

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Extracción de ADN de *Solanum pimpinellifolium* para futuros  
estudios genéticos**

**Ana Carolina Ulloa Sotomayor**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, Mayo del 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Extracción de ADN de *Solanum pimpinellifolium* para futuros análisis  
genéticos**

**Ana Carolina Ulloa Sotomayor**

**Nombre del profesor, Título académico**

**María José Pozo Andrade, MBS**

Quito, 04 de Mayo de 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Ana Carolina Ulloa Sotomayor

Código: 00116499

Cédula de identidad: 1104296791

Lugar y fecha: Quito, Mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La extracción de ADN es una técnica que consiste en purificar el mismo a partir de células o tejidos de interés. El ADN extraído puede servir para realizar estudios como: análisis de diversidad genética, análisis de patrones evolutivos, estudio de procesos ecológicos, aplicación de marcadores moleculares, detección de patógenos, etc. Para asegurar que la calidad y cantidad de ADN obtenido sea óptima, según el uso que se dará al ADN, se pueden modificar y estandarizar protocolos.

*Solanum pimpinellifolium* es una especie de tomatillo salvaje que se encuentra distribuido desde Ecuador hasta el norte de Perú. Además ha sido introducido en las islas Galápagos en donde se ha observado que su presencia podría estar afectando a las especies endémicas de tomate. El presente proyecto consistió en extraer ADN a partir de hojas de *Solanum pimpinellifolium* que fueron recolectadas en diferentes zonas del Ecuador continental. Se realizó la extracción de ADN de muestras de 92 individuos y se determinó mediante cuantificación y electroforesis la calidad y concentración del ADN extraído. Los resultados obtenidos indican que las muestras de ADN se encuentran en condiciones óptimas y podrán ser usadas para posteriores análisis genéticos que tendrán como objetivo establecer la distribución de *Solanum pimpinellifolium* y determinar el origen continental del tomatillo introducido en las Islas Galápagos.

*Palabras claves:* extracción de ADN, *Solanum pimpinellifolium*, tomatillo, especie invasiva, cuantificación, concentración.

## ABSTRACT

DNA Extraction is a technique that consists in purifying DNA from cells or tissues of interest. Purified DNA can be used in future studies such as: genetic diversity analysis, evolutionary studies, research on ecological processes, molecular marker studies, pathogen detection, among others. Protocols are constantly being modified and standardized to ensure that the quality and quantity of the extracted DNA is ideal.

*Solanum pimpinellifolium* is a wild species of tomato that can be found in Ecuador and northern Peru. It has also been introduced in the Galapagos Islands, where evidence shows that its presence may be affecting endemic tomato species. The goal of this project was to extract DNA from leaves of *Solanum pimpinellifolium*, which were collected in different areas of Ecuador. DNA was obtained from leaf samples of 92 individuals and in order to verify its quantity and quality, quantification and electrophoresis were performed. The obtained results show that the DNA samples are in optimal conditions and can be used for future genetic studies, which seek to discover the continental distribution of *Solanum pimpinellifolium* and determine the continental origin of the introduced Galapagos populations.

*Key Words:* DNA extraction, *Solanum pimpinellifolium*, tomatillo, invasive species, quantification, concentration.

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>MÉTODOS</b> .....	14
2.1 Recolección de Material Vegetal .....	14
2.2 Extracción de ADN .....	14
2.3 Cuantificación de ADN .....	15
2.4 Electroforesis en gel de agarosa .....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	17
3.1 Extracción de ADN .....	17
3.2 Cuantificación de ADN .....	17
3.3 Electroforesis en gel de agarosa .....	17
<b>DISCUSIÓN</b> .....	18
<b>CONCLUSIONES</b> .....	21
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>TABLAS</b> .....	26
<b>FIGURAS</b> .....	28

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> Cuantificación de ADN extraído de 76 muestras de <i>Solanum pimpinellifolium</i> .	26
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído en *Solanum pimpinellifolium*, (muestras 103-1 a 305-11). 28
- Figura 2** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído en *Solanum pimpinellifolium*, (muestras 305-12 a 312-4). 29

## INTRODUCCIÓN

De las plantas con flor, el género *Solanum* es uno de los más grandes, dentro de este se pueden encontrar aproximadamente 1500 especies. Incluidos en este género se encuentran especies de gran importancia económica al ser consumidas como alimento alrededor del mundo tales como: tomate, papa, naranjilla, berenjena, entre otros (Sarkinen, et. al, 2015). Las especies del género *Solanum* se encuentran distribuidas por todo el mundo y se pueden encontrar en zonas con temperaturas templadas o tropicales (Eskandari, Assad, Shirzadian, & Mehregan, 2019). A pesar de esto, la mayoría de sus especies salvajes están localizadas en el oeste sudamericano, a lo largo de la cordillera andina desde Colombia, pasando por Ecuador, Perú, Bolivia y llegando hasta el norte de Chile. Además, se ha observado la presencia de ciertas especies de *Solanum* en las islas Galápagos (González, 2013).

