

1. Naranjilla + -aspectos genéticos -- tesis y disertaciones académicas
2. Genética vegetal y genética
3. Biotecnología -- tesis

Tesis
SB
379
.N3
T67
2007

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Caracterización genética de la Naranjilla (*Solanum quitoense*) y sus parientes interespecíficos de la sección *Lasiocarpa* mediante análisis de secuencias simples repetidas

Andrés Francisco Torres Salvador

USFQ - BIBLIOTECA

45602

Proyecto presentado como requisito para la obtención del título de B.S en Biotecnología

Quito

Marzo de 2007

06 JUN 2007	03-07
-Dr. Andres Torres	
USFO - BIBLIOTECA	
01824	

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO FINAL

Caracterización genética de la naranjilla (*Solanum quitoense*) y sus parientes interespecíficos de la sección *Lasiocarpa* mediante análisis de secuencias simples repetidas

Andrés Francisco Torres Salvador

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Directora de Proyecto

.....
María de Lourdes Torres

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité

.....
María de Lourdes Torres

Venancio Arahana, Ph.D.
Miembro del Comité

.....
Venancio Arahana

Hugo Valdebenito, Ph.D.
Miembro del Comité

.....
Hugo Valdebenito

Hugo Valdebenito, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

.....
Hugo Valdebenito

Quito, marzo de 2007

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO FINAL

**Caracterización genética de la naranjilla (*Solanum quitoense*) y sus parientes
interespecíficos de la sección *Lasiocarpa* mediante análisis de secuencias simples
repetidas**

Andrés Francisco Torres Salvador


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

.....


Hugo Valdebenito, Ph.D.
Decano del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

.....


Quito, marzo de 2007

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de autor
Andrés Francisco Torres Salvador
2007

DEDICATORIA

Por haberme enseñado el valor del
sacrificio, el poder de la fe, y la
belleza del amor.
A mis padres...nuevamente.
Siempre.

RESUMEN

La naranjilla (*Solanum quitoense*) es una planta de origen andino que posee el potencial necesario para convertirse en un producto de importancia económica dentro de los mercados internacionales de exportación. Desafortunadamente, la efectividad productiva del cultivo se ve disminuida por su susceptibilidad a diversas plagas y enfermedades y a su limitada variabilidad intraespecífica. Los esfuerzos de fitomejoramiento del cultivo, consecuentemente, se centran en el cruzamiento de la naranjilla con sus parientes interespecíficos de la sección *Lasiocarpa*.

En la presente investigación, se evaluó el nivel de polimorfismo genético de la sección *Lasiocarpa* mediante un análisis de regiones microsatélite altamente conservadas en Solanáceas. Cincuenta y cinco accesiones de la colección *in vivo* del INIAP fueron colectadas y sondeadas con un set de dieciocho pares de primers. De este set, solamente 8 primers amplificaron; 3 desplegaron patrones microsatélite y 5 produjeron patrones inespecíficos multi-banda. Todos los patrones, incluyendo los patrones microsatélite, fueron evaluados en un análisis tipo "fingerprinting, donde las bandas amplificadas fueron tomadas como marcadores dominantes de presencia/ausencia. Mediante la aplicación del coeficiente de asociación DICE, se calculó un índice de similitud de 0.46 para la sección *Lasiocarpa*; y también se generó un cladograma de agrupamientos de la sección, donde *S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium* aparecen como un grupo hermano para el resto de las especies dentro de la mencionada sección.

El índice de similitud obtenido establece un bajo nivel de variabilidad genética interespecífica para la sección *Lasiocarpa*. Este resultado parece contradecir las proyecciones esperadas -donde se predecía que el alto contenido de información de los microsatélites ayudaría a determinar un mayor nivel de variabilidad genética para este grupo vegetal- pero se justifica cuando se considera el uso de marcadores no-específicos para naranjilla, el reducido número de marcadores empleados, su conversión a marcadores dominantes, y la carencia de ciertos miembros de la sección *Lasiocarpa*.

ABSTRACT

The naranjilla (*Solanum quitoense*) is an Andean crop that has the potential to develop into a food product of economic importance within global export markets. Unfortunately, its crop production efficiency is weakened by its susceptibility to a wide range of plagues, diseases and its limited intraespecific genetic variability. As a result of this, crop improvement efforts are aimed at crossing the naranjilla with its interespecific relatives from the *Lasiocarpa* section.

In this research project, the level of genetic polymorphism for the *Lasiocarpa* section was evaluated through the analysis of microsatellite regions highly conserved in the *Solanaceae* family. Fifty five naranjilla entries were collected from the *in vivo* collection at the INIAP and analyzed with a set of eighteen primer pairs. Of the total set, only eight primers amplified; three produced microsatellite amplification patterns and five produced highly unspecific multi-band amplification patterns. All amplified patterns, including all microsatellite patterns, were evaluated in a fingerprinting type analysis, where all amplified bands were converted into absence/presence dominant markers. Through the application of DICE coefficient, a similarity index of 0.46 was calculated for section *Lasiocarpa*. A relations tree graph was also generated, where *S. sessiliflorum* and *S. stramonifolium* form a sibling cluster from the rest of the species within the group.

The established similarity index indicates that the *Lasiocarpa* section has a low level of interespecific genetic variability. This result seems to contradict initial expectations, where it was thought that the high information content of microsatellite markers would help determine a higher level of genetic diversity for this plant group; but is justified when considering the use of crop unspecific markers, low number of markers employed, their conversion into dominant markers, and the lack of representation of a few species from the *Lasiocarpa* section.

TABLA DE CONTENIDOS

Derechos de Autor.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Resumen	v
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción General del Cultivo.	1
1.1.1. Historia y Características Morfológicas.....	1
1.1.2. Características Ecológicas	2
1.2. Situación Actual del Cultivo en el Ecuador e Importancia Económica.	4
1.3. Problemática del Cultivo y Enfermedades.	5
1.4. Los Híbridos Interespecíficos y la Problemática de su Cultivo.	7
1.4.1. Fitomejoramiento de la Naranja por Cruzamientos Interespecíficos con Especies de la Sección Lasiocarpa.....	7
1.4.2. Problemática del Cultivo de los Híbridos Comerciales	8
1.5. Aplicación de Análisis Moleculares en el Fitomejoramiento de la Naranja.....	10
1.5.1. Marcadores Moleculares: Descripción General y Utilidad en el Mejoramiento Vegetal.....	10
1.5.2. Tipos de Marcadores Moleculares Basados en PCR.....	12
1.5.2.1. RAPD's.....	12
1.5.2.2. Microsatélites	13
1.5.2.3. AFLP's.....	14
1.5.3. La Aplicación de Marcadores Moleculares en el Fitomejoramiento de la Naranja.....	15
1.5.4. Caracterización Genética de la Naranja mediada por Microsatélites	16
2. Objetivo General	18
3. Objetivos Específicos.	18
4. Justificación	19
5. Área De Trabajo.	20
6. Materiales, Reactivos y Equipos	20
6.1 Material Vegetal	20
6.2. Materiales para la Extracción de ADN de Plantas de Naranja.....	21
6.3. Materiales para PCR: Amplificación de Microsatélites.....	21
6.4. Materiales para la Resolución Electroforética en Gel de Agarosa	22
7. Metodología.....	22
7.1. Recolección y Almacenamiento de Material Vegetal.....	22
7.2. Extracción de ADN de Plantas de Naranja.....	22
7.3. Cuantificación y Dilución de ADN de Plantas de Naranja	23

7.4. Prueba de Amplificación de Primers	24
7.5. Amplificación de Microsatélites	25
7.6. Resolución de Productos de PCR mediante Electroforesis en Geles de Agarosa.....	26
7.7. Análisis de Distancia Génica y Construcción de Cladograma.....	27
8. Resultados	28
8.1. Cuantificación y Dilución de ADN de Plantas de Naranjilla	28
8.2. Prueba de Amplificación de Primers	28
8.3. Análisis de Variabilidad Genética de la Sección Lasiocarpa mediante Amplificación de Microsatélites	28
8.4. Análisis de Distancia Génica y Construcción de Cladograma.....	30
9. Discusión	31
9.1. Amplificación de Regiones Específicas Microsatélite.....	31
9.2. Relaciones Filogenéticas de la Sección Lasiocarpa	32
9.3. Justificación del Análisis Estadístico Elegido.....	34
9.4 Análisis del Coeficiente de Similitud y la Variabilidad Genética de la Sección Lasiocarpa	34
10. Conclusiones y Recomendaciones	37
10.1. Conclusiones.....	37
10.2. Recomendaciones.....	38
10. Bibliografía.....	40
11. Figuras.....	42
12. Tablas	52

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

11. Figuras.....	42
Figura 1. Resolución Electroforética del Ensayo de Validación de Primers	42
Figura 2. Resolución Electroforética para Primer S011ws	43
Figura 3. Resolución Electroforética para Primer S024ws	44
Figura 4. Resolución Electroforética para Primer S036ws	45
Figura 5. Resolución Electroforética para Primer S047ws	46
Figura 6. Resolución Electroforética para Primer S051ws	47
Figura 7. Resolución Electroforética para Primer S052ws	48
Figura 8. Resolución Electroforética para Primer S069ws	49
Figura 9. Resolución Electroforética para Primer S089ws	50
Figura 10. Cladograma de Relaciones Genéticas para la Sección Lasiocarpa.....	51
12. Tablas	52
Tabla 1. Lista de Acciones y Especies Recolectadas	52
Tabla 2. Lista de Primers y Sus Secuencias Específicas	53
Tabla 3. Reacción Estándar de PCR para Amplificación de Microsatélites	54
Tabla 4. Mastermix para Ensayo de Validación de Primers.....	54
Tabla 5. Programa de Amplificación de Microsatélites para Termociclador	54
Tabla 6. Receta General para la Producción de Geles de Agarosa al 1%.....	55
Tabla 7. Lecturas de Absorbancia, Concentración y Dilución de Muestras de ADN.....	55
Tabla 8. Resultados de Ensayo de Validación de Primers.....	56
Tabla 9. Resultados de Amplificación de Microsatélites	57
Tabla 10. Matriz Básica de Datos para Patrones de Amplificación (Muestras 1 -20).....	58
Tabla 11. Matriz Básica de Datos para Patrones de Amplificación (Muestras 21 -36).....	59
Tabla 12. Matriz Básica de Datos para Patrones de Amplificación (Muestras 37 -55).....	60

1. INTRODUCCIÓN

Muchos frutos de origen andino poseen el potencial necesario para convertirse en productos de importancia económica tanto a nivel local, como dentro de los mercados internacionales de exportación. Durante los últimos siglos, la naranjilla (*Solanum quitoense*) se ha establecido como uno de los cultivos tropicales más importantes y populares del Ecuador. Distintos escritores la han descrito como el “fruto dorado de los Andes,” mientras que otros han optado por denominarla “néctar de los Dioses” (National Research, 1989). Cualquiera sea el caso, ambas descripciones hacen referencia al incomparable sabor de la naranjilla y su inherente viabilidad comercial como futuro cultivo tropical de renombre internacional.

1.1. Descripción General del Cultivo

1.1.1. Historia y Características Morfológicas

La historia de la naranjilla podría considerarse reciente, pues ésta no se encuentra archivada arqueológicamente; de hecho, sus primeros registros datan de mediados del siglo diecisiete (Patiño, 1963). Aunque diversos autores denominaron al Valle del Pastaza como la cuna del cultivo (Jiménez, 1982), actualmente se conoce que la naranjilla es oriunda de los bosques subtropicales, localizados en las estribaciones orientales de las cordilleras andinas del Ecuador y Colombia (Heiser, 1985). En el presente, estos países también constituyen la región de mayor producción de naranjilla, mientras que el cultivo se da en menor escala en los países de Perú, Venezuela, Panamá y Costa Rica (Soria, 1997).

La “naranjilla” (*Solanum quitoense*) es una Solanácea que se encuentra ubicada dentro de la sección *Lasiocarpa* del género *Solanum* (Heiser, 1993). En la actualidad existen dos

variedades principales de la naranjilla: *Solanum quitoense* var. *quitoense* (sin espinas) y *Solanum quitoense* var. *septentrionale* (con espinas fuertes); la primera cultivada en el Ecuador, y la segunda en Colombia y en otros países de menor producción (Soria, 1997). A nivel morfológico, la naranjilla se presenta como una planta arbustiva de ciclo perenne, que puede alcanzar una altura promedio de 2 metros (Heiser, 1985). Su robusto tallo se caracteriza por ser semi-leñoso, velludo y de color verde; mientras que sus grandes hojas palmeadas se ven definidas por su forma obloglovalada y sus pronunciadas nervaduras color púrpura (Castañeda, 1992). Las flores de la naranjilla -pentámeras y perfectas- presentan pétalos blancos y sépalos púrpuras, y generalmente se encuentran agrupadas en inflorescencias en forma de cima escorpioide tipo drepanio (Castañeda, 1992).

Sin embargo, aún cuando la naranjilla presenta una morfología de fácil identificación, el rasgo distintivo de este cultivo se ve caracterizado por su fruto. Los frutos de la naranjilla se presentan como bayas globosas de color anaranjado; de aquí su alusión a una pequeña naranja (Heiser, 1992). La epidermis del fruto está recubierta por vellos punzantes de tono amarillo y además emana el atractivo aroma cítrico característico de la naranjilla. La pulpa de la naranjilla es de color verde y mantiene un pH ácido que oscila entre 3.6 y 4 (Castañeda, 1992). Esta última representa la fuente del incomparable jugo de la naranjilla, apreciado en las localidades donde se produce el cultivo y apetecido también por la industria internacional (Heiser, 1985).

1.1.2. Características Ecológicas

En términos agronómicos, la naranjilla se considera una especie silvestre, pues para su crecimiento y desarrollo óptimo ésta requiere de un hábitat natural con características boscosas

(Samaniego, 1982). Al ser un cultivo de latitudes amazónicas, la naranjilla se presenta como una planta de día corto con rendimientos productivos en altitudes que varían entre los 1000 y 1400 metros sobre el nivel del mar (Castañeda, 1992). Es importante destacar, no obstante, que dentro de la Amazonía ecuatoriana el cultivo ha sido registrado desde los 200 hasta los 1800 metros de altura (ECORAE, 2001). Adjunto a estos parámetros latitudinales, la naranjilla exhibe además gran sensibilidad en términos de los suelos de cultivo. En base a sus requisitos terrenales, por ejemplo, la naranjilla se ha establecido en la zona del Pastaza como un cultivo de inicio; es decir, este cultivo es realizado previo al establecimiento de pastizales u otros cultivos agrícolas (Samaniego, 1982). El rendimiento eficiente de la naranjilla exige suelos con alta fertilidad; particularidad que sólo puede obtenerse en aquellos bosques tropicales donde la montaña no ha sido talada, o aquellos terrenos que no hayan sobrepasado los diez años de edad (Castañeda, 1992). Estos suelos deben ser ricos en materia orgánica, francos, bien drenados y mantener un pH de 5.2 – 5.8 (Samaniego, 1982). Adicionalmente, los terrenos donde se cultiva la naranjilla deben poseer la protección de un bosque, o cuando menos la presencia de unos pocos árboles. La naranjilla no prolifera adecuadamente bajo la plena exposición a la luz solar, pues ésta se debilita fisiológicamente e incrementa su susceptibilidad a enfermedades (Castañeda, 1992).

