

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Diferenciación de variedades en cultivos de Tomate de Árbol, *Solanum  
betaceum* mediante la técnica molecular de AFLP**

**Soledad Ordoñez Álvarez**

Tesis de grado presentada como requisito para la  
Obtención del título de B.S en Biotecnología

Quito

Mayo 2007

DERECHOS DE AUTOR  
©Derechos de autor  
Soledad Ordoñez Álvarez  
2007

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su incondicional apoyo y preocupación, y a los miembros de mi familia y amigos que han sabido cada uno a su manera, ayudarme a lo largo de mi carrera y formación profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a en primer lugar a todos los profesores de la Facultad de Ciencia Biologicas y Ambientales, especialmente a Maria de Lourdes Torres y Venancio Arahana por los valiosos conocimientos que durante toda mi carrera compartieron conmigo, y por su invaluable ayuda en la realizacion de este proyecto.

A toda la gente del Laboratorio de Agrobiotecnologia de la Universidad San Francisco de Quito, no solo por los materiales, equipos e instrumentos de los que fui proveída como parte del mismo, si no por su ayuda, experiencia y apoyo durante la realización de esta tesis.

Así mismo a todos los que trabajaron conmigo en el Laboratorio de Agrobiotecnologia, mis compañeros y amigos: Andrea Arias, Pedro González, Andrés Torres, Nicolás Peñafiel, Nicolás Bastidas, Diana Ayala, Eteban Borrero, Jose Antonio Riofrio.

A mi hermana y amigos, que supieron darme palabras de aliento y su ayuda en aquello que les fuera posible durante la corrección de este trabajo.

## RESUMEN

El presente trabajo trata de establecer cuanta variabilidad genética existe tanto intra como inter lvarietal dentro de los cultivares de *Solanum betaceum* en Ecuador. La técnica usada para este propósito fue AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism, por sus siglas en inglés).

Para el desarrollo de ésta investigación, 26 frutos de diferentes plantas de tomate de árbol fueron recolectadas de tres provincias: Imbabura, Pichincha y Tungurahua, las cuales representaron seis variedades descritas morfológicamente (amarillo puntón, amarillo gigante, amarillo bola, morado gigante, morado bola y morado común), representando 5 accesiones a cada variedad, con la excepción de las variedades bola amarillo y bola morado que fueron representadas por 3 accesiones y dos accesiones, respectivamente.

En un paso previo, 44 combinaciones de primers fueron probados en una muestra de tomate de árbol, y se seleccionó 8 combinaciones para analizar la variabilidad genética existente en todos los genotipos muestreados. Se encontró variabilidad limitada entre accesiones, teniendo un máximo del 18% de distancia entre genotipos del tipo amarillo con respecto a los del tipo morado, pero no fue posible ver diferencias con respecto a forma del fruto. El total de combinaciones de primers, detectaron un total del 60% de polimorfismo entre accesiones.

## ABSTRACT

The present work tried to establish the genetic variability inside and between cultivars of *Solanum betaceum* in Ecuador. The technology used for this purpose was AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism).

For the development of this investigation, 26 plant samples were recollected from three provinces: Imbabura, Pichincha , and Tugurahua, which represented 6 morphological varieties ( amarillo puntón, amarillo gigante, amarillo bola, morado gigante, morado bola and morado común), from each variability 5 samples were collected, with the exception of bola amarillo and bola morado with 3 and two samples respectively.

On a previous step 44 primer combinations were tested on one accession of *S. betaceum*, selecting 8 of them for testing variability in all the genotypes analyzed. Limited variability was found between samples, the maximum being 18% of dissimilarity between genotypes representing yellow and red cutivars but it was not possible to separate them by shape. All primers combination detected a total of 60% polimorphism between samples.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Derechos de Autor.....</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Botánica y distribución del tomate de árbol .....	1
1.1.1. Importancia Económica.....	3
1.1.2. Problemas del Cultivo.....	5
1.1.3. Variedades.....	5
1.2. Técnicas moleculares.....	8
1.2.1. Técnicas y usos.....	8
1.2.2. Marcadores AFLPs .....	12
1.2.3. Comparación entre técnicas.....	15
<b>2. Objetivo General.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Área de estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>6. Materiales, Reactivos y Equipos.....</b>	<b>19</b>
6.1. Material vegetal.....	19
6.1.1. Esterilización de semillas de tomate de árbol.....	19
6.1.2. Medios de cultivo y germinación de semillas.....	19
6.2. Extracción de ADN de tomate de Árbol.....	19
6.2.1. Cuantificación del ADN.....	20
6.3. Amplificación con AFLP® Invitrogen™.....	20
6.3.1. Restricción y Ligación.....	20
6.3.2. Amplificación preselectiva.....	20
6.3.3. Amplificación selectiva.....	21
6.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	21
6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	21
6.6. Tinción en plata.....	22
6.6.1. Protocolo Promega.....	22
6.6.1.1. Solución fijadora y Parada .....	22
6.6.1.2. Solución de Plata.....	22
6.6.1.3. Solución Reveladora.....	22
6.6.2. Protocolo mejorado por Halima Benbouza, et al.....	22
6.6.2.1. Solución fijadora y Parada .....	23
6.6.2.2. Solución de Plata.....	23
6.6.3.3. Solución Reveladora.....	23
6.7. Análisis de datos.....	23
<b>7. Metodología.....</b>	<b>23</b>
7.1. Esterilización de semillas de tomate de árbol.....	23
7.1.1. Cultivo in vitro de tomate de árbol.....	24
7.1.2. Nomenclatura de individuos obtenidos por variedad.....	24

7.2. Extracción del DNA de tomate de árbol.....	24
7.2.1. Cuantificación y dilución del DNA en cada muestra.....	25
7.3. Amplificación AFLP.....	26
7.3.1. Restricción y ligación.....	26
7.3.2. Preamplificación.....	27
7.3.3. Amplificación selectiva.....	27
7.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
7.5. Electroforesis en gel de acrilamida.....	28
7.6. Tinción con plata.....	29
7.7. Selección de primers.....	29
7.7. Análisis de resultados.....	29
<b>8. Resultados.....</b>	<b>31</b>
8.1. Extracción de ADN, restricción y ligación de las muestras.....	31
8.2. Selección de primers.....	32
8.3. Técnica de AFLPs.....	32
8.3.1. Amplificación preselectiva.....	32
8.3.2. Amplificación Selectiva.....	32
8.3.3. Determinación de Variabilidad.....	33
8.3.4. Análisis de similitud y agrupamiento.....	37
<b>9. Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>10. Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>48</b>
<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>50</b>
<b>12. Tablas.....</b>	<b>53</b>
<b>13. Figuras.....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>12.1. Tablas.....</b>	<b>53</b>
Tabla 1. Nomenclatura de las muestras, variedad a la que pertenecen lugar de donde se extrajo el material.....	53
Tabla 2. Resultados de la cuantificación del ADN extraído de las muestras de tomate de árbol mediante espectrofotometría .....	54
Tabla 3. Secuencias de primers probadas para la amplificación selectiva de las muestras.....	55
Tabla 4. Protocolo de tinción con plata modificado del protocolo de Promega...55	
Tabla 5. Tabla de datos binarios obtenida de la combinación de primers 26 (M-CAC E-ACA).....	56
Tabla 6. . Número asignado para la combinación de primers EcoR 1/Mse 1, secuencia arbitraria de primers, marcadores obtenidos por combinación y número de marcadores que demostraron ser polimórficos.....	57
Tabla 7. Tabla de similitud entre cada genotipo de las variedades amarillas, utilizando el coeficiente de Dice.....	57
Tabla 8. Tabla de similitud entre cada genotipo de las variedades moradas, utilizando el coeficiente de Dice.....	58
Tabla 9. . Tabla de similitud entre las variedades amarillas vs. las variedades moradas, utilizando el coeficiente de Dice.....	58
Tabla 10. Tabla de similitud entre los genotipos de la provincia de Tungurahua e Imbabura, utilizando el coeficiente de Dice.....	59
Tabla 11. de similitud entre los genotipos de la provincia de Tungurahua y Pichincha, utilizando el coeficiente de Dice.....	59
Tabla 12. Coeficientes de similitud entre los genotipos de la provincia de Pichincha e Ibarra, utilizando el coeficiente de Dice.....	59
<b>12.2. Figuras.....</b>	<b>61</b>
Figura 1. Resultados de la extracción de ADN de las muestras. Se puede ver que la concentración no es uniforme, estos resultados se utilizaron para posteriormente homogenizar la concentración.....	61
Figura 2. Amplificación selectiva de las 44 combinaciones de primers obtenidas para tomate de árbol.....	61
Figura 3. Resultados de preamplificación de las muestras. (Ladder 100bp, Ac5P- Mc2P muestras de tomate de árbol analizadas).....	62
Figura 4. Resultados obtenidos de la PCR selectiva con la combinación de primers 26 ( M-CAC E-ACA), en un gel de poliacrilamida al 6%.....	63
Figura 5. Fenograma obtenido de la combinación 5 (M-CAT E-ACT). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.....	64
Figura 6. . Fenograma obtenido de la combinación 6 ( M-CTG E-ACA ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice .....	65
Figura 7. Fenograma obtenido de la combinación 7 ( M-CAA E-ACG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.....	66

Figura 8. Fenograma obtenido de la combinación 8 (M-CTC E-ACG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice. ....	67
Figura 9. Fenograma obtenido de la combinación 18 (M-CAA E-AAG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice. ....	68
Figura 10. Fenograma obtenido de la combinación 26 (M-CAC E-ACA ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice. ....	69
Figura 11. Fenograma obtenido de la combinación 46 (M-CAC E-ACT ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice ....	70
Figura 12. Fenograma obtenido de la combinación 43 (M-CTG E-ACG). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice ....	71
Figura 13. . Fenograma obtenido con las ocho combinaciones de primers de la Tabla 5. Generado por NTSYS 2.11, Neighbor Joining, usando el coeficiente de Nei.....	72
Figura 14. Fenograma obtenido de las combinaciones nombradas en la Tabla 5. Generado por NTSYS 2.11, UPGMA, usando el coeficiente Dice.....	73

## **1. Introducción:**

El tomate de árbol o *Solanum betaceum*, un fruto andino, tiene un gran potencial para su comercialización y por tanto es necesario saber más sobre su diversidad y cultivo en el país. Las nuevas técnicas moleculares pueden ayudar al mejor entendimiento de esta especie a nivel genético, ayudando así a establecer planes de conservación y a aprovecharla mejor como cultivo.

### **1.1. Características y distribución del cultivo de tomate de árbol**

El tomate de árbol es una fruta endémica de la región oriental de los Andes (Lewis, 1999). En cuanto a su morfología y hábitat se trata de un arbusto semileñoso de 2 a 3 metros de altura (SICA, 2004), crece en altitudes entre un rango de 1000 a 3000 metros sobre el nivel del mar. Se caracteriza por su fruto de forma ovoide terminando en punta en el extremo inferior (dependiendo de la variedad), su mesocarpio de color amarillo, morado o tomate, con cáscara lisa y gruesa variando su color de rojo a amarillo (SICA, 2004). Su propagación puede ser por semilla, tallos o raíces. El tiempo que se tarda la planta de tomate de árbol en dar frutos está entre los ocho y diez meses. En cuanto a su reproducción, esta especie puede ser tanto alógama como autógama (Albornoz G., 1992).

Por lo general, *Solanum betaceum* es diploide con un número cromosómico igual a  $2n$  pero en raras ocasiones, con una frecuencia de 0.24%, aparecen individuos poliploides que presentan cambios a nivel del fenotipo y una baja en la viabilidad del polen (G.J. Pringle & B.G. Murray, 1992).

Las características nutritivas del tomate de árbol lo hacen atractivo para el consumo y exportación a mercados exteriores. Teniendo un sabor dulce agrio, según la

variedad, así como un alto contenido de vitamina A y C, fibra,  $\beta$  caroteno y un bajo contenido calórico. Se lo ha usado industrialmente para la preparación de jaleas, jugos, helados, mermeladas y conservas con resultados satisfactorios (Prohens et al, 1996)

La distribución de la familia *Solanaceae* es amplia, comenzando en el norte desde México, pasando por América Central, noroeste de Sud América (Región Andina), hasta llegar a Argentina, otro punto de diversidad se encuentra en el sur de Brasil (Pringle, 1991). El tomate de árbol o *Solanum betaceum* es originario de la Región Andina de Sudamérica (Colombia, Ecuador, Perú) y actualmente es un cultivo de importancia en Venezuela, tierras altas de Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico, Haití, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile, Brasil y Argentina (G.J.Pringle & B.G. Murray, 1991; Aristizábal C. 1998).

Sus semillas debieron ser llevadas tempranamente al Este de África, Asia y el Este de la India, ya que en la actualidad este cultivo está bien establecido en Nigeria, montañas de Malasia e India y es parte de las plantas cultivadas en jardines en Australia, parte de Nueva Guinea y Nueva Zelanda (Cadena, 2000).

Al tomate de árbol se lo conoce también con otros nombres dependiendo de su región de origen. En Centroamérica se lo conoce con los nombres de *tomate cimarrón*, y *tomate extranjero*; en México como “*tomate de palo*”; en Colombia y Perú como *tomate de monte*, *tomate silvestre*; en Bolivia se lo llama *chilto*, *sima*, o *tomate de lima*. Es también conocido como *tomate chimango*, *tomateiro da serra* en Brasil y *tamarillo* en Nueva Zelanda, país en donde ha sido introducido (Cadena, 2000).

En cuanto al nombre científico de la especie, desde los años 1799 hasta 1845, fue clasificada como *Solanum betaceum* por Cavanilles, para después pasar al género

*Ciphomandra* donde se quedó hasta el año 1995, momento en el cual Bohs L. lo volvió a clasificar como *Solanum*. (Heiser,1999; Bohs L, 1995). Estos continuos cambios de género han provocado gran dificultad para establecer programas de mejoramiento de variedades, ya que para este propósito se necesitaría conocer a las especies cercanas pertenecientes al mismo género que pueden ayudar en el proceso de mejoramiento (G.J.Pringle, 1991).

### **1.1.1. Importancia económica**

El tomate de árbol es un cultivo económicamente importante en los países andinos como Ecuador, Colombia y Perú. Entre los países productores se cuenta a Colombia, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, California (EE.UU.), India, Sri Lanka, entre otros. Según estudios de prefactibilidad desarrollados por SICA en el 2004, el cultivo de tomate de árbol ha ido en aumento en los países Andinos. En registros de Ecuador y Colombia se ha visto un aumento significativo de la superficie cultivada, (SICA, 2004).

Particularmente en Ecuador, por ejemplo, desde 1991 al 1998 se registró una duplicación en el área cultivada y producción. Siendo ésta de 1 020 ha. en 1991 y 2 287 ha. en 1998. En Colombia del 1995 al 2004 la superficie aumentó de 5,602.4 a 7,047.8 ha. (IICA, 2005).

Antiguamente las principales zonas de cultivo de tomate de árbol en el Ecuador fueron Patate y Baños. En la actualidad con el incremento en la demanda interna y para la exportación, el cultivo se ha ido extendiendo a toda la serranía ecuatoriana. De acuerdo al estudio realizado por Esteban Cadena dentro del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador en el año 2000, en 1999 las provincias que más superficie dedicaban al

cultivo de este frutal eran Tungurahua con un 39.2 %, Chimborazo 22.2 %, Azuay 14.1%, Pichincha 10%, e Imbabura 4.8 %. Ecuador empezó con la exportación de tomate de árbol en la década 80's pero hasta ahora sin lograr ampliar el mercado de exportación considerablemente. Una de las razones principales es que no se produce un fruto de color homogéneo, de buen tamaño, apto para la exportación (heterogeneidad en los cultivos). Otra desventaja es la presencia de la mosca de la fruta en las zonas de cultivo de este producto, lo que impide su exportación a Estados Unidos (SICA, 2004).

En Nueva Zelanda, el cultivo de tomate de árbol se introdujo al principio de 1800 y después de esta fecha han existido una serie de reintroducciones (Lewis.1999). El cultivo para fines comerciales, usando una variedad mejorada con material proveniente de Loja- Ecuador, empezó cerca de 1920 y siguió en aumento hasta llegar a un pico de 2000 toneladas por año en 1967. Para 1993 Nueva Zelanda seguía produciendo 2000 toneladas al año, sembrando en una superficie de 200 ha., sin embargo para 1999 el área cultivada aumentó a 300 ha (Morton, 1987).

Colombia y los países de la Región Andina tienen una gran ventaja en el cultivo de tomate de árbol ya que el clima permite su cosecha durante todo el año. En Nueva Zelanda, Kenya y Zambia, por el contrario, la temporada de cosecha es escalonada. En el caso de Nueva Zelanda esta temporada comienza a fines de marzo, permaneciendo hasta principios de octubre, para Kenya desde finales de marzo a fines de mayo y en Zambia desde noviembre hasta el mes de marzo (Morton, 1987).

Los principales mercados que importan tomate de árbol y en los que, en la actualidad mantienen una demanda en alza son: Estados Unidos, Holanda, Canadá, Bélgica, Alemania, Suecia, Suiza, Dinamarca, Reino Unido, España y Finlandia (Cadena,

2000). Según el reporte del 2000 de SICA, Ecuador realiza la mayor parte de sus exportaciones a mercados como Suiza, Canadá, Estados Unidos y Alemania.

### **1.1.2. Problemas en el cultivo**

En Ecuador el principal problema que surge en las plantaciones de tomate es la diseminación de nemátodos debido al mal manejo del cultivo, limitando la vida útil de la planta a 3 años. Una solución a este problema, para aumentar la densidad de plantas por ha., y su vida útil es el uso de injertos. El tabaquillo, *Nicotiana glauca*, es la especie más usada para este propósito (Cadena, 2000).

Entre las principales enfermedades de este cultivo están varios tipos de hongos, como es el caso de *Erysiphe* sp. y *Oidium* sp. que se observa más frecuentemente y pueden causar la defoliación de la planta; cinco tipos de insectos, como pulgón (*Myzus* sp., *Aphis* sp.), chinches (*Leptoglossus zonatus*) y gusano trozador (*Spodoptera* sp.). En el caso de infecciones por virus, *Solanum betaceum* es muy sensible, siendo afectado principalmente por el virus de mosaico del pepino (CMV), de la papa (PAMV), Arabis (ArMV), y Tamarillo (TaMV), en estos casos, los efectos en la planta no son visibles si el cultivo es realizado en una zona con una temperatura mayor a 20°C, donde las consecuencias son una disminución en la cantidad de fruto y su calidad (SICA, 2004).