*Solanum pimpinellifolium*, comúnmente conocido como tomatillo, es una especie salvaje que está estrechamente relacionada al tomate domesticado *Solanum lycopersicum*. Ambas son autocompatibles, producen frutos rojos, siendo los frutos de *S. pimpinellifolium* de menor tamaño, y pueden hibridar de forma natural (Caicedo & Schaal, 2004). Es una planta arbustiva pequeña que ha formado poblaciones densas en el Ecuador y el norte de Perú, y ha sido usada principalmente como fuente de alimento para las comunidades locales (Zuriaga, et. al, 2009). Esta especie posee la capacidad de crecer en hábitats variados, desde costas áridas que están sobre el nivel del mar, hasta zonas que pueden llegar a los 3000 metros de altura (Morales, et. al, 2016). Además, *S. pimpinellifolium* ha sido introducida a las islas Galápagos. Fue reportada en las islas por primera vez en 1985, sin embargo existe evidencia que indica que esta especie estaba presente en las islas en años anteriores. El científico Joseph Hooker describió tres tipos de especies de tomates a partir de colecciones de muestras que habían sido previamente recolectadas en 1835 por Charles Darwin, incluido dentro de estas especies estaba *S. pimpinellifolium* (Darwin, Knapp & Peralta, 2003). Se ha encontrado a *S. pimpinellifolium*

en zonas donde habitan especies de tomate que son endémicas a las islas, y se cree que el tomatillo introducido podría estar afectando el crecimiento y la diversidad genética de estas especies (Darwin, Knapp & Peralta, 2003).

La extracción de ADN es una técnica que se desarrolló con el fin de separar al ADN de proteínas y otros componentes celulares (Butler, 2010). Esta técnica se basa en la estructura físico-química que presenta la molécula de ADN. Su carga negativa y su alta polaridad, permiten que el ADN pueda ser disuelto en soluciones acuosas y que alrededor del ADN se forme una capa hidratante, la cual, al ser expuesta a etanol, se rompe. Esto permite que los grupos fosfato de la molécula de ADN se puedan unir a cationes y que se induzca su precipitación (Green & Sambrook, 2012). Existen varias metodologías que se pueden usar, dependiendo del tipo de muestra que se esté manejando, sin embargo las principales etapas que se deben seguir son: homogenización del tejido en donde se busca romper la muestra a partir de la cual se va a extraer el ADN, inducción de la lisis celular en donde se usan detergentes para romper las membranas celulares, separación de proteínas, lípidos y otros componentes celulares mediante el uso de centrifugación y solventes orgánicos, precipitación del ADN que generalmente se realiza con etanol y elución final del ADN extraído (Rocha, 2002). La extracción orgánica, en donde se utilizan diferentes compuestos tales como el fenol-cloroformo, es una de las formas más comunes para extraer ADN. Estos solventes orgánicos participan en la denaturación de las proteínas, sin embargo el fenol, al ser tóxico, podría contaminar el ADN y por tanto, es recomendable no acarrearlo durante todo el proceso de extracción (Puerta & Ureña, 2005). Con el paso del tiempo, las técnicas han ido mejorando e incluso se han elaborado kits para simplificar la extracción de ADN, y así obtener un ADN más puro y sobre todo para evitar que exista la presencia de algún contaminante o moléculas que no son de interés, que podrían actuar como un inhibidor para futuros procesos (Butler, 2010). La mayoría de los kits utilizan detergentes para inducir la lisis celular, y alguna enzima, como

RNAsa o proteinasa K, para eliminar la presencia de RNA o de proteínas. Además, se utiliza etanol para lavar el ADN precipitado y eliminar la presencia de cualquier residuo de buffer o solvente que haya sido usado en los pasos anteriores durante el proceso de extracción. Una de las ventajas del uso de estos kits es que el proceso de extracción requiere de menos tiempo, los resultados son mejores y no se necesita gran cantidad de muestra inicial (Demeke & Jenkins, 2010). Algunos kits de extracción han implementado el uso de columnas de sílice con membranas de fases sólidas. El sílice de la columna permite que únicamente el ADN se adhiera a la membrana para eliminar otros compuestos como proteínas o lípidos que estén presentes, los cuales van a pasar por la columna (Alvis-Arango & Giraldo-Vásquez, 2015). Después de una serie de lavados con etanol, se utiliza una solución específica que provoca que el ADN se desprenda del sílice. Al finalizar la extracción, el ADN se almacena en agua destilada o en la misma solución de elución (Alejos, Aragón, & Cornejo, 2014). Es importante que la purificación de ADN se realice de la forma adecuada según el uso posterior que se le dará al ADN (Alejos, Aragón, & Cornejo, 2014).