Finalmente, la naranjilla es un cultivo incapaz de tolerar cambios erráticos de climatología; por consiguiente, el clima se convierte en el factor determinante del éxito del cultivo. El mejor rendimiento productivo de la naranjilla se da a una temperatura de aproximadamente 20 grados Celsius, siendo el cultivo tolerante a un rango climatológico que fluctúa entre los 17 y 26 grados Celsius (Castañeda, 1992). La precipitación también juega un rol importante en la producción de esta planta, ya que las fuertes lluvias y los vientos

intempestivos pueden ocasionarle fuertes daños mecánicos (Samaniego, 1982). En promedio, la precipitación ideal para la naranjilla es de 2500 milímetros anuales, aún cuando ésta puede llegar a tolerar hasta 4300 milímetros (Castañeda, 1992). Cabe mencionar, sin embargo, que los terrenos sin protección boscosa tienden a perder su fertilidad debido al lento proceso de descomposición de la materia orgánica, ocasionado por la precipitación excesiva (Castañeda, 1992).

1.2. Situación Actual del Cultivo en el Ecuador e Importancia Económica

Dentro del Ecuador, la naranjilla se presenta como uno de los frutales andinos de mayor popularidad y crecimiento económico. En 1992, el INEC establecía al cultivo como uno de los frutales de mayor difusión nacional y demanda externa. La superficie cultivada equivalía a 10.780 hectáreas, mientras que el volumen anual de producción se estableció en 39.635,55 toneladas (Soria Idrovo, 1996). En la actualidad, la naranjilla ocupa más de 9.459 hectáreas; donde el 50% de la producción nacional corresponde a la variedad conocida como híbrido Puyo, un 45% al híbrido INIAP Palora y el 5% restante a la naranjilla común (SICA, 2001; ECORAE, 2001).

Pero más allá de ser un rubro económico de importancia para el agricultor de la Amazonía, la naranjilla también presenta abundantes perspectivas económicas para el mercado de exportaciones del Ecuador. Aunque no es muy conocida en el exterior, la naranjilla posee el potencial necesario para convertirse en el nuevo sabor tropical de la alimentación global. Hace aproximadamente 30 años, diversos estudios evidenciaron el potencial económico de la naranjilla, resaltando su importancia como un producto de exportación (National Research, 1989). En los 70's, por ejemplo, la Campbell Soup Company intentó introducir un jugo

tropical de naranjilla en los Estados Unidos, pero el programa tuvo que ser abandonado ya que no existía una fuente amplia y constante del cultivo (Heiser, 1985). La alta demanda internacional de frutas exóticas convierte a la naranjilla en un potencial candidato para la exportación de semillas y su posterior cultivo en países con climas similares a los de la región Andina. Adicionalmente, la naranjilla puede imponer un gran impacto en regiones industrialmente desarrolladas (Europa, Norte América y Japón) en forma de bebidas tropicales u otros subproductos (National Research, 1989). Los primeros esfuerzos registrados hacia la explotación del potencial económico de la naranjilla se establecieron en Colombia; país que junto a su Federación de Cafeteros y la Flota Mercante Grancolombiana emprendió una campaña de promoción de frutos tropicales en Europa, Estados Unidos y Japón. Los resultados de este evento promocional fueron exitosos, hasta el punto en el cual, hoy en día, la producción interna no es suficiente para abastecer la demanda internacional (Castañeda, 1992). En la actualidad, los Estados Unidos, Holanda y España se encuentran entre los mayores importadores del fruto; y aunque la naranjilla se ha circunscrito al nicho gourmet de estos países, no cabe duda que esta fruta podría comercializarse exitosamente en los mercados populares de los países mencionados (SICA, 2001).

1.3. Problemática del Cultivo y Enfermedades

Si la naranjilla fuese manejada adecuadamente y producida en grandes cantidades, ésta podría convertirse en un importante rubro de exportación para el país, y además ofrecería trabajo y sustento para las poblaciones rurales del oriente. En vista del gran potencial económico de este producto nacional, el Ecuador debería aprovechar su ventaja comparativa y optimizar la producción de naranjilla para incrementar su exportación y desarrollar el

potencial comercial del cultivo en su totalidad.

La optimización del cultivo de la naranjilla, sin embargo, no se presenta como una tarea fácil, incluso cuando se excluye su baja adaptabilidad a condiciones climáticas diferentes a las de su hábitat natural (Vélez, 1988). La naranjilla común es una planta que presenta muy poca variabilidad morfológica, fisiológica y organoléptica a nivel intraespecífico; y algunos estudios han demostrado una aparente carencia de variabilidad genética, pues el cultivo continúa dentro de su período de domesticación (Soria, 1997; National Research, 1989). Esta característica del cultivo ha impedido el hallazgo de genotipos que puedan ser empleados en la resolución de sus problemas de producción, entre los cuales la susceptibilidad a plagas es prioritaria (Soria, 1997).

A finales de la década de los 70's, la naranjilla común fue desplazada de sus áreas tradicionales de cultivo debido a la aparición imprevista de una variada gama de pestes y plagas (ECORAE, 2001). La naranjilla puede ser atacada por enfermedades fungosas, entre las cuales se pueden incluir la Artracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*), pudrición algodonosa (*Sclerotinia sclerotiorum*), y Fusariosis; enfermedades bacterianas como la marchitez bacterial y pudrición suave; y diversas enfermedades virales (Navarro, 1988). Entre las plagas más significativas de la naranjilla se puede apreciar al "barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*), cuya larva perfora los frutos de la naranjilla, e incluso puede atacar sus flores. Diversos estudios han demostrado la voracidad de esta plaga, la cual puede llegar a ocasionar pérdidas de hasta un 90% de la producción (Vélez, 1988). No obstante, los nemátodos se presentan como el problema fitosanitario de mayor importancia para el cultivo; particularmente al considerar aquellas especies pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Thrichodorus*, y *Helicofylonchus* (Navarro, 1988). Los nemátodos generalmente atacan a las

raíces, ocasionando que éstas pierdan funcionalidad y no respondan a los tratamientos de fertilización (Navarro, 1988). El debilitamiento fisiológico producido por los nemátodos también predispone al cultivo a otras enfermedades, particularmente a la marchitez bacteriana y la Fusariosis (Vélez, 1988).

Los problemas fitosanitarios de la naranjilla reducen la vida agrícola del cultivo (acortando el valor normal de 5 años a 2 años) y aumentan los costos de producción debido a la incesante dependencia colateral de agroquímicos y pesticidas de control (Soria Idrovo, 1996). En la actualidad, la naranjilla común es virtualmente inexistente, y la persistente falta de apoyo científico para el mejoramiento del cultivo posiciona a las plagas y enfermedades como el mayor problema del productor de naranjilla (National Research, 1989).

1.4. Los Híbridos Interespecíficos y la Problemática de su Cultivo

1.4.1. Fitomejoramiento de la Naranjilla por Cruzamientos Interespecíficos con Especies de la Sección Lasiocarpa

A principios de la década de los 80's, la escasez de la naranjilla común fue sobrellevada gracias a la aparición de un nuevo híbrido interespecífico de la naranjilla; variedad conocida comercialmente como "híbrido Puyo" (Soria, 1997). Se conoce actualmente que este nuevo híbrido -descubierto inicialmente por el Sr. Raúl Viteri, un agricultor campesino del norte del Puyo- fue obtenido tras el cruzamiento interespecífico entre *S. sessiliflorum* (donador de polen) y *S. quitoense* (Soria, 1997). Las ventajas de la nueva variedad comercial radicaban en una mayor tolerancia y resistencia a enfermedades comunes para la naranjilla, pero su obvia desventaja yacía en su producción de frutos naturalmente pequeños (Soria, 1997; ECORAE, 2001).

La existencia del híbrido Puyo, junto con la necesidad de nuevos esfuerzos de fitomejoramiento para la naranjilla, concluyó en el establecimiento de un sistema de mejoramiento genético basado en cruzamientos interespecíficos. En vista de la escasa variabilidad intraespecífica de la naranjilla y su utilización en la obtención de individuos o líneas con resistencias a nemátodos y otras plagas, el Dr. Charles Heiser –un botánico de la Universidad de Indiana- inició un programa de cruzamientos interespecíficos con especies de la sección *Lasiocarpa* del género *Solanum*, grupo al cual pertenece la naranjilla (Heiser, 1993; Heiser, 2000; Soria, 1997). Considerando que una vía posible de fitomejoramiento es mediante cruzamientos interespecíficos, Heiser produjo cruzamientos de naranjilla con diferentes especies que poseían características deseables a transferir. Los primeros cruzamientos con éxito fueron aquellos obtenidos con *Solanum hirtum*, del cual se obtuvo un híbrido con alta resistencia a nemátodos. No obstante, a principios de los noventa, un híbrido de *S. quitoense* (donador de polen) y *S. sessiliflorum*, fue llevado a la estación experimental del INIAP, y se liberó bajo el nombre "híbrido Palora" (Soria, 1997). Esta nueva línea posee frutos de tamaño mayor a los de la naranjilla, pero con los mismos atributos de sabor del cultivo original (Soria, 1997; Heiser, 1993; Fiallos, 2000). En la actualidad, la vía más factible para el mejoramiento genético de la naranjilla yace en este proceso de cruces interespecíficos y la incorporación de nuevos grupos de genes provenientes de los genotipos de los parientes interespecíficos del cultivo.

1.4.2. Problemática del Cultivo de los Híbridos Comerciales

En el principio de su introducción, los híbridos Palora y Puyo presentaron soluciones temporales a los problemas de plagas que presentaba el cultivo de la naranjilla, debido parcialmente a sus resistencias y su variada tolerancia a nuevas y extenuantes condiciones

climáticas (Soria, 1989; Soria, 1997; Fiallos, 2000). Desafortunadamente, estos cultivos también presentan diversas susceptibilidades a enfermedades; y debido a que tanto el híbrido Puyo, como el híbrido Palora, se propagan vegetativamente como clones genéticamente uniformes, estos guardan riesgos de ser presas de nuevas plagas y enfermedades (Soria, 1997).

Adicionalmente, los problemas relacionados con la seguridad alimentaria también juegan un rol importante en la optimización del cultivo de la naranjilla. En cualquiera de las líneas comerciales presentadas anteriormente persiste el problema del uso indiscriminado de pesticidas. El híbrido Puyo, por ejemplo, presenta frutos pequeños que solamente pueden adquirir tamaños comerciales tras la exposición del cultivo a la 2,4 D durante su período de floración (Soria, 1997). El uso irracional de agroquímicos no sólo presenta consecuencias económicas; sino también problemas perjudiciales para el consumidor, pues residuos tóxicos del químico pueden manifestarse tanto en los frutos como en sus productos derivados procesados (Soria, 1997).

Un estudio realizado en la región oriental del Ecuador, escenario de la mayor producción de naranjilla, tuvo el objetivo final de estimar y evaluar las tasas de uso de agroquímicos tóxicos en frutales andinos; particularmente al considerar su gran susceptibilidad a plagas y enfermedades (Soria Idrovo et al, 1997). Las encuestas realizadas demostraban que el 95% de los productores de la zona utilizaban cuando menos uno de los plaguicidas clasificados como extremadamente tóxicos por la FAO, el 47% empleaban por lo menos dos de éstos, y un 26% llegaba a utilizar hasta tres agroquímicos restringidos. Los análisis de niveles residuales de pesticida en el fruto demostraban que los pesticidas Aldicarb, Carbofurán, y la hormona 2,4 D -todos registrados por la EPA como plaguicidas de uso restringido- eran empleados hasta en volúmenes 20 veces mayores a los niveles de aplicación

permitidos (Soria Idrovo et al, 1997). Estos resultados no deben considerarse únicamente en relación a la seguridad del consumidor ecuatoriano, sino también en relación a los problemas de exportación que tendrían los productores nacionales frente a las rigurosas leyes de los países importadores.

1.5. Aplicación de Análisis Moleculares en el Fitomejoramiento de la Naranja

1.5.1. Marcadores Moleculares: Descripción General y Utilidad en el Mejoramiento Vegetal

Como se estableció anteriormente, los cruzamientos interespecíficos en naranja representan una opción ventajosa en el mejoramiento genético del cultivo y la búsqueda de mejores resistencias a plagas y enfermedades. Adicionalmente, la aplicación de las tecnologías moleculares contemporáneas abre nuevas perspectivas para la ampliación del conocimiento genético de una población; promoviendo así la aceleración de los programas de mejoramiento vegetal. En la actualidad, la caracterización genética mediada por marcadores moleculares implica uno de los procesos más importantes dentro de los sistemas de fitomejoramiento contemporáneo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares se presentan como puntos de referencia cromosómicos que a través de técnicas moleculares permiten la determinación de la variabilidad genética de una especie eucarionte. En principio, los análisis en base a marcadores moleculares implican un proceso que busca la identificación y segregación de genotipos mediante la detección de biomoléculas asociadas a la expresión génica. Consecuentemente, los marcadores moleculares permiten la obtención de una inmensa cantidad de información sobre la diversidad y las

relaciones filogenéticas del germoplasma utilizado por el fitomejorista; información que puede ser integrada en los procesos de selección y recombinación de genotipos. Si bien es cierto, los marcadores moleculares producen una variada y extensa cantidad de caracteres fenotípicos, que al combinarse con los marcadores tradicionales morfológicos, proporcionan un cuadro más completo sobre el agrupamiento del germoplasma; facilitando así la planificación de los cruzamientos de mejora vegetal. La información molecular sobre la diversidad y distancia génica de una población puede ser de alta utilidad en la evaluación de redundancias y deficiencias de las colecciones del fitomejorista, y el manejo y ampliación de su banco de germoplasma (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Adicionalmente, dentro de los procesos de mejoramiento vegetal también es indispensable mencionar la importancia de los marcadores moleculares dentro de los procesos de control de cruzamientos. La identificación de alelos exclusivos para un determinado carácter fenotípico puede ser empleada en la evaluación de la fidelidad de cruzamientos controlados, la determinación de la tasa de contaminación por polen extraño, y la identificación de los progenitores de los híbridos obtenidos. Los patrones de inferencia de fecundación pueden ser tecnificados para facilitar el proceso de selección; alelos específicos para caracteres deseados –aquellos relacionados con mejores tolerancias, resistencias, o mejor productividad- pueden ser rastreados en los procesos de mejoramiento con el fin de identificar a la progenie que ha adquirido los genes deseados. El “fingerprinting” molecular no sólo sirve para acelerar los procesos de fitomejoramiento, sino que se utilizan además en los proyectos de identificación y protección de variedades silvestres y comerciales (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.2. Tipos de Marcadores Moleculares Basados en PCR

El desarrollo de diversas técnicas moleculares fomentó el descubrimiento de distintos marcadores genéticos y abrió la posibilidad de estudiar aquellos genomas vegetales previamente no contemplados. En la actualidad existen tres clases principales de marcadores moleculares basados en la técnica del PCR; los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA), Microsatélites y AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism). Aún cuando estos marcadores pueden ser empleados dentro de cualquier proyecto de mejoramiento vegetal, es importante recalcar que su aplicación depende invariablemente de la base genética del polimorfismo revelado por el marcador, y de la disponibilidad y fiabilidad de la técnica. Consecuentemente, antes de contemplar la utilización de estos marcadores dentro de los proyectos de mejoramiento vegetal, es importante analizar primero sus características generales.