### **1.1.3. Determinación de variedades**

Para el propósito de este estudio, es importante definir el término “variedad” el cual se usa frecuentemente pero sin un completo entendimiento. Tal es así que muchos agricultores y agrónomos hablan de variedades refiriéndose principalmente a las

características del fruto, la mayoría de veces sin prestar demasiada atención a otros caracteres morfológicos de la planta (Albornoz G. 1992). En cuanto a la determinación de una variedad agrícola, sesenta y tres países alrededor del mundo, incluyendo al Ecuador, forman parte del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales UPOV (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, por sus siglas en inglés), por el cual la determinación de una variedad agrícola se basa en pruebas, descritas en detalle en el convenio, que establezcan sus diferencias, su uniformidad y su estabilidad o DUS (Distinctness, Uniformity and Stability, por sus siglas en inglés). En la actualidad este proceso para comprobar la autenticidad de una variedad no consta de pruebas a nivel molecular, pero ya se está creando normas para pruebas realizadas con marcadores moleculares (UPOV, 2007).

Marcadores moleculares tales como AFLPs se están probando al momento para la distinción entre variedades, tenemos por ejemplo el caso de la remolacha o *Beta vulgaris*, en la cual se demuestran desventajas al momento de usar estos marcadores como herramienta para comprobar la homogeneidad y estabilidad “DUS testing”, debido a la dificultad para la comparación de resultados obtenidos con las diferentes técnicas ( J. De Riek, 2000). En un estudio comparativo de técnicas morfológicas vs. técnicas moleculares en césped inglés (*Lolium perenne*), se obtuvo resultados similares con las dos técnicas, aunque cada una midió de forma distinta la similitud entre variedades. Ésta medición distinta de similitud dificultaría la comparación entre estudios, sobretodo entre la técnica morfológica y las técnicas moleculares (SSR, RAPD y AFLP) (Roldan I., 2001). Otro estudio realizado en tomate riñón, (*Lycopersicum esculentum*), con dos tipos de marcadores SSR y AFLPs, encontró que éstos podían diferenciar entre variedades



cercanamente emparentadas, y que el uso de los dos marcadores en conjunto puede ayudar a una determinación más precisa de las variedades (Martinez S., 2006).

Para *Solanum betaceum*, el número de variedades existentes en Ecuador difiere de acuerdo a la fuente consultada, y la clasificación se basa principalmente en características fenotípicas del fruto. Según un reporte del SICA y en el estudio de prefactibilidad para el cultivo de tomate de árbol realizado por el Ing. Esteban Cadena de la misma organización, en Ecuador existen cinco variedades reconocidas y producidas: tomate de altura o negra, tomate redondo, tomate mora, amarillo, y tomate puntón.

Un estudio más detallado realizado en el Ecuador por el Ing. Guillermo Albornoz de la Universidad Central en 1992, toma en cuenta otros caracteres morfológicos de la planta, como son copa, brote apical o terminal del árbol, lámina foliar, características de las flores e inflorescencias, frutos, semillas, días de madurez fisiológica y altura de la planta. En este último estudio se distinguen cinco supuestas variedades originarias del Ecuador y una proveniente de Nueva Zelanda.

Según Albornoz (1992), en el Ecuador actualmente existen dos variedades, similares a las que debieron ser las primeras plantas de tomate de árbol domesticadas, su similitud se debe a la gran semejanza de sus frutos con aquellos de las plantas silvestres. Estas variedades son: la amarilla y la negra, o tomate de altura que proviene de Loja y del Norte de la sierra ecuatoriana. La tercera variedad se distingue por su fruto de mejores características para el consumo como son color y sabor de la pulpa y mucílago, llamada “Criollo” o tomate de árbol, ya que su color la asemejaba a otro fruto de la familia Solanacea, *Lycopersicum esculentum*. Esta tercera variedad, debido a efectos de domesticación y mutación se dividió en dos subvariedades, el puntón y el redondo (por la

forma del fruto). Finalmente, la que vendría a ser una quinta variedad, es la denominada roja; según este estudio debe ser de origen posterior a las antes nombradas, y proviene de Tungurahua. Posiblemente sea el resultado de un cruce entre la variedad negra que sería la donadora del ovulo, y una de las otras variedades anteriormente nombradas.

En esta investigación es importante notar que las variedades recolectadas en el campo no son las anteriormente nombradas, sino las variedades que distingue el agricultor y que se encuentra en sus cultivos. Estas variedades son la combinación de dos caracteres del fruto: color (amarillo o morado) y forma (ponton, gigante o bola), dando como resultado un total 6 posibles variedades. Estas son: amarillo puntón, amarillo gigante, amarillo bola, morado puntón, morado gigante y morado bola.

## **1.2. Técnicas moleculares**

### **1.2.1. Técnicas y Usos**

El descubrimiento de técnicas moleculares, como también en un inicio el uso de marcadores isoenzimáticos, revolucionó el estudio de la genética e hizo factible el mejoramiento de plantas importantes tanto para la agricultura como también a nivel económico. Antes del descubrimiento de estas técnicas, la mayoría de estudios genéticos y mejoramiento, se realizaba en base a características fenotípicas.

Las limitaciones de los marcadores fenotípicos son muchas, entre ellas la poca diferenciación dentro de un mismo linaje, lo que reduce la probabilidad de una asociación con genes de interés agronómico y económico, además su uso era restringido a pocas especies de plantas como son el maíz, el tomate o el arroz (Grattapaglia D., 2000).

Actualmente existe una gran variedad de marcadores moleculares, cada uno con sus ventajas y limitaciones, y su uso se ha extendido a todas las especies de plantas con distintas aplicaciones. Los marcadores iniciales que identificaron variabilidad directamente en el nivel del ADN fueron los RFLPs (Restriction fragment length polymorphism, por sus siglas en inglés) y los marcadores basados en *Loci* hipervariables de minisatélites (Grattapaglia D., 2000).

Los marcadores RFLPs se basan en la utilización de enzimas de restricción. Estas permiten la búsqueda de variabilidad (polimorfismo) mediante la observación de la longitud o peso de los fragmentos cortados e hibridados con sondas específicas, al correr las muestras en un gel. Este polimorfismo es producto de las mutaciones, inserciones, deleciones, translocaciones o inversiones dentro de la secuencia de reconocimiento de la enzima, que es aproximadamente de 4 a 8 pares de bases, lo que evita que la enzima reconozca y corte; o también dentro del fragmento, entre un corte enzimático y otro, que cambiará la longitud del fragmento final, diferenciando así al individuo. Una de sus mayores ventajas, comparado con el uso de isoenzimas, es que se logra cubrir extensamente el genoma, por lo tanto, hay más posibilidades de que alguno de estos marcadores esté ligado a un gen de interés (Grattapaglia D., 2000). Finalmente, la limitación más importante es la limitada disponibilidad de una biblioteca de sondas y la dificultad al construirlas, que por lo general lleva meses de trabajo (IPGRI, 2003), especialmente en especies locales por no ser de importancia mundial.

La generación más nueva de marcadores moleculares está basada en la PCR (polimerase chain reaction, por sus siglas en inglés). Esta tecnología fue desarrollada a mediados de la década de los 80 por Kary Mullis. Las ventajas que brinda la PCR al

análisis y estudios genéticos son varias, algunas de estas son la facilidad, sensibilidad y rapidez de la técnica que hizo que muchos de los métodos antiguos de secuenciación, clonación y análisis aceleraran su paso y en otros casos que fueran sustituidos. Entre los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa están; RAPDS, SSR, AFLPs (Grattapaglia D., 2000).

La técnica de RAPDS ( random amplified polymorphic DNA, por sus siglas en inglés), es una de las primeras aplicaciones desarrolladas gracias al descubrimiento de la PCR. Se basa en el uso de primers de secuencia arbitraria que amplifican segmentos del genoma en regiones de ADN repetitivo, tanto como en regiones de copia única, lo que le diferencia y le da ventaja sobre la técnica de RFLPs (Grattapaglia D., 2000).

Los RAPDs son marcadores dominantes, esto quiere decir que solo un alelo es detectado (aparece como banda), lo que hace imposible la identificación de individuos heterocigóticos que no podrían ser discriminados. Las limitaciones de los RAPDS son básicamente la dificultad de reproducir los resultados y su limitado uso para el análisis entre individuos genéticamente distantes (Grattapaglia D., 2000; IPGRI, 2003).

Con la automatización de las técnicas de secuenciación, el uso de la PCR para la amplificación y clonación, la capacidad de clonar fragmentos más grandes utilizando cromosomas artificiales como YACs y BACs, se pudo convertir a las técnicas de RFLPs y RAPDs en marcadores basados en PCR específicos. Con los RFLPs por ejemplo, los extremos de las sondas (genómicas o cADN) utilizadas para los RFLPs, pudieron ser secuenciadas con el objetivo de crear pares de primers que permitan recuperar los segmentos polimórficos, recuperando así segmentos génicos. A este tipo de marcadores se les dio el nombre de STS ( sequence tagged sites, por sus siglas en inglés) (Grattapaglia

D., 2000). Para los RAPD la conversión fue parecida a la realizada con RFLPs, y a estos marcadores se les dio el nombre de SCARs (sequence characterized amplified regions, por sus siglas en inglés), (Grattapaglia D., 2000).

Los microsatélites o SSR (simple sequence repeat) son secuencias repetitivas de 1 a 4 nucleótidos, distribuidas a lo largo del genoma. Mucho más polimórficas que las secuencias minisatélites. En plantas, la distribución de las regiones de microsatélites se da con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases, siendo el dinucleótido más común AT (Morgante & Olivieri, 1993). En la actualidad los SSR son comúnmente utilizados para la elaboración de mapas genéticos y diferenciación de variedades (IPGRI, 2003).

La técnica funciona amplificando, por medio de la PCR, secuencias sencillas repetidas, usando un par de primers específicos de 20 a 30 pares de bases, complementarios a las secuencias específicas que flanquean el microsatélite. Cada región microsatélite es blanco de inserciones y deleciones de la secuencia repetida (AT, por ejemplo), lo que hace a estos sitios altamente polimórficos o “multialélicos”. Se ha visto que el nivel de heterogeneidad de estas regiones es mayor a 0.7 % (IPGRI, 2003).

La característica multialélica y su expresión codominante permite a estos marcadores ser los más potentes para encontrar polimorfismo en un locus específico. Por esta razón son ideales para el mapeamiento genético, para discriminar genotipos, o para estudiar genética de poblaciones. Otra de las ventajas de este tipo de marcador es que los sitios donde se ubican los microsatélites son conservados entre especies y géneros relacionados, haciendo posible su transferencia (Grattapaglia D., 2000).

La limitación más importante de los marcadores microsatélites, es la gran cantidad de trabajo requerida para poder producir los primers específicos, siendo así

limitado su uso a especies vegetales en las que se tiene un mayor conocimiento sobre su genoma, como es el caso de especies como el trigo, tomate, o el arroz. Otra limitación en cuanto a estos marcadores es el bajo número de locus que pueden ser mapeados. En casos como la determinación de variabilidad en poblaciones pequeñas, o que simplemente tienen baja diversidad, los microsatélites serían de poca ayuda, como lo muestra el estudio comparativo de microsatelites y AFLPs hecho por Campell en 1991.

### **1.2.2. Marcadores AFLPs**

La tecnología más reciente y que fue el producto de todos los avances y anteriores metodologías, es la de los AFLPs (Amplified fragment length polymorphism, por sus siglas en inglés). Esta técnica se convirtió en la más efectiva para la obtención de un gran número de marcadores de locus independientes no específicos (Incirli, 2000).

Básicamente la tecnología de AFLPs combina la técnica de RFLPs y el concepto de los marcadores RAPDs, dándole así ventajas sobre estas dos técnicas (IPGRI, 2003). Según (Zabeau, M., 1993), la tecnología de AFLPs consta de cuatro etapas.

En la primera, el ADN es digerido por dos tipos de endonucleasas, una de corte frecuente que tiene un sitio de restricción de 4pb, y una de corte raro con un sitio de restricción de 6pb. Como resultado se obtienen fragmentos de un tamaño promedio menor a 1kb. En la segunda etapa, adaptadores de doble cadena son ligados a los bordes de los fragmentos, estos servirán como sitio de reconocimiento para los primers que van a ser usados en la amplificación y van a hacer posible amplificar a estos fragmentos sin necesidad de conocer su secuencia. La tercera parte, también llamada preamplificación, se basa en la utilización de primers que contengan en su extremo 3' un nucleótido

escogido al azar, que permita seleccionar un determinado grupo de fragmentos. Por último, se escogen dos primers, cada uno con tres nucleótidos al azar en su extremo 3', y se hace una amplificación para seleccionar un nuevo grupo, más reducido, de segmentos. Esta última amplificación lleva el nombre de amplificación selectiva y los productos de la reacción son los que serán analizados.

En la actualidad los marcadores desarrollados por la técnica de AFLPs tienen diversas aplicaciones. Como su primer uso está la gran cantidad de marcadores obtenidos de una sola combinación de primers, los que permiten observar algo parecido a una huella digital, la identidad de la muestra, llamada también un "Finger print". Estos fingerprints del ADN, a su vez, sirven para ser comparados con otros y así ver la relación o cercanía evolutiva entre las accesiones (Nuez F., 2000).

La aplicación específica de lo anteriormente descrito se puede ver en diferentes estudios fenéticos entre especies, así como dentro de éstas (entre cultivares, por ejemplo). Una publicación que llama la atención al respecto trata sobre la relación fenética entre especies relacionadas a la yuca, (*Manihot esculenta*). Esta fue determinada con la ayuda de la técnica de AFLPs y logró no solo agrupar a las distintas variedades y determinar su variabilidad dentro de cada especie, sino también comprobar cuales fueron los ancestros de la yuca que hoy en día es cultivada (Roa A.C., 1997).

La posibilidad de comprobar cuáles fueron los ancestros de la yuca, nos indica el poder resolutivo de esta técnica, que puede ser útil entonces, para estudios de determinación de flujo génico (Coulibaly S, 2002). Otra indicación de la efectividad de esta técnica, es su aplicabilidad para encontrar variabilidad dentro de una especie, y agrupar a distintas variedades y genotipos. La técnica de AFLPs es muy importante en

casos de escasa variabilidad, ya que permite “encontrar” diferencias, para poder seleccionar los genotipos de interés en el caso que se esté mejorando un cultivo (Amer J., 2005).

Otro uso de la tecnología AFLPs es la creación de mapas de ligamiento. Para esto, una población segregante de individuos será examinada, con los marcadores ligados a genes que se obtengan mediante AFLPs y observando la frecuencia de segregación de los marcadores, determinando así su localización en los distintos cromosomas. Esta técnica sobrepasa a otras, principalmente para investigaciones en plantas que no tengan un alto polimorfismo a nivel de su ADN, o para especies que no hayan sido anteriormente estudiadas y de las que no se tenga suficiente información respecto de su genoma (Nuez F., 2000).

Entre sus limitaciones más importantes está la característica dominante de los marcadores AFLPs, es decir que solo es posible visualizar un alelo por locus, las demás variaciones se las toma como alelo nulo, por lo que se obtiene poca información por locus. Otra limitación se da por la cantidad de pasos que implica la metodología en sí hasta llegar a los resultados, esto genera sitios donde puedan introducirse errores (Grattapaglia D., 2000).

Es necesario agregar que para este tipo de técnica es muy importante la concentración, calidad del ADN y ausencia de inhibidores en la muestra, ya que esto influye en las siguientes etapas como son; restricción enzimática, ligación y PCR. En caso de fallar alguno de estos pasos, los fragmentos obtenidos van a ser diferentes y serán erróneamente analizados como polimórficos (Zabeau, M., 1993).



### 1.2.3. Comparación con otras técnicas

Comparado con otras técnicas, los marcadores AFLPs han presentado algunas ventajas. Un estudio realizado en césped inglés (*Lolium perenne*) muestra diferencias en los resultados obtenidos con relación al estudio de variedades de esta especie, usando marcadores moleculares (STS, AFLPS) y marcadores morfológicos (Roldán Ruiz, 2001).

La mayor diferencia encontrada en este estudio fue la forma en que se llegó a agrupar a las variedades, ya que los datos medidos por cada técnica eran distintos. Estas diferencias fueron más evidentes entre los marcadores morfológicos con relación a los moleculares, donde solo las variedades muy cercanamente relacionadas o muy alejadas, se agruparon de manera similar. Estos resultados son principalmente importantes el momento de la aplicación de estas técnicas para registros de variedades, en el que no va a ser posible comparar entre las variedades asignadas si éstas son determinadas por distintos métodos (Roldán Ruiz, 2001).

En comparación con los marcadores RAPDs, la técnica de AFLPs ha presentado una gran ventaja. En un estudio genético en el cual se utilizaron AFLPs y RAPDs con el objetivo de compararlos, se utilizó variedades muy cercanas y fenotípicamente idénticas de la especie *Theobroma cacao*, obteniéndose mejores resultados mediante la técnica de AFLPs que no solo pudo distinguir entre variedades de cacao, sino que reveló variabilidad dentro de cada variedad, lo que no se pudo obtener mediante RAPDs. (Perry et al, 1998). Marianna Hagidimitriou et al.(2005), obtuvo un resultado similar comparando RAPDs, AFLPs y marcadores morfológicos.

Otra de las ventajas que brinda el método de AFLPs, esta vez comparándolo con los microsatélites, es su facilidad para escanear un número mayor de loci en busca de

diferencias. Esto le da una ventaja en cuestión de tiempo, al obtener los datos suficientes para una muestra estadísticamente aceptable (Campbell, 1991). Lo anteriormente expuesto se puede observar en aplicaciones concretas. Un ejemplo interesante, ya que nos incumbe en el este estudio, es la asignación de individuos a poblaciones o variedades.