Una vez extraído el ADN, se lo debe analizar para determinar la concentración del mismo y observar si existe la presencia de contaminantes. La espectrofotometría ultravioleta y con fluorescencia son dos de los métodos que se usan para cuantificar el ADN (Nicklas & Buel, 2003). Al realizar espectrofotometría, el ADN absorbe luz UV a 260 nm y de esta forma se obtiene la concentración del ADN en ng/ $\mu$ l. Por otro lado, para determinar la pureza del ADN extraído se analizan las relaciones 260/280 y 260/230, los cuales indican la presencia de proteínas o contaminantes respectivamente. De esta forma se puede concluir si el ADN posee las características necesarias para cualquier uso posterior o no (Pachchigar, Khunt & Hetal, 2016).

Otra forma de conocer la calidad de ADN es mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica sirve para visualizar el tamaño y la integridad de los fragmentos de ADN. Se basa

en la aplicación de corrientes eléctricas lo que va a provocar que el ADN, de carga negativa, se dirija hacia el ánodo, atravesando una matriz porosa. Mientras más grande sea la molécula de ADN, más tiempo le va a tomar moverse y esto va a permitir separarlas en función de los tamaños (Fierro, 2014). Para poder visualizar el ADN en el gel, es importante el uso de un colorante fluorescente. Alguno de los más usados son el bromuro de etidio, SYBR Green o GelRed, siendo el SYBR Green el más seguro de usar para el operador (Demeke & Jenkins, 2010).

El presente proyecto consistió en extraer ADN a partir de muestras de *Solanum pimpinellifolium*, cuantificarlo y conocer la calidad y pureza del ADN extraído. El propósito de obtener ADN de esta especie es para que pueda ser usado en futuros estudios genéticos.

## MÉTODOS

### 2.1 Recolección de Material Vegetal

Se utilizaron 76 muestras de hojas de individuos de *Solanum pimpinellifolium*, las cuales habían sido previamente recolectadas en diferentes provincias de Ecuador continental: Imbabura, Bolívar, Los Ríos, Manabí, Santo Domingo y Esmeraldas.

### 2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), con ciertas modificaciones. Se comenzó pesando entre 18 a 20 g de la muestra, la cual fue triturada en un mortero con nitrógeno líquido. Luego de obtener un polvo fino, se agregaron 600 µl de buffer AP1 del kit de extracción y se mezcló en el mortero hasta obtener un líquido verde, sin presencia de residuos sólidos. Después, se procedió a colocar esta mezcla en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 4 µl de proteinasa K. Se colocó en vórtex por unos minutos y se incubó la mezcla por 10 minutos a 65°C en cama de arena, tratando de invertir el tubo 3 veces durante la incubación. Una vez pasados los 10 minutos, se agregaron 130 µl del buffer P3 del kit de extracción y se incubó en hielo por 5 minutos para luego centrifugar la mezcla a 13,200 rpm por 5,5 minutos. Se extrajo el sobrenadante obtenido con ayuda de una pipeta y este fue colocado en una columna QIAshredder que se encontraba dentro de un tubo de recolección de 2 ml, y se centrifugó a 13,200 rpm por 2 minutos. Después, se transfirió el líquido obtenido a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml, con cuidado de no tocar el pellet formado en el fondo del tubo, y se agregaron 1,5 volúmenes de Buffer AW1 del kit de extracción. Se tomaron 650 µl de la mezcla anterior y se colocaron en una columna DNeasy Mini la cual, de igual manera, se encontraba dentro de un tubo de recolección de 2ml, y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se repitió este paso en caso

de que haya quedado mezcla restante en el tubo eppendorf. Posteriormente, la columna DNeasy Mini fue colocada dentro de un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se agregaron 500  $\mu$ l de Buffer AW2, provisto por el kit. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante obtenido. Se realizó este paso una vez más, pero esta vez se centrifugó a 13,200 rpm por 2,5 minutos. Nuevamente se tomó la columna DNeasy Mini y se la colocó dentro de un tubo eppendorf de 1,5 ml en donde se almacenaría el ADN extraído. Para las primeras extracciones realizadas, se agregaron 100  $\mu$ l de Buffer AE, provisto por el kit de extracción, para realizar la elución del ADN, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minutos. Se repitió este paso una vez más y se almacenó el ADN extraído en refrigeración. Debido a que el ADN extraído se encontraba muy diluido al agregar 100  $\mu$ l de Buffer AE, para las siguientes extracciones se redujo la cantidad de buffer a 50  $\mu$ l, de manera que se pueda obtener ADN más concentrado.