1.5.2.1. RAPD's

La técnica de los marcadores RAPD se presenta como una variación estratégica de la técnica tradicional del PCR. Esta particular tecnología amplifica ADN mediante la utilización de un primer de secuencia arbitraria, cuya secuencia blanco es también desconocida. En este tipo de amplificación, las secuencias blanco complementarias al primer deben tener un grado específico de adyacencia (< 4000 pares de bases) y presentar una orientación opuesta. En este sentido, la base genética del polimorfismo de los marcadores RAPD se establece en mínimas diferencias (deleciones, inserciones o mutaciones de hasta un solo par de bases) en la secuencia blanco, causando la no complementariedad del primer al sitio de iniciación de la amplificación; o inserciones a lo largo de la secuencia amplificada, colocando a dos sitios

adyacentes a una distancia superior a la que la ADN polimerasa es capaz de recorrer (Williams et al, 1990). Consecuentemente, el polimorfismo de este marcador asume una disposición binaria basada en la ausencia o presencia de un alelo específico.

Finalmente, aunque los marcadores RAPD presentan un bajo costo de implementación y producen grandes niveles de polimorfismo, estos también presentan serias deficiencias. Debido a su disposición binaria, o dominancia alélica, los marcadores RAPD presentan poca información genética por locus, impidiendo analizar alelos codominantes o determinar diferencias entre genotipos heterocigóticos y homocigóticos. Adicionalmente, debido a la baja sensibilidad de un primer específico para discriminar entre distintos sitios de amplificación, el análisis de individuos genéticamente distantes es limitado (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.2.2. Microsatélites

En términos moleculares, los microsatélites representan una clase de secuencias simples repetidas, constituidas por pequeñas sucesiones de 1 a 4 nucleótidos repetidas en tandeos adyacentes (Litt y Luty, 1989). Estas secuencias se distribuyen arbitrariamente y frecuentemente en los genomas de todos los eucariontes; en plantas, por ejemplo, los sitios de microsatélites se encuentran ampliamente distribuidos con frecuencias de uno por cada 50 mil pares de bases (Ferreira y Grattapaglia, 1998). La periodicidad de estas secuencias altamente repetitivas se ha confirmado en 34 especies vegetales, siendo el dinucleótido AT el elemento más común (Morgante y Olivieri, 1993).

Los microsatélites son amplificados individualmente a través de la técnica del PCR, partiendo de un par de primers específicos y complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estas secuencias, presentan

un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos (Beckmann y Soller, 1990). De esta manera, cada microsatélite constituye un locus genético altamente variable, multi-alélico, y de gran contenido informativo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La mayor limitante de los marcadores a base de microsatélites radica en las limitaciones tecnológicas, pues el desarrollo de estos marcadores necesita de mucha tecnología, trabajo y apoyo económico; de hecho, estos marcadores se han desarrollado especialmente para aquellas especies vegetales de importancia mundial. Es importante recalcar, sin embargo, que muchos de los marcadores desarrollados para cultivos específicos son transferibles y pueden ser empleados con éxito en cultivos genéticamente distantes, pero relacionados a nivel específico o genérico (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.2.3. AFLP's

Los marcadores AFLP se establecen bajo una técnica compleja de tres fases que combina la especificidad de las enzimas de restricción y el poder resolutivo de la técnica del PCR. El primer paso de esta técnica implica la digestión del genoma con dos enzimas de restricción; una de corte frecuente y una de corte infrecuente. En el segundo paso se incorporan adaptadores específicos a los productos de la digestión enzimática; estos adaptadores poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte de las enzimas de restricción. Consecuentemente, el tercer paso consiste en la amplificación selectiva de fragmentos determinados mediante el empleo de primers específicos que reconocen las secuencias de los adaptadores y poseen además de uno a tres nucleótidos arbitrarios (Zebeau, 1993). Esta acción selectiva se lleva a cabo en dos sub-etapas, una

amplificación preselectiva con un primer que solamente contiene una base arbitraria adicional, y una amplificación de mayor intensidad selectiva con primers que poseen hasta 2 nucleótidos arbitrarios adicionales; ambos procesos instalados para reducir el número de fragmentos analizados y facilitar la resolución de los alelos amplificados (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El polimorfismo entre fragmentos AFLP es de naturaleza binaria y resulta de mutaciones de punto, inversiones, o deleciones que alteran los sitios de restricción o las secuencias reconocidas por los nucleótidos arbitrarios de los primers que dirigen la amplificación selectiva (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Esta técnica ofrece un alto nivel de información de polimorfismo, es muy útil en los análisis comparativos interespecíficos, y se puede emplear en cualquier genoma que no haya sido estudiado previamente (Zebeau, 1993). No obstante, su naturaleza binaria lo convierte en un marcador de bajo contenido de información genética por *locus*, e impide la detección de genomas heterocigóticos y homocigóticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.3. La Aplicación de Marcadores Moleculares en el Fitomejoramiento de la Naranja

Como se estableció inicialmente, la naranja es un cultivo que presenta escasa variabilidad a nivel morfológico, fisiológico, organoléptico y genético. Un análisis isoenzimático de trece accesiones de *Solanum quitoense*, todas provenientes del Ecuador y Colombia, no reveló mayores variaciones en los genes codificadores para las 12 proteínas enzimáticas analizadas (Whalen y Carusso, 1983). Con tan poca variabilidad genética intraespecífica, los programas de mejoramiento de la naranja requieren la incorporación de genotipos pertenecientes a otras especies. Interesantemente, los estudios isoenzimáticos descritos anteriormente también vislumbraban la carencia relativa de diversidad genética

dentro de la sección *Lasiocarpa* (Whalen y Carusso, 1983). La falta de variabilidad genética entre la naranjilla y sus parientes interespecíficos sería corroborada posteriormente a través de un estudio basado en el análisis de fragmentos de restricción en cloroplastos (Bruneau et al, 1994).

Consecuentemente, las técnicas de marcadores moleculares se presentan como una herramienta indispensable en el futuro de los proyectos de mejoramiento de naranjilla. Por un lado, el uso de marcadores moleculares modernos permitirá la obtención de un marco informativo más completo sobre las relaciones filogenéticas de la sección *Lasiocarpa*, la cual ya ha sido empleada en los proyectos de mejoramiento mediados por cruzamientos interespecíficos. Este estudio podría proporcionar datos útiles para el fitomejorista, asistiéndolo en la selección de los progenitores a partir de las poblaciones básicas, y también puede dar paso a proyectos de selección y mejoramiento asistido por marcadores moleculares.

1.5.4. Caracterización Genética de la Naranjilla mediada por Microsatélites

Indudablemente, los microsatélites se presentan como el mejor marcador molecular para la caracterización genética de la naranjilla y sus parientes interespecíficos de la sección *Lasiocarpa*. En primer lugar, los microsatélites poseen el más elevado nivel de “contenido de información de polimorfismo por locus,” y permiten además la expresión codominante y el multi-alelismo. De hecho, los análisis de microsatélites presentan el mayor nivel de relevancia al momento de realizar evaluaciones de germoplasma y estudios de filogenia en plantas autógamias (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Los microsatélites son muy frecuentes y muy aleatorios en el genoma, y por ende permiten una cobertura completa del mismo, característica importante en estudios de plantas que demuestran poca variabilidad genética, como la

naranjilla.

En segundo plano, debido a que las regiones de microsatélites se encuentran conservadas en especies relacionadas, el uso de marcadores heterólogos se presenta como una opción indispensable en estudios de cultivos poco conocidos. Los sitios de microsatélites bien conservados pueden ser empleados para la transferencia de marcadores entre especies, e incluso géneros (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Este último punto es esencial dentro del estudio, considerando que la naranjilla no es un producto de importancia mundial, y que por ende, su genoma no ha sido investigado con el fin de crear marcadores específicos para el cultivo. En la naranjilla, la aplicación de un análisis con primers heterólogos de cultivos económicamente importantes y genéticamente relacionados, como lo son la papa o el tomate (ambos *Solanum*), permitiría un análisis completo y detallado de la diversidad genética de la sección *Lasiocarpa*.

En la presente investigación se realizó una evaluación del nivel de variabilidad genética de la sección *Lasiocarpa* mediante un análisis de secuencias simples repetidas. Cincuenta y cinco accesiones – entre las cuales se encontraban representadas 7 especies de la sección *Lasiocarpa* – fueron analizadas para verificar diferencias en regiones microsatélite comúnmente conservadas en Solanáceas. Este análisis se llevo a cabo mediante el sondeo de dieciocho pares de primers específicos para regiones microsatélite y originalmente desarrollados para estudios de diversidad genética en papa. Los patrones de polimorfismo genético establecidos para este grupo fueron empleados en la creación de un coeficiente de similitud y cladograma de agrupamientos para la sección *Lasiocarpa*.

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta investigación radica en la evaluación del nivel de polimorfismo genético de la sección *Lasiocarpa*, mediante un análisis molecular de regiones microsatélite.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la caracterización genética de 55 accesiones – todas pertenecientes a la sección *Lasiocarpa* - de la colección *in vivo* del INIAP, mediante un análisis molecular con microsatélites heterólogos para *Solanáceas* y originalmente descubiertos en papa.
- Establecer un protocolo de extracción de ADN de naranjilla y un protocolo de PCR para la amplificación de microsatélites en naranjilla.
- Establecer un cladograma de agrupamientos de especies para la sección *Lasiocarpa*.
- Determinar el nivel de polimorfismo genético y calcular el coeficiente de distancia génica de la sección *Lasiocarpa*.
- Comparar los resultados obtenidos con aquellos estudios realizados con marcadores morfológicos, isoenzimáticos y RFLP's.
- Determinar el nivel de transferibilidad de 18 pares de primers originalmente generados para papa, y específicos para regiones microsatélite altamente conservadas, en especies de la sección *Lasiocarpa*.

4. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, la caracterización molecular de la naranjilla y sus parientes interespecíficos representa uno de los procesos más importantes dentro de los futuros proyectos de fitomejoramiento en naranjilla. Un estudio detallado sobre los niveles de variabilidad genética de la sección *Lasiocarpa* busca ampliar la información molecular sobre la diversidad y distancia génica de esta población vegetal; información que puede ser empleada en el manejo del banco de germoplasma de naranjilla y aplicada en los actuales proyectos de fitomejoramiento por cruces interespecíficos, los cuales cabe recalcar han tenido mucho éxito. En este aspecto, la presente investigación despliega grandes perspectivas para el desarrollo eficiente del cultivo y promueve de esta manera el desarrollo comercial y económico del Ecuador. Si bien es cierto, los esfuerzos que buscan suscitar el potencial económico de este cultivo proyectan grandes ventajas y beneficios a largo plazo; todos encaminados hacia la apertura de nuevos rubros de exportación para la nación y la creación de nuevas fuentes de trabajo y sustento para las poblaciones del Oriente ecuatoriano. La diversificación agrícola y la posesión de variedades eficientes y productivas posicionarían al Ecuador como el primer productor de uno de los frutales andinos con mayor proyección internacional. Adicionalmente, este estudio también impulsa el interés hacia la producción de otros frutales andinos y productos exóticos nacionales, y abre nuevas posibilidades para la expansión de la agricultura ecuatoriana en los mercados de consumo internacional.

Pero más allá de las proyecciones económicas, la presente investigación también vislumbra ventajas y perspectivas benéficas para el desarrollo científico y social de nuestra nación. En la actualidad, la biotecnología presenta grandes soluciones para los países en vías de desarrollo, particularmente en lo que concierne a la productividad agrícola y la seguridad

alimentaria. Con esto en mente, el Ecuador debería proyectarse como uno de los beneficiarios de esta disciplina científica. El presente estudio impulsa la innovación biotecnológica en el país y busca promocionar sus ventajas y beneficios. Pocos estudios en el Ecuador reflejan la importancia del fitomejoramiento asistido por marcadores, y son casi inexistentes aquellos programas de fitomejoramiento que emplean microsátélites. La posibilidad de llevar a cabo un proyecto de estas dimensiones demuestra el potencial de crecimiento científico que tiene el Ecuador y el valor que puede presentar la biotecnología en la implementación de una agricultura sostenible y ambientalmente amigable. En última instancia, este proyecto tiene la finalidad de promover la aceptación pública y científica de la biotecnología, tras desplegar sus beneficios para la sociedad.

5. ÁREA DE TRABAJO

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y el Laboratorio de Biología Molecular. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito. Cumbayá, Ecuador.

6. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

6.1 Material Vegetal

- Se recolectó muestras de hojas de 55 accesiones de la colección *in vivo* de la sección *Lasiocarpa* del INIAP. El listado completo de las accesiones recolectadas puede ser observado en la Tabla 1.