De hecho, Bernatchez y Duchesne (2000) comprobaron que para asignar individuos a poblaciones es más importante aumentar el número de loci analizados que obtener un mayor número de alelos por locus, (este último es el caso de los microsatélites). En la publicación realizada por Campbell (1991) se comprueba que la información que se llega a obtener con 6 microsatélites puede ser similar en valor a la información de un par de primers usando AFLP's. Esta diferencia de los AFLPs vs. SSR hace a los primeros más interesantes para especies en las cuales no se tiene mucha información genética y no se han desarrollado una cantidad suficiente de primers específicos.

Es importante también notar que estas dos técnicas pueden complementarse en diferentes aplicaciones. Garcia Martinez S., en un estudio realizado en el 2006, muestra un interesante estudio en variedades Españolas de *Solanum lycopersicum* con limitada variación genética. En éste se demuestra que el uso en conjunto de SSR y AFLPs logra diferenciar a todas las variedades estudiadas, lo que no hace ninguna de las dos técnicas por separado. El poder de discriminación y la robustez de los fenogramas alcanzados por las dos técnicas fueron similares. Esta complementariedad entre las dos técnicas se logra principalmente por que los dos tipos de marcadores se dirigen a sitios distintos del genoma, ofreciendo así una búsqueda más amplia de diferencias.

En este estudio se utilizó la técnica AFLP con el propósito de conocer, de manera general, el nivel de variabilidad genética, tanto inter como intra varietal, que existe dentro de las variedades de cultivo de *Solanum betaceum* en el Ecuador.

## **2. Objetivo General**

- Determinar la variabilidad genética intra e inter varietal entre las seis variedades de tomate de árbol cultivadas en el Ecuador.

## **3. Objetivos específicos**

- Establecer un buen protocolo de extracción de ADN, Amplificación de AFLPS y tinción con Plata.
- Obtener Fingerprints de cada muestra de las 6 variedades de Tomate de árbol.
- Poder diferenciar a nivel molecular las muestras de las distintas variedades y tener una idea de la variabilidad existente.

## **4. Justificación**

Hay dos razones principales para el desarrollo de esta investigación. La primera es el conocer más sobre la variabilidad de nuestros cultivos con el objetivo de desarrollar estrategias de conservación y evitar la erosión genética de éstos, principalmente para las especies o variedades locales. En el caso del tomate de árbol específicamente, el conocimiento acerca de su variabilidad genética entre las distintas poblaciones existentes en el Ecuador y entre las supuestas variedades no es suficiente; de hecho este es uno de los primeros estudios realizados a nivel molecular, en el que se trata de medir la variabilidad existente.

La segunda razón por la cual se realizó este estudio es su importancia a nivel agronómico. El agricultor en un futuro cercano va a necesitar diferenciar de manera clara las variedades que va a cultivar, ya sea por el uso posterior que se le va a dar al fruto cosechado (cada variedad del tomate sirve para distintos fines), como para obtener variedades que puedan cumplir con los estándares de calidad requeridos por el mercado, o simplemente para mejorar la producción total de sus tierras, es decir para que exista más homogeneidad en el cultivo y que éste sea de la variedad requerida.

Por otro lado, también es muy importante notar que los estudios sobre variabilidad a nivel genético son el primer paso en el camino a mejorar una especie con fines agronómicos y económicos. El conocer los genotipos existentes y saber, a largo plazo, los genes ligados a caracteres de interés agrícola va a permitir una selección más rápida y consciente de las variedades. Esto último y en consecuencia, la mejor selección de las variedades para el cultivo va a beneficiar al país, no solo en el momento de proteger sus recursos genéticos sino también en el ámbito económico, ya que la mejor producción de nuestras tierras y la mejora del producto que se obtiene va a permitir aumentar la exportación y abrir más puertas en el mercado exterior.

Este estudio constituye un primer paso para el conocimiento a nivel molecular del tomate de árbol, permitiendo determinar la variabilidad genética existente en esta especie en el Ecuador, a la vez que tratará de aclarar la clasificación de las posibles variedades, que se identificaron en anteriores estudios con técnicas morfológicas.

## **5. Área de Estudio**

La realización de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal; Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales; Cumbayá- Ecuador. La recolección de las muestras se realizó en cultivos de tomate de árbol de las provincias de Imbabura, Pichincha y Tungurahua.

## **6. Materiales, Reactivos y Equipos**

### 6.1 Material Vegetal:

Se recolectaron frutos maduros de tomate de árbol de las seis variedades existentes en los cultivos del Ecuador; amarillo puntón, amarillo bola, morado gigante, morado puntón, morado bola, y amarillo bola. Estos frutos se obtuvieron de diferentes cultivos en las provincias de Pichincha, Tungurahua e Imbabura.

#### 6.1.1 Esterilización de semillas de tomate de árbol

- Solución de etanol al 70%
- Solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %
- Agua destilada estéril
- Tween 20

#### 6.1.2. Medios para el cultivo y germinación de semillas

- Medio MS (Murashige y skoog, 1962) 30g/L de sacarosa, 7 g /L de agar y pH 5.8

### 6.2. Extracción del ADN de tomate de árbol

- CTAB 2X
- B-mercaptoetanol (10ul/ml de CTAB)
- Cloroformo/ alcohol isoamílico 25:1

- Isopropanol
- Etanol al 76%
- Buffer TE (Tris 10mM, 1mM EDTA estéril, pH 7.5)

#### 6.2.1. Cuantificación de ADN

- Espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraespec 2000*
- Celda de cuarzo
- Agua destilada

#### 6.3. Kit de amplificación AFLP® Invitrogen™

##### 6.3.1 Restricción y Ligación

- 5X reaction buffer
- DNA de la muestra (100ng/ul)
- EcoR 1/Mse1
- Agua destilada
- Solución de ligación con adaptadores
- T4 DNA ligasa
- Centrífuga Eppendorf 5415D

##### 6.3.2 Reacción de preamplificación

- DNA de tomate de árbol
- PRE-AMP PRIMER MIX
- 10x PCR buffer plus Mg
- Taq DNA polimerasa

- Termociclador Biometra Biometra T *personal*

### 6.3.3 Reacción de amplificación selectiva

- primer EcoR1
- primer Mse1
- 10X PCR buffer plus Mg,
- Taq DNA polimerasa
- DNA de la muestra

### 6.4. Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa 1%
- Bromuro de etidio (EtBr) (0.025ul de Et Br/mL del gel de agarosa)
- Cámara de electroforesis *Horizontal EC Apparatus Cooperation Maxicell EC-360*
- Transimulador Vilber Lourmat TFX 35M
- Cámara digital Kodak DC290 *Zoom*
- Software Kodak 1D
- Fuente de poder EC- Apparatus Cooperación EC20607 Series 90

### 6.5. Electroforesis en gel de acrilamida

- Fuente de poder BIORAD *Powerpac HV<sup>TM</sup>*
- Cámara de electroforesis Vertical BIORAD *Sequi-Gen GT Sequencing cell*
- Poliacrilamida al 6%

- Persulfato de amonio al 1%
- TEMED
- Ladder 100bp Invitrogen
- Buffer de carga (glicerol)
- Repel
- Silane sianol
- TBE 1X

## 6.6. Tinción en plata

### 6.6.1. Protocolo de Promega

#### 6.6.1.1. Solución fijadora y Parada

- Ácido Acético 200ml en 1800 de agua destilada

#### 6.6.1.2. Solución de Plata

- Nitrato de Plata 2gr
- Formaldehído 37% 2.57ml
- Agua Deionizada 2000ml

#### 6.6.1.3. Solución reveladora

- Carbonato de Sodio 105gr
- Formaldehído 4.5gr
- Tiosulfato de Sodio 0.0371%
- Agua Deionizada 3500ml



## 6.6.2. Protocolo mejorado por Halima Benbouza, et al., 2006

### 6.6.2.1. Solución fijadora y parada, 2000ml

- Etanol al 10%,
- Acido acético al 0.5%

### 6.6.2.2. Solución de plata, 1000ml

- Nitrato de plata 1,5gr
- Formaldehido al 37% 1,5ml

### 6.6.2.3. Solución reveladora, 1000ml

- NaOH 15gr
- Formaldehido 2ml

## 6.7. Análisis de resultados

- NTSYSpc 2.11
- matrices de similitud; coeficientes de Dice y Nei
- Phenogramas; SAHN, Neighbor Joining

## 7. Metodología

### 7.2. Esterilización de semillas de tomate de árbol

Para la extracción de semillas, los frutos recolectados se partieron y se extrajo las semillas, las cuales posteriormente fueron lavadas en agua y se las dejó secar un día entero sobre papel toalla.

Las semillas fueron separadas por variedad y por individuo. El proceso de esterilización comenzó sumergiéndolas por 5 minutos en un vaso de precipitación con

etanol al 70%. Seguidamente se las lavó en agua destilada estéril y se las volvió a sumergir durante 20 minutos esta vez en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% a la que se adicionó cuatro gotas de Tween 20. Posteriormente, las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril cuatro veces, para asegurar que no queden residuos de hipoclorito de sodio.

### **7.2.1. Cultivo in vitro de tomate de árbol**

Las semillas fueron colocadas en frascos estériles que contenían medio MS (Murashige y skoog, 1962) con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar a pH 5.8. El número de semillas por frasco fue de 6 a 7.

Durante el proceso de germinación y crecimiento, las semillas estuvieron en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Después de germinadas se esperó hasta que las plantas tengan un tamaño de más o menos 4 cm. y se los subcultivó en medio MS (Murashige y skoog, 1962) igual al anteriormente descrito, cumpliendo con el objetivo de obtener hojas grandes para la extracción de DNA en un lapso de 5 semanas en promedio.

### **7.2.2. Nomenclatura de individuos obtenidos por variedad**

La nomenclatura usada para las muestras indica la provincia y la variedad a la que pertenece la muestra. La nomenclatura se indica en la Tabla 1.

## 7.2. Extracción de DNA de tomate de árbol

Se tomó hojas grandes y jóvenes, provenientes del cultivo in vitro de 26 plantas pertenecientes a las seis posibles variedades cultivadas en el Ecuador. El material vegetal (aproximadamente dos hojas por planta) se maceró en un mortero con 800 ul de CTAB hasta obtener una solución con pocos fragmentos de la hoja que se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5ml, adicionando 8 ul de b-mercapto etanol. Seguidamente, se llevó a las muestras contenidas en cada eppendorf al baño de arena, cuya temperatura era de 62°C, por un tiempo de una hora, agitando cada 15 minutos.

Después de este tiempo se adicionaron 500 ul de cloroformo/ alcohol isoamilico 25:1 y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea, dejándolo reposar por 20 minutos. Al finalizar los 20 minutos se procedió a centrifugar las muestras a una velocidad de 13.000 rpm por 20 minutos, obteniendo al final la separación en tres fases: una fase verde densa en la parte inferior, una blanca y una transparente en la parte superior de la mezcla.

A continuación, con una micropipeta se extrajo la fase transparente y se la transfirió a otro eppendorf con el objetivo de adicionar un volumen de isopropanol y agitar hasta que los hilos de DNA sean visibles y puedan ser separados. Por último, el pellet de DNA fue separado con la punta de una micropipeta y transferido a otro eppendorf, donde se lavó tres veces con etanol al 76%/ 0.2M de Acetato de Sodio, 76% alcohol/10mM Acetato de amonio y alcohol al 70% respectivamente. El pellet lavado se dejó secar a temperatura ambiente hasta que todo el alcohol se hubiere evaporado y se resuspendió en 70ul de TE estéril.

### 7.2.1 Cuantificación y dilución del DNA en cada muestra

El DNA fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Pharmacia Biotech *Ultraespec 2000*. Se utilizó como blanco 3ml de agua destilada y se prosiguió a medir la absorbancia adicionando, 5ul del DNA de la muestra a los 3 ml de agua dentro de la cubeta de cuarzo. Este proceso fue realizado con cada muestra y los valores anotados para el cálculo de la concentración y posterior dilución se pueden ver en la Tabla 2.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$A * 1/FD * 50ng/ul = [ADN \text{ ng/ul}]$$

Donde FD es el factor de dilución.

De las concentraciones de ADN obtenidas en cada una de las 26 muestras de tomate de árbol, se realizaron diluciones para que la concentración final sea 100ng/ul. Tabla 2.

### 7.3. Amplificación AFLP

El proceso se realizó de acuerdo al manual del Kit de AFLPs, con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

#### 7.3.1. Restricción y ligación

La restricción se realizó con 2ul EcoR1/Mse1, que se adicionaron a 5ul de la muestra diluida, 5ul del buffer de reacción y 13 ul de agua destilada estéril, en un eppendorf de 1.5ml. Esta mezcla se centrifugó por pocos segundos y se llevó a una incubadora por 2 hrs a 37°C. Luego de este periodo se pasaron las muestras a un baño de arena a 70°C por 15 min., logrando así la desactivación de las enzimas. Por último, las

muestras se pusieron en hielo y se centrifugaron nuevamente antes de ser guardadas en una congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El siguiente paso fue la ligación de los adaptadores en las muestras anteriormente cortadas. A la muestra de ADN previamente cortada con las enzimas EcoR1 y Mse1, se le adicionaron 24  $\mu\text{l}$  de la solución de adaptadores proveniente del Kit de AFLPs y 1  $\mu\text{l}$  de T4 ADN ligasa, centrifugando por pocos segundos. Como paso final, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por una hora y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **7.3.2. Preamplificación**

Para la preamplificación de las 26 muestras de DNA de tomate de árbol se siguió los pasos especificados en el manual del Kit, con las siguientes modificaciones: en un tubo de microcentrífuga de 0.2 ml. se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  de la muestra anteriormente ligada con adaptadores, 40  $\mu\text{l}$  de la solución *Preamp primer Mix1*, 5  $\mu\text{l}$  del buffer 10x para PCR y 1  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa. El PCR para la preamplificación se realizó según el manual del Kit de AFLP.

### **7.3.3. Amplificación selectiva**

Para la amplificación selectiva se usaron ocho combinaciones de primers, (ver Tabla 3) junto con las 26 muestras anteriormente preamplificadas. La reacción por cada muestra contenía 5  $\mu\text{l}$  de la solución que contenía a los primers, 10  $\mu\text{l}$  de la solución que contenía a la polimerasa y 5  $\mu\text{l}$  de la muestra específica preamplificada. El ciclo del PCR fue igual al descrito en el manual del Kit de AFLP de Invitrogen.

#### **7.4. Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa sirvió para la comprobación de los resultados obtenidos en cada una de las etapas del proceso de AFLPs, como también, para elegir los pares de primers con mejores resultados en el momento de la amplificación selectiva utilizando una muestra de tomate de árbol.

El gel fue preparado a 1% de agarosa en 100ml de TBE 1X. A esta solución se la calentó en un microondas hasta punto de ebullición y se dejó enfriar hasta que la temperatura fue suficientemente tolerable al contacto con la mano, sin dejar que se solidifique, y se adicionó 5ul de Bromuro de Etidio por cada 100ml de gel. Como paso final, al gel se dejó solidificar en el molde de electroforesis *Apparatus Corporation Maxicell* junto con los peines que forman los posillos, por un periodo de media hora.

Se colocó cinco microlitros de las muestras en cada posillo del gel, previamente mezclada con 2ul de buffer de carga, y se corrió durante dos horas a 80 V. La foto del gel fue tomada con la cámara digital Kodak DC 290 Zoom.

#### **7.5. Electroforesis en gel de acrilamida**

Los productos de la amplificación selectiva de cada una de las muestras con los diferentes pares de primers se analizaron en geles de poliacrilamida. Para la preparación del gel se usó 100ml de poliacrilamida al 6%, 120ul de TEMED y 600 ul de Persulfato de Amonio al 10%. Esta mezcla fue inyectada entre los dos vidrios de la cámara de electroforésis BIORAD a una velocidad constante. Es importante que estos vidrios hayan sido limpiados previamente con alcohol y cubiertos con los respectivos reactivos, en el

caso del vidrio al que va a pegarse el gel será cubierto con Bind silane y el otro con Repel.

Antes de cargar cada muestra en el gel se adicionó a éstas 15 ul de buffer de carga y se desnaturalizó con ayuda del Termociclador *Biometra*, a una temperatura de 95°C por 5 minutos. Cada posillo del gel llevó 5ul de la muestra respectiva y se utilizó 1ul de Ladder 100bp de Invitrogen en una relación de 1:3 con el buffer de carga, y se lo cargó en los dos extremos del gel. El gel se corrió de 85 a 100 voltios en el transcurso de 2 horas y media, a una temperatura de 45 a 50°C.

#### **7.6. Tinción con plata**

Para la tinción del gel de poliacrilamida, se usaron los protocolos de Promega, y el protocolo de Benbouza H. del 2006, este último sin ninguna modificación.

Para el protocolo de Promega, las modificaciones y el proceso de ensamblaje de la cámara se pueden ver en la Tabla 4.

#### **7.7. Selección de primers**

La selección de los primers para el análisis de la totalidad de muestras, se realizó probando 44 combinaciones de primers sugeridas en el manual del Kit AFLP de *Invitrogen*, en una muestra de tomate de árbol del tipo “amarillo”. La calidad de cada par de primers, se determinó observando el producto de amplificación en un gel de Agarosa al 1%.

## 7.8. Análisis de datos

Como primer paso para el análisis, las bandas observadas mediante tinción con plata de los geles de poliacrilamida se transformaron a datos binarios y se construyeron tablas o MBDs (matrices básicas de datos). Más en detalle, las bandas con buena resolución, es decir en las que se pudieron identificar claramente su ausencia o presencia y su tamaño promedio, se las registró como (1) presencia o (0) ausencia y esos datos fueron ingresados en una tabla de Excel. Esta tabla constaba con el número de marcadores (bandas del mismo peso) obtenidas por par de primers en cada fila y el nombre de la variedad e individuo ubicados en las columnas (Tabla5).

Adicionalmente, se ingresó el número total de tablas, filas, columnas y bandas no identificadas con su código en la parte superior a la tabla de izquierda a derecha.

Como siguiente paso para el análisis de datos se usó el programa NTSYCpc 2.11. En este programa, todas las combinaciones de primers escogidas y cuyas matrices en Excel ya fueron obtenidas, se analizaron y transformaron a matrices de similitud mediante el uso de un coeficiente de asociación.