### **2.3 Cuantificación de ADN**

Una vez extraído el ADN de las muestras de *Solanum pimpinellifolium*, se procedió a realizar la cuantificación por espectrofotometría, mediante el uso de Nanodrop 2000c (ThermoScientific™). En el pedestal de medición, se colocaron 2  $\mu$ l del buffer AE del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), el cual sirvió como blanco y después se colocaron 2  $\mu$ l del ADN extraído de manera que se pueda obtener los valores de cuantificación.

### **2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Para evaluar la calidad del ADN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% de concentración. El colorante usado en este proceso fue SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). En cada pocillo se colocaron 5  $\mu$ l de ADN, previamente mezclado con BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen). Adicionalmente se corrió 2  $\mu$ l de Ladder 100 bp

(Invitrogen) en el primer pocillo. Se dejó correr el gel a 80 voltios por 40 minutos y se visualizaron los resultados en el equipo ChemiDoc™ XRS+ (BIORAD).

## RESULTADOS

### 3.1 Extracción de ADN

En total, se logró realizar extracción de ADN a partir de 92 muestras de hojas de *Solanum pimpinellifolium*. El ADN extraído fue almacenado en buffer de elución en refrigeración.

### 3.2 Cuantificación de ADN

Se realizó cuantificación de 76 muestras de ADN extraído y se obtuvieron valores como son la concentración de ADN que varían desde 20 (ng/μl) a 270,7 (ng/μl), sin embargo, cinco muestras tuvieron valores menores a 20 (ng/μl). Además, se observaron los valores de los índices de pureza 260/280 y 260/230, los cuales en su mayoría, fueron cercanos a 2. Los valores de concentración y los índices de pureza de cada muestra se pueden encontrar en la Tabla 1.

### 3.3 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó electroforesis de 63 muestras. Al realizar electroforesis del ADN genómico extraído, se observó la presencia de bandas intensas (Figuras 1 y 2).

## DISCUSIÓN

*Solanum pimpinellifolium* es una especie de tomatillo salvaje de gran importancia alimenticia. Sin embargo, su presencia en las islas Galápagos, probablemente sea problemático para las especies endémicas de tomate. Es por esto que es importante estudiar su distribución en el Ecuador continental y determinar el origen de la invasión en las islas (Darwin, Knapp & Peralta, 2002). Debido a esto, la extracción de ADN debe dar como resultado un ADN en condiciones óptimas para su posterior uso en procesos como son secuenciación, análisis de diversidad genética y estudio de patrones evolutivos. Mientras más estandarizado esté el proceso de extracción, la posibilidad de que existan errores en estas técnicas se minimiza y a su vez se maximiza la eficiencia del trabajo realizado (Wehausen, Ramey & Epps, 2004).

Métodos de extracción de ADN, como el uso de fenol-cloroformo o sales, tienen ciertas desventajas, usualmente se requiere mayor cantidad de tejido, los procesos son más largos y hay mayor posibilidad de contaminación con enzimas o inhibidores que afectan todo el proceso de extracción (Ahnmed, et. al, 2009). Es por esto, que se han creado kits comerciales que aseguran que la calidad del ADN extraído sea la mejor. Uno de ellos es el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) que ha sido ampliamente usado para la extracción de ADN de plantas como maíz, soya, trigo, tomate, etc. Las ventajas que presenta este kit al usar columnas con membranas de sílice son que permite el procesamiento de varias muestras a la vez y no usa fenol o cloroformo por tanto es más seguro de manipular por el operador (Qiagen, 2006). La literatura menciona que el ADN obtenido mediante el uso de este kit es de gran pureza y calidad ya sea si es obtenido de muestras frescas o de muestras procesadas, y además que puede recuperar mayor cantidad de ADN amplificable que luego puede ser usado para hacer PCR u otras técnicas (Tengel, et. al, 2001).

Se comprobó que la extracción de ADN fue exitosa, las concentraciones obtenidas de ADN varían entre 6,2 (ng/μl) a 270,7 (ng/μl). Existen muestras que obtuvieron valores de

concentración más bajos, es probable que esto se deba a que a medida que se comenzó a probar el kit de extracción, se hicieron ciertas modificaciones como la cantidad de buffer de elución que se utiliza al final del proceso. Las muestras que poseen los valores de concentración más bajos, tenían mayor cantidad de buffer de elución AE, esto solo indica que la muestra está mucho más diluida, pero no afecta la calidad de la muestra.

