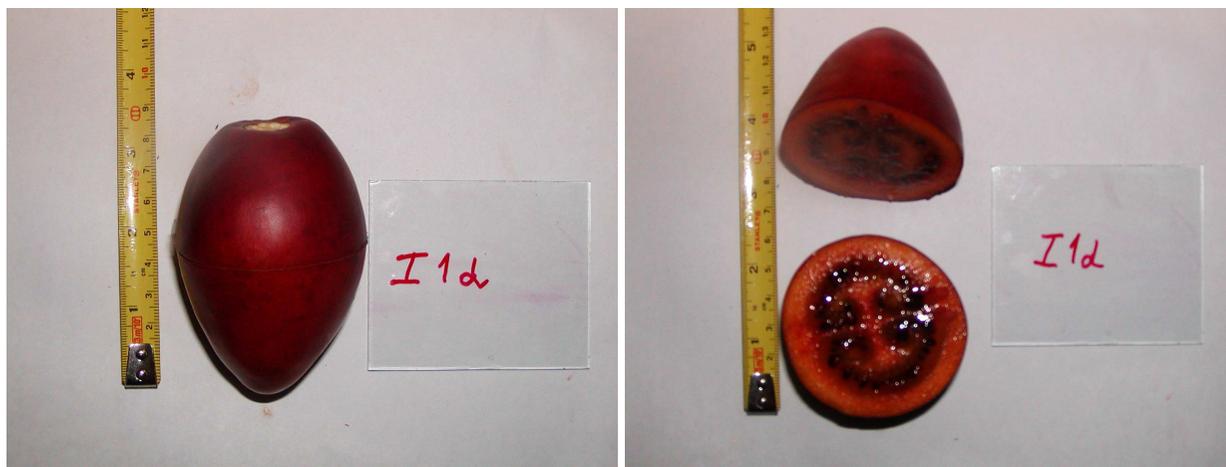
\* Se consideró a un SSR polimórfico cuando presentaba por lo menos dos alelos. El porcentaje de loci polimórficos se calculó en relación al total de loci muestreados (n).

## 14. FIGURAS

**Figura 1.** Vista externa del fruto y corte transversal de cada una de las variedades propuestas para el tomate de árbol en este estudio.