6.2. Materiales para la Extracción de ADN de Plantas de Naranja

- CTAB (2X)
- B-mercaptoetanol (14.34 %)
- Cloroformo - Alcohol Isoamílico (24:1)
- Isopropanol
- Etanol (76%)
- Tris-EDTA Estéril (10mM Tris-HCl, 1 M EDTA)
- Tubos Eppendorf (1.5 ml)

6.3. Materiales para PCR: Amplificación de Microsatélites

- dNTP's 20 mM (Invitrogen)
- Buffer 10 X (Invitrogen)
- Taq Polimerasa 5 Unidades/uL (Invitrogen)
- Agua Estéril Libre de DNAsa-RNAsa (Gibco)
- Primers para Amplificación de Microsatélites
 - Todos los primers utilizados en esta investigación fueron donados por el Centro Internacional de la Papa (CIP) localizado en Lima, Perú.
 - El listado completo de los primers utilizados durante la investigación, y sus secuencias específicas, se presentan en la Tabla #2.
- Tubos Eppendorf (0.2 ml)

6.4. Materiales para la Resolución Electroforética en Gel de Agarosa

- Tris-Borato EDTA (TBE 1X)
- Agarosa (Invitrogen)
- Bromuro de Etidio 10mg/ml
- Buffer de Carga (6X)
 - 30% Glicerol, 0.25% Azul de Bromofenol, 0.25% Cianol Xileno
- Ladder 100 b.p. (Invitrogen)

7. METODOLOGÍA

7.1. Recolección y Almacenamiento de Material Vegetal

Se recolectó muestras de hojas de 55 accesiones de la colección in vivo de la sección *Lasiocarpa* del INIAP. Para cada accesión se seleccionó únicamente hojas jóvenes y sanas, las cuales fueron cortadas con podadoras manuales a partir del peciolo. Una vez recolectado, el material vegetal fue empacado en bolsas plásticas impermeables y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de mantener la integridad y calidad de las muestras previo al proceso de extracción de ADN.

7.2. Extracción de ADN de Plantas de Naranjilla

La extracción de ADN de plantas de naranjilla se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Shagai-Marroof, et al (1984). Para cada una de las 55 accesiones analizadas, se seleccionaron dos hojas jóvenes de aproximadamente 2 cm^2 , las cuales se depositaron dentro de un mortero estéril. A éstas se les añadió $800\text{ }\mu\text{l}$ de una solución CTAB 2X- 1% β -mercaptoetanol ($10\text{ }\mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol por cada ml de CTAB). Las hojas fueron

maceradas hasta obtener una mezcla líquida de color verde, la cual sería transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, e incubada a 62 °C durante una hora, con agitación rigurosa cada 15 minutos.

Una vez finalizado el período de incubación, se agregó a cada muestra 500 µl de una solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó rigurosamente y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 r.p.m durante 20 minutos, con el fin de separar la mezcla en dos fases; una fase acuosa y una fase orgánica.

El sobrenadante de color amarillo, el cual constituía la fase acuosa, fue extraído con una micropipeta y transferido a un nuevo tubo. A éste se le añadió 600 µl de isopropanol frío (4 °C), y se invirtió el tubo suavemente hasta observar la aparición de un pellet blanquecino que concentra el ADN de la muestra vegetal. Cuando este pellet no era visible, la muestra era centrifugada de 2 -5 minutos a 5.000 r.p.m.

El sobrenadante fue descartado, dejando únicamente al pellet en la parte inferior del tubo. Seguidamente se agregó 800µl de etanol al 70%, con el fin de lavar el pellet y despegarlo así de las paredes del tubo. El etanol fue removido con una micropipeta y la muestra se dejó secar para eliminar cualquier resto del alcohol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 70 µl de TE estéril y se conservó a -20 °C.

7.3. Cuantificación y Dilución de ADN de Plantas de Naranjilla

Tras el proceso de extracción, las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante la técnica de espectrofotometría de rayos UV. Para calibrar el espectrofotómetro, se depositó 3 ml de agua destilada y 5 µl de TE en una cubeta de cuarzo; esta mezcla constituyó el “blanco”

con el cual se calibró el aparato a una longitud de onda de 260 nm. Posteriormente, para medir la concentración de ADN extraído, se agregó 5 µl de muestra en 3 ml de agua destilada, y se registró la absorbancia bajo el valor de longitud de onda preestablecido a 260 nm. La determinación de la cantidad de ADN extraído por muestra se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$A \times \frac{1}{FD} \times 50 \text{ ng} / \mu\text{l} = \text{Concentración de ADN}$$

FD = Factor de Dilución

Finalmente, a partir de las concentraciones establecidas, las muestras de ADN fueron diluidas a una concentración final de 20 ng/µl, valor necesario para llevar a cabo la amplificación de microsatélites.

7.4. Prueba de Amplificación de Primers

Previo al proceso de caracterización molecular de la sección *Lasiocarpa*, los 18 sets de primers obtenidos del CIP y desarrollados originalmente para papa fueron sometidos a un ensayo de validación, con el fin de determinar su capacidad y calidad de amplificación en naranjilla. Los primers fueron evaluados individualmente en una reacción de PCR estándar, cuyas características se presentan en la Tabla 3. Adicionalmente, es importante destacar que estos ensayos de validación de primers fueron realizados utilizando muestras de ADN de naranjilla elegidas al azar.

Con el fin de facilitar el procedimiento y disminuir la pérdida de reactivos, se preparó una mezcla (mastermix) proporcionada para 10 reacciones a partir de la receta estándar. Esta mastermix, cuyas proporciones por reactivo se detallan en la Tabla 4, contenía todos los

reactivos de la reacción estándar de PCR, exceptuando al primer. La muestra de ADN, la cual serviría de templado para la acción de los primers y la cual fue elegida al azar a partir del total de muestras de ADN aisladas en este proyecto, también se encontraba presente en la mastermix en proporciones suficientes para 10 reacciones estándar.

Se repartió 9.6 μl de mastermix en 10 tubos Eppendorf de 0.2 ml, y a cada tubo se le añadió respectivamente 0.4 μl de un set de primers específico. Los tubos finalmente se llevaron al termociclador (Biometra *T Personal*), y fueron sometidos al programa de amplificación descrito en la Tabla 5. La validación de primers se realizó en tres series; en el primer ensayo se evaluaron 8 primers, en el segundo 7 y en el tercero 3.

7.5. Amplificación de Microsatélites

Tras el proceso de validación de primers, se seleccionó únicamente a aquellos sets de cebadores que presentaban patrones claros de amplificación en naranjilla. Estos serían empleados en el análisis del nivel de polimorfismo genético de la sección *Lasiocarpa*, llevado a cabo a través la amplificación selectiva de regiones microsatélites mediada por la técnica del PCR.

Para cada primer analizado, se preparó una mastermix capaz de suplir el número de muestras de naranjilla a ser evaluadas -las cantidades de reactivo se calculaban tras multiplicar los valores de la receta estándar por el número de accesiones analizadas. La mastermix, sin embargo, incluía todos los ingredientes establecidos por la reacción estándar de la Tabla 3, exceptuando a la muestra de ADN. Una vez preparada la mezcla, ésta se repartía en volúmenes de 8 μl en tubos Eppendorf de 0.2 ml, y a éstos se les añadía, subsecuentemente, 2

μ l de la muestra de ADN. Finalmente, las reacciones preparadas se llevaban al termociclador y se sometían al programa de amplificación descrito en la Tabla 5.

7.6. Resolución de Productos de PCR mediante Electroforesis en Geles de Agarosa

Los productos de PCR de los ensayos de validación de primers y los ensayos de caracterización molecular fueron analizados mediante la técnica de resolución electroforética en geles de agarosa. Durante esta investigación, todos los geles producidos se prepararon al 1% de agarosa con TBE 1X.

En dependencia del tamaño del gel, se preparó primero una mezcla de agarosa y TBE 1X, siguiendo los valores descritos en la Tabla 6. Esta mezcla fue calentada hasta su punto de ebullición, y posteriormente se le añadió 5 μ l de Bromuro de Etidio (10 μ g/ml) por cada 100 ml de gel. Una vez tibia, la mezcla se vertió dentro del molde de la cámara de electroforesis, la cual ya incluía los peines formadores de pocillos. El gel se dejó reposar hasta solidificar, y una vez solidificado, los peines fueron removidos y la cámara de electroforesis fue llenada con TBE 1X hasta cubrir el gel.

Subsecuentemente, se agregó 3 μ l de buffer de carga a los productos de PCR, y se cargó un volumen final de 13 μ l de producto en los pocillos correspondientes. Adicionalmente, se cargó – cuando necesario - 4 μ l de ladder 100 bp (Invitrogen) en el primer pocillo de cada gel. Finalmente, el gel se corrió a 80 voltios durante 2 horas. Tras la culminación del periodo de corrida, el gel se llevó al transiluminador UV, donde se le tomó una fotografía con cámara digital (Kodak DC 290 Zoom).

7.7. Análisis de Distancia Génica y Construcción de Cladograma

A través del análisis visual de los geles obtenidos, se produjo una matriz detallando los patrones amplificantes de cada muestra. Para cada set de primers, las bandas analizadas fueron tomadas como caracteres de ausencia o presencia, y calificados como 0 o 1 respectivamente. De esta manera, la matriz representaba un análisis completo de las diferencias en las bandas presentadas por cada especie de la sección *Lasiocarpa*.

A continuación, la matriz de datos, elaborada en Excel, fue procesada con el programa NT-SYS 2.0 y analizada mediante la aplicación del coeficiente estadístico de asociación DICE. Este coeficiente matemático permite calcular el nivel de similitud que existe entre los individuos de un estudio, midiendo las coincidencias y diferencias que presentan estos últimos para cada uno los caracteres analizados. Su aplicación en esta investigación se basa en aquellas pruebas empíricas que recomiendan el uso de coeficientes de asociación en estudios donde predominan los caracteres de doble estado (presencia o ausencia). Los coeficientes de distancia y correlación, empleados también en la resolución de los niveles de similitud de una población, son utilizados principalmente en estudios donde predominan los caracteres multi-estado (Crisci y López, 1984).

Finalmente, el producto del análisis estadístico de la matriz fue agrupado mediante la opción de “clustering” SAHN, la cual creaba un cladograma de relaciones genéticas de la sección *Lasiocarpa* y calculaba también el índice de similitud genética del grupo. A partir de esta opción también se produjo un “tree graph” para poder visualizar el agrupamiento de las diversas especies.

8. RESULTADOS

8.1. Cuantificación y Dilución de ADN de Plantas de Naranjilla

El proceso de extracción resultó exitoso; se obtuvo ADN para las 55 accesiones recolectadas con una concentración promedio de aproximadamente 775 µg/ml. Solamente en pocas ocasiones se necesitó repetir las extracciones (Accesiones 49, 54, 84,105, 272), pues el material vegetal estaba demasiado viejo, y esto impedía la obtención de ADN de alta calidad. Las lecturas de absorbancia y resultados de cuantificación de ADN para las 55 accesiones se presentan en la Tabla 7.

8.2. Prueba de Amplificación de Primers

La Figura 1 despliega los resultados de la resolución electroforética del ensayo de validación de primers. De los 18 sets de primers probados, solamente 10 presentaron patrones discernibles de amplificación: S011ws, S024ws, S036ws, S047ws, S051ws, S052ws, S069ws, S089ws, S104ws y S106ws. Los primers S020ws, S029ws, S042ws, S056ws, S081ws, S084ws, S095ws y S101ws no amplificaron secuencias específicas o inespecíficas en naranjilla. Un resumen detallado de estos resultados se presenta en la Tabla 8.

8.3. Análisis de Variabilidad Genética de la Sección *Lasiocarpa* mediante Amplificación de Microsatélites

Durante esta investigación, 55 accesiones de la sección *Lasiocarpa* fueron analizadas con un número total de 10 pares de primers. Los resultados de la resolución electroforética para cada ensayo pueden ser apreciados en las Figuras 2-9.

De los diez pares de primers ensayados, seis (S011ws, S047ws, S051ws, S052ws, S069ws, y S089ws) presentaron altos niveles de polimorfismo alélico dentro de las 55 accesiones estudiadas, mientras que dos (S024ws y S036ws) exhibieron patrones monomórficos a nivel interespecífico. Es importante recalcar, no obstante, que aquellos primers que desplegaron altos niveles de polimorfismo, también produjeron patrones multi-banda. Los primers S047ws, S051ws, S052ws, S069ws y S089ws despliegan desde 4 a 9 bandas anónimas e inespecíficas; patrón que se asemeja mucho a aquellos producidos con marcadores tipo RAPD. Estas bandas inespecíficas eran persistentes tanto a nivel intraespecífico (variedades de naranjilla), como a nivel interespecífico. Para la naranjilla y sus parientes interespecíficos, todos diploides (Bernardello et al, 1994), el patrón esperado para la amplificación de regiones microsatélite específicas es de máximo dos bandas. Únicamente los primers S011ws, S024ws y S036ws presentaron patrones microsatélite con bandas dentro del rango esperado (83 bp – 250 bp). Debido a que los patrones inespecíficos pueden ser analizados únicamente como marcadores dominantes, un análisis estadístico que incluye patrones dominantes y patrones codominantes, requiere que los últimos sean convertidos a patrones dominantes (Crisci y López, 1984). Consecuentemente, los patrones amplificados, incluyendo a aquellos que presentaban bandas microsatélite, fueron analizados como marcadores dominantes de ausencia o presencia tipo RAPD.

En este punto también es importante destacar, que aunque los primers S104ws y S106ws proyectaron patrones de amplificación durante el ensayo de validación de primers, éstos nunca produjeron resultados discernibles durante la evaluación molecular de las muestras. Es muy posible que las condiciones estandarizadas de amplificación no hayan sido las ideales para el

funcionamiento de estos primers, aunque también existe la posibilidad de que estos hayan sido inactivados por mala manipulación.

Un resumen breve de estos resultados puede ser encontrado en la Tabla #9.

8.4. Análisis de Distancia Génica y Construcción de Cladograma

La matriz básica de datos, la cual codifica todos los patrones de amplificación obtenidos como caracteres de ausencia/presencia, y se emplea en los análisis de agrupamiento y distancia genética, se presenta en las Tablas 10, 11 y 12.

Al emplear el coeficiente de asociación DICE, se calculó finalmente un coeficiente de distancia genética para la sección *Lasiocarpa* de aproximadamente 0.54. El análisis de agrupamientos, por otro lado, produjo un cladograma de relaciones genéticas de la sección *Lasiocarpa* que puede ser apreciado en la Figura 10.

Al analizar el cladograma, es importante destacar la resolución uniforme de los grupos específicos; salvo a la presencia de ciertas especies en grupos no correspondientes. Por ejemplo, en el segmento donde se agrupa *S. quitoense*, existe una accesión perteneciente a *S. hirtum*; mientras que el grupo que concentra a *S. sessiliflorum* contiene además una accesión de *S. candidum*.