Para que el índice de pureza 260/280 sea considerado como aceptable, es importante que los valores sean cercanos a 1,8. En caso de que los valores obtenidos estén muy lejanos, esto indicaría que existe la presencia de alguna proteína o contaminante que en algunos casos podrían ser residuos de las soluciones usadas durante el proceso de extracción (ThermoScientific, 2016). En los valores obtenidos que se pueden ver en la Tabla 1, se observa que existe un rango entre 1,5 y 1,9, lo cual es aceptable dentro del valor estándar y demuestra que estas muestras no poseen contaminantes. Solamente dos muestras mostraron valores de 2,03 y 2,17, lo que indica que en estas muestras existió una mínima contaminación que se pudo dar durante el proceso de extracción, o la cantidad y la conservación de la muestra no fue la adecuada (Díaz, et. al, 2013).

En cuanto al índice de pureza 260/230, los valores que indican mayor pureza están entre 1,8 y 2,2. (ThermoScientific, 2016). En la Tabla 1 se observa que la mayoría de valores obtenidos se encuentran cercanos a este rango y solamente dos muestras, las muestras ECU103-8 y ECU305-8 poseen valores de 4,18 y 5,77 respectivamente.

Para complementar el análisis de la calidad del ADN extraído se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la literatura se ha observado que para análisis de ADN genómico es recomendable usar 1% de agarosa (Demeke & Jenkins, 2010). En las figuras 1 y 2 se observa la presencia de una sola banda clara y solamente un poco de arrastre por degradación del ADN, esto nos indica que la calidad del ADN es la óptima y que no existe la presencia de ARN. De

esta forma también se puede visualizar que el proceso de extracción tuvo un alto rendimiento (Daza, Guillén, Rey & Ruiz, 2014) (Castro, Cobos, Ramírez & Imán, 2012).

## CONCLUSIONES

En el presente proyecto, se buscaba realizar la extracción de ADN de *Solanum pimpinellifolium*, para que pueda ser usado en futuros estudios que buscan determinar la distribución continental de la especie y conocer el origen continental de las poblaciones invasoras en las islas Galápagos. Luego de haber realizado los análisis de cuantificación por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa, se puede concluir que el ADN extraído se encuentra en condiciones óptimas para ser usado posteriormente. Adicionalmente, se pudo demostrar que el kit de extracción usado, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), funciona de forma eficiente para obtener ADN de buena calidad de la especie *Solanum pimpinellifolium*.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ahmed, I., Islam, M., Arshad, W., Mannan, A., Ahmad, W. & Mirza, B. (2009). High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *Journal of Applied Genetics*, 50(2), 105 – 107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433907>
- Alejos, P., Aragón, M. & Cornejo, A. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. INECC.
- Alvis-Arango & Giraldo-Vásquez. (2015). Evaluación de los métodos fenol-cloroformo y columnas de sílice para extracción de ADN a partir de tejido óseo. *Colombia Forense*, 2(1), 69 – 74. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/ml/article/view/1199>
- Butler, J. (2010). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Elsevier Inc.
- Caicedo, A. & Schaal, B. (2004). Population structure and phylogeography of *Solanum pimpinellifolium* inferred from a nuclear gene. *Molecular Ecology*, 13. 1871 – 1882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189210>
- Castro, J., Cobos, M., Ramírez, R. & Imán, S. (2012). Aislamiento de ADN genómicos de *Myrciaria dubia* (HBK) “Camu Camu” apropiado para análisis moleculares. *Ciencia Amazónica*, 2(1), 7 – 16. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5072959>
- Darwin, S., Knapp, S. & Peralta, I. (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*, 1(1). 29 – 53. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1017/S1477200003001026>
- Daza, C., Guillén, J., Rey, J. & R, V. (2014). Evaluación de un método de extracción y purificación de DNA a partir de tejido muscular fijado en formaldehído de cadáveres no identificados. *Revista Med*, 22(1), 42 – 49. <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rmed/article/view/1019>

- Desjardins, P. & Conklin, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis*, 45. <https://europepmc.org/article/med/21189466>
- Demeke, T. & Jenkins, R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1977 – 1990. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789856>
- Díaz, C., Garrote, H., Amor, A., Suárez, Y. & González, R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 29(3). <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=45146>
- Eskandari, M., Assadi, M., Shirzadian, S. & Mehregan, I. (2019). Ethnobotanical study and distribution of *Solanum* Section *Solanum* species (Solanaceae) in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 18(71), 85 – 98. [http://jmp.ir/browse.php?a\\_id=2668&sid=1&slc\\_lang=en](http://jmp.ir/browse.php?a_id=2668&sid=1&slc_lang=en)
- Fierro, F. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. INECC.
- González, P. (2013). Distribución geográfica de los “tomates silvestres” (*Solanum* L. Sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. Solanaceae). *Arnaldoa*, 20(2), 301 – 314. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/249918#/summary>
- Green, M. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morales, M., Morales, A., Artiles, A., Milián, Y. & Espinosa, G. (2016). Caracterización fenotípica y genética de cuatro especies silvestres del género *Solanum*, sección *Lycopersicon*. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 109 – 119. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193246976013>