a) Amarillo Gigante



b) Morado Gigante



c) Amarillo Común



d) Morado Común

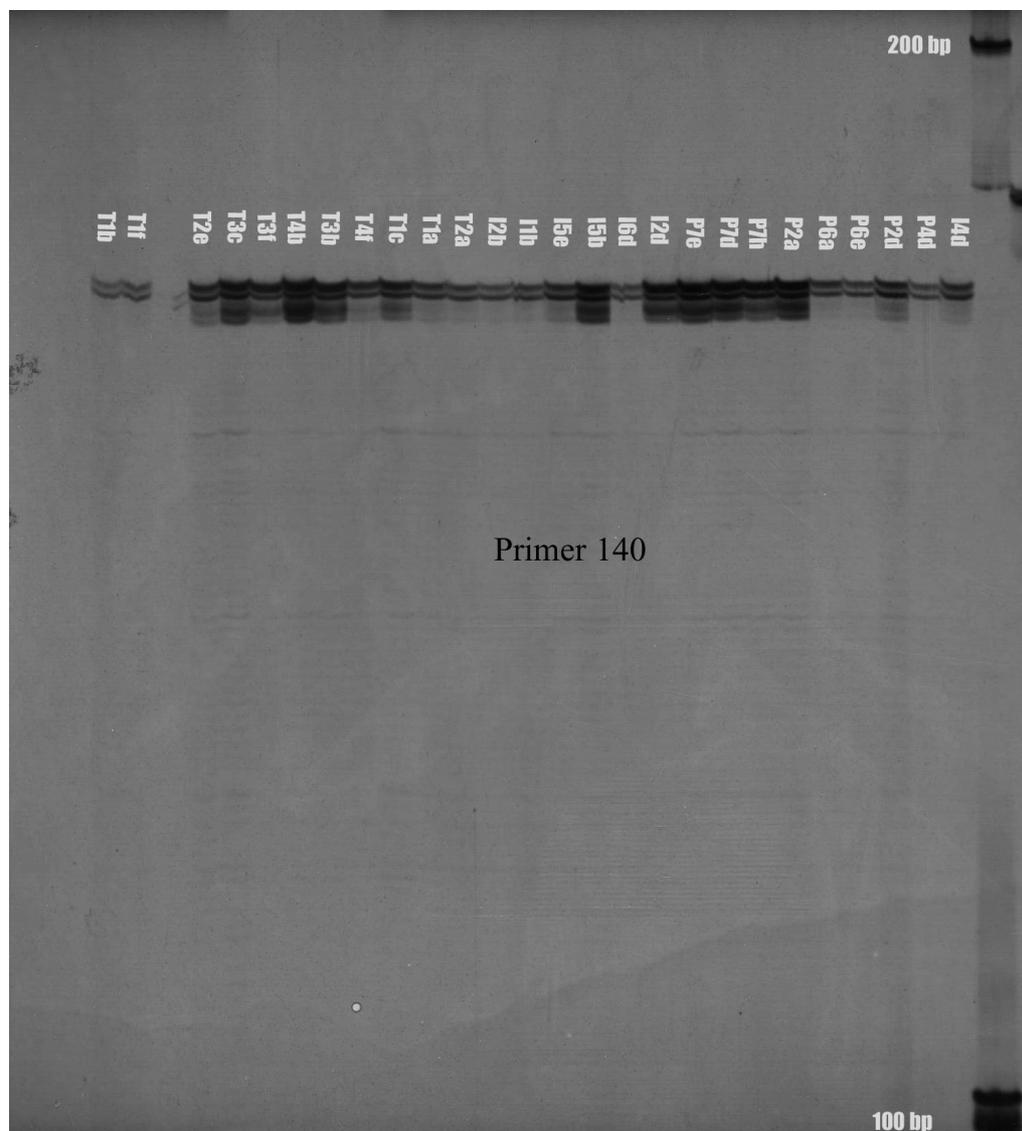


e) Amarillo Bola

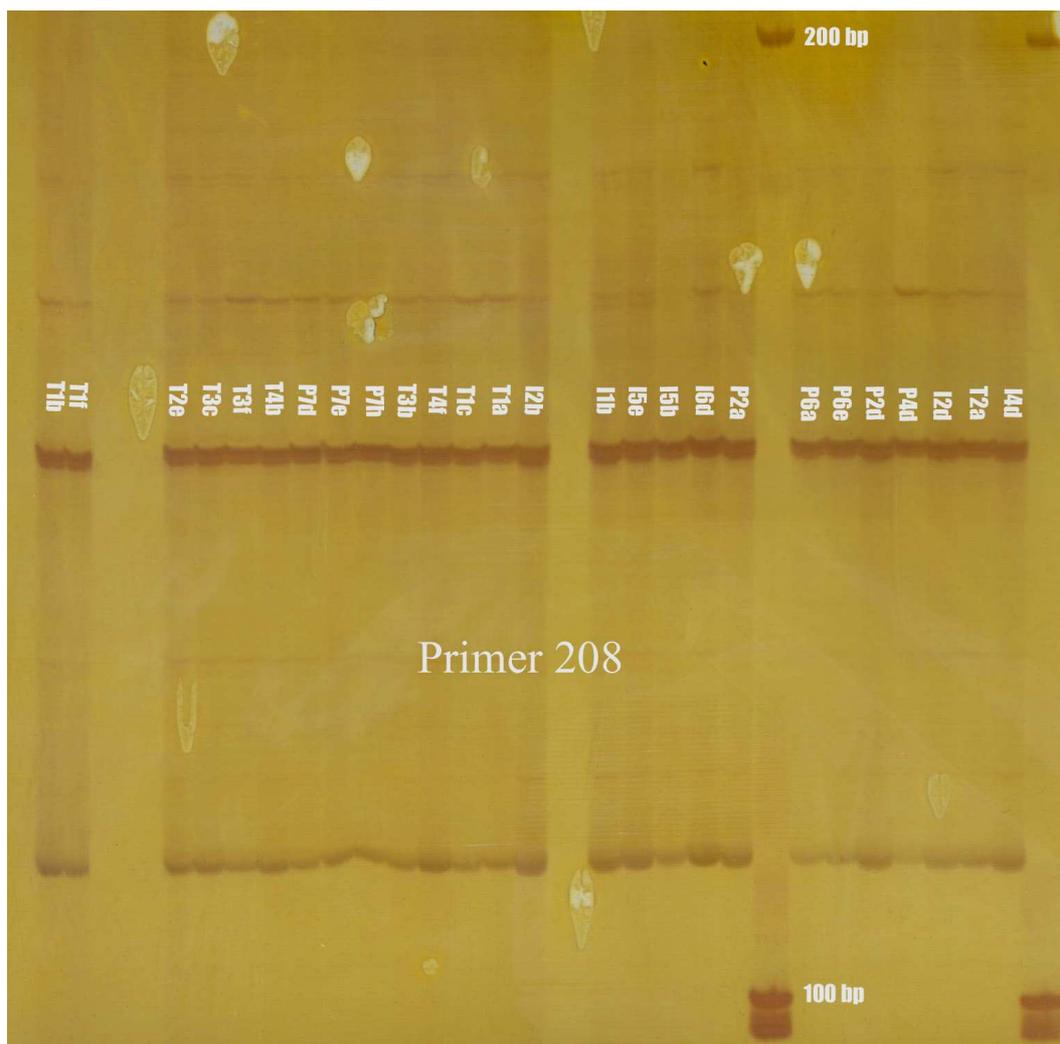


f) Morado Bola

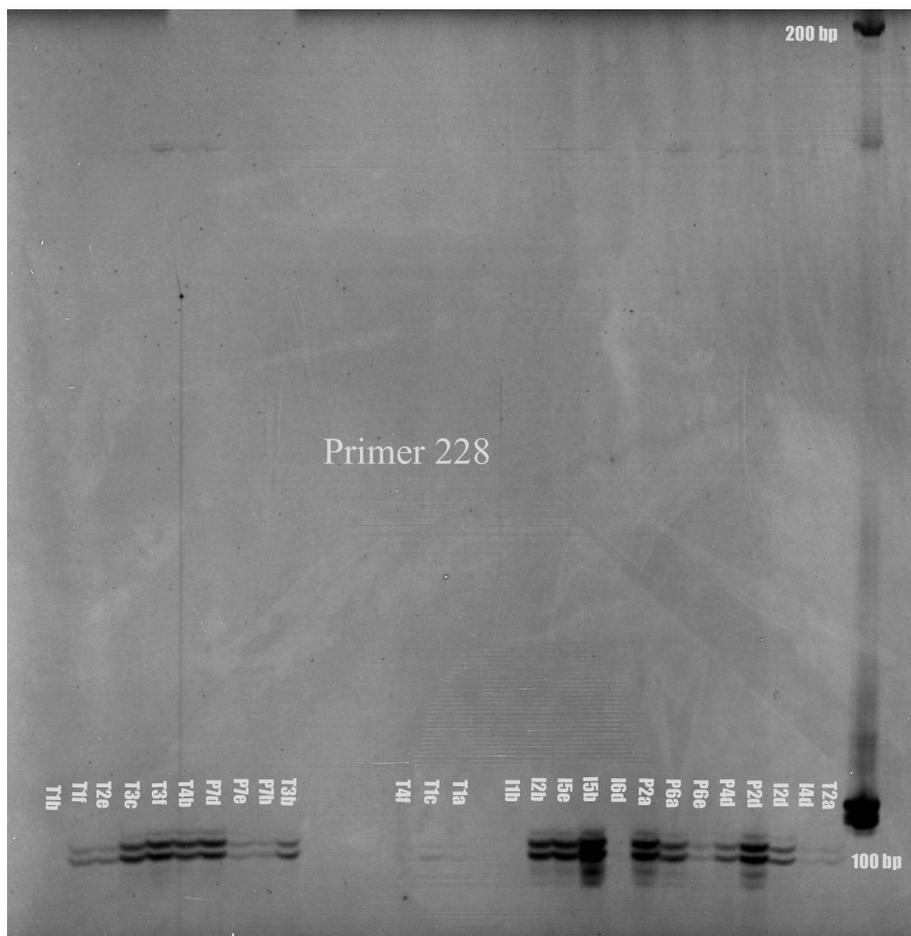
**Figura 2.** Geles de acrilamida en los que se muestra la separación por electroforesis de productos de amplificación por PCR de algunos de los pares de primers usados en el estudio para analizar las accesiones de tomate de árbol.