El coeficiente de asociación elegido para el análisis de cada combinación de primers fue el coeficiente de Dice. Éste coeficiente de asociación da mas peso a las coincidencias y no cuenta a las dobles ausencias como similitud. En este análisis este factor es conveniente ya que la ausencia de una banda específica puede deberse a diferentes razones (Crisci V. 1983). El análisis en conjunto de las combinaciones de primers también se realizó con el coeficiente de Nei.

El uso del coeficiente de Nei tiene ciertas ventajas que son útiles para este estudio, principalmente porque este coeficiente y su método de agrupación “Neighbor



joining” sirven para crear árboles filogenéticos asumiendo que no todos los individuos tienen la misma tasa de evolución, por lo tanto va a dar como resultado un árbol “sin raíz”, es decir, que puede contener tanto ramas positivas como negativas. A comparación de otros métodos de análisis, éste ha demostrado ser estadísticamente más consistente (Phylip3.6, 2006).

De las matrices de similitud obtenidas, con el objeto de poder visualizar de mejor manera las similitudes entre genotipos, se construyeron árboles fenéticos. En el caso de Dice, se realizó con la opción “Clustering” y dentro de ésta la opción “SAHN” (*Sequential Agglomerative Hierarchical Nesting*, por sus siglas en inglés), UPGMA (Unweighted Pair Group Method, Arithmetic averaging, por sus siglas en inglés). Con el coeficiente de Nei se utilizó en cambio la opción “Neighbor joining”.

La validez de estos últimos árboles genéticos se comprobó mediante un análisis del coeficiente de correlación co-fenético, realizado también con el programa NTSYSpc 2.11 que permite comparar la matriz co-fenética (costruida a base del fenograma), con la matriz original de la que se partió para sacar el fenograma. Dando así un valor de distorsión entre el gráfico obtenido y la matriz (Rolph F.J., 1998).

## **8. Resultados**

### **8.1. Extracción del ADN, restricción y ligación de las muestras**

La absorbancia y concentración de ADN para cada una de las muestras de tomate de árbol analizadas, se encuentran en la Tabla 2. Se pudo observar que la concentración variaba de 2850 ng/ul a 660 ng/ul, por lo que se procedió a diluir las muestras, para conseguir una concentración final aproximada de 100ug/ml en todas las muestras. Esta

concentración final se comprobó en un gel de agarosa al 1% como se puede ver en la Figura 1.

La digestión enzimática se realizó incubando 100ng/ul de ADN de la muestra con dos endonucleasas (*EcoR I* / *Mse I*) simultáneamente durante un periodo de dos horas a 37°C. El proceso de ligación de los adaptadores a los fragmentos de ADN generados durante la restricción se realizó después de la inactivación enzimática (70°C durante 15 minutos). Se mezcló el ADN digerido con 1ul de ligasa y 24 ul de la solución que contenía a los adaptadores, dejando actuar durante 2 horas a 20°C. El éxito de los dos procesos se comprobó corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1% durante dos horas a un voltaje de 80 V.

## 8.2. Selección de los primers

Los productos de la amplificación selectiva de las 44 combinaciones de primers probadas fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, donde se observó que el tamaño de los fragmentos variaba desde 800 pb a 100 pb (Figura 2).

Los pares de primers puestos a prueba, en su mayoría, mostraron productos de amplificación del ADN, y la selección de los “mejores” se realizó observando los que mostraban bandas mejor definidas y mejor distribución de éstas en el gel. Estas combinaciones fueron; 18 (M-CAA/E-AAG), 26 (M-CAC/E-ACA), 6 (M-CTG/E-ACA), 7 (M-CAA/E-ACG), 8 (M-CTC/E-ACG), 43 (M-CTG/E-ACG), 46 (M-CAC/E-ACT), 5 (M-CAT/E-ACT).

## 8.3. Técnica de AFLPs

### 8.3.1. Amplificación preselectiva

La amplificación preselectiva de las 26 muestras de ADN previamente cortado y ligado se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En todas las muestras se obtuvo un número alto de fragmentos amplificados, lo cual se evidenció en el gel por una distribución casi sin separación perceptible entre fragmentos (Figura 3).

### 8.3.2. Amplificación Selectiva

Un total de 24 muestras pudieron ser analizadas después de la amplificación selectiva, de las cuales cinco correspondieron a la variedad amarillo gigante, cinco a morado gigante, cinco al amarillo común, cinco a las variedades Bola, y cuatro a la variedad morado común o puntón.

Los resultados obtenidos en la amplificación, con cada uno de los pares de primers escogidos, se visualizaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Las bandas obtenidas pudieron ser identificadas después de la tinción con plata, viéndose más definidas con el protocolo mejorado por Halima Benbouza, et al en el 2006, que con el protocolo de *Promega* (Figura 4).

Hubo dos combinaciones de primers con las cuales se obtuvo una mayor resolución y se pudo contar de manera satisfactoria las bandas, estos fueron la 26 (M-CAC/ E-ACA) y la 18 (M-CAA/ E-AAG). En muchos casos la calidad de la tinción no permitió observar bien la definición de bandas ya que no hubo el suficiente contraste con el fondo, sobretodo con el protocolo de tinción de *Promega*. Esto disminuyó la cantidad de bandas que pudieron ser tomadas en cuenta para el análisis.

En algunos casos las bandas no pudieron ser contadas, ya que la concentración del ADN de la muestra parecía ser muy baja, por lo que no se pudo distinguir la división entre bandas, o también su ausencia o presencia. Las muestras que más problemas

presentaron fueron la Mc4I y la Mc5I, que corresponden a la variedad morado común o puntón, en las cuales el patrón de bandas se mostró completamente distinto y no comparable con las otras muestras, por lo que se las omitió del análisis. En otros casos el problema anteriormente mencionado se solucionó repitiendo la electroforesis y adicionando más volumen en las muestras que no estaban claras en el ensayo previo.

### 8.3.3. Determinación de Variabilidad

La medición de la variabilidad se realizó transformando las bandas observadas en los geles a datos binarios (presencia/ausencia de bandas), y haciendo con estos matrices en Excel, como se explica en la metodología. Un ejemplo de las matrices obtenidas se puede ver en la Tabla 5.

El número de marcadores obtenidos por cada par de primers y cuántos de éstos resultaron ser polimórficos se puede observar en la Tabla 6. Los resultados de polimorfismo en cada combinación de primers, será expuesto a continuación.

La combinación de primers 26 (M-CAC/ E-ACA) fue con la que más marcadores obtuvo, con un 78.3 % (36 bandas) del total de bandas mostrando polimorfismo entre las muestras. El par de primers 18 (M-CAA/ E-AAG) fue el segundo en presentar más información aunque, comparado con la combinación 26 (M-CAC/ E-ACA), éste tiene solo un 53.4% (19 bandas) que muestran diferencias entre los individuos muestreados.

El par de primers número 46 (M-CAC/E-ACT) fue el tercero en contener más marcadores, con un 40% (10 bandas) de éstos que mostraban polimorfismo entre las muestras. Con las combinaciones 6 (M-CTG/E-ACA) y 8 (M-CTC/E-ACG) se obtuvo un igual número de marcadores y un porcentaje parecido de polimorfismo, 52.4% (11bandas) y 66.7% (14 bandas) respectivamente, aunque las muestras que pudieron ser

analizadas con éstos en busca de marcadores fue menor. La combinación 6 (M-CTG/E-ACA), por ejemplo, solo pudo utilizarse en 8 muestras que representaban a tres variedades, y la combinación 8 (M-CTC/E-ACG) en 19 muestras que representaban a las cinco variedades.

Las combinaciones de primers que brindaron menos marcadores fueron los pares 7 (M-CAA/E-ACG), 43 (M-CTG/E-ACG) y 5 (M-CAT/E-ACT), obteniendo 18, 10 y 8 marcadores respectivamente. Así mismo, el polimorfismo encontrado fue de un 50%, 100% y 30% en cada caso. Para las combinaciones de primers 7 (M-CAA/E-ACG) y 5 (M-CAT/E-ACT), tampoco se pudo analizar con la totalidad de muestras, así como con la combinación 43 (M-CTG/E-ACG), con la que no se obtuvo una alta cantidad de marcadores.

En general, de los ocho pares de primers seleccionados para la amplificación selectiva se obtuvo un total de 183 marcadores, siendo 110 polimórficos, esto equivaldría a un 60% de polimorfismo encontrado entre las muestras. El peso molecular de los marcadores encontrados se obtuvo al comparar las bandas obtenidas con un Ladder 100 bp, *Invitrogen*. Los pesos de las bandas encontradas variaron entre 800 a 100 bp, en la mayoría de casos, y existía una mayor definición de las bandas desde los 600 bp hasta los 200 bp.

Las tablas de similitud obtenidas a través del programa NTSYSpc 2.11 con el coeficiente DICE, usando todas las combinaciones de primers, se pueden observar en las Tablas 7,8 y 9.

La Tabla 7 compara los genotipos de las variedades amarillas. Claramente se puede ver que el genotipo Ac4 P es el más distante comparado con los otros genotipos,

con una similitud de 76% con el genotipo más cercano. Se puede observar también que todos los genotipos son muy similares entre si (con una similitud promedio de 95% entre ellas).

La Tabla 8 compara los genotipos de variedades moradas. Se puede observar que todos los genotipos son más distantes entre ellos de lo que se ve entre genotipos amarillos (con una similitud promedio de 86% entre cada uno). En esta tabla tampoco se distingue una diferenciación de los genotipos con respecto a la forma del fruto.

La Tabla 9 compara los genotipos de las variedades moradas con los genotipos de las variedades amarillas. En ésta se evidencia que los genotipos de la variedad bola morado son bastante cercanos a las variedades amarillas, por el contrario, los genotipos Mg1P, Mg2T, Mg3T, Mg5P, Mc2P y Mc3T son los más alejados con respecto a las variedades amarillas. Se puede notar también una similitud muy alta entre los genotipos de las variedades bola siendo del 95% el promedio entre genotipos.

Se realizaron también tres análisis por separado (Tablas 10, 11, y 12), con los resultados de similitud obtenidos para cada genotipo de acuerdo a la provincia donde fueron recolectados. Se puede observar que existen más diferencias entre los genotipos de Tungurahua en comparación con los de Imbabura, esto se debe que los genotipos de Tungurahua eran del tipo morado, mientras que los genotipos provenientes de Ibarra eran del tipo amarillo, por lo que se puede pensar que la diferencia encontrada no es por el lugar de origen sino mas bien por la característica del color del fruto. En las comparaciones realizadas entre las provincias de Pichincha vs. Tungurahua y Pichincha vs. Ibarra no se observan diferencias en los genotipos, esto indica que el lugar de origen no es un factor que influya para distinguir a las muestras.

Comparando los resultados de todas las tablas de similitud obtenidas, se ve que la variabilidad existente entre genotipos no es mayor al 20%, esta poca variabilidad no solo se encuentra entre genotipos representantes de las diferentes variedades, sino también entre genotipos que representan a un mismo tipo morfológico. Esto puede deberse a que cada genotipo provino de una semilla distinta, aumentando así las diferencias entre individuos. Otra razón puede ser que debido a la mezcla de variedades en el cultivo, los individuos muestreados sean heterocigotos y no solo muestren semejanzas entre genotipos de la misma variedad.

#### 8.3.4. Análisis de similitud y agrupamiento

Con los datos contenidos en cada matriz de similitud se realizó un fenograma, con la opción “clustering” y SAHN del programa NTSYS 2.11, como se describe en la metodología. A continuación se describen los resultados por cada par de primers y luego se describe la combinación de los que mejores resultados presentaron para construir un fenograma final.

Con las combinaciones de primers 5 (M-CAT/E-ACT), 6 (M-CTG/E-ACA) y 7 (M-CAA/E-ACG) se obtuvieron fenogramas poco útiles por sí solos para lograr los objetivos de esta investigación. Su baja utilidad se debió a lo poco representadas que estuvieron las variedades en cada fenograma, ya que no pudieron analizarse todas las muestras. La combinación de primers que menos variedades pudo comparar fue la número 6 (M-CTG/E-ACA) (Figura 6).

En la combinación de primers número 7 (M-CAA/E-ACG), se muestran agrupamientos entre los individuos sin distinción de su color o forma (características del fruto tomadas en cuenta para su clasificación en el campo) (Figura 7).

En la combinación número 8 (M-CTC/E-ACG), el fenograma obtenido pudo separar a las muestras en dos grupos principales, A y B (Figura 8), con un coeficiente de similitud de 0.82 (18% de distancia), dentro del grupo A, el grupo A contiene a los genotipos más distantes (Ac5P y Mb1P) con respecto a las demás muestras. El segundo grupo B, se divide a su vez en dos subgrupos, nombrados en el gráfico como B1 y B2, muy diferenciados y dos genotipos un poco más distantes, que son el Mb5P y el Mc1P, los dos del tipo morado, con una distancia del 10% entre éstos y de 20% a 30% con respecto a las demás muestras.

De los dos subgrupos B1 y B2, anteriormente nombrados, el más interesante es B1 que agrupa a los fenotipos Ag4I, Ag3I y Ac2I del tipo amarillo con una distancia del 35% con respecto al otro grupo. El grupo B2, por el contrario, es heterogéneo, agrupando a los restantes genotipos como iguales sin distinción del color del fruto, con excepción de dos muestras Mc3T, y Mg2T del tipo morado. Teniendo Mg2T un coeficiente de similitud de 0.3, con respecto al resto de genotipos que conformaban el grupo B2.

En el caso de los pares de primers 18 (M-CAA/E-AAG) y 26 (M-CAC/E-ACA), fueron los que mejor agrupación entre muestras mostraron. El agrupamiento pareció tener sentido al diferenciar las muestras por el color del mesocarpio, más que por la forma.

En el fenograma obtenido de la combinación número 18 (M-CAA/E-AAG), se pudo observar que los fenotipos Mc3T, y Mc2P del tipo morado fueron los más diferentes, con un coeficiente de similitud de 0.92 (8% de distancia) respecto a las otras muestras. Las muestras del tipo amarillo se agruparon juntas, con un coeficiente de similitud de un 92 a 98% con respecto a las muestras del tipo morado. (Figura 9)



Con la combinación de primers 26 (M-CAC/E-ACA) se obtuvo un fenograma similar al que se obtuvo con la combinación 18 (M-CAA/E-AAG), pero los genotipos se distinguieron mejor que en este último. Se obtuvo un grupo que contenía a todas las muestras del tipo amarillo con excepción de Ac4P y que tenía un coeficiente de similitud de 0.76 con respecto al resto de muestras del tipo morado. Con respecto a la forma, los genotipos Ac1P, Ac3P y Ac2I del tipo común se agruparon juntos dentro del grupo de las amarillas. Hubo cuatro genotipos del tipo morado que se encontraron dentro del grupo de amarillos, éstos fueron Mb5P, Mb1P, MciPy Mg4P. Dentro del grupo del tipo morado, las muestras Mg5P y Mg1P del tipo morado gigante también mostraron ser más similares entre sí que con respecto a las otras variedades moradas (Figura 10).

Con la combinación de primers número 43 (M-CTG/E-ACG), se obtuvo un fenograma que separa a los genotipos en dos grupos grandes A y B (Figura 11), con un coeficiente de similitud entre estos de 0.28. De las agrupaciones más interesantes vale distinguir en el primer grupo a dos subgrupos A1 y A2, que contienen a los genotipos del tipo amarillo con un coeficiente de similitud de 0.63 entre éstos. En el grupo B hay una clara agrupación de los genotipos Mg1P, Mg2T, Mc2P y Mg3T del tipo morado con un coeficiente de similitud de 0.71 con respecto a los otros fenotipos del grupo.

En el caso de la combinación de primers 46 (M-CAC/E-ACT) (Figura 12), aunque no se obtuvieron bastantes marcadores para construir un mejor fenograma, éste mostró una diferencia clara entre las muestras, distinguiéndose por el color del fruto, sea del tipo amarillo o del tipo morado. El coeficiente de similitud fue de 0.98 para el grupo que contenía a los genotipos del tipo amarillo con respecto al grupo más cercano, y de

0.97, 0.96, 0.94 y 0.82 de similitud comparando a éste mismo grupo con los genotipos restantes.

Como paso final y para unir lo obtenido en cada fenograma se realizó una matriz con los resultados obtenidos de los ocho pares de primers probados. De esta matriz de datos se obtuvieron dos matrices de similitud usando el coeficiente de Dice y Nei como se señaló en la metodología.

En este caso los dos fenogramas resultantes mostraron una agrupación similar de las muestras, separando a la mayoría de los genotipos de las variedades moradas en un solo grupo (Figura 13 y 14).

En el fenograma obtenido con el algoritmo de Dice y usando para el análisis de agrupación UPGMA (Figura 14), se ve una separación en dos grupos, uno incluye la mayoría de genotipos del tipo morado y el otro incluye a la mayoría del tipo amarillo, con un coeficiente de similitud de 0.86 entre ellos. Dentro del grupo del tipo amarillo, se encuentran dos genotipos, B5 y B4, de la variedad Bola morado, según la clasificación que da el agricultor. Otras excepciones y que se repiten en otros fenogramas son la agrupación del genotipo Mc1P y Mg4P del tipo morado, que siempre se acerca más a los fenotipos del tipo amarillo y la separación del fenotipo de Ac4P con un coeficiente de 0.73 con respecto a las otras muestras.

Con el fenograma realizado por la función “Neighbor joining” (Figura 13), se puede ver también la diferencia entre los genotipos del tipo morado y los del tipo amarillo. El grupo que contiene a las muestras del tipo amarillo se encuentra “dividido” en dos, ya que el grupo morado, aunque más distante del resto de muestras (0.11 de

distancia), se ubica en el centro. El fenotipo Ac4P parece ser distinto a todas las muestras, con una distancia de más o menos 0.20 del genotipo más cercano, que es Ac5P.

El valor co-fenético del fenograma final se obtuvo como se describe en la metodología. El valor  $r$  obtenido fue de:  $r = 0.91$  lo que indica que el grado de distorsión del fenograma con respecto a la matriz de similitud del cual fue obtenido es de 0.09.