En síntesis, existe un bloque que agrupa a todas las especies de *Solanum quitoense* y que se correlaciona directamente con un grupo no-específico, compuesto por una única accesión de *S. candidum*. Estos dos agrupamientos, por otro lado, se encuentran relacionados directamente con un grupo mixto que concentra a la gran mayoría de especies de *Solanum candidum* y a dos especies de *Solanum quitoense*. Este sector del cladograma se une posteriormente con el grupo de *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum*. Los parientes más

alejados a *Solanum quitoense* se despliegan en un bloque mayor y parafilético que incluye una división bien definida entre *Solanum stramonifolium* y *Solanum sessiliflorum*.

9. DISCUSIÓN

9.1. Amplificación de Regiones Específicas Microsatélite

Dentro del proceso de análisis de regiones microsatélite, existieron diversos inconvenientes que ocasionaron cambios en la dirección original de la investigación. El primer problema radicó en el bajo nivel de transferibilidad de los primers empleados durante el proyecto. De los 18 sets de primers originalmente desarrollados para papa, solamente 8 pudieron ser empleados dentro del proceso de evaluación de variabilidad genética de la sección *Lasiocarpa*; esto implica que sólo el 44% de los primers fueron transferibles en naranjilla. Al ser primers que amplifican regiones conservadas en solanáceas, es muy posible que estas regiones hayan sido modificadas en naranjilla, lo que ocasionaría la pérdida o modificación de los sitios de anclaje de los primers ya descritos. Adicionalmente, es importante destacar que solamente el 16% del set completo de primers produjo patrones microsatélite; y que en la gran mayoría de casos, estos patrones eran monomórficos.

El segundo problema encontrado en el análisis de polimorfismo genético radicó en la amplificación inespecífica de los primers empleados; 5 sets de primers amplificaron secuencias multi-banda no esperadas como patrones microsatélite. Las condiciones de amplificación estandarizadas para este proyecto no fueron las adecuadas para estos 5 cebadores, y cada uno de estos cebadores producía diversos niveles de inespecificidad (Existían primers que producían patrones de hasta 10 bandas anónimas, y otros que solamente producían 4 bandas anónimas). No obstante, estos patrones inespecíficos se caracterizaban por

un alto nivel de información de polimorfismo genético, y abrían la posibilidad de realizar un estudio basado en el análisis de bandas anónimas tipo RAPD. Con solamente 3 sets de primers amplificando patrones microsatélite, dos de los cuales eran monomórficos, el “fingerprinting” molecular de los patrones inespecíficos se presentaba como la mejor alternativa para la realización del análisis del nivel de polimorfismo genético de la sección *Lasiocarpa*.

9.2. Relaciones Filogenéticas de la Sección *Lasiocarpa*

Como se estableció anteriormente, el cladograma de relaciones genéticas produjo una resolución uniforme de los grupos de especies de la sección *Lasiocarpa*. Aunque el árbol producido carece de la representación de 5 especies de este grupo vegetal, es importante destacar que éste presenta ciertas similitudes con cladogramas de estudios anteriores (Whalen et al, 1981; Bruneau et al, 1984). La mayor similitud se presenta en la distribución de las especies *S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum*. En el árbol de la Figura 10 se puede apreciar que ambas especies aparecen como un grupo hermano para el resto de las especies de la sección *Lasiocarpa*. Este resultado concuerda con los hallazgos producidos en el estudio izoenzimático de Whalen et al (1981) y el análisis combinado de marcadores morfológicos y RFLP's en cloroplastos de Bruneau et al (1984); aunque cabe destacar que estos autores proponen un origen parafilético para estas dos especies. El análisis de agrupamiento presentando en esta investigación, no obstante, postula un origen monofilético para *S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium*, pues estos comparten un origen común; hallazgo que tendrá que ser confirmado mediante un análisis de mayor extensión.

Los otros tres grupos bien definidos se presentan para las especies *S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. pseudolulo*. Whalen et al (1981) y Whalen y Carusso (1983) proponían un origen

.omonofilético para estas especies y *S. candidum*, y proponían una estrecha relación entre *S. hirtum* y *S. pseudolulo*. El agrupamiento producido en esta investigación no soporta un origen monofilético para estas especies, pero si las agrupa, y asocia más estrechamente a *S. hirtum* y *S. pseudolulo*. Adicionalmente, *S. candidum* también se agrupa dentro de este sector del cladograma, y se encuentra correlacionado con el bloque de *S. quitoense*.

Finalmente, existen dos grupos no específicos que no se han podido definir. Existe un grupo donde se encuentran muestras de *S. quitoense* separadas del grupo mayor de esta especie y un grupo comprendido por representantes de *S. quitoense* y la única muestra de *S. pectinatum*. La incongruencia de estos grupos dificulta la formación completa de un árbol uniforme que ayude a explicar con certeza las relaciones filogenéticas de la sección *Lasiocarpa*. Parte del problema puede ser atribuido al hecho de que para ciertas especies sólo existe una o muy pocas accesiones para el análisis. No obstante, también existe la posibilidad de que estas especies se encuentren mal identificadas o determinadas a nivel taxonómico, y por eso se encuentran fuera de los grupos grandes ya establecidos. Es también posible que el escaso número de marcadores empleados para el análisis no permitan una clasificación y diferenciación completa de las diversas especies de este grupo vegetal. Adicionalmente, la baja transferibilidad de estos primers tampoco permitió la explotación de la naturaleza altamente polimórfica y coodominante de los microsátélites, pues la gran mayoría de patrones obtenidos eran de carácter anónimo y dominante. El empleo de un marcador altamente polimórfico y aplicable a cualquier especie vegetal, como lo son los AFLP's, podría ofrecer una solución al problema ya descrito.

9.3. Justificación del Análisis Estadístico Elegido

Para esta investigación se eligió analizar los resultados con el coeficiente de asociación tipo DICE. Crisci y López (1984) destacan la importancia del uso de coeficientes de asociación en estudios taxonómicos donde se emplean caracteres de doble-estado; es decir, aquellos marcadores a los que sólo se les puede conferir dos valores. El coeficiente DICE se presentaba como una de las mejores opciones, pues además de cumplir con las características ya mencionadas, este índice también pone mayor peso en las coincidencias y proporciones de similitud de los caracteres empleados en el estudio (Crisci y López, 1984). Este último punto es de suma importancia al considerar la naturaleza del tipo de marcador molecular empleado durante esta investigación. En naranjilla, las regiones y alelos sondeados por los microsátélites empleados no son conocidos y por ende, sería muy difícil asegurar que la presencia de una banda diferente entre dos especies representa una variación alélica. En otras palabras, esta banda no podría ser medida como diferencia entre dos especies, sino que ambas bandas deben considerarse dos caracteres fenéticos distintos. Consecuentemente, el análisis tipo DICE, que pone mayor peso sobre la coincidencia de caracteres, sería de mayor utilidad para el análisis de la sección *Lasiocarpa* en el presente caso.

9.4 Análisis del Coeficiente de Similitud y la Variabilidad Genética de la Sección *Lasiocarpa*

El análisis de estimación de parecido taxonómico, llevado a cabo mediante la aplicación del coeficiente de asociación DICE, indica que los miembros más distantes de la sección *Lasiocarpa* presentan un índice de similitud de aproximadamente 46%. En teoría, este resultado podría ser interpretado como una señal del bajo nivel de variabilidad genética de la

sección *Lasiocarpa*, particularmente al comparar esta investigación con estudios similares en otras especies. Por ejemplo, en un estudio de caracterización molecular de cultivares de yuca (cassava), el coeficiente de similitud entre los cultivares más distantes era del 47% (Colombo et al, 1998). Aunque este valor se asemeja mucho al resultado obtenido durante esta investigación, es importante destacar que el estudio citado solamente comprendía un análisis intraespecífico de diversas variedades comerciales. Consecuentemente, al evaluar estos resultados, es posible establecer que la sección *Lasiocarpa* presenta un menor nivel de polimorfismo genético de lo que esperaría para un grupo interespecífico. Cricsi y López (1983) explican que los valores de coeficiente de similitud de un estudio no pueden ser comparados con los valores de otro; después de todo, los coeficientes estadísticos solamente pueden interpretarse como un número descriptivo de la realidad taxonómica de ese estudio. No obstante, la comparación realizada parece ser acertada, pues el coeficiente de asociación obtenido durante esta investigación encaja sutilmente dentro de las teorías ya establecidas sobre la variabilidad genética de la sección *Lasiocarpa* (Whalen y Carusso, 1983; Bruneau et al, 1984).

Estudios previos habrían señalado el bajo nivel de variabilidad genética de la naranjilla y sus parientes interespecíficos. Por un lado, Whalen y Caruso (1983) establecieron, a través de un estudio isoenzimático, que la variabilidad genética de la naranjilla era casi nula, y posicionaban a las especies andinas de la sección *Lasiocarpa* bajo un origen monofilético. Por otro lado, Bruneau et al (1984) proponía que las diversas especies de la sección *Lasiocarpa* eran extremadamente similares en términos de sus caracteres morfológicas y moleculares. Los resultados expuestos por este estudio se acoplan a estas teorías, pues el nivel de variabilidad genética de la sección *Lasiocarpa* no supera al valor esperado de 75% para

grupos interespecíficos (Arahana, Comunicación Personal). Pero más allá de los valores estadísticos, esta concordancia de resultados presenta un cierto nivel de coherencia en relación con la historia evolutiva de la naranjilla. La naranjilla es un cultivo relativamente joven que todavía se encuentra dentro de una etapa de domesticación; el desarrollo de su variabilidad genética no ha sido explotada aún por el agricultor (Soria, 1997). Adicionalmente, el simple hecho de que las diversas especies de la sección *Lasiocarpa* presenten un alto grado de cruzamiento sexual – evidenciado por la alta ocurrencia de cruzamientos interespecíficos naturales y artificiales- demuestra finalmente una carencia relativa de variabilidad genética para el grupo. Heiser (2000) había establecido la existencia de híbridos artificiales entre la naranjilla y *S. candidum*, *S. hyporhodium* y *S. vestissimum*, e incluso la producción de híbridos con la especie asiática *S. lasiocarpum*. Es importante destacar, sin embargo, que estos híbridos son estériles, lo cual indica que los diversos miembros de la sección *Lasiocarpa* podrían encontrarse dentro de un proceso evolutivo de especiación.

Finalmente, aunque los resultados presentados tienen un alto grado de concordancia con las teorías previamente expuestas, es importante tomar en cuenta dos últimas consideraciones. En primer lugar, dentro de este estudio solamente se pudo realizar la caracterización molecular de siete especies de la sección *Lasiocarpa*, debido a la imposibilidad de conseguir el material vegetal para las cinco especies restantes. En este sentido, la caracterización genética del grupo aún no está completa, y existe la posibilidad de una mayor apertura del nivel de polimorfismo genético interespecífico de la sección *Lasiocarpa*. Dentro de la lista de accesiones se encuentran los parientes asiáticos, con los cuales también se ha logrado producir híbridos interespecíficos, y los cuales también pueden aportar nuevos genes de interés agrícola. En segundo lugar, el número de marcadores

empleados durante este estudio se puede considerar relativamente bajo. Existe la posibilidad de que con un mayor número de marcadores podría crecer el número de regiones genómicas estudiadas y producir más información sobre los niveles de polimorfismo de los parientes interespecíficos de la naranjilla. También se debe considerar que los marcadores empleados durante esta investigación fueron diseñados para papa y son heterólogos para *Solanáceas*, lo cual explicaría su alto nivel de conservación dentro de la naranjilla y sus parientes. Tal vez, este grado de conservación convertía a estos marcadores en menos informativos de lo que se esperaba, pues estos no cubrían segmentos específicos del genoma donde se pueden haber dado los distintos procesos de especiación de la sección *Lasiocarpa*. Adicionalmente, es importante destacar que el nivel informativo de estos marcadores se perdió cuando estos fueron tomados como caracteres dominantes y no codominantes. Aunque los patrones multi-banda obtenidos en esta investigación ayudaron a cubrir un rango más amplio del genoma, el poder resolutivo y altamente polimórfico del análisis alélico de los microsatélites no pudo ser aprovechado.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1. Conclusiones

La caracterización molecular de la sección *Lasiocarpa*, con microsatélites heterólogos para *Solanáceas*, permitió la producción de un cladograma de relaciones genéticas de la naranjilla y sus parientes interespecíficos que se asemeja de cierta manera a los cladogramas de estudios previos por otros autores. En este, *S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium* se presentan como un grupo hermano para el resto de las especies de la sección *Lasiocarpa*, en donde se pudo ubicar en grupos concretos a las especies andinas *S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. pseudolulo*.

La presencia de grupos no definidos podría atribuirse a la errónea identificación taxonómica de las accesiones que no encajan en el análisis, o a la falta de marcadores que ayuden a diferenciar con mayor precisión a estas especies.

El coeficiente de similitud utilizado para determinar el nivel de variabilidad genética de la naranjilla y sus parientes, establece que entre las especies más distantes de la sección *Lasiocarpa* existe un índice de similitud del 46%. Este resultado parecería contradecir las proyecciones esperadas, donde se predecía que el alto contenido de información de los microsatélites ayudaría a determinar un mayor nivel de variabilidad genética para la sección *Lasiocarpa*; pero se justifica cuando consideramos el reducido número de marcadores empleados y su conversión a marcadores dominantes. Aunque esta carencia de variabilidad genética corrobora teorías previas, existe la posibilidad de ampliar los resultados al incluir a los miembros faltantes de la sección *Lasiocarpa*.

10.2. Recomendaciones

El presente estudio presentó varias deficiencias que pueden ser mejoradas con el fin de realizar un análisis más completo de la sección *Lasiocarpa*. En primer lugar, uno de los requisitos para un próximo estudio radica en la necesidad de obtener un mayor número de muestras de análisis, donde se incluya a todos los miembros de la sección *Lasiocarpa* y donde exista una representación equitativa de cada especie. Esto permitiría un análisis más completo y más exacto del grupo vegetal.

En segundo lugar, aunque los microsatélites ofrecieron un marcador relativamente confiable, es importante destacar que no hubo suficientes microsatélites como para ampliar el estudio, y además, éstos no son los marcadores más apropiados para el estudio por lo descrito

en la sección de discusiones. Tal vez sea necesario emplear un marcador más afín a especies cuyos genomas no han sido estudiados; los AFLP's se presentan como una buena opción por su alto contenido de información de polimorfismo. También, la resolución de los productos de las caracterizaciones moleculares debería ser analizada con geles de acrilamida, donde el espaciamiento y diferenciación de bandas es mejor.