a) Gel de acrilamida de amplificaciones con el primer S140. Se hace evidente el monomorfismo y la presencia de individuos heterocigotos

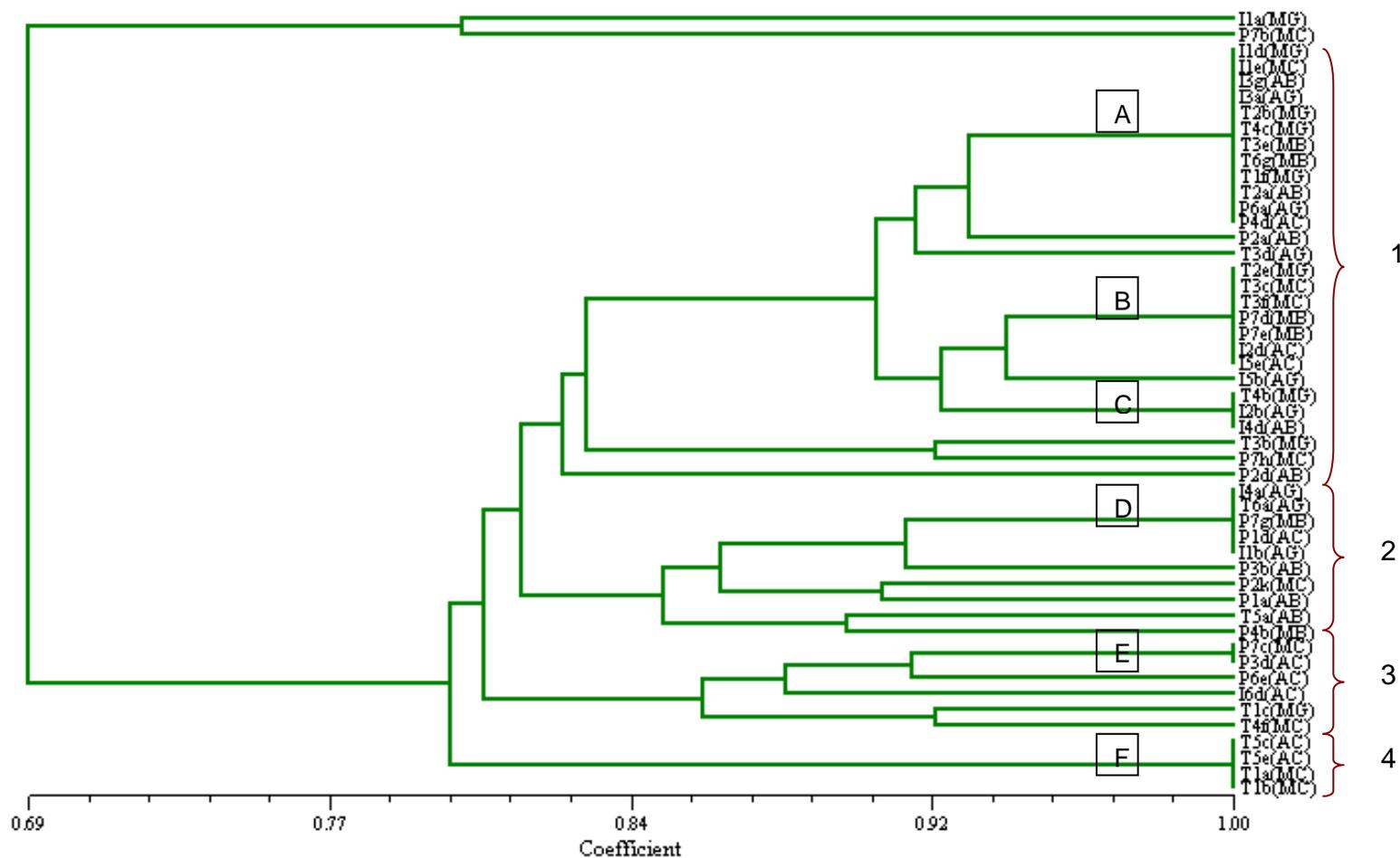


b) Gel de acrilamida de amplificaciones con el primer S208, en el que se hace evidente un patrón monomórfico.



c) Gel de acrilamida de amplificaciones con el primer S228, en el que se hace evidente el patrón monomórfico, la presencia individuos heterocigotos y la presencia de alelos nulos.