## 9. **Discusión**

La extracción del ADN, que es el paso inicial, es extremadamente crítico en el uso de la técnica molecular de AFLPs. La calidad y pureza del ADN de las muestras es fundamental para la apropiada restricción y ligación a los adaptadores (Aytül INCIRLI, 2000). Si en el caso de la extracción del ADN, la concentración y pureza fueran bajas, o en el caso de la restricción las enzimas no tuvieran su funcionamiento óptimo, el patrón de bandas obtenido variará y, seguramente, podrá ser confundido por polimorfismo entre las muestras.

Los resultados de esta investigación mostraron que la calidad y pureza el ADN, para casi todas las muestras fue bastante buena, lo que garantiza la obtención de patrones de bandas comparables, con excepción de dos muestras: Mc4I y Mc5t, que en los últimos pasos de amplificación selectiva mostraron no haber sido cortados adecuadamente, ya que se pudo observar un patrón de bandas completamente diferente y casi sin fragmentos. Por esta razón se las omitió de los análisis subsiguientes.

El número de muestras y combinación de primers utilizados fue suficiente para separar a las variedades por el color del fruto (amarillas o moradas). Comparado con otros estudios que tratan sobre variabilidad intravarietal (Federici M., 2001; L. Perera,

1998), el número de pares de primers utilizado y el número de muestras es similar. Aunque las agrupaciones de las muestras de tomate de árbol obtenidas en los fenogramas no diferencian a los genotipos por la forma del fruto, sino solo por color, es posible que aumentando la combinación de primers se puedan encontrar marcadores ligados a las características morfológicas que son usadas por Albornoz (1992) para definir las variedades.

Un ejemplo de esta posibilidad, es un estudio realizado en variedades de durazno y nectarine, donde se necesitó analizar 64 combinaciones de primers para poder obtener marcadores que diferencien a las 8 variedades de durazno y 6 variedades de nectarine (Manubes A.1999).

El manual de Invitrogen para AFLPs, contiene una guía para la selección de primers en algunas especies de plantas. Tomando en cuenta que muchas de estas especies nombradas en el manual son genéticamente cercanas a *Solanum betaceum*, como por ejemplo, el tomate riñón, la papa y el pimiento, la selección de los primeros 44 pares de primers probados en esta investigación fue en base a las combinaciones recomendadas para estas especies.

La mayoría de las combinaciones probadas sirvieron para la amplificación selectiva y mostraron buenos resultados en el gel de agarosa. El principal problema se dio en la siguiente selección de los marcadores, dado que no se pudo distinguir la cantidad de bandas obtenidas por par de primers debido a la definición obtenida en el gel de agarosa. Esta puede ser una de las razones por las cuales tres de los pares de primers dieron menos de 20 marcadores o bandas para comparar entre las muestras.

Los resultados obtenidos con los ocho pares de primers utilizados mostraron un número de bandas que iba desde 8 a 46 por combinación probada. Esto tiene mucho que ver con la secuencia de los tres últimos nucleótidos en los primers de la combinación. La cantidad de Citocinas y Guaninas, vuelve al primer más selectivo y hace más difícil la unión al ADN que los nucleótidos A, T. Esto se debe a que las regiones con más pares C-G son más compactas, haciendo más difícil la unión del primer. Otra de las razones es que, en las plantas la concentración de pares A-T es mucho mayor a la de C-G (Manual AFLP, 2003). En los resultados obtenidos (Tabla 4), se puede ver que los primers con mayor concentración de pares C-G, por ejemplo la combinación 43 (M-CTG E-ACG) que produjo 8 bandas, sugiere que pudo existir un proceso similar al descrito anteriormente. El tamaño de las bandas que se encontraron estuvo en un rango de 2000 a 100 bp, lo que es congruente con lo encontrado en investigaciones como Manubens, (1999), en la que se vio que el patrón de bandas se encontraba en un rango de 2600 hasta 75pb.

La selección del coeficiente de asociación que se usó para el análisis de las muestras es importante, ya que depende de esto que el resultado refleje la relación filogenética real entre los genotipos muestreados. Los marcadores moleculares; SSR, RFLPS, y el que usamos en este estudio, AFLPs, se analizaron transformando sus resultados, bandas obtenidas por electroforesis en el gel, a datos doble estado o binarios (0 y 1). (Grattapaglia D., 2000)

En el caso de los marcadores producidos por la técnica de AFLPs específicamente, los más usados en estudios de variabilidad genética dentro y entre

especies, son los coeficientes de: Jaccard, Dice, Nei y SM (simple matching, por sus siglas en inglés) (Federici M. 2001; Perera L.; Droogenbroeck, 2002; Coulibaly S. 2002).

Una razón más específica por la cual es importante la selección del coeficiente es que, aunque muchos de los coeficientes de asociación anteriormente nombrados muestren fenogramas similares, puede ocurrir que muy pequeñas diferencias entre grupos bien definidos dentro del fenograma afecten las relaciones genéticas encontradas entre genotipos muy similares (Duarte J., 1999).

La elección del coeficiente de *Sorensen-Dice* para este estudio en AFLPs se realizó tomando en cuenta lo siguiente: la doble ausencia de una banda específica entre dos genotipos no determina la similitud entre estos, por lo tanto los coeficientes que eliminan esta doble ausencia son *Jaccard* y *Sorensen-Dice*. Siendo *Dice* frecuentemente usado en investigaciones realizadas por medio de marcadores AFLPs, entre especies y dentro de éstas (Droogenbroeck, 2002).

Con excepción de las combinaciones de primers 5(M-CAA E-ACG), 6(M-CTG E-ACA) y 7(M-CAT E-ACT), los fenogramas obtenidos agruparon a las muestras en dos tipos: morado y amarillo. Los fenogramas individuales más que mostrar la diferencia entre las muestras, nos indican que la similitud existente entre sus genotipos impide una diferenciación clara si solo tomamos en cuenta el color y la forma del fruto.

Esta difícil asignación de las muestras a grupos concretos puede deberse también a la cantidad de marcadores utilizados para formar el fenograma, un ejemplo de esto es la combinación número 5, donde los 10 marcadores conseguidos y un polimorfismo del 30% no fue suficiente para separar a las muestras, ni siquiera por color del fruto.

Algunos fenogramas también sugieren que las muestras que se analizaron representaban a genotipos producto de la mezcla entre las diferentes “variedades” en el área de cultivo.

Esta observación también sustentaría lo planteado por Albornoz (1992). Él habla de dos variedades que se asemejan mucho a las que posiblemente fueron las variedades ancestrales, estas son la variedad amarilla y la negra. La variedad roja, por el contrario, Albornoz sugiere que surgió de una mezcla entre las variedades anteriormente nombradas. Los resultados obtenidos del análisis de similitud de los 26 genotipos con todas las combinaciones de primers, muestran que los genotipos Mg4P, Mc1P, Mb5P, y Mb1P del tipo morado (variedad definida por Albornoz como roja) muestran ser más similares a los genotipos del tipo amarillo que a las demás muestras representantes del tipo morado. Si tomamos en cuenta lo expuesto por Albornoz, se podría pensar que este agrupamiento de estos cuatro genotipos morados pueden deberse a que son heterocigotos, o una mezcla de la variedad amarilla con la morada y se los diferenció como representantes del tipo morado porque la planta expresaba las características morfológicas del parental morado. Es posible también pensar que la poca diferencia en general de los genotipos morados, con respecto a los genotipos amarillo se deba a que las muestras analizadas no son puras.

Dentro de la combinación 43, por ejemplo, las muestras del tipo morado se encontraban en la mitad o separando a las muestras del tipo amarillo. El grupo A2 de genotipo morado era más similar al grupo A1 del tipo amarillo, mientras el otro grupo morado B1 era más similar a un grupo B2 de amarillo (Figura 10).

Aunque hay ventajas en el análisis individual de las combinaciones de primers, como es la de conocer la cantidad de información brindada por par de primers, también

trae una desventaja: el no poder diferenciar todos los genotipos de manera singular, como pasó en el caso de la combinación de primers número 8 (M-CTC E-ACG). El poder obtener diferencias entre cada genotipo puede dar una idea mejor de la variabilidad existente entre genotipos que sean morfológicamente similares (como los de igual color de fruto, por ejemplo).

Para el análisis de la matriz compuesta por todos los marcadores, obtenidos de las ocho combinaciones de primers, se decidió utilizar también el coeficiente de Nei aparte del de Dice, con el objetivo de comparar los agrupamientos obtenidos. Aunque los coeficientes obtenidos con Nei no son comparables con los obtenidos con Dice (Duarte,1999), la distribución de las muestras en los grupos dentro de los fenogramas sí son comparables y en este caso mostraron ser similares, como se puede ver en las Figuras 12 y 13.

El resultado obtenido del análisis del coeficiente de correlación co-fenética nos sirve para confirmar la validez del fenograma obtenido (F.J.Rohlf, 1998). Este permite la comparación de la matriz “co-fenética”, con la matriz de datos original y así, obtener el grado de distorsión del fenograma con respecto a la matriz de similitud de la que se obtuvo. El valor  $r = 0.91$  obtenido, confirma que el fenograma se acerca mucho a lo ideal.

El porcentaje de polimorfismo encontrado en la matriz final de todas las combinaciones de primers es del 60%, e indica que existen variaciones entre los genotipos, con lo que se puede llegar a decir que la variabilidad dentro del cultivo de este frutal en el Ecuador todavía no se agota, aunque no parece ser suficiente para la futura selección de genotipos más aptos para el cultivo. El coeficiente de similitud (0.86) obtenido en el fenograma final (con el coeficiente de Dice), indica un 14% de diferencia



entre el grupo que contiene a los genotipos amarillos y el grupo que contiene a los genotipos morados. Esto talvez no sea suficiente como para determinar una separación y hablar de diferentes variedades, aunque el porcentaje de distancia específico requerido para determinar una variedad no está definido.

Con respecto a la variabilidad entre individuos que se observa en las Tablas de similitud 6 y 7, no se encuentran diferencias mayores a 0.2 entre genotipos, con excepción del genotipo Ac4P que se encuentra muy alejado del resto de genotipos. Esto indicaría muy poca variabilidad intravarietal como inter varietal. A pesar de encontrar muy poca variabilidad a nivel molecular, a nivel morfológico existen múltiples diferencias en los genotipos de las muestras recolectadas. Esto puede deberse a que algunos individuos muestreados sean heterocigotos, o que en algún momento las variedades se mezclaron en los campos de cultivo y lo que se tiene actualmente es una mezcla entre estas.

Investigaciones realizadas en la estación Santa Catalina del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) mediante la utilización de RAPDS y posteriormente SSR, mostraron que la base genética del tomate de árbol en Ecuador es estrecha. En la investigación más reciente, se utilizaron 44 primers para microsatélites provenientes de la papa (*Solanum tuberosum*), 8 de los cuales resultaron ser polimórficos para tomate de árbol y especies silvestres, en un grupo de muestras que contenía 87 accesiones de variedades cultivadas y 11 accesiones de especies silvestres. El resultado obtenido fue de 12 alelos en las accesiones cultivadas y 27 alelos en las especies silvestres, mientras que en el dendrograma NJ (Neighbor Joining) obtenido

separó a las especies silvestres de las muestras de *Solanum betaceum*, dentro de las cuales no se encontró distinciones (INIAP, 2006).

Comparando la presente investigación basada en marcadores AFLP con la realizada por el INIAP basada en la técnica de microsatélites, se puede concluir que la técnica de AFLP tuvo un poder de detección mucho más alto y pudo encontrar polimorfismo entre muestras y una separación entre accesiones morfológicamente distintas. Este poder de detección se debe a que las 8 combinaciones de primers usadas en la técnica AFLP lograron muestrear una región más amplia del genoma, comparadas con los 8 primers para microsatélites, que al no ser propios de *Solanum betaceum* y al ser complementarios de regiones específicas que flanquean secuencias repetitivas (microsatélites), pueden muestrear muy pocas regiones del genoma.

## **10. Conclusiones y recomendaciones**

Los marcadores AFLP fueron útiles para la búsqueda de variabilidad en *Solanum betaceum*, permitieron encontrar polimorfismo de hasta un 60% dentro del grupo muestreado. Aunque los múltiples pasos de esta técnica pueden generar fácilmente errores, un uso adecuado de estos marcadores, puede generar una cantidad suficiente de datos como para tener una visión general de la especie en estudio.

Con esta investigación se puede llegar a concluir que los cultivos de *Solanum betaceum* en la sierra ecuatoriana están conformados por un cultivo heterogéneo. Posiblemente la falta de selección y separación entre los individuos produjo que el actual cultivo no tenga genotipos completamente diferenciables, sino una mezcla, que puede haber sido el producto del cruce entre posibles variedades iniciales.

El trabajo realizado en esta tesis da una idea general de lo que está pasando a nivel del cultivo en la sierra ecuatoriana. Para futuras investigaciones sería importante coleccionar un mayor número de muestras y analizar sus diferencias a nivel genético con otras combinaciones de primers, comparándolas también con las muestras que se analizaron en esta tesis. El objetivo a largo plazo sería poder identificar y conservar esta variabilidad para futuros usos de ésta en la agricultura y evitar la erosión génica en la especie.

En futuros estudios un uso de técnicas moleculares complementarias, como es el caso de los AFLPs (ya usado en este estudio) y SSRs mejoraría la confiabilidad y consistencia de los resultados. Principalmente si se quiere dividir a la especie *Solanum betaceum* en distintas variedades cultivables. El uso de AFLP como marcador dominante y de SSR para determinar heterocigosis puede ser una buena opción.

Otro estudio interesante, por sus implicaciones en el mejoramiento del cultivo de tomate de árbol, es el estudio de variedades silvestres de tomate de árbol. La comparación con el tomate de cultivo a nivel molecular, podría indicar cuanta variabilidad existe, cuales son las variedades que dieron origen a las variedades actuales que se cultivan, y que tanto han cambiado su genoma durante los años de selección por el hombre.

## 11. Bibliografía

1. Albornoz G. “El tomate de árbol, Determinación de las características varietales”. Universidad Central del Ecuador (1992).
2. Aristizábal J.C. “Efecto de las Podas, Distancias de Siembra y Sistemas de Manejo Sobre el Crecimiento y Producción del Tomate de Árbol(*Solanum betaceum* Sendt.)”. Frutales 19 (1998).
3. Aytul Incirli. “ Assessment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *Aegilops* sp”. Turk J Biol. (2000).
4. Bohs L. “Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and Its Species to *Solanum*”. Taxon vol 4. N°4 (1995) 583-587.
5. Cadena E. “Estudio de Prefactibilidad para el Tomate de Árbol”. SICA, Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. 13 Enero 2007.<<http://www.sica.gov.ec/agronegocios>>
6. Campbell D., Pierre Duchesne y Louis Bernatchez. “AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites”. Molecular Ecology 12 (2003) 1979- 1991.
7. Coulibaly S, R.S. Pasquet, R. Papa y P. Gepts. “AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types”. Theor Appl Genet (2002) 104:358–366.
8. Crisci Victor, Fernanda López. “Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica”. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 1983.
9. Duarte M, João Bosco dos Santos y Leonardo Cunha Melo. “ Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common Bean”. Genetics and Molecular Biology, 22, 3, 427-432 (1999).
10. Rohlf F.J. “GUIA PARA EL USO DEL PROGRAMA NTSYS-pc” Introducción a la Taxonomía (1998).
11. Felsenstein Joseph. “Phylogeny Inference Package”. PhYlip. 3.6. University of Washington. 10 Abril 2007. < <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>>
12. García-Martínez S, Lorella Andreani, Marta Garcia-Gusano, Filippo Geuna, and Juan J. Ruiz.”Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars”. Genome 49 (2006) 648-656

13. Grattapaglia D. M. Ferreira. "Clases de Marcadores Moleculares para el análisis Genético". CENARGEN/ EMBRAPA, Universidad de Brasilia. (2000)
14. Heiser C, G. Anderson. "'New' Crops". Perspectives on new crops and new issues. Ed. J. Janick. Indiana: ASHS press, 1999.
15. IICA. "La Cadena de los Frutales de Exportación en Colombia". 8 Marzo 2007. <<http://www.agrocadenas.gov.co>>.
16. INCIRLI A., Hatice BILGI., y M. S. AKKAYA. "Assessment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *Aegilops* sp." Middle East Technical University (2000).
17. Tápia Cesar, Eddie Zambrano, Eduardo Morillo. "Tomate de árbol (*Ciphomandra betacea* sendt.) frutal promisorio para la diversificación del agro andino". INIAP. 2006
18. Invitrogen. "Instruction Manual". Catalog nos. 10544-013 and 10483-014. version B (2003).
19. IPGRI y Cornell University. "Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje, Tecnologías basadas en el ADN". 20 Marzo 2007. <<http://www.biodiversityinternational.org>>.
20. Manubens A., Sergio Lobos, Yael Jadue, Manuel Toro, Rosa Messina, Manuel Lladserl y Daniela Seelenfreund. "DNA Isolation and AFLP Fingerprinting of Nectarine and Peach Varieties (*Prunus persica*)". Plant Molecular Biology Reporter 17 (1999) 255–267.
21. Matthew D., Perry Michael R., Davey J., Brian Power, Kenneth C., Lowe H. Frances J. Bligh Paul S., Roach and Chris Jones. "DNA Isolation and AFLPTM Genetic Fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.)". Plant Molecular Biology Reporter 16: 49–59, (1998)
22. Morgante, M., and A.M. Olivieri." PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics". Plant J. 3 (1993)175-182.
23. Morton J. "Tree Tomato".Fruits of Warm Climates. Miami FL 33189. (1987) 437- 440.
24. Nuez F., J. M. Carrillo. "Los marcadores genéticos en la mejora vegetal". Universidad politécnica de Valencia. Editorial U.P.V. (2000).