- Nicklas, J. & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 1160 – 1167.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-003-1924-z>
- Pachchigar, K., Khunt, A. & Hetal, B. (2016). DNA Quantification. ICAR.
- Puerta, C. & Ureña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Rocha, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, 23(3). 9 – 17.  
<https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/921>
- Qiagen. (2006). *DNeasy Plant Handbook*. QIAGEN.
- Sarkinen, T., Baden, M., Gonzáles, P., Cueva, M., Giacomini, L., Spooner, D., Simon, R., Juárez, H., Nina, P., Molina, J. & Knapp, S. (2015). Listado anotado de Solanum L. (Solanaceae) en el Perú. *Revista Peruana de Biología*, 22(1). 003 – 062.  
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/11121>
- Tengel, C., Schubler, P., Setzke, E., Balles, J. & Sprenger, M. (2001). PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw Highly Processed Foodstuffs. *Biotechniques*, 31, 426 – 429. <https://www.future-science.com/doi/10.2144/01312pf01>
- ThermoScientific. (2016). *Espectrofotómetros micro-UV/Vis NanoDrop. NanoDrop One. Guía del usuario*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Wehausen, J., Ramey, R. & Epps, C. (2004). Experiments in DNA Extraction and PCR Amplification from Bighorn Sheep Feces: the importance of DNA Extraction Method. *Journal of Heredity*, 95(6), 503 – 509.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475396>

Zuriaga, E., Blanca, J., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W., Morales, R. & Nuez, F. (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56. 39 – 51.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10722-008-9340-z>

