



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
MICROSATÉLITES PARA GENOTIPAJE DE NARANJILLA
(*SOLANUM QUITOENSE LAM.*)

Autora

Denisse Atalía Yáñez Gálvez

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
MICROSATÉLITES PARA GENOTIPAJE DE NARANJILLA (*SOLANUM
QUITOENSE LAM.*)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía

PhD. Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Autora

Denisse Atalía Yáñez Gálvez

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo

Doctorado en Agrobiotecnología

CI: 171682966-6

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Eduardo Morillo Velastegui

Doctorado en Recursos Fitogenéticos e Interacciones Biológicas

CI: 170820763-2

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Denisse Atalía Yánez Gálvez

CI: 172590838-6

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Marisol y Ricardo por todo su amor y apoyo, por estar siempre a mi lado guiándome. Gracias por esforzarse cada día y ser el mejor ejemplo de valentía.

Este logro es suyo por todo el sacrificio, trabajo y cuidado para hacer de mí y mis hermanos personas integra y buenas.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias "INIAP" especialmente al Departamento de Biotecnología por permitir la realización de este proyecto de investigación.

Al Ingeniero Fernando Rivas por la guía y apoyo para la culminación exitosa de este proyecto, Gracias.

DEDICATORIA

A mi familia, mis mejores amigos.

Por toda la alegría y sonrisas por ser quienes cambian mis malos días y me impulsan a ser mejor.

RESUMEN

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) se considera un frutal con alto potencial económico y de exportación, representa una fuente importante de recursos para la Amazonía Ecuatoriana, ya que genera cerca del 93% de la producción nacional del cultivo. Sin embargo, aunque se han desarrollado programas de mejoramiento tradicional y existe una descripción fisiológica y morfológica del frutal, la escasa información genética y molecular de la especie limita el desarrollo de programas de mejoramiento frente a plagas y enfermedades de las cuales el cultivo es susceptible. El INIAP ejecuta un programa de desarrollo de la tecnología de marcadores moleculares en cultivos de importancia económica, en cuyo marco se desarrolló esta investigación. En este estudio se planteó como objetivo la caracterización de cincuenta marcadores microsatélites específicos para naranjilla, con el fin de identificar un set de cebadores útiles en estudios de diversidad genética en esta especie. Se evaluaron seis cultivares tradicionales de naranjilla, cada uno representado por siete plantas, de las cuales se realizó la extracción de ADN empleando el protocolo descrito por Kang y colaboradores (1998) y posteriormente la amplificación por PCR, consecutivamente se verificó la amplificación de los marcadores, de los cuales cuarenta y nueve amplificaron exitosamente. Los marcadores seleccionados fueron amplificados por método M13 Tailing en mónoplex y combinaciones multiplex. Se obtuvieron los perfiles genéticos de treinta y tres marcadores SSR de los cincuenta ensayados. De estos, diez presentaron patrones heterocigóticos con un total de veinte alelos. Los veintitrés restantes presentaron patrones homocigóticos. Se obtuvo un promedio de contenido de índice polimórfico de 0.1113. Los resultados sugieren una pérdida de alelos en la especie, producida por la fragmentación de sus poblaciones. Por esta razón, se recomienda ampliar la base genética de la naranjilla y variedades híbridas con el fin de enriquecer los recursos genéticos de la especie.

ABSTRACT

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) Is considered a fruit with high economic and export potential, represents an important source of resources for the Ecuadorian Amazon, since it generates about 93% of the national production of the crop. However, although traditional breeding programs have been developed and there is a physiological and morphological description of the fruit, the scarce genetic and molecular information of the species limits the development of breeding programs against pests and diseases from which the crop is susceptible. INIAP is implementing a program for the development of molecular markers technology in economically important crops, under which this research was developed. This study aimed to characterize fifty microsatellite markers specific for naranjilla, in order to identify a set of primers useful in studies of genetic diversity in this species. Six traditional naranjilla cultivars were evaluated, each represented by seven plants, from which DNA extraction was performed using the protocol described by Kang et al. (1998) and subsequently the PCR amplification, the amplification of the markers was consecutively verified, of which forty-nine successfully amplified. The selected markers were amplified by M13 Tailing method in singleplex and multiplex combinations. The genetic profiles of thirty-three SSR markers were obtained from the fifty tested. Of these, ten presented heterozygous patterns with a total of twenty alleles. The remaining twenty-three had homozygous patterns. An average polymorphic index content of 0.1113 was obtained. The results suggest a loss of alleles in the species, caused by the fragmentation of their populations. For this reason, it is recommended to expand the genetic basis of naranjilla and hybrid varieties in order to enrich the genetic resources of the species.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
1.4 Justificación.....	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Solanum quitoense, características generales.....	6
2.1.1 Descripción botánica.....	7
2.2 Importancia de la naranjilla en el Ecuador.....	11
2.3 Mejoramiento del cultivar.....	14
2.4 Marcadores moleculares.....	15
2.4.1 Microsatélites.....	15
2.5 Secuenciación de nueva generación (NGS).....	18
2.6 Metodología M13 Tailing.....	20
2.7 Análisis de Diversidad genética.....	22