Finalmente, una posible opción para efectivizar los estudios de variabilidad genética de la naranjilla podría incluir la creación de microsatélites específicos para este cultivo. Este estudio incluiría además un estudio de mapeo genético del cultivo, con el cual se podría obtener mayor información sobre el posicionamiento de genes y secuencias de importancia molecular y agrícola. La producción de marcadores microsatélites específicos para la naranjilla permitiría una mejor caracterización molecular de los parientes interespecíficos dentro de las regiones de especiación del cultivo.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bruneau A., Dickson E., y Kapp S. "Congruence of chloroplast DNA restriction site characters with morphological and isoenzyme data in *Solanum* sect. *Lasiocarpa*." Canadian Journal of Botany 73 (1984): 1151-1167.
2. Beckman JS. y Soller M. "Towards a unified approach to genetic mapping of eukaryotes base don sequence tagged microsatellite sites." Biotechnology 8 (1990): 930-932.
3. Bernardello L., Heiser C., y Piazzano M. "Karyotypic Studies in *Solanum* Section *Lasiocarpa* (Solanaceae)." American Journal of Botany 81 (1994): 95-103.
4. Castañeda, I. El lulo, su cultivo y conservación. Ediciones Tecnológicas, Colombia, 1992.
5. Crisci J.V. y López M.F. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. OEA, Washington D.C., 1983.
6. Colombo C., Second G., Losada Valle T., y Charrier A. "Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz)." Genetics and Molecular Biology 21 (1998): 105-113.
7. Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la Amazonía Ecuatoriana. ECORAE, Ecuador, 2001.
8. Ferreira E.F. y Grattapaglia D. Marcadores Moleculares y Su Empleo en el Mejoramiento de Plantas. Embrepa, Brasilia, 1998.
9. Fiallos, J. Naranjilla "INIAP-Palora": Híbrido Interespecífico de Alto Rendimiento. Artes Gráficas SILVA, Palora, 2000.
10. Heiser, C. "Ethnobotany of the Naranjilla (*Solanum quitoense*) and Its Relatives." Economic Botany 39 (1985): 4-11.
11. Heiser C. "The naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid." Gene Conservation and Exploitation, ed. Gustafson J. et al, Plenum Press, New York, 1993.
12. Heiser, C. "Interespecific hybridization and the improvement of the Naranjilla (*Solanum quitoense*). Paper presentado en la 5th International Solanaceae Conference, Julio, 2000.
13. Jiménez, B. "Apuntes sobre el cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la zona centro oriental del Ecuador." Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP, Ecuador, 1982.

14. Litt M. y Luty J.A. "A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleótido repeat within the cardiac muscle actin gene." American Journal of Human Genetics 44 (1989): 398-401.
15. Morgante M. y Olivieri A.M. "PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics." The Plant Journal 3 (1993): 175-182.
16. National Research Council. Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press, Washington D.C., 1989.
17. Navarro, R. "Enfermedades del Lulo." Memorias del Primer Seminario Nacional del Cultivo del Lulo, Secretaría de Agricultura de Antioquia, Publicación Técnica N12, Colombia, 1988.
18. Patiño, V.M. Plantas Cultivadas y Animales Domésticos en América Equinoccial. Imprenta Departamental, Cali, 1963.
19. Samaniego, V. "El cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la zona de Pastaza en el Ecuador." Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP, Ecuador, 1982.
20. Soria Vasco V. "La Naranjilla que Actualmente se cultiva y consume en Ecuador." Gaceta Agropecuaria 41 (1989).
21. Soria Vasco V. "Mejoramiento Genético de la Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) Mediante Cruzamientos Interespecíficos." Uso y Manejo de Recursos Vegetales: Memorias del Segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica, Ed. Ríos M. y Pedersen, H., Ediciones ABYA-AYALA, Quito, 1997.
22. Soria Idrovo N. "Problemática de la Pre y Post-Cosecha del Frutales en Ecuador." Manejo Pre y Post-cosecha de Frutales y Hortalizas para Exportación. PROCIANDINO, Quito, 1996.
23. Soria Idrovo N., Espín S., y Dolores, L. Niveles Residuales de Plaguicidas en Frutas Andinas. Pasquel Producción de Publicaciones, Quito, 1997.
24. Vélez, A. "Plagas y Otros Insectos del Lulo o Naranjilla." Memorias del Primer Seminario Nacional del Cultivo del Lulo, Secretaría de Agricultura de Antioquia, Publicación Técnica N12, Colombia, 1988.
25. Whalen M., Costich D., y Heiser C. "Taxonomy of *Solanum* Section *Lasiocarpa*." Gentes Herb. 12 (1981): 41-129.
26. Whalen M. y Carusso E. "Phylogeny of *Solanum* sect. *Lasiocarpa* (Solanaceae): congruence of morphological and molecular data." Systematic Botany 8 (1983): 369-380.

11. FIGURAS

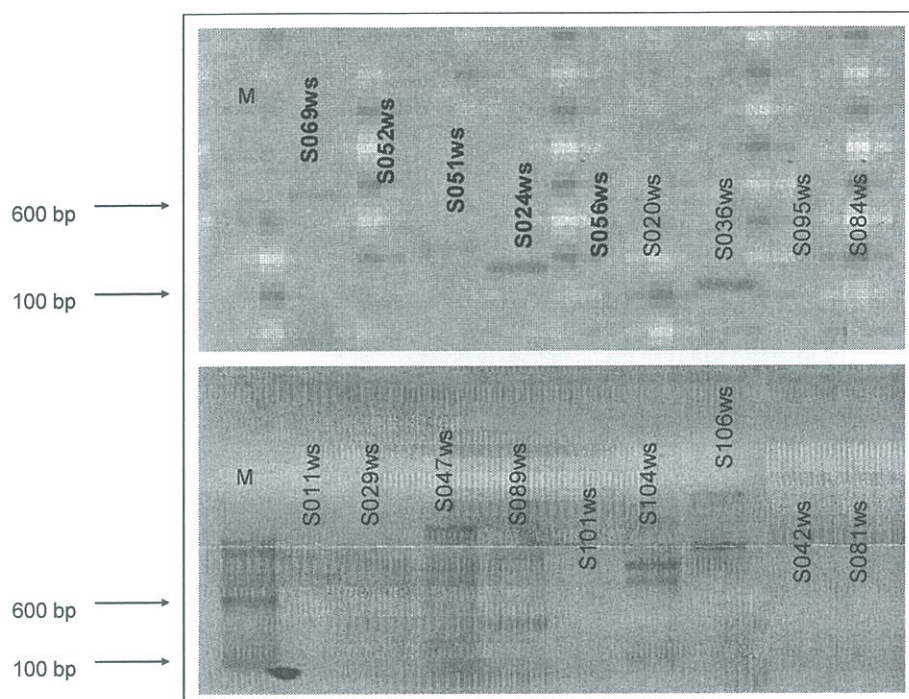


Figura 1. Resolución Electroforética del Ensayo de Validación de Primers: En la presente figura se puede observar que solamente 10 primers presentaron patrones discernibles de amplificación: S011ws, S024ws, S036ws, S047ws, S051ws, S052ws, S069ws, S089ws, S104ws, y S106ws. Los primers S020ws, S029ws, S042ws, S056ws, S081ws, S084ws, S095ws, y S101ws no amplificaron secuencias específicas o inespecíficas en naranjilla.

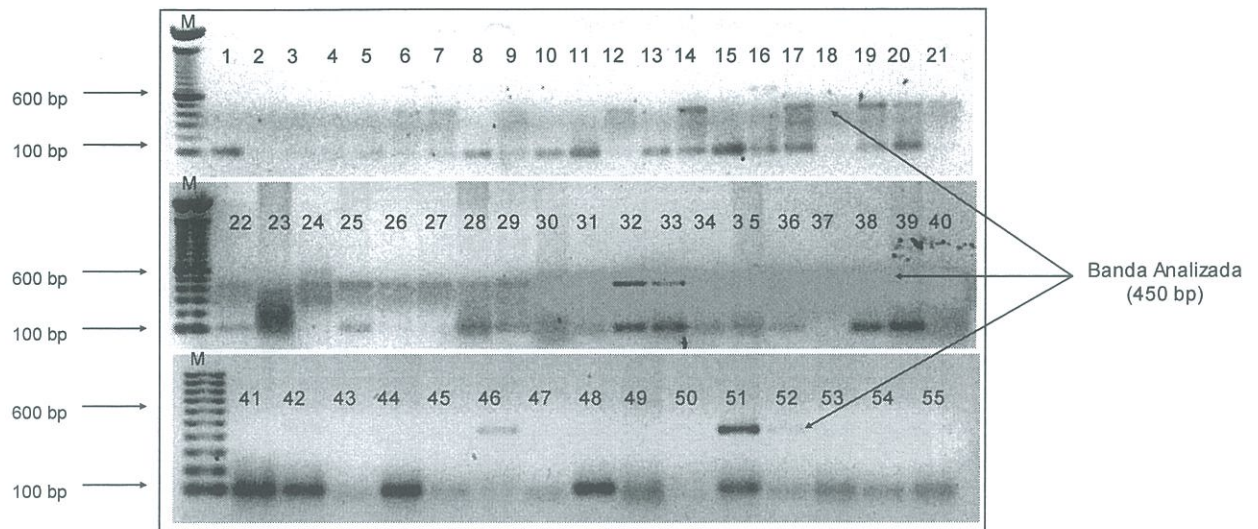


Figura 2. Resolución Electroforética para Primer S011ws: El siguiente primer produjo un patrón microsatélite heterocigoto con una banda polimórfica de aproximadamente 450 bp. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

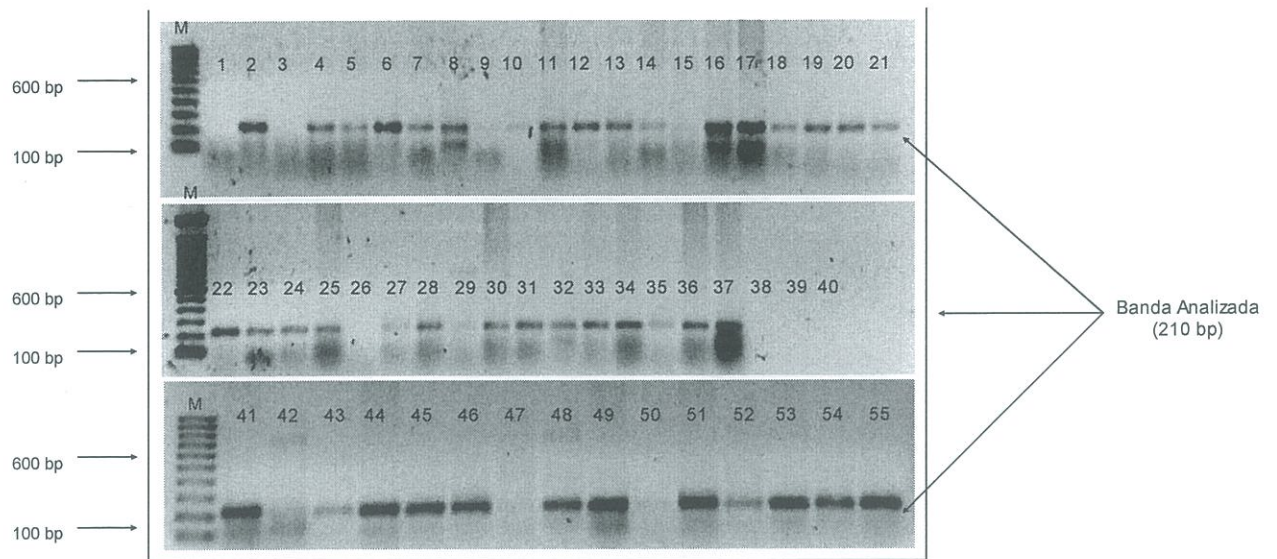


Figura 3. Resolución Electroforética para Primer S024ws: El siguiente primer produjo un patrón microsatélite monomórfico con una sola banda de aproximadamente 210 bp. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

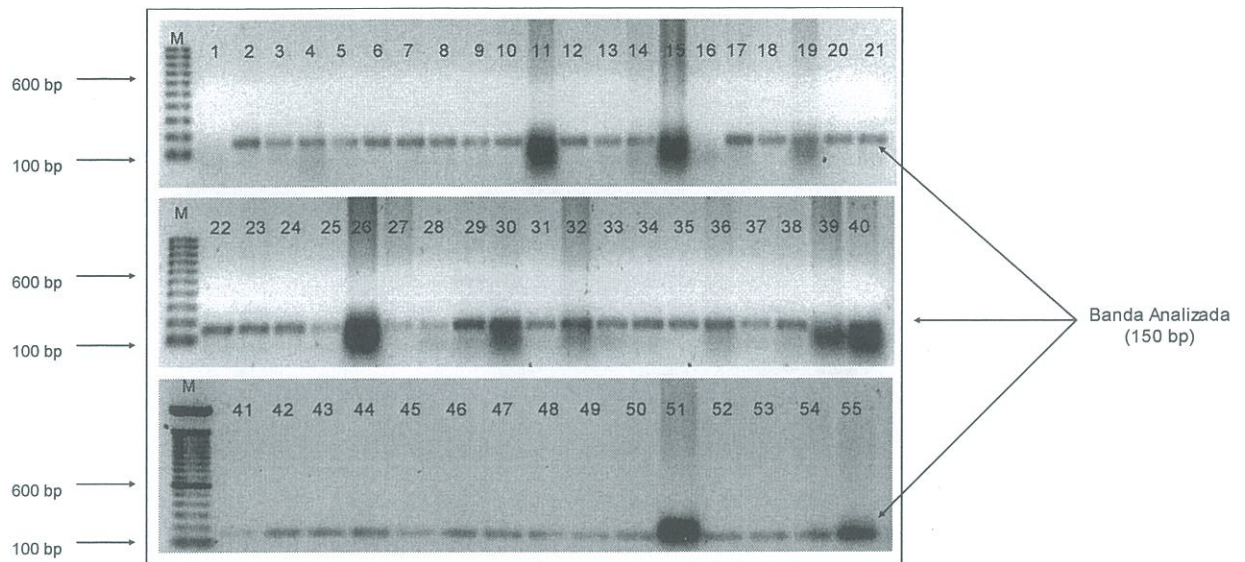


Figura 4. Resolución Electroforética para Primer S036ws: Este primer presenta un patrón monomórfico, con una sola banda de aproximadamente 150 bp. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