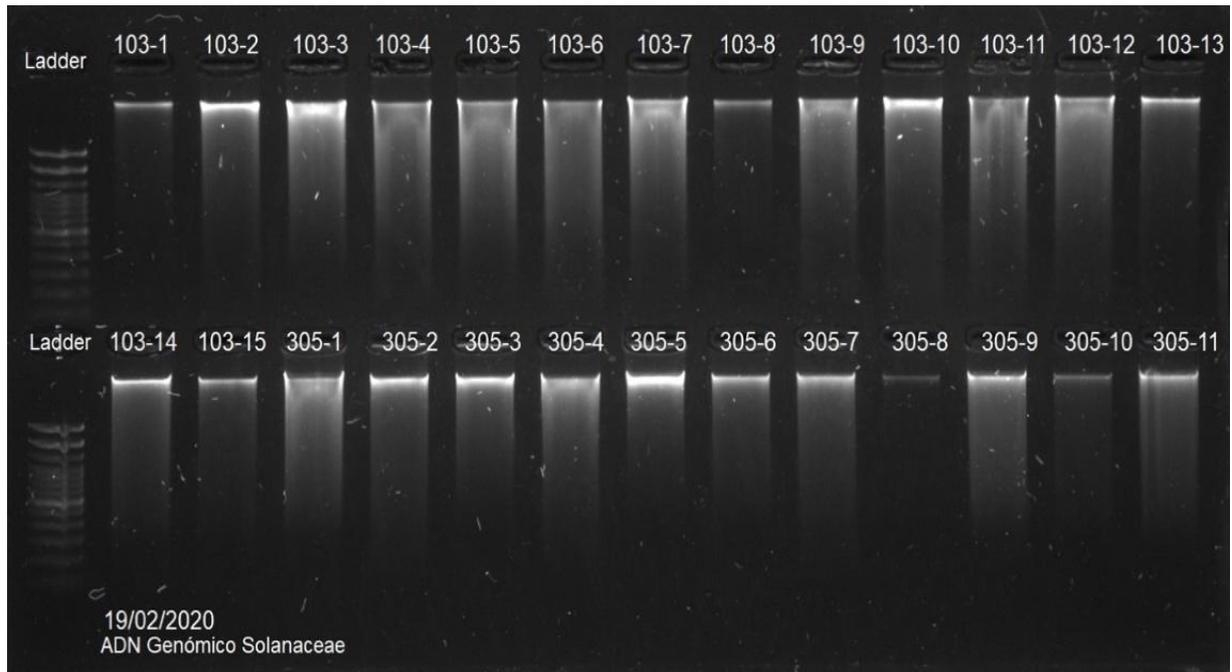
## TABLAS

**Tabla 1** Cuantificación de ADN extraído de 76 muestras de *Solanum pimpinellifolium*.

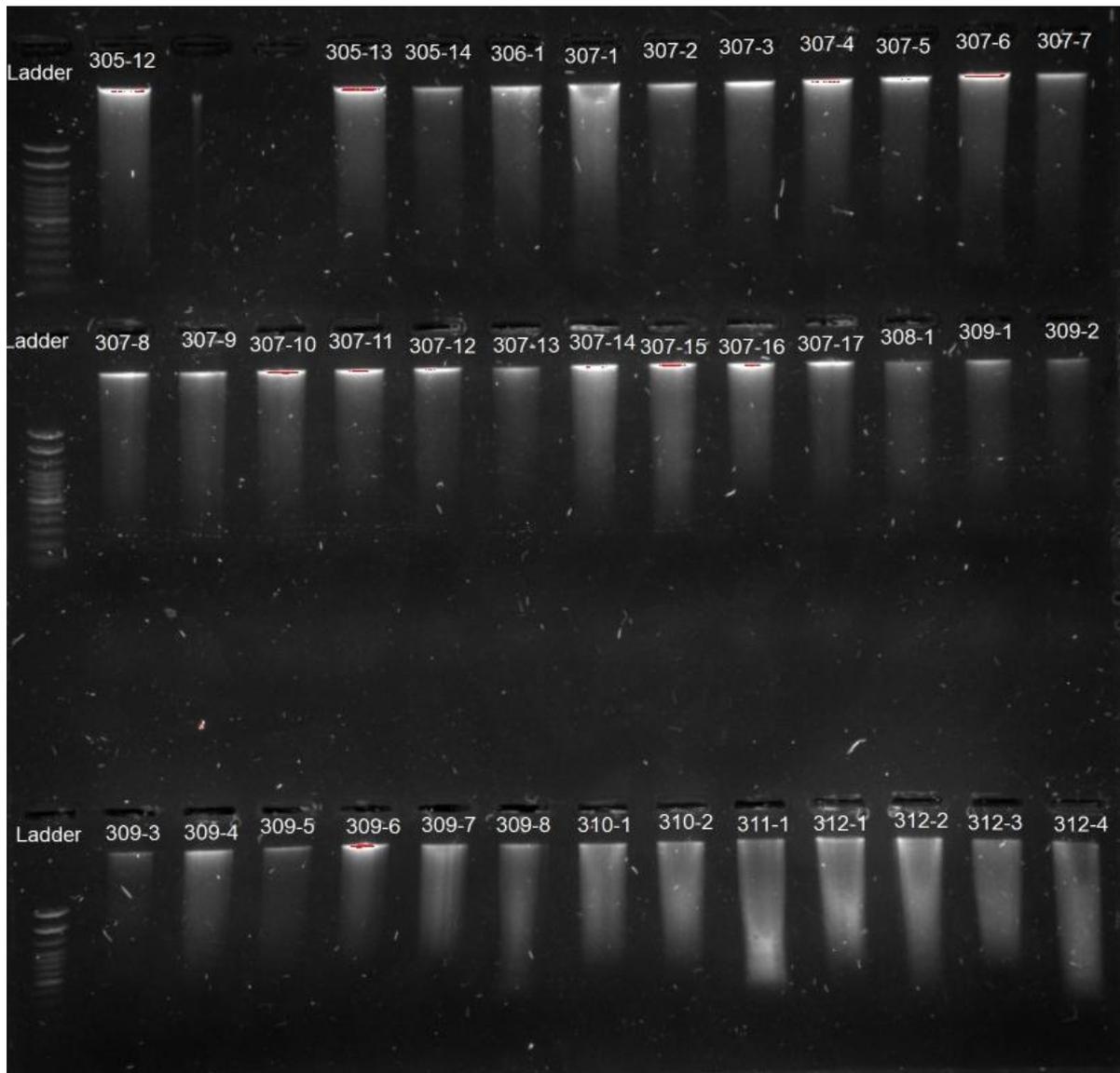
<b>Muestra</b>	<b>Concentración ADN (ng/μl)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>Fecha de Extracción</b>
ECU103-1	26,3	1,95	1,86	04/02/20
ECU103-2	55,9	1,85	1,57	04/02/20
ECU103-3	106,2	1,83	1,85	04/02/20
ECU103-4	127,4	1,83	1,77	04/02/20
ECU103-5	120,9	1,84	1,75	04/02/20
ECU103-6	95,0	1,83	1,65	04/02/20
ECU103-7	109,9	1,82	1,89	04/02/20
ECU103-8	17,4	1,82	4,18	31/01/2020
ECU103-9	99,0	1,70	1,30	04/02/20
ECU103-10	79,8	1,82	1,55	04/02/20
ECU103-11	118,1	1,77	1,43	04/02/20
ECU103-12	106,5	1,79	1,78	13/02/2020
ECU103-13	133,2	1,64	1,06	13/02/2020
ECU103-14	56,1	1,73	1,36	13/02/2020
ECU103-15	28	1,76	2,34	31/01/2020
ECU305-1	100,4	1,82	1,66	14/02/2020
ECU305-2	70,8	1,70	0,94	07/02/20
ECU305-3	42,4	1,82	2,13	07/02/20
ECU305-4	93,9	1,77	1,38	07/02/20
ECU305-5	75,0	1,70	1,23	07/02/20
ECU305-6	31,4	1,78	1,70	31/01/2020
ECU305-7	44,6	1,77	1,57	07/02/20
ECU305-8	6,2	1,53	5,77	31/01/2020
ECU305-9	54,3	1,79	1,97	07/02/20
ECU305-10	24,0	1,69	0,98	07/02/20
ECU305-11	74,3	1,78	0,96	07/02/20
ECU305-12	70,2	1,74	1,50	07/02/20
ECU305-13	66,7	1,78	1,51	13/02/2020
ECU305-14	36,1	1,84	1,63	13/02/2020
ECU306-1	54,1	1,86	1,69	17/02/2020
ECU307-1	88,9	1,79	1,96	14/02/2020
ECU307-2	40,1	1,81	1,53	14/02/2020
ECU307-3	49,3	1,83	1,39	14/02/2020
ECU307-4	63,2	1,77	1,27	14/02/2020
ECU307-5	53,5	1,74	1,13	14/02/2020
ECU307-6	77,1	1,75	1,07	14/02/2020