25. Pringle G.J., B.G.Murray. "Polyploidy and Anaploidy in the Tamarillo, *Ciphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae)". Plant breeding. 108 (1992) 132-138.
26. Prohens J. J.Ruiz y F. Nuez. "Advancing the Tamarillo Harvest by Induced Proharvest Ripening". HortScience 31 (1996):109-111.
27. Pringle G.J., B.G.Murray. "Intes specific Hibridization involving the Tamarillo, *Ciphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae)". New Zeland Journal of crop and Horticultural Science. 19 (1991) 103-111.
28. Pringle G. J, Brian G. Murray. "Karyotype Diversity and Nuclear DNA Variation in *Ciphomandra*". Solanaceae III. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London (1991).
29. Riek J. · E. Calsyn · I. Everaert · E. Van Bockstaele y M. De Loose. "AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties". Theor Appl Genet 103 (2001) 1254-1265.
30. Roa A. C., M. M. Maya, M. C. Duque, J. Tohme, A. C. Allem y M. W. Bonierbale. "
31. AFLP analysis of relationships among cassava and other Manihot species". Theor Appl Genet 95(1997) 741-750.
32. Roldán-Ruiz I, F.A. van Eeuwijk, T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann, J. Lallemand, M. De Loose y C.P. Baril. "A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties". Theor Appl Genet (2001) 103:1138–1150.
33. Ruiz Roldan I, F.A. van Eeuwijk, T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann, J. Lallemand, M. De Loose y C.P. Baril. "A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties" Theor Appl Genet 103 (2001) 1138-1150
34. SICA. Ministerio de Agricultura y Ganaderia del Ecuador, Servicio de información Agropecuaria. 10 Enero 2007. <<http://www.sica.gov.ec/agronegocios>>
35. UPOV. Unión Internacional para la protección de las obtenciones Vegetales. 3 Marzo 2007. < <http://www.upov.int/indexes.html>>
36. Van Droogenbroeck B., P. Breyne, P. Goetghebeur, E. Romeijn-Peeters, T. Kyndt, G. Gheysen. "AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador". Theor Appl Genet (2002) 105:289–297
37. Zabeau, M. and Vos, P. European Patent Application. EP 0534858. (1993).

## 12. Tablas

**Tabla 1. Nomenclatura de las muestras, variedad a la que pertenecen y lugar de donde se extrajo el material.**

<b>Nomeclatura</b>	<b>Variedad</b>	<b>Lugar de Origen</b>
Mg1p	Morado gigante	Granja de la USFQ /Pichincha
Mg2t	Morado gigante	Cantón Pelileo/ Tungurahua
Mg3t	Morado gigante	Cantón Pelileo/ Tungurahua
Mg4p	Morado gigante	Granja de la USFQ/Pichincha
Mg5p	Morado gigante	Granja de la USFQ/Pichincha
Ag1i	Amarillo gigante	Cantón Chaltura/ Imbabura
Ag2i	Amarillo gigante	Cantón Atuntaqui/Imbabura
Ag3i	Amarillo gigante	Cantón Chaltura/ Imbabura
Ag4i	Amarillo gigante	Cantón Atuntaqui/Imbabura
Ag5i	Amarillo gigante	Cantón Chaltura/ Imbabura
Ag6i	Amarillo gigante	Cantón Imbabura
Ac1p	Amarillo común	Cantón Pichincha
Ac2i	Amarillo común	Cantón Chaltura/ Imbabura
Ac3p	Amarillo común	Granja de la USFQ/Pichincha
Ac4p	Amarillo común	Cantón Puembo/ Pichincha
Ac5p	Amarillo común	Pichincha
Mb1p	Bola morado	Granja de la USFQ/Pichincha
Ab2p	Bola amarillo	Pichincha
Ab3i	Bola amarillo	Imbabura
Ab4p	Bola amarillo	Granja de la u/pichincha
Mb5p	Bola morado	Granja de la u/pichincha
Mc1p	Morado común	Pichincha
Mc2p	Morado común	Cantón Puembo/ Pichincha
Mc3t	Morado común	Tungurahua
Mc4i	Morado común	Imbabura
Mc5t	Morado común	Cantón Artesón/ Tungurahua

Ac= Amarillo común  
 Ag= Amarillo gigante  
 Ab= Amarillo bola  
 i= Imbabura  
 t= Tungurahua

Mg= Morado gigante  
 Mc= Morado común  
 Mb= Morado bola  
 p= Pichincha

**Tabla 2. Resultados de la cuantificación del ADN extraído de las muestras de tomate de árbol mediante espectrofotometría.**

Se puede observar que las concentraciones obtenidas están en un rango de 2820 a 480 ng/ul. También se puede observar la cantidad de ADN a ser utilizado para llegar a una concentración de 100ng/ul en un volumen de 50ul.

Muestras	Absorbancia a 260nm	Concentración de ADN en la muestra (ng/ul)	Volumen de la muestra para 50ul	Volumen de agua para 50ul
Mg1p	0.047	1410	3.55	46.45
Mg2t	0.094	2820	1.77	48.23
Mg3t	0.025	750	6.67	43.33
Mg4p	0.092	2760	1.81	48.19
Mg5p	0.028	840	5.95	44.05
Ag1i	0.095	2850	1.75	48.25
Ag2i	0.073	2190	2.28	47.72
Ag3i	0.066	1980	2.53	47.47
Ag4i	0.027	810	6.17	43.83
Ag5i	0.016	480	10.42	39.58
Ag6i	0.037	1110	4.50	45.50
Ac1p	0.04	1200	4.17	45.83
Ac2i	0.074	2220	2.25	47.75
Ac3p	0.097	1740	2.87	47.13
Ac4p	0.03	900	5.56	44.44
Ac5p	0.049	1470	3.40	46.60
Mb1p	0.068	2040	2.45	47.55
Ab2p	0.027	810	6.17	43.83
Ab3i	0.022	660	7.58	42.42
Ab4p	0.032	960	5.21	44.79
Mb5p	0.053	1590	3.14	46.86
Mc1p	0.053	1590	3.14	46.86
Mc2p	0.034	1020	4.90	45.10
Mc3t	0.09	2700	1.85	48.15
Mc4i	0.059	1770	2.82	47.18
Mc5t	0.03	900	5.56	44.44



**Tabla 3. Secuencias de primers probadas para la amplificación selectiva de las muestras.**

	<b>M-CAA</b>	<b>M-CAC</b>	<b>M-CAG</b>	<b>M-CAT</b>	<b>M-CTA</b>	<b>M-CTC</b>	<b>M-CTG</b>	<b>M-CTT</b>
<b>E-AAC</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>E-AAG</b>	X	X	o	o	o	o	o	o
<b>E-ACA</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>E-ACC</b>	o	X	X	X	X	X	X	X
<b>E-ACG</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>E-ACT</b>	X	X	X	X	o	o	o	o
<b>E-AGC</b>	X	o	o	o	o	o	o	o
<b>E-AGG</b>	X	o	X	X	X	X	X	X

X= Combinaciones probadas  
 o = Combinaciones no probadas

**Tabla 4. Protocolo de tinción con plata modificado del protocolo de Promega**

<b>Etapas del proceso</b>	<b>Duración</b>	<b>Reactivos</b>
<b>Fijación</b>	20 minutos	Solución fijadora (Ácido acético al 10%)
<b>Lavados</b>	10 minutos por cada enjuague	Agua desionizada
<b>Tinción con Plata</b>	40 minutos (en oscuridad y en constante movimiento)	Solución con plata (2gr de Nitrato de Plata, 2.6mL de Formaldehído, y 2000mL Agua Deionizada)
<b>Lavado</b>	6 segundos (oscuridad)	Agua desionizada
<b>Revelado</b>	Hasta que salgan las bandas (oscuridad y en constante movimiento.)	Solución reveladora (Ácido acético al 10%)





Ag4I	9.76	9.38	10											
Ag6I	9.71	9.44	9.7	10										
Ag2I	10	9.59	9.7	9.9	10									
Ab3I	9.84	9.43	9.87	9.56	9.95	10								
Ac1P	9.65	9.24	9.62	9.7	9.78	9.49	10							
Ac2I	9.84	9.41	9.7	9.71	9.86	9.87	9.71	10						
Ac3P	9.79	9.41	9.66	9.7	9.89	9.58	9.8	9.82	10					
Ac5P	9.26	9.25	9.21	9.17	9.23	9.17	9.38	9.08	9.22	10				
Ac4P	6.67	7.21	7.25	6.85	7.37	7.23	7.69	7.22	7.45	8.19	10			
Ab2P	9.69	9.24	9.77	9.69	9.67	9.72	9.77	9.56	9.72	9.52	7.64	10		
Ag3I	9.44	9.27	9.51	9.6	9.35	9.42	9.54	9.25	9.4	9.4	7.47	9.52	10	
Ab4P	9.71	9.24	9.82	9.53	9.65	9.66	9.53	9.65	9.69	9.3	7.42	9.77	9.35	10

**Tabla 8. Tabla de similitud entre cada genotipo de las variedades moradas, utilizando el coeficiente de Dice.**

Se puede observar que la similitud entre los genotipos de las variedades moradas es menor que la observada entre los genotipos de las variedades amarillas, como se ve en la tabla 6. No se observa que los genotipos se diferencien por su forma.

	Mb5P	Mb1P	Mg5P	Mc3T	Mg1P	Mc1P	Mg4P	Mc2P	Mg3T	Mg2T
Mb5P	1									
Mb1P	9.57	1								
Mg5P	7.86	7.95	1							
Mc3T	8.15	8.13	8.64	1						
Mg1P	7.95	7.79	8.54	8.69	1					
Mc1P	9.37	9.25	8.28	8.7	8.27	1				
Mg4P	9.2	9.26	7.63	8.19	7.67	9.54	1			
Mc2P	8.87	8.81	8.45	9.1	8.61	9.2	8.76	1		
Mg3T	8.93	9.91	8.71	9.22	8.88	9.17	8.76	9.52	1	
Mg2T	8.48	8.3	8.48	9.22	9.25	8.78	8.34	9.12	9.44	1

**Tabla 9. Tabla de similitud entre las variedades amarillas vs. las variedades moradas, utilizando el coeficiente de Dice.**

Se observa que existe menos similitud entre variedades moradas y amarillas, comparada con la variabilidad existente dentro de éstas. Es evidente que el genotipo Ac4P es el más diferente con respecto a los demás genotipos.

	Ag1 I	Ag5 I	Ag4 I	Ag6 I	Ag2 I	Ag3 I	Ac1 P	Ac2 I	Ac3 P	Ac5 P	Ac4 P	Ab2 P	Ab3 I	Ab4 P	
Mc3 T	8.79	8.54	8.58	8.46	8.79	7.98	8.6	8.7	1	8.74	7.66	6.1	7.89	8.62	8.27
Mc2 P	9.27	8.8	9.07	9.08	9.32	8.72	9.31	9.2	5	9.43	8.54	7.27	8.94	9.15	8.99
Mc1 P	9.8	9.39	9.58	9.7	9.82	9.3	9.57	9.6	7	9.71	9.24	7.37	9.61	9.89	9.54

Mg4 P	9.69	9.43	9.56	9.53	9.69	9.25	9.37	9.7	9.51	9	6.57	9.37	9.59	9.37
Mg1 P	8.45	8.32	8.28	7.9	8.58	7.88	8.29	8.4 2	8.62	7.55	6.87	7.7	8.16	8.07
Mg3 T	9.2	8.7	9.04	9	9.22	8.86	9.26	9.1 5	9.34	8.5	7.27	8.82	9.11	9.05
Mg2 T	8.82	8.58	8.71	8.43	8.92	8.28	8.82	8.8 3	8.95	8.17	7.57	8.33	8.76	8.58
Mg5 P	8.34	8.44	8.21	8.33	8.43	8.12	8.4	8.3 5	8.38	7.88	6.94	7.87	8.06	7.86
Mb1 P	9.3	8.84	9.37	9.38	9.31	9.36	9.55	9.3 9	9.43	9.45	7.64	9.66	9.5	9.60 6
Mb5 P	9.38	8.99	9.44	9.29	9.46	9.39	9.43	9.4 6	9.31	9.33	7.82	9.77	9.44	9.72 1

**Tabla 10. Tabla de similitud entre los genotipos de la provincia de Tungurahua e Imbabura, utilizando el coeficiente de Dice.**

La similitud entre las muestras obtenidas en cultivos de Tungurahua con las obtenidas en cultivos de Imbabura esta entre 9.2 y 7.98. Es importante notar que las variedades provenientes de la provincia de Tungurahua son del tipo morado y comparación de las provenientes de Ibarra que son del tipo amarillo.

	Mc3T	Mg3T	Mg2T
Ag1l	8.79	9.2	8.82
Ag5l	8.54	8.7	8.58
Ag4l	8.58	9.04	8.71
Ag6l	8.46	9	8.43
Ag2l	8.79	9.22	8.92
Ab3l	8.62	9.11	8.76
Ag3l	7.98	8.86	8.28
Ac2l	8.71	9.15	8.83

**Tabla 11. Tabla de similitud entre los genotipos de la provincia de Tungurahua y Pichincha, utilizando el coeficiente de Dice.**

Se puede observar que el genotipo Ac4P es el más distante comparado con las muestras de Tungurahua. Los genotipos de las variedades moradas de Pichincha muestran ser diferentes a los genotipos morados de tungurahua, a pesar de pertenecer a las mismas variedades (morado gigante y morado común). El genotipo Mc2P muestra mas similitud

con respecto a los genotipos provenientes de Tungurahua, principalmente con Mg3T, a pesar de representar a individuos con distinta forma de fruto.

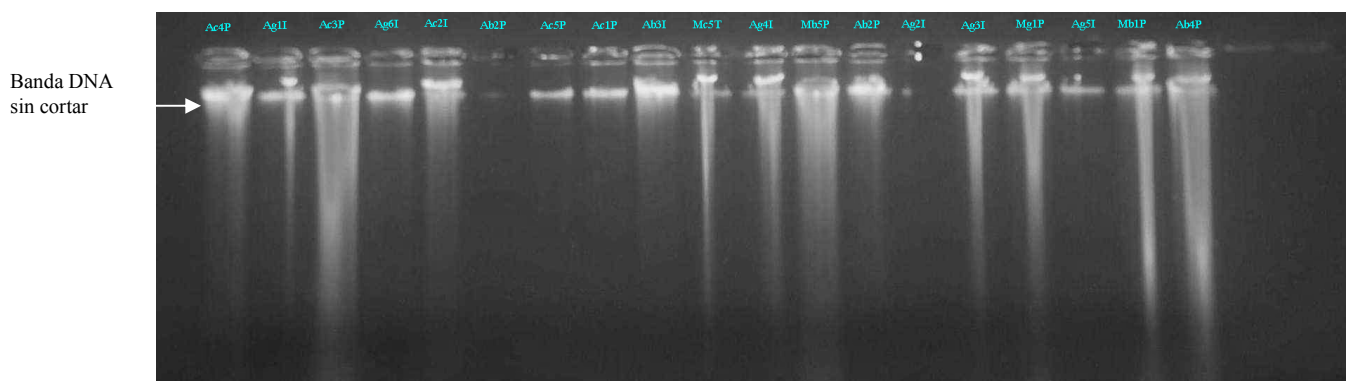
	Mc3T	Mg3T	Mg2T
Ac1P	8.6	9.26	8.82
Ac3P	8.74	9.34	8.95
Ac5P	7.66	8.5	8.17
Ac4P	6.1	7.27	7.57
Ab2P	7.89	8.82	8.33
Mb5P	8.15	8.93	8.48
Ab4P	8.27	9.05	8.58
Mb1P	8.13	9.9	8.3
Mg5P	8.64	8.71	8.48
Mg1P	8.69	8.88	9.25
Mc1P	8.7	9.17	8.78
Mg4P	8.19	8.76	8.34
Mc2P	9.1	9.52	9.12

**Tabla 12. Coeficientes de similitud entre los genotipos de la provincia de Pichincha e Ibarra, utilizando el coeficiente de Dice.**

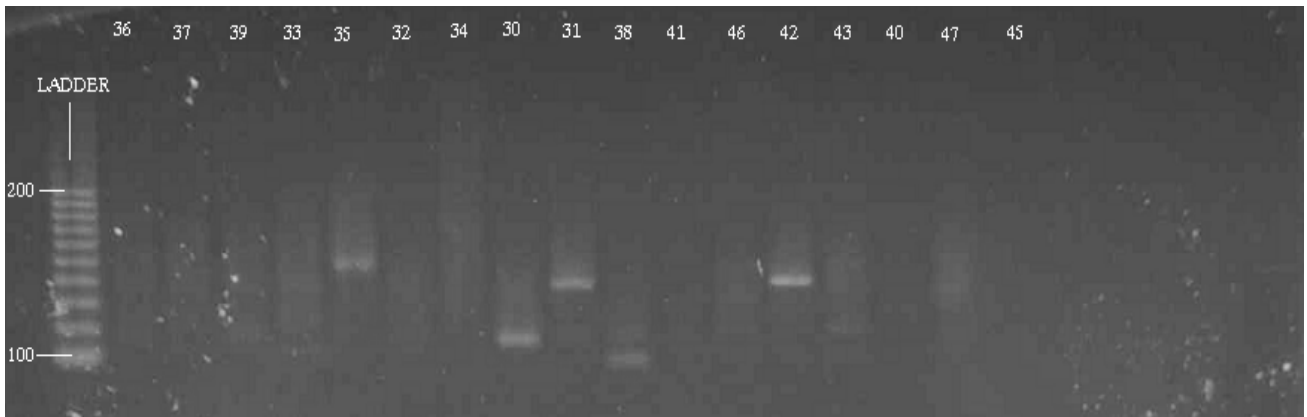
Se observa que la similitud encontrada entre los genotipos de las dos provincias, no parece estar ligada al lugar de recolección de las muestras. Se observa una menor similitud entre los genotipos morados de la provincia de Pichincha a comparación de los genotipos amarillos de la provincia de Imbabura.

	Ag1I	Ag5I	Ag4I	Ag6I	Ag2I	Ag3I	Ab3I	Ac2I
Ac1P	9.65	9.243	9.621	9.697	9.779	9.544	9.49	9.71
Ac3P	9.79	9.412	9.663	9.704	9.89	9.4	9.58	9.82
Ac5P	9.26	9.251	9.206	9.166	9.231	9.4	9.17	9.08
Ac4P	6.67	7.209	7.253	6.849	7.368	7.47	7.23	7.22
Ab2P	9.69	9.24	9.773	9.686	9.666	9.524	9.72	9.56
Mb5P	9.38	8.991	9.44	9.286	9.457	9.385	9.44	9.46
Ab4P	9.71	9.239	9.82	9.53	9.65	9.353	9.66	9.65
Mb1P	9.3	8.84	9.37	9.38	9.31	9.356	9.5	9.39
Mg5P	8.34	8.44	8.21	8.333	8.43	8.12	8.06	8.35
Mg1P	8.45	8.32	8.28	7.9	8.58	7.88	8.16	8.42
Mg4P	9.69	9.43	9.56	9.53	9.69	9.25	9.59	9.7
Mc1P	9.8	9.39	9.58	9.7	9.82	9.3	9.89	9.67
Mc2P	9.27	8.8	9.07	9.08	9.32	8.72	9.15	9.25

### 13. Figuras



**Figura 1. Resultados de la extracción de ADN de las muestras.** Se puede ver que la concentración no es uniforme, estos resultados se utilizaron para posteriormente homogenizar la concentración.