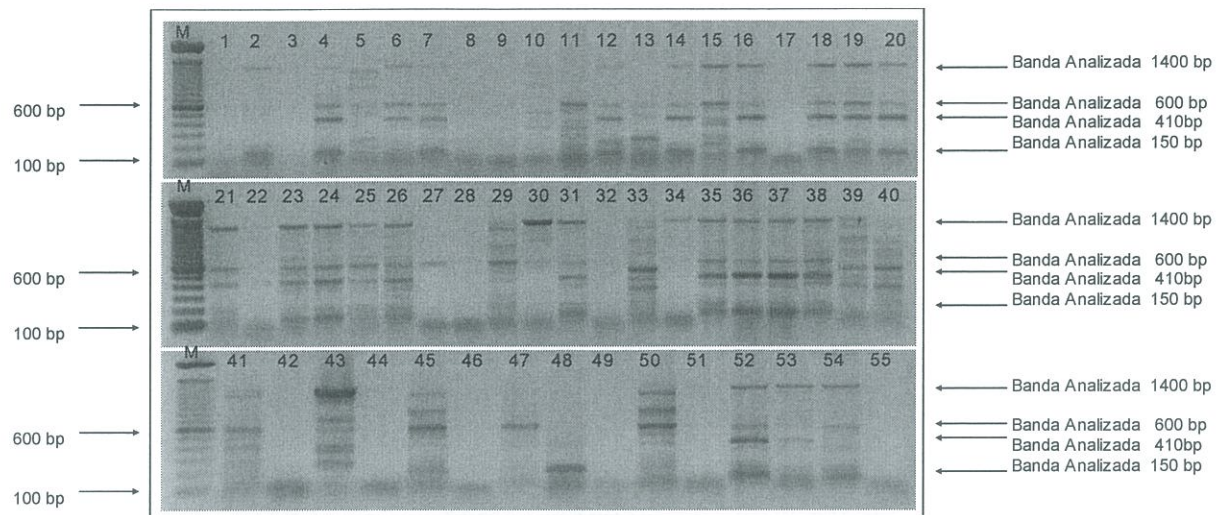


Figura 5. Resolución Electroforética para Primer S047ws: El presente primer despliega un patrón inespecífico altamente polimórfico de aproximadamente 6 bandas. Las bandas analizadas, elegidas por su alto contenido polimórfico y calidad de resolución, se encuentran posicionadas a los 150 bp, 410 bp, 600 bp, y 1400 bp. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

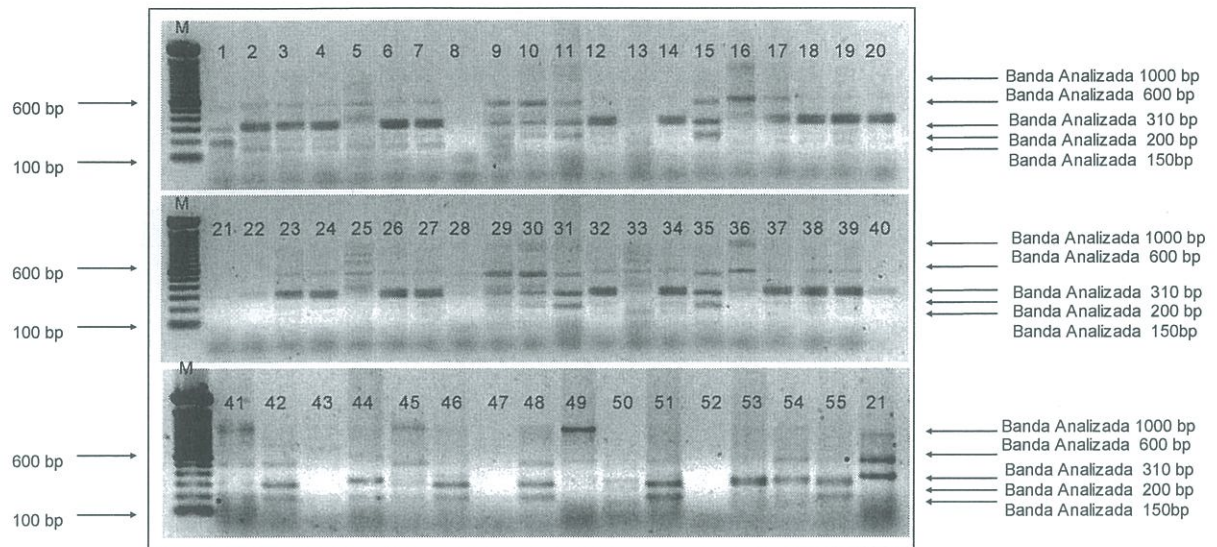


Figura 6. Resolución Electroforética para Primer S051ws: Éste primer produjo un patrón altamente inespecífico de 5 bandas, caracterizado por una buena calidad resolutive y un alto contenido de información de polimorfismo. Las bandas polimórficas situadas en 150bp, 200 bp, 310 bp, 600 bp y 1000 bp fueron tomadas en cuenta para el análisis de polimorfismo de la sección *Lasiocarpa*. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

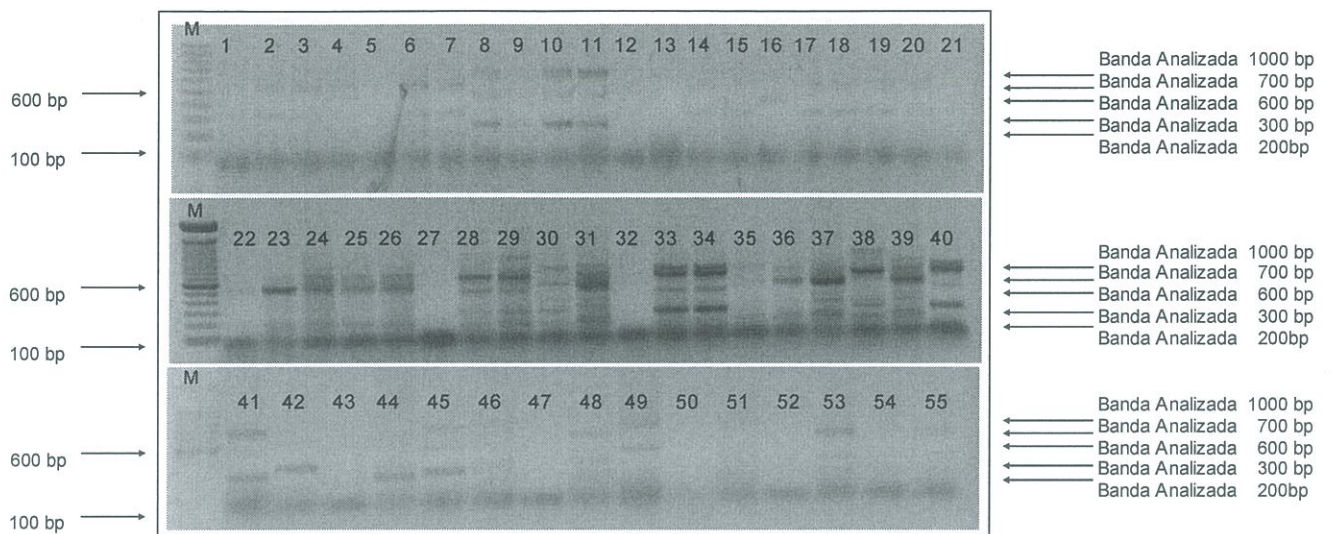


Figura 7. Resolución Electroforética para Primer S052ws: Este primer presenta un patrón multi-banda inespecífico con 5 bandas polimórficas. Las bandas analizadas se encuentran situadas respectivamente a 200 bp, 300 bp, 600 bp, 100 bp y 1000 bp. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

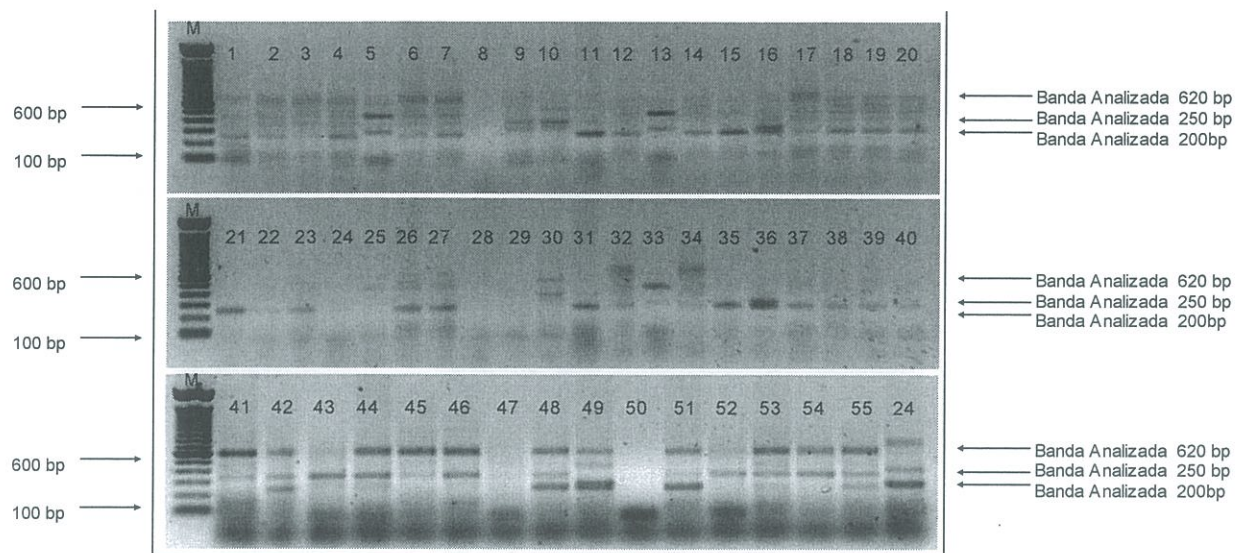


Figura 8. Resolución Electroforética para Primer S069ws: El siguiente primer presenta un patrón altamente polimórfico e inespecífico. Las bandas analizadas – establecidas en 200 bp, 250 bp, y 620 bp – fueron elegidas por su alto contenido polimórfico y alta resolución. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

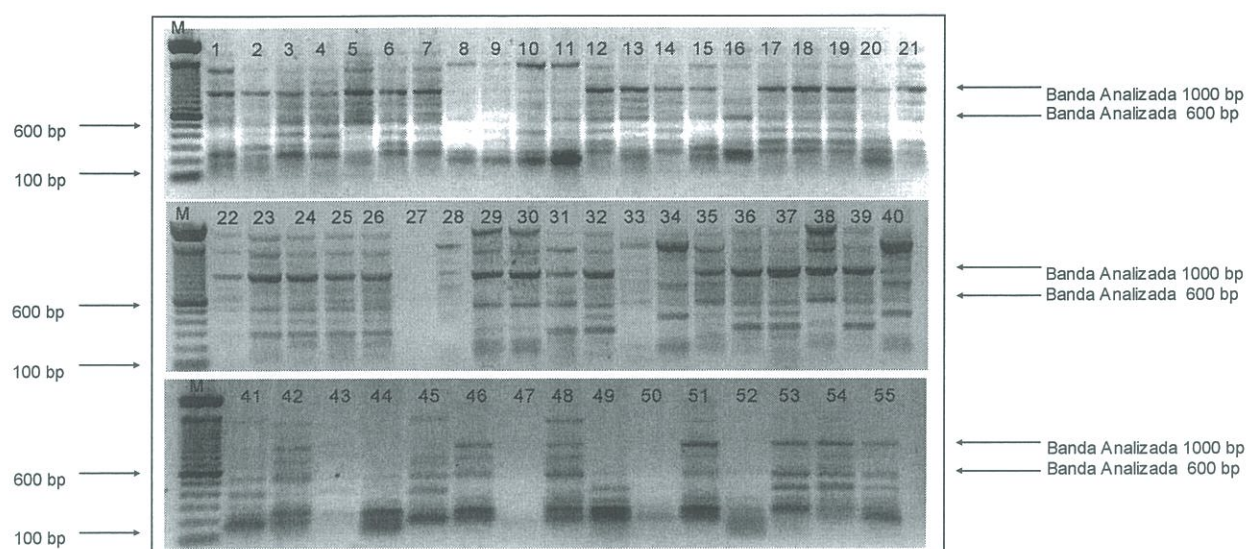


Figura 9. Resolución Electroforética para Primer S089ws: Este primer presentó un patrón inespecífico de aproximadamente 10 bandas. Las dos bandas analizadas se situaban a 600 bp y 1000 bp respectivamente. (M: Ladder 100 bp.; 1-55: Muestras de naranjilla numeradas según Tabla 1).