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	24
4. PROCEDIMIENTOS	26
4.1 Población y muestreo	26
4.1.1 Población	26
4.1.2 Muestras	26
4.2 Materiales y Métodos	27
4.2.1 Material de laboratorio: reactivos y equipos	27
4.2.2 Extracción de ADN de variedades de Solanum quitoense	28
4.2.3 Cuantificación y validación del ADN de Solanum quitoense	28
4.2.4 Rastreo de marcadores	30
4.2.5 Validación del polimorfismo de los marcadores SSR amplificados. ...	32
4.3 Análisis de datos	37
4.3.1 Análisis de Diversidad genética	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 Validación del DNA de cultivares de Solanum quitoense	38
5.2 Validación de amplificación de Marcadores SSR	39
5.3 Estandarización de amplificación de combinaciones singleplex, dúplex y tríplex por M13 Tailing	42
5.4 Genotipado de SSR en el equipo LI-COR 4300S	44

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
6.1 Conclusiones.....	54
6.2 Recomendaciones	55
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tallo de Solanum quitoense var quitoense..	8
Figura 2. Tallo de Solanum quitoense var septentrional..	8
Figura 3. Hojas de Solanum quitoense var septentrional	9
Figura 4. Hojas de Solanum quitoense var quitoense	9
Figura 5. Inflorescencia de Solanum quitoense con pistilo largo.	10
Figura 6. Diagrama floral de género Solanum.	10
Figura 7. Fruto de Solanum quitoense semimaduro.	11
Figura 8. Estadísticas de cultivo de naranjilla a nivel nacional.	13
Figura 9. Estructura de microsatélites, ejemplo de un SSR.	16
Figura 10. Esquema de metodología M13 Tailing	21
Figura 11. Diseño del plan experimental	25
Figura 12. Resultados de amplificación por PCR de las variedades de Solanum quitoense.	38
Figura 13. Visualización de productos de PCR en gel de agarosa.	40
Figura 14. Visualización de productos de PCR en gel de agarosa	41
Figura 15. Visualización de productos de PCR por método M13 Tailing	42
Figura 16. Estandarización de combinaciones multiplex.	43
Figura 17. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR	44
Figura 18. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR obtenidos con el LI-COR 4300S.	45
Figura 19. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Solanum quitoense</i>	7
Tabla 2. Muestras seleccionadas de <i>Solanum quitoense</i>	27
Tabla 3. Mezcla de PCR para la validación de muestras de <i>Solanum quitoense</i> empleando un marcador ISSR 844A.	29
Tabla 4. Programa de amplificación para la validación de las muestras de <i>Solanum quitoense</i> con los marcadores ISSR 844A.	29
Tabla 5. Mezcla de PCR para la validación de 50 marcadores microsatélite empleando muestras de ADN del frutal naranjilla.	31
Tabla 6. Programa de amplificación (PCR) para la validación de los 50 marcadores microsatélite con las muestras de ADN de naranjilla.	31
Tabla 7. Programa de amplificación (PCR) para validación de SSR con gradiente de temperatura.	32
Tabla 8. Combinaciones en dúplex, tríplex y mónoplex con los marcadores seleccionados.	33
Tabla 9. Mezcla de PCR para la amplificación de combinaciones tríplex, dúplex y singleplex.	35
Tabla 10. Programa de amplificación, metodología M13 Tailing.	36
Tabla 11. Alelos reportados por locus en variedades de <i>Solanum quitoense</i>	47
Tabla 12. Diversidad genética presente en variedades de <i>Solanum quitoense</i>	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), es una fruta tropical perteneciente a la sección *Lasiocarpa*, la que incluye entre 11 y 13 especies dentro de la familia de las Solanáceas (Heiser, 1985). Este frutal es considerado como un cultivo propio de la región andina, principalmente en el noreste de Suramérica. Se cultiva desde la antigüedad, específicamente desde la época de la Real Audiencia de Quito, por lo que se la denominó “quitoense” (Heiser, 1972). Es un fruto de forma ovalada, con un endospermo carnoso lleno de pulpa de color verde, sabor y olor agrídulce y aromático. Por su contenido en vitaminas y minerales es apetecido por el mercado nacional y extranjero (Silva *et al.*, 2016)