ECU307-7	56,9	1,75	1,05	14/02/2020
ECU307-8	53,5	1,70	1,21	14/02/2020
ECU307-9	75,4	1,71	1,00	13/02/2020
ECU307-10	70,9	1,75	1,09	14/02/2020
ECU307-11	52,2	1,73	1,22	14/02/2020
ECU307-12	35,3	1,81	1,30	14/02/2020
ECU307-13	35,6	1,84	1,18	17/02/2020
ECU307-14	87,7	1,75	0,93	13/02/2020
ECU307-15	65,0	1,78	1,14	13/02/2020
ECU307-16	45,6	1,88	1,78	17/02/2020
ECU307-17	47,2	1,92	1,12	17/02/2020
ECU308-1	29,5	2,03	2,29	17/02/2020
ECU309-1	27,8	1,90	1,63	17/02/2020
ECU309-2	18,2	1,94	2,12	17/02/2020
ECU309-3	16,4	1,96	3,30	17/02/2020
ECU309-4	65,1	1,78	0,97	17/02/2020
ECU309-5	19,6	2,17	2,09	17/02/2020
ECU309-6	48,5	1,72	1,46	21/02/2020
ECU309-7	55,6	1,92	1,87	21/02/2020
ECU309-8	62,6	1,79	1,51	21/02/2020
ECU310-1	61,1	1,82	2,68	21/02/2020
ECU310-2	98,3	1,88	1,35	21/02/2020
ECU311-1	150,3	1,83	1,48	21/02/2020
ECU312-1	152,5	1,84	2,23	21/02/2020
ECU312-2	270,7	1,54	0,71	21/02/2020
ECU312-3	85,0	1,79	1,30	21/02/2020
ECU312-4	191,2	1,79	1,61	21/02/2020
ECU312-5	62,1	1,78	2,64	03/03/20
ECU312-6	22,7	1,80	2,49	31/01/2020
ECU312-7	184,9	1,74	1,47	03/03/20
ECU312-8	63,4	1,64	1,44	03/03/20
ECU312-9	131,1	1,76	1,74	03/03/20
ECU312-10	79,8	1,65	1,13	03/03/20
ECU312-11	80,1	1,71	1,57	03/03/20
ECU312-12	145,0	1,66	1,16	03/03/20
ECU312-13	164,1	1,84	2,05	03/03/20
ECU312-14	51,1	1,77	3,02	03/03/20
ECU312-15	17,7	1,83	4,73	31/01/2020
ECU312-16	163,7	1,70	1,20	03/03/20
ECU312-17	59,6	1,73	2,48	03/03/20

## FIGURAS



**Figura 1** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído en *Solanum pimpinellifolium*, (muestras 103-1 a 305-11).



**Figura 2** Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico extraído en *Solanum pimpinellifolium*, (muestras 305-12 a 312-4).