**Figura 3.** Dendrograma generado por el método UPGMA, usando el coeficiente de similitud de Jaccard, a partir de los patrones de bandas generadas por 11 pares de primers de SSRs en 50 accesiones de tomate de árbol.



Junto a cada accesión y entre paréntesis se especifica la variedad a la que pertenece. Se distinguen 6 grupos de genotipos idénticos, identificados con letras. A nivel de valor de similitud de aproximadamente 0.82 se distinguen 4 grupos grandes, identificados con números, y un par de muestras (I1a y P7b) separadas del resto.

## 14. ANEXOS

**Anexo 1.** Comparación de características entre los marcadores moleculares más populares.

Característica	Isoenzimas	RFLPs	RAPDs	SSRs	AFLPs
Costo de desarrollo	bajo	medio	bajo	alto	bajo
Nivel de polimorfismo	Bajo	Medio	Medio	Alto	medio
Automatización	No	No	Sí/no	Sí/no	Sí/no
Confiabilidad	Alto	Alto	Bajo	Alto	Medio
Grado de pericia requerido	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo/Medio	Medio
Naturaleza del marcador	Codominante	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante
Control genético	Unilocus	Uni-/multilocus	Multilocus	Unilocus	Multilocus
Cobertura del genoma	Pobre	Media	Alta	Alta	Alta
Localización dentro del genoma	Loci que se expresan, agrupados	Agrupados	Ubicuito	Ubicuito	Ubicuito

Tomado de Bhat (s.f.).

**Anexo 2.** Plagas y enfermedades que afectan al tomate de árbol y su tratamiento.

Artrópodos:

Nombre común	Nombre científico	Tratamiento
Chinche de las flores y del fruto.	<i>Leptoglossus zonatus</i>	Permetrina Cipermetrina Diazinon
Chinche de encaje	<i>Corythueasp.</i>	Acidos grasos Azadirachtina
Cochinillas	<i>Icerya purchasi</i>	Aceite agrícola <i>Verticillium lecanii</i> Dienocloro
Pulgón	<i>Myzus sp.</i> , <i>Aphis sp.</i>	<i>Verticillium lecanii</i> Pirimifos – metil <i>Aphidius colemani</i>
Gusano trozador	<i>Spodoptera sp.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> Alfacipermetrina Extracto ajo-ají

Nemátodos:

Nombre común	Nombre científico	Tratamiento
Nemátodo nodulador	<i>Meloidogyne</i> spp.	Acidos grasos Azadirachtina Carbofuran Fenamiphos
Nemátodo de la Lesión	<i>Tylenorrhynchus</i> sp.	Acidos grasos Azadirachtina Ethoprophos

Hongos:

Nombre común	Nombre científico	Tratamiento
Tizón de la hoja o lanchar	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Trichoderma lignorum</i> <i>T. viride.</i>  Cobre pentahidratado Oxadixyl + Mancozeb
Tizón menor de la hoja o alternariosis	<i>Alternaria solani</i>	Cobre pentahidratado Mancozeb
Oidio o mildiu polvoriento	<i>Oidium</i> sp.	Pyrazophos  Tridemorph Azufre
Antracnosis	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Gloeosporium</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> Oxicloruro de Cobre
Muerte de plántulas	<i>Fusarium oxysporum.</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Gliocladium roseum</i> <i>Trichoderma</i> spp. Iprodione
Muerte descendente	<i>Verticillium</i> sp.	Benomyl  Imazalil.
Muerte de los ápices	<i>Diplodia</i> sp.	Carbendazin  Oxadixyl + Mancozeb

## Bacterias:

<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Tratamiento</b>
Pudrición de la base	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Bacillus</i> spp. Cobre pentahidratado Cobre (+) Mancozeb
Bacteriosis	<i>Xanthomonas michiganensis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Bacillus</i> spp. Oxicloruro de Cobre

## Virus:

<b>Nombre común</b>	<b>Tratamiento</b>
Mosaico del tamarillo (TaMV), mosaico rugoso, mosaico del pepino (CMV), mosaico de la alfalfa (AIMV), mosaico arábico (AMV) entre otros.	Erradicación de vectores y de las plantas afectadas.

Tomado de MAG (2001) y modificado a partir de Velastegui 1988 y de Eagles et al. 1994.