El cultivo de naranjilla representa un rubro de alto potencial económico para la Amazonía Ecuatoriana. Las provincias de Napo, Morona Santiago, Pastaza y Sucumbíos llegan a generar hasta el 93% de la producción nacional (Silva *et al.*, 2016). Según el INEC en 1990 se produjeron 20663 toneladas de naranjilla, mientras que en el 2010 la producción fue de 20005 toneladas, que significó una reducción del 4% a nivel nacional (INEC, 2010). Estas pérdidas en rendimiento y hectáreas sembradas se deben a la susceptibilidad del cultivo a varias enfermedades y plagas, tales como fusariosis (*Fusarium oxysporum*), nemátodos (*Meloydogine.sp*), gusano del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*), artrópodos, entre otros (Andrade, 2005). El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y la Universidad de Virginia Tech colaboraron con el desarrollo del programa de Investigación denominado “Manejo Integrado de Plagas en Solanaceas” (MIP), el mismo que realizó un aporte en la difusión de buenas prácticas agrícolas, especialmente en lo referente al manejo de plagas, su prevención y control. Se evaluó el impacto socio-económico positivo que los agricultores obtuvieron después de la adopción de las metodologías propuestas (INIAP, 1998).

La naranjilla al representar una fuente de recursos económicos importante para sus cultivadores y además por su aporte nutricional, ha sido objeto de investigaciones enfocadas a disminuir el impacto de enfermedades y plagas (Revelo *et al.* 2010). Jurado y colaboradores, (2013) usó técnicas para la reproducción de *Solanum quitoense* en injertos de diferentes Solanáceas como *S. hirtum*, *S. umbellatum*, *S. marginatum* y *S. sessiliflorum* donde se evaluó *in vitro* y *ex vitro* la capacidad de resistencia y comportamiento agronómico de la variedad en diferentes condiciones ambientales. Se registraron resultados no significativos entre los tratamientos, sin embargo *Solanum quitoense* con el patrón de *S. hirtum* presento mejores rendimientos *ex vitro* que los demás patrones (Jurado *et al.*, 2013).

La mejora genética de los cultivos representa un avance en el campo agronómico y ha permitido obtener variedades con mejores características en cuanto a calidad de fruto, tamaño del fruto, productividad y sobre todo se ha enfocado a la resistencia de plagas (Soria, 1997, Silva, *et al.* 2016). Se han desarrollado híbridos interespecíficos que han buscado conferir resistencia, pero se ha evidenciado la pérdida de calidad en los frutos. Silva y colaboradores, (2016) ha generado una población segregante que proviene de los cruzamientos interespecíficos entre *Solanum quitoense* y otras solanáceas como *Solanum hipodorum* y *Solanum vestissimum*, las cuales le confieren genes de resistencia. El cruzamiento de *Solanum quitoense* y *S. sessiliflorum* mostró mayor resistencia a problemas de suelo, sin embargo, los individuos mostraron disminución en la calidad de fruto (Silva, *et al.* 2016).

El mejoramiento genético se ha apoyado en la observación morfológica y fisiológica de estas especies y variedades híbridas debido a la ausencia de información genética y molecular, lo que ha limitado el desarrollo de programas de mejoramiento y ha incentivado el desarrollo de técnicas moleculares.

Los marcadores moleculares son secuencias de DNA que se localizan dentro del genoma de un organismo y pueden brindar información valiosa sobre la diversidad genética de individuos y poblaciones. Los marcadores moleculares son específicos y son útiles para la detección de polimorfismos. Entre los marcadores moleculares más aplicados están los RFLP (Polimorfismos de

longitud de fragmentos de restricción), AFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), ISSR (secuencias intercaladas entre los microsatélites) y SSR (Repetición de secuencia simple) (Azofeifa, 2006).