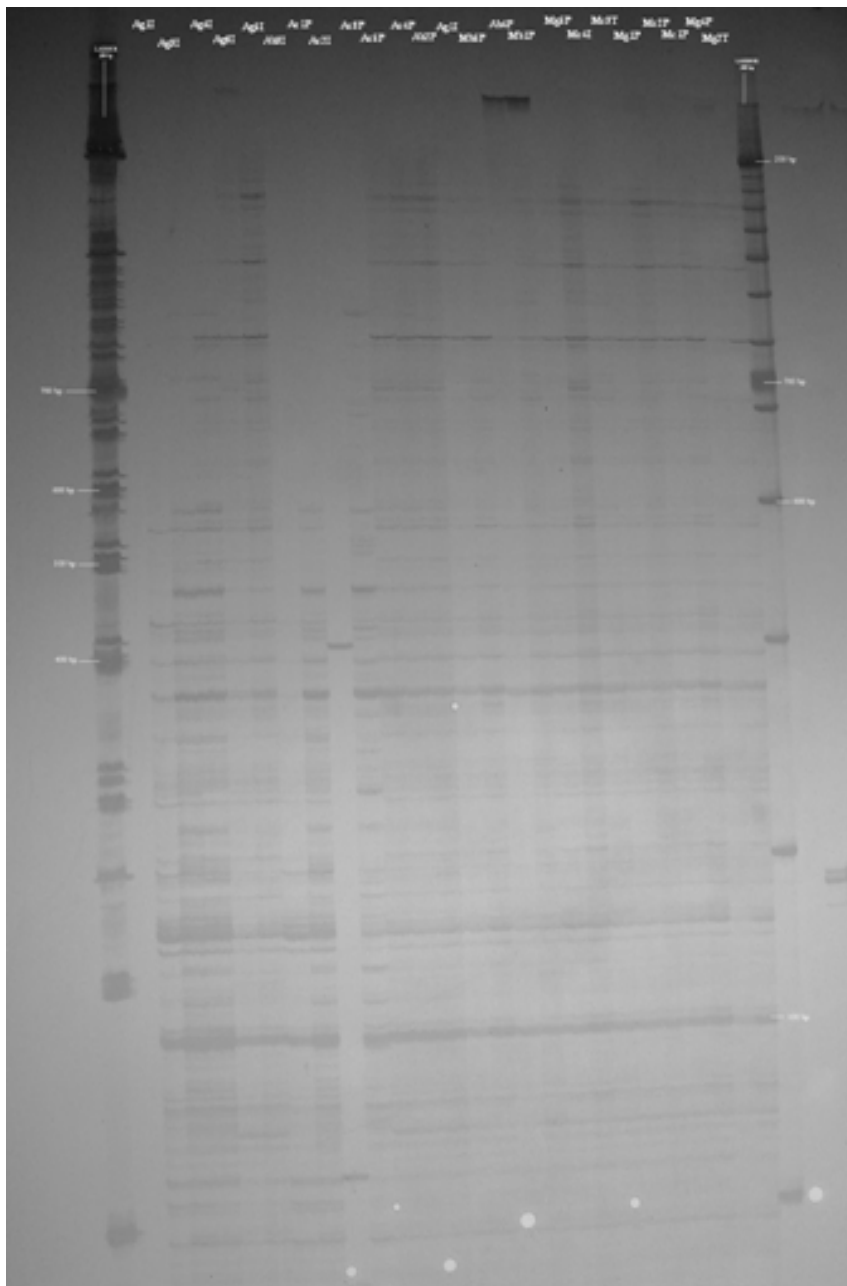
**Figura 2. Amplificación selectiva de las 44 combinaciones de primers obtenidas para tomate de árbol.**

Se observa el resultado de la amplificación selectiva de las combinaciones de primers del 30 al 47, en un gel de agarosa al 1%. En el caso de las combinaciones de primers 30, 31, 35, 38, y 42 se observan bandas gruesas debidas a la concentración de fragmentos de similar tamaño en una región del gel.



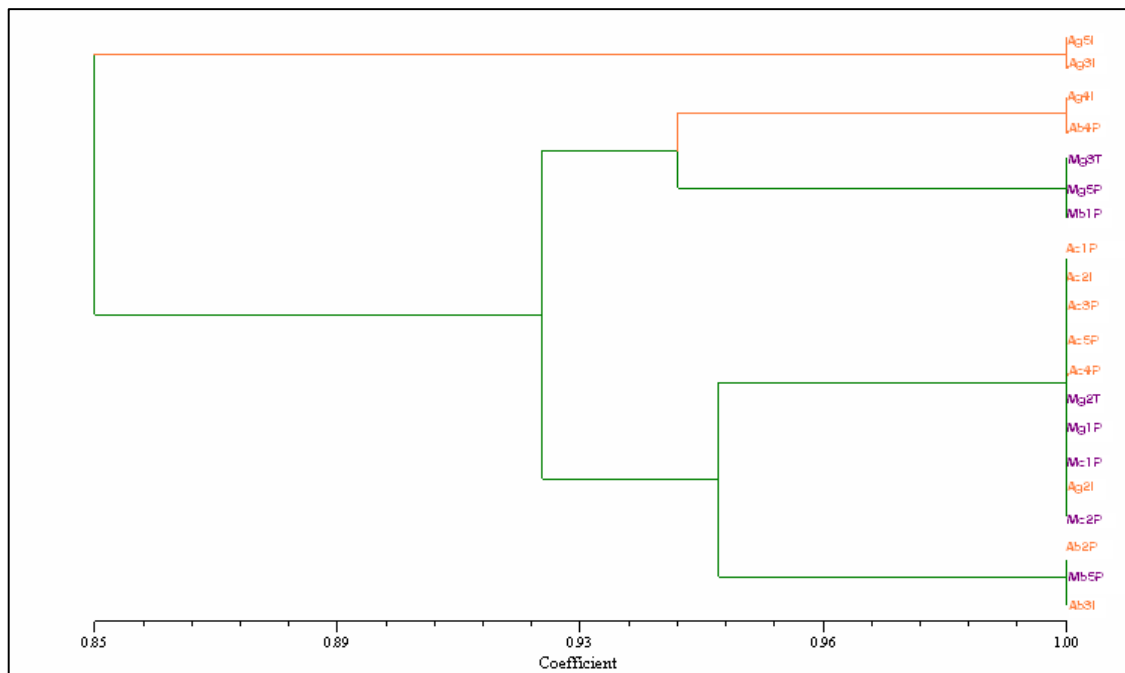


**Figura 3. Resultados de preamplificación de las muestras. (Ladder 100bp, Ac5P-Mc2P muestras de tomate de árbol analizadas). El acrónimo que identifica las muestras esta formado de Ac= amarillo común, Ag= amarillo gigante.**  
Se puede observar una alta concentración de fragmentos de diferentes tamaños desde un tamaño de 2000pb a 100 bp.



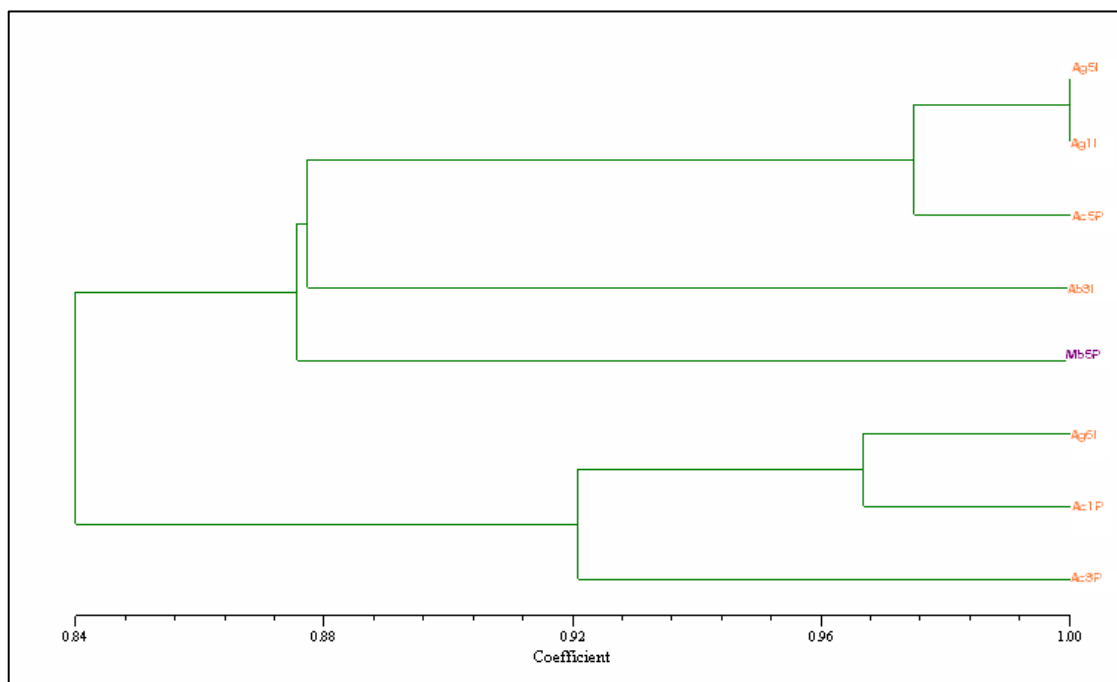
**Figura 4. Resultados obtenidos de la PCR selectiva con la combinación de primers 26 (M-CAC E-ACA), en un gel de poliacrilamida al 6%.**

Se puede observar los patrones de bandas para los 26 genotipos muestreados. Se tomaron los datos de las bandas que tenían un tamaño entre 700 y 200 bp, las cuales fueron más claras.



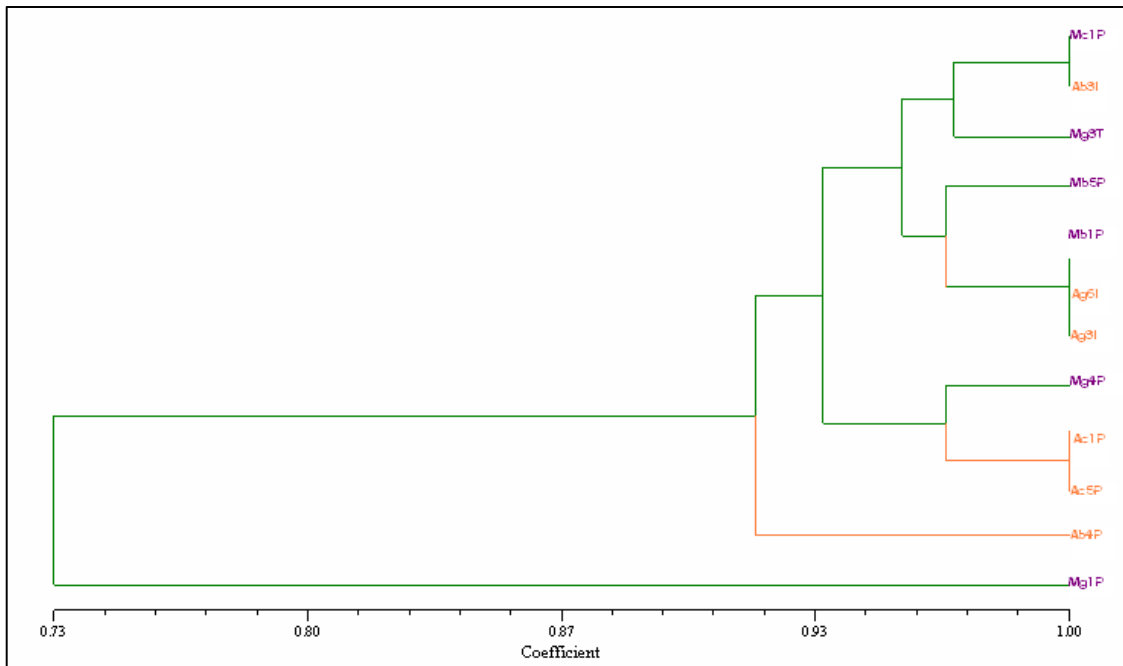
**Figura 5. Fenograma obtenido de la combinación 5 (M-CAT E-ACT). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Se puede observar dos agrupaciones principales. En la primera agrupación están las accesiones Ag5I y Ag3I, con un porcentaje de similitud del 85% con respecto al resto de accesiones. El segundo grupo es heterogéneo y contiene al resto de accesiones, se pueden ver dos subagrupaciones que diferencian a cuatro accesiones por el color del fruto, estas son: la agrupación Ag4I y Ab4P y la agrupación que contiene a las accesiones del tipo marado Mg3T, Mg5P, y Mb1P.



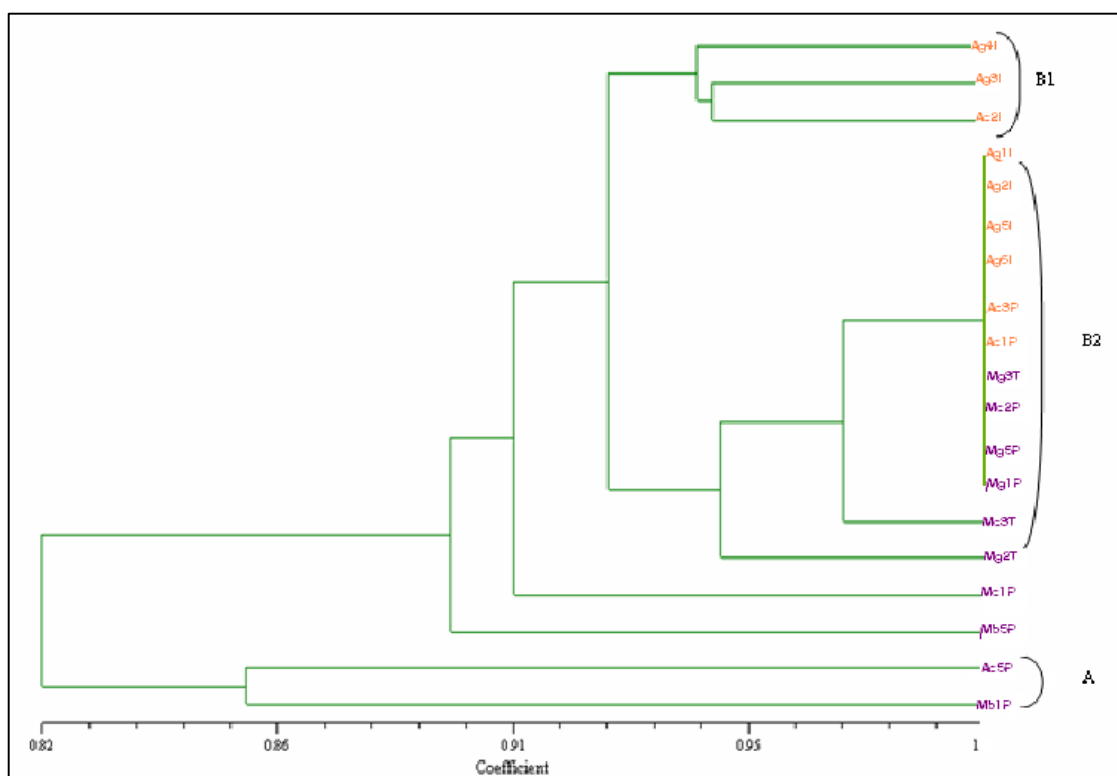
**Figura 6. Fenograma obtenido de la combinación 6 ( M-CTG E-ACA ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Las accesiones que se observan en este fenograma son del tipo amarillo, con excepción del genotipo Mb5P, perteneciente a la variedad bola morado. Se ven dos grupos con un 84% de similitud entre ellos, el uno agrupa a dos genotipos de la variedad amarillo común (Ac1P y Ac3P) junto con un genotipo de la variedad amarillo gigante (Ag6I), el segundo grupo contiene al genotipo morado Mb5P, dos genotipos de la variedad amarillo gigante que muestran ser iguales (Ag5I, Ag1I), un genotipo del tipo amarillo común (Ac5P) y un genotipo del tipo bola amarillo (Ab3I).