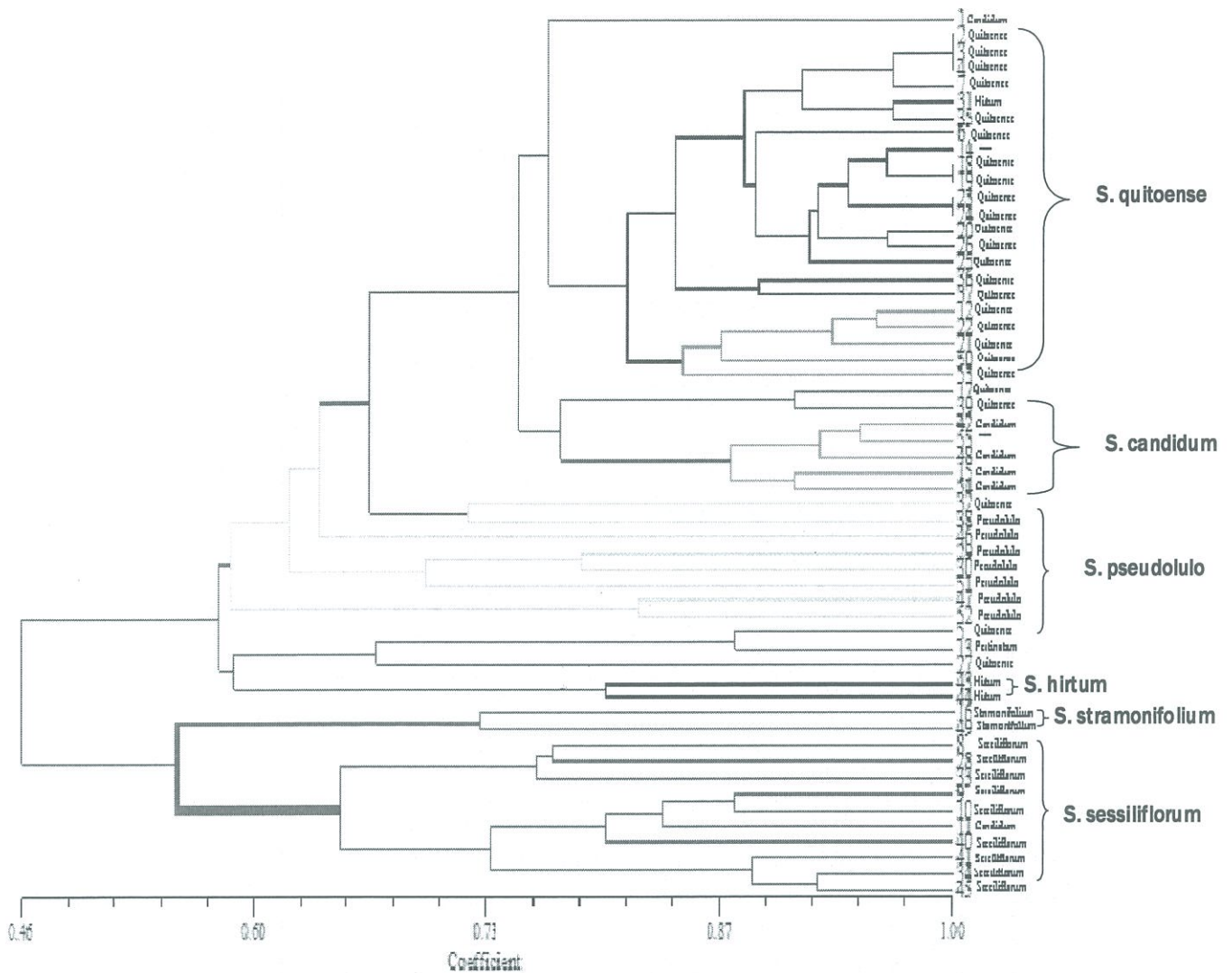


Figura 10. Cladograma de Relaciones Genéticas para la Sección Lasiocarpa: El gráfico establece un bloque que agrupa a todas las especies de *Solanum quitoense* y que se correlaciona directamente con un grupo no-específico, compuesto por una única accesión de *S. candidum*. Estos dos agrupamientos, por otro lado, se encuentran relacionados directamente con un grupo mixto que concentra a la gran mayoría de especies de *Solanum candidum* y a dos especies de *Solanum quitoense*. Este sector del cladograma se une posteriormente con el grupo de *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum*. Los parientes más alejados a *Solanum quitoense* se despliegan en un bloque mayor y parafilético que incluye una división bien definida entre *Solanum stramonifolium* y *Solanum sessiliflorum*.

12. TABLAS

Tabla 1. Lista de Accesiones y Especies Recolectadas

Número de Muestra	Número de Accesoión	Especie	Número de Muestra	Número de Accesoión	Especie
1	1	<i>S. Tequilense</i>	34	124	<i>S. Hirtum</i>
2	5	<i>S. Quitoense</i>	35	125	<i>S. Quitoense</i>
3	6	<i>S. Quitoense</i>	36	128	<i>S. Sessiliflorum</i>
4	30	<i>S. Quitoense</i>	37	131	<i>S. Sessiliflorum</i>
5	39	<i>S. Quitoense</i>	38	197	<i>S. Tequilense</i>
6	43	<i>S. Quitoense</i>	39	211	<i>S. Quitoense</i>
7	44	<i>S. Quitoense</i>	40	226	<i>S. Quitoense</i>
8	47	<i>S. Sessiliflorum</i>	41	221	<i>S. Pseudolulo</i>
9	49	<i>S. Sessiliflorum</i>	42	229	<i>S. Quitoense</i>
10	53	<i>S. Sessiliflorum</i>	43	239	<i>S. Sessiliflorum</i>
11	54	<i>S. Tequilense</i>	44	250	<i>S. Sessiliflorum</i>
12	56	<i>S. Quitoense</i>	45	251	<i>S. Tequilense</i>
13	57	<i>S. Pectinatum</i>	46	252	<i>S. Hirtum</i>
14	59	-----	47	253	<i>S. Hirtum</i>
15	63	<i>S. Tequilense</i>	48	256	<i>S. Sessiliflorum</i>
16	67	<i>S. Stramonifolium</i>	49	269	<i>S. Pseudolulo</i>
17	68	<i>S. Quitoense</i>	50	271	<i>S. Pseudolulo</i>
18	69	<i>S. Quitoense</i>	51	272	<i>S. Pseudolulo</i>
19	74	<i>S. Quitoense</i>	52	286	<i>S. Candidum</i>
20	75	<i>S. Quitoense</i>	53	289	<i>S. Stramonifolium</i>
21	80	<i>S. Quitoense</i>	54	296	<i>S. Quitoense</i>
22	84	<i>S. Quitoense</i>	55	297	<i>S. Pseudolulo</i>
23	91	<i>S. Quitoense</i>	56	298	<i>S. Pseudolulo</i>
24	94	<i>S. Quitoense</i>	57	300	<i>S. Pseudolulo</i>
25	95	<i>S. Quitoense</i>	58	305	<i>S. Quitoense</i>
26	97	<i>S. Quitoense</i>	59	307	<i>S. Pseudolulo</i>
27	105	<i>S. Quitoense</i>	60	308	<i>S. Pseudolulo</i>
28	106	<i>S. Quitoense</i>	61	311	<i>S. Quitoense</i>
29	108	<i>S. Quitoense</i>	62	313	-----

Tabla 1. Lista de Acciones y Especies Recolectadas (Continuación)

Número de Muestra	Número de Accesoión	Especie	Número de Muestra	Número de Accesoión	Especie
30	109	<i>S. Quitoense</i>	63	315	<i>S. Quitoense</i>
31	111	<i>S. Sessiliflorum</i>	64	317	<i>S. Sessiliflorum</i>
32	117	<i>S. Pseudolulo</i>	65	319	<i>S. Nobastum</i>
33	119	<i>S. Pseudolulo</i>			

Tabla 2. Lista de Primers y Sus Secuencias Específicas

Identificación de Set de Primers (2 Primers por Set)	Secuencia
S011ws	AATAGGTGTAAGTCTCAATG TTGAAGTAAAAGTCCTAGTATGTG
S020ws	TGTGTTTGTCTGTAT AATTCTATCCTCATCTCTA
S024ws	AATCGGTGATAAATGGTAATGC ATGCTTGCCATGGTATGTGT
S029ws	TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC
S036ws	TCTCCCCATCTTAATGTTTC CAACACAGCATAACAGATCATC
S042ws	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA
S047ws	AGAGATCGATGTAAAACACGT GTGGCATTGATGGATT
S051ws	TTCTGATTTTATGCATGTTTCC ATGCTTGCCATGTGATGTGT
S052ws	CATACGCACGCACGTACAC TTCAACCTATCATTGTTGTGAGTCG
S056ws	CTACCAGTTTGTGATTGATTGTGGTG AGGGACTTTAATTTGTTGGACG
S069ws	CCCATAAATACTGTCGATGAGCA GAATGTAGGGAAACATGCATGA
S081ws	TGATTCTTGCCTACTGTAATCG CAAAGTGGTGTGAAGCTGGTA
S084ws	CAATTTGTTTTTTCATGTGACAC ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA
S089ws	CAACTCAAACCAGAAGGCAAA GAGAAATGGGCAAAAAACA
S095ws	AAGCTGTTACTTGATTGCTGCA GTTCTGGCATTCCATCTAGAGA
S101ws	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG ATGCGAATCTACTCGTCATGG
S104ws	TTCGGAATTACCCTCTGCC AAAAAAGAACGCGCACG
S106ws	GCGTCAGCGATTTCACTACTA TTCAGTCAACTCCTGTTGCG

Tabla 3. Reacción Estándar de PCR para Amplificación de Microsatélites

Reactivo	Cantidad
dNTP's 20 nmol	0.1 µl
Buffer 10 X con MgCl	1.0 µl
Agua Libre de DNAsa/RNAsa	6.3 µl
Taq polimerasa (5 Unidades/ µl)	0.2 µl
Primer	0.4 µl
ADN	2.0 µl

Tabla 4. Mastermix para Ensayo de Validación de Primers

Reactivo	Cantidad
dNTP's 20 nmol	1.0 µl
Buffer 10 X con MgCl	10 µl
Agua Libre de DNAsa/RNAsa	63 µl
Taq polimerasa (5 Unidades/ µl)	2.0 µl
ADN	20 µl

Tabla 5. Programa de Amplificación de Microsatélites para Termociclador

Paso Inicial		94 C por 1 min.
Ciclo de Amplificación (Repetir 33 Veces)	Paso #1	94 C por 30 sec.
	Paso #2	50 C por 30 sec.
	Paso #3	72 C por 1 min.
Paso #4		72 C por 5 min.
Paso Final		4 C (Pausa)

Tabla 6. Receta General para la Producción de Geles de Agarosa al 1%

Tamaño de Gel	Concentración de Gel	Cantidad de Agarosa	Cantidad de TBE 1X
70 ml	1%	0.7 g	70 ml
100 ml		1 g	100 ml
200 ml		2 g	200 ml
300 ml		3 g	300 ml

Tabla 7. Lecturas de Absorbancia, Concentración y Dilución de Muestras de ADN

Número de Muestra	Absorbancia	Concentración (ng/ml)	Cantidad de ADN (Para 50 µl de Dilución)	Cantidad de Agua (Para 50 µl de Dilución)
1	0,013 A	390	2,66	47,34
5	0,007 A	210	4,76	45,24
6	0,013 A	390	2,66	47,34
30	0,034 A	1020	0,98	49,02
39	0,020 A	600	1,67	48,33
43	0,006 A	180	5,56	44,44
44	0,011 A	330	3,03	46,97
47	0,003 A	90	11,1	38,9
53	0,054 A	390	2,66	47,34
54	0,006 A	1620	0,62	49,38
56	0,002 A	180	5,56	44,44
57	0,019 A	60	16,67	33,33
59	0,046 A	570	1,75	48,25
63	0,018 A	1380	0,72	49,28
67	0,019 A	540	1,85	48,15
68	0,005 A	390	2,66	47,34
74	0,021 A	150	6,67	43,33
75	0,003 A	630	1,59	48,41
80	0,003 A	90	11,1	38,9
84	0,002A	90	11,1	38,9
94	0,009 A	60	16,6	33,4
95	0,004 A	270	3,7	46,3
97	0,003 A	120	8,33	41,67
105	0,108 A	90	11,1	38,9
106	0,017 A	3240	0,3	49,7
108	0,013 A	510	1,96	48,04
111	0,006 A	1620	0,62	49,38
117	0,031 A	930	1,08	48,92
119	0,006 A	1620	0,62	49,38
124	0,007 A	210	4,76	45,24
125	0,021 A	630	1,59	48,41

Tabla 7. Lecturas de Absorbancia, Concentración y Dilución de Muestras de ADN
(Continuación)

Número de Muestra	Absorbancia	Concentración (ng/ml)	Cantidad de ADN (Para 50 µl de Dilución)	Cantidad de Agua (Para 50 µl de Dilución)
128	0,011 A	330	3,03	46,97
131	0,013 A	390	2,56	47,44
197	0,003 A	90	11,1	38,9
211	0,009 A	270	3,7	46,3
226	0,006 A	1620	0,62	49,38
221	0,030 A	900	1,11	48,89
229	0,120 A	3600	0,277	49,723
239	0,291 A	6930	0,144	49,856
250	0,013 A	510	1,96	48,04
251	0,006 A	1620	0,62	49,38
252	0,002 A	180	5,56	44,44
253	0,019 A	60	16,67	33,33
256	0,007 A	210	4,76	45,24
269	0,011 A	330	3,03	46,97
272	0,002A	90	11,1	38,9
286	0,046 A	570	1,75	48,25
289	0,017 A	3240	0,3	49,7
296	0,007 A	210	4,76	45,24
298	0,003 A	90	11,1	38,9
300	0,054 A	390	2,66	47,34
305	0,006 A	1620	0,62	49,38
311	0,013 A	510	1,96	48,04
313	0,009 A	270	3,7	46,3

Tabla 8. Resultados de Ensayo de Validación de Primers

Primers	Resultado de Amplificación
S011ws	Si Amplifica
S020ws	No Amplifica
S024ws	Si Amplifica
S029ws	No Amplifica
S036ws	Si Amplifica

Tabla 8. Resultados de Ensayo de Validación de Primers (Continuación)

Primers	Resultado de Amplificación
S042ws	No Amplifica
S047ws	Si Amplifica
S051ws	Si Amplifica
S052ws	Si Amplifica
S056ws	No Amplifica
S069ws	Si Amplifica
S081ws	No Amplifica
S084ws	No Amplifica
S089ws	Si Amplifica
S095ws	No Amplifica
S101ws	No Amplifica
S104ws	Si Amplifica
S106ws	Si Amplifica

Tabla 9. Resultados de Amplificación de Microsatélites

Primers	Patrón Amplificado	Número de Bandas Discernibles
S011ws	Polimórfico	2
S024ws	Monomórfico	1
S036ws	Monomórfico	1
S047ws	Polimórfico	4
S051ws	Polimórfico	4
S052ws	Polimórfico	5
S069ws	Polimórfico	4
S089ws	Polimórfico	5
S104ws	No Amplificó	n/a
S106ws	No Amplificó	n/a

Tabla 11. Matriz Básica de Datos para Patrones de Amplificación (Muestras 21 -36)

Primer	Banda	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Sw011	Banda 1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Sw024	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sw036	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sw047	Banda 1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
	Banda 2	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1
	Banda 3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	Banda 4	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Sw051	Banda 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
	Banda 2	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
	Banda 3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
	Banda 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
	Banda 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Sw52	Banda 1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
	Banda 2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
	Banda 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
	Banda 4	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
	Banda 5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Sw069	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
	Banda 2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	Banda 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Sw89	Banda 1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
	Banda 2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1

Tabla 12. Matriz Básica de Datos para Patrones de Amplificación (Muestras 37 -55)

Primer	Banda	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	
Sw011	Banda 1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
Sw024	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sw036	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sw047	Banda 1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
	Banda 2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
	Banda 3	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	
	Banda 4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	
Sw051	Banda 1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
	Banda 2	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	
	Banda 3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	
	Banda 4	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	Banda 5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Sw52	Banda 1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Banda 2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	
	Banda 3	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
	Banda 4	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	
	Banda 5	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
Sw069	Banda 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	
	Banda 2	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
	Banda 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
Sw89	Banda 1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	
	Banda 2	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	