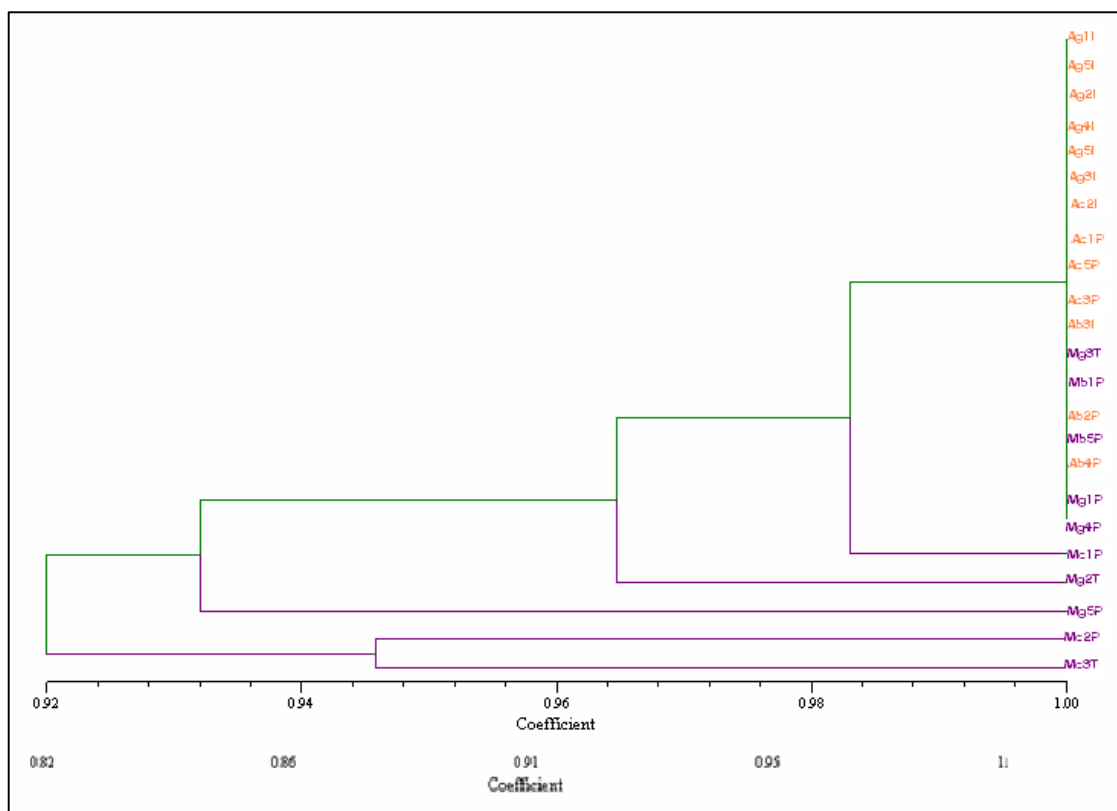
**Figura 7. Fenograma obtenido de la combinación 7 ( M-CAA E-ACG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Se observa que el genotipo Mg1P es el más alejado con una similitud del 73% con respecto al resto. Los restantes genotipos forman un grupo heterogéneo. No se diferencian agrupaciones de genotipos morfológicamente similares.



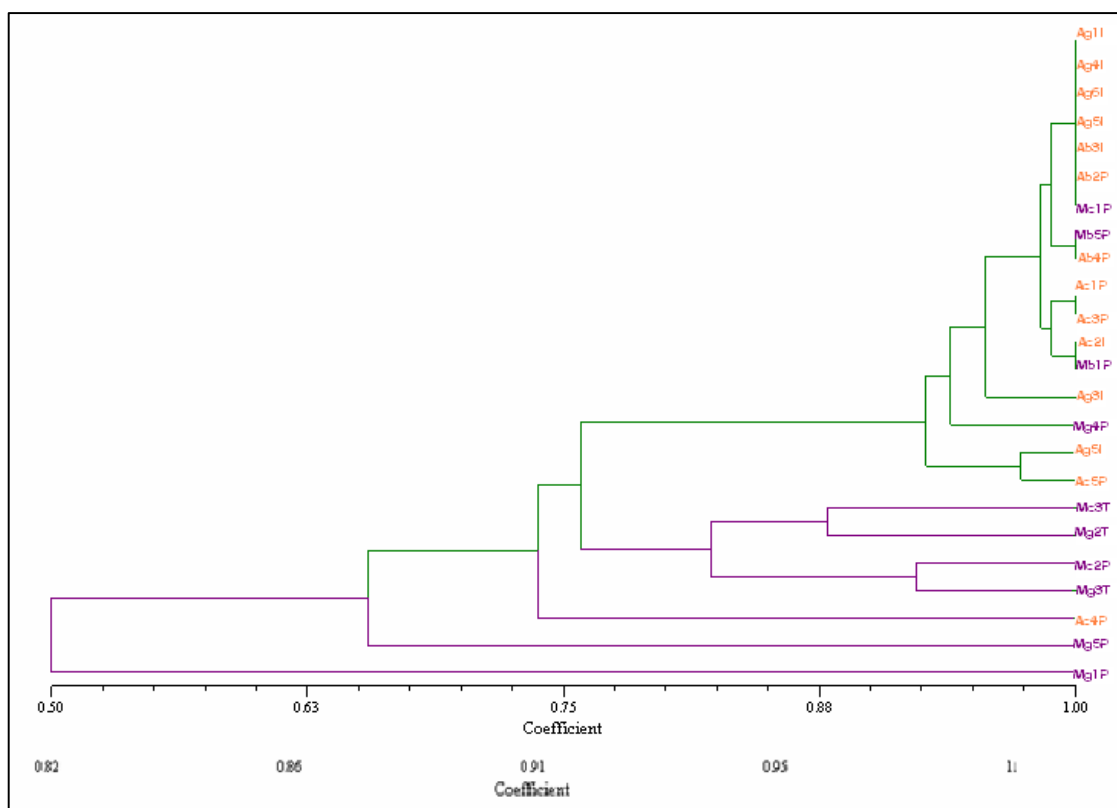
**Figura 8. Fenograma obtenido de la combinación 8 (M-CTC E-ACG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Se pueden observar dos grupos, señalados en el fenograma como B y A. En el grupo A se encuentran los genotipos Ac5P y Mb1P con una similitud del 82% con los genotipos del grupo B. El grupo B se subdivide en dos grupos B1 y B2. El grupo B1 contiene a tres variedades del tipo amarillo (Ag4I, Ag3I y Ac2I), mientras que el grupo B2 es heterogéneo y no discrimina entre genotipos que pertenecen a distintas variedades morfológicas.



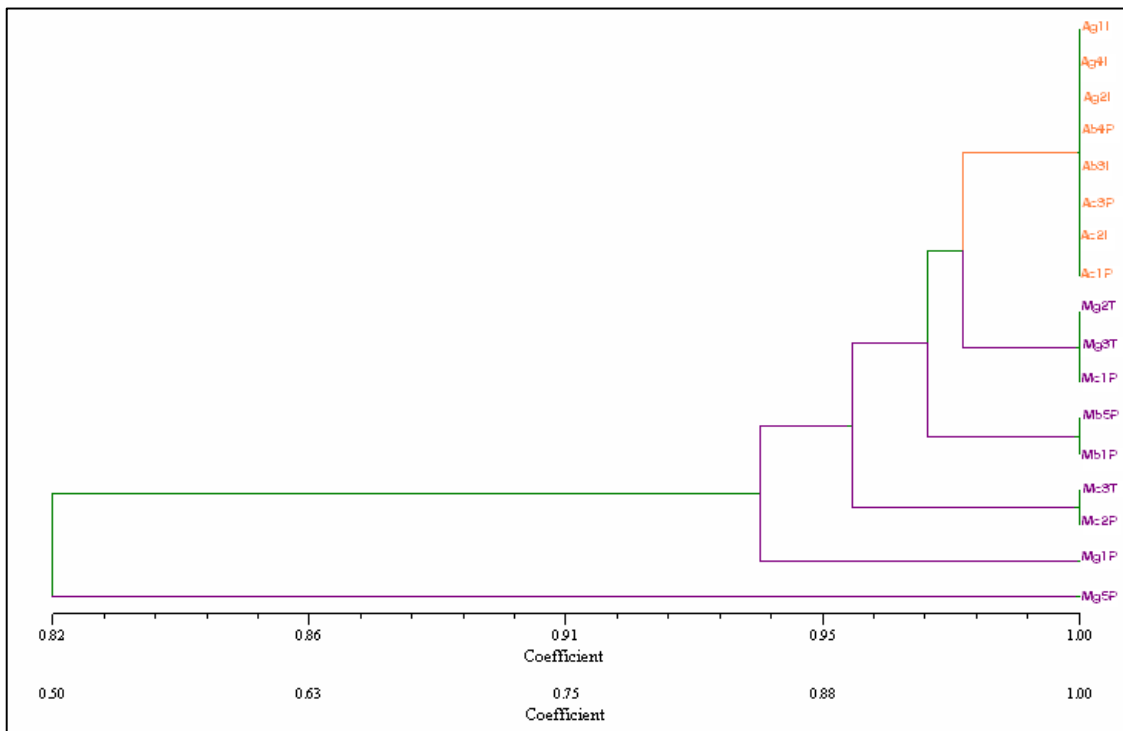
**Figura 9. Fenograma obtenido de la combinación 18 (M-CAA E-AAG ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Con ésta combinación de primers los genotipos morados son los que más se lograron diferenciar, presentando similitudes del 92 al 93% entre sí y un 93% de similitud con respecto a los genotipos del tipo amarillo. Los genotipos del tipo amarillo no presentan diferencias entre sí.



**Figura 10. Fenograma obtenido de la combinación 26 (M-CAC E-ACA ). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

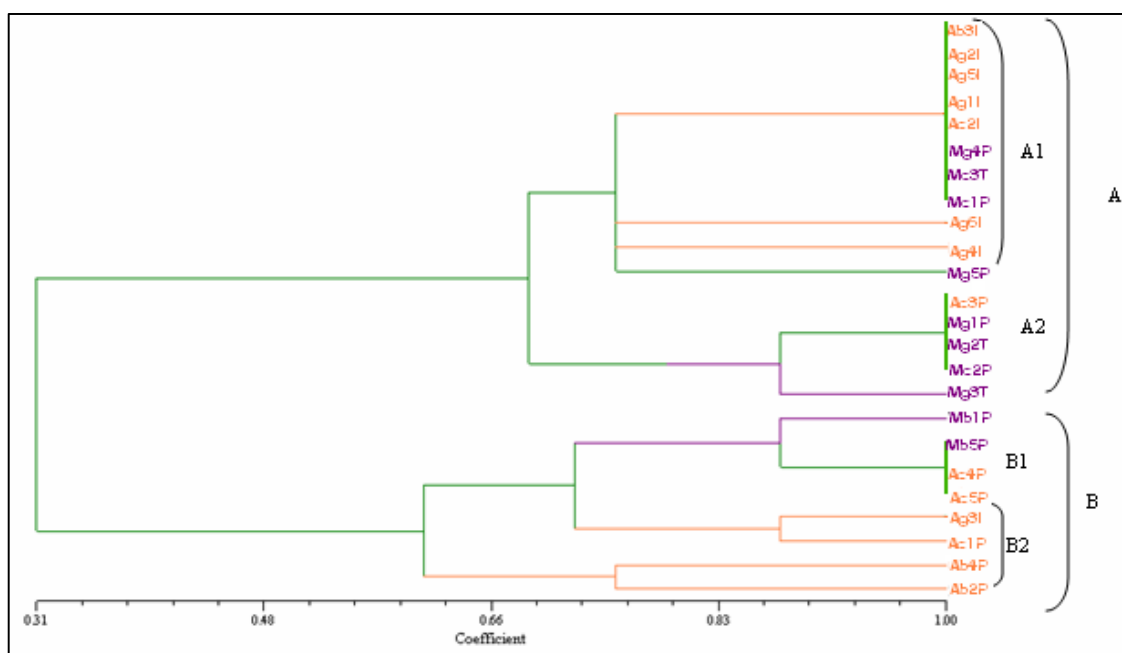
Se puede observar que la variedad Mg1P difiere en un 50% con respecto al resto. Se ve que las variedades amarillas están agrupadas juntas, teniendo un 75% de similitud con los genotipos del tipo morado, con la excepción de los genotipos Mc1P, Mb5P, Mb1P y Mg4P que están mas cercanas a las variedades amarillas y Ac4P que por el contrario se agrupa dentro de las variedades moradas.



**Figura 11. Fenograma obtenido de la combinación 46 (M-CAC E-ACT). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA, usando el coeficiente Dice.**

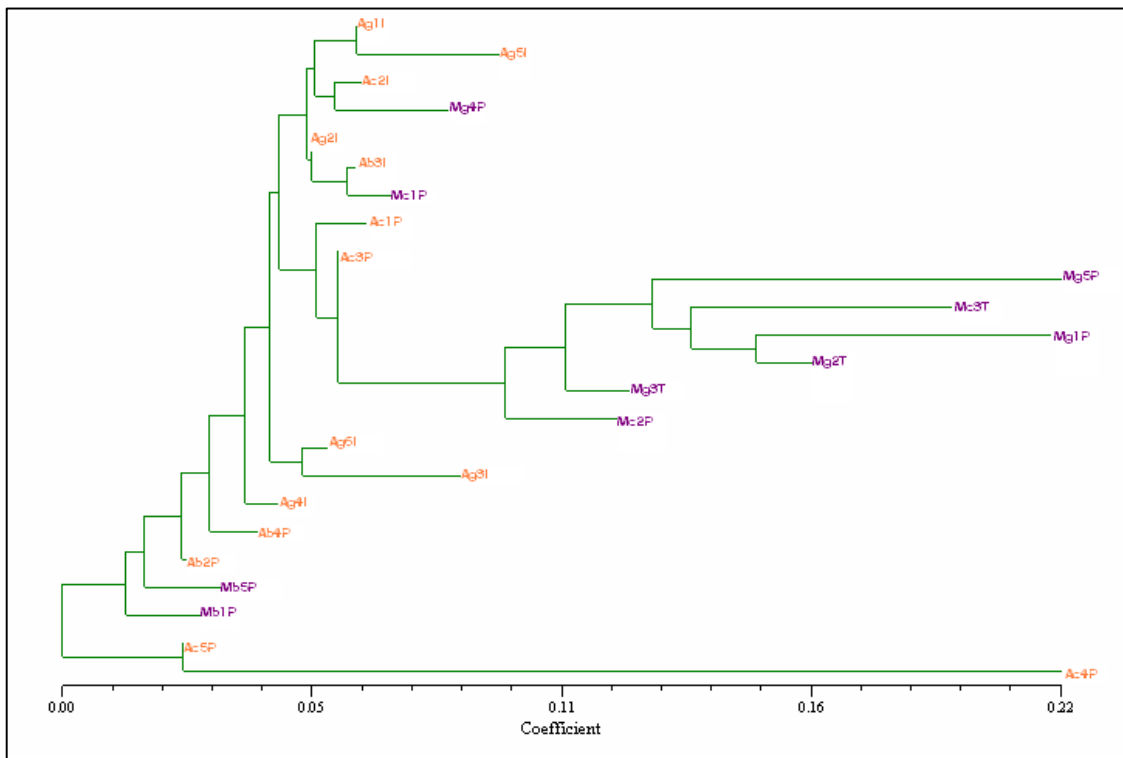
Se observa una agrupación de las variedades amarillas con una similitud del 99% al grupo más cercano y de 82% con respecto al genotipo más alejado. Las muestras del tipo morado muestran tener más diferencias entre sí.





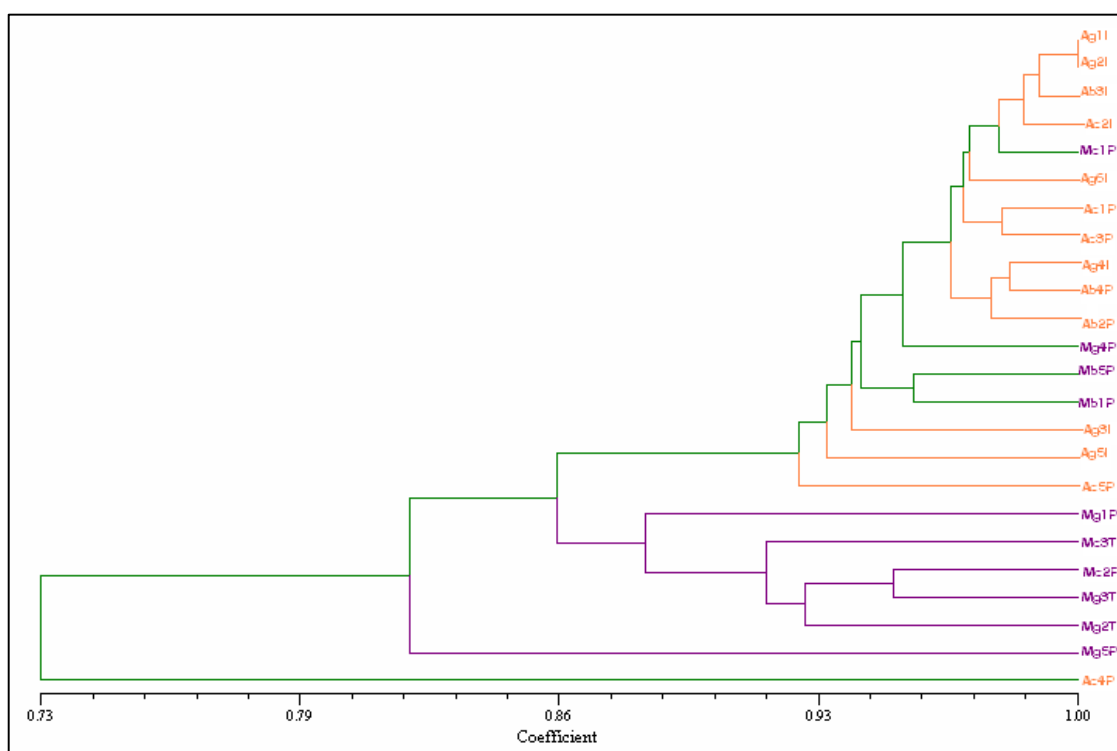
**Figura 12. Fenograma obtenido de la combinación 43 (M-CTG E-ACG). Generado por NTSYSpc2.11, UPGMA , usando el coeficiente Dice.**

Se puede observar en el fenograma dos grupos A y B con una similitud del 31%. El grupo A contiene tanto a genotipos del tipo morado como del tipo amarillo, agrupando a la mayoría de genotipos morados en un subgrupo A2, que tiene una diferencia del 66% con el subgrupo A1. En el grupo B se encuentran diferenciados los genotipos del tipo amarillo B2 con respecto a dos genotipos morados ( Mb5P, Mb1P) y un genotipo del tipo amarillo (Ac4P).



**Figura 13. Fenograma obtenido con las ocho combinaciones de primers de la Tabla 5. Generado por NTSYS 2.11, Neighbor Joining, usando el coeficiente de Nei.**

Se puede observar una distancia mayor entre los genotipos morados con relación a los genotipos amarillos, con excepción de los genotipos Mc1P, Mc4P, Mb5P y Mb1P, que parecen estar más relacionados con los genotipos del tipo amarillo.



**Figura 14. Fenograma obtenido de las combinaciones nombradas en la Tabla 5. Generado por NTSYS 2.11, UPGMA, usando el coeficiente Dice.**

Se puede observar que el genotipo Ac4P se diferencia un 27% del resto. Los genotipos del tipo amarillo están agrupados con una semejanza del 86% con respecto a los genotipos morados, con excepción de Mg4P, Mb5P, Mb1P y Mc1P, que son mucho más cercanos a los genotipos del tipo amarill.