Fory y colaboradores, (2011) realizaron la evaluación de la diversidad genética de especies de naranjilla y especies de la sección *Lasiocarpa*, de la región andina y amazónica mediante marcadores AFLP, para determinar el nivel de polimorfismo entre las especies. Se obtuvo un dendograma que permitió la clasificación de las muestras en grupos de especies y entre taxa. Las especies de esta sección mostraron que poseen barreras para la hibridación, tales como el aborto de semillas híbridas y esterilidad híbrida parcial, por lo que esta sección puede ser un linaje del clado *Leptostemonum*. Del grupo de *Lasiocarpaceae* de la región Andina se obtuvieron tres subgrupos, que están estrechamente relacionados: en el primero se encuentra *S. hirtum* y *S. pseudolulo*; en el segundo *S. quitoense* y *S. vestissimum*; y finalmente accesiones de *S. pectinatum*, mientras que en la región amazónica se determinó una similitud de casi el 99% entre *S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium*. Se demostró también que existe una mayor variabilidad genética en las especies silvestres en comparación con los cultivados lo que puede atribuirse a la pérdida de alelos debido a la deriva génica (Fory *et al.*, 2011).

Los marcadores microsatélite son un avance tecnológico en el campo de la biología molecular, ya que poseen ventajas sobre otras técnicas de marcadores RAPDs, RFLPs donde los niveles de heterocigosidad suelen ser más bajos y no presentan codominancia (Provan *et al.* 1996). Se han realizado diferentes investigaciones dentro del género *Solanum* en las cuales se han empleado marcadores microsatélite para evaluar el alcance y distribución de diversidad genética (Cheng *et al.*, 2012, Feingold *et al.*, 2005., Provan *et al.*, 1996). Los SSR permiten la identificación de la diversidad genética de plantas que son autógamias o que han sufrido polinización cruzada natural como el caso de la naranjilla (Torres *et al.*, 2008). Se utilizaron 48 SSR altamente polimórficos descritos para *Solanum tuberosum*, los cuales son heterólogos y poseen una amplia distribución a lo largo del genoma para la caracterización molecular de

especies de la sección *Lasiocarpa*, y la obtención de marcadores útiles para el genotipado de *Solanum quitoense*. Se evaluó la transferibilidad de estos marcadores y una diversificación preliminar de la sección. 13 marcadores pudieron ser transferidos exitosamente, sin embargo las tasas de transferibilidad fueron más bajas de lo esperado, debido a la distancia filogenética entre las especies y los SSR, dando como resultado un bajo índice de polimorfismo para los marcadores, lo que los hace inadecuados para el genotipado de dicha especie (Torres *et al.*, 2008)

Pese a que los marcadores basados en ADN son altamente informativos y útiles en investigación de genética molecular, su desarrollo y obtención es costosa y compleja, por esta razón se ha desarrollado la tecnología de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS). Esta técnica identifica rápida y eficientemente marcadores microsatélites con un mínimo costo y sin los esfuerzos de las técnicas tradicionales (Zapala, 2011). En 2014 Morillo desarrolló librerías genómicas a partir de la secuenciación de la variedad de *Solanum quitoense* (N3) para análisis moleculares por NGS. Se obtuvo 32073 contigs con secuencias SSR de los cuales 14918 fueron analizados para el desarrollo cincuenta marcadores SRR los cuales serán utilizados en el proyecto (Morillo, sin publicar)

1.2 Planteamiento del problema

A pesar que la naranjilla representa un rubro de importancia para el Ecuador la información que existe de la especie y sus variedades es solamente empírica, es decir ha sido netamente fenotípica, morfológica y fisiológica y existe poca o ninguna información genética y molecular del cultivo.

La caracterización genética del frutal permitirá obtener información relevante que dará paso al planteamiento diferentes programas de fitomejoramiento por lo que es preciso obtener un set de marcadores polimórficos útiles para el genotipado de *Solanum quitoense*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

Validar y caracterizar un set de marcadores microsatélites útiles en el genotipaje de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Validar la amplificación de un set de marcadores microsatélites (SSRs) identificados por NGS en *Solanum quitoense*.
- Caracterizar el polimorfismo de los SSRs validados en diferentes cultivares de *Solanum quitoense*
- Establecer combinaciones multiplex de los marcadores polimórficos para genotipaje de *S. quitoense* utilizando la tecnología M13-Tailing

1.4 Justificación

El uso de marcadores moleculares de especies como la naranjilla permite obtener información relevante sobre la diversidad genética de la especie. La información fenotípica que se ha documentado a lo largo de los años no ha sido suficiente para solucionar la susceptibilidad del cultivo a plagas y enfermedades y generar un programa de fitomejoramiento efectivo, al mismo tiempo excluye una gran cantidad de información que podría ser interés agronómico. La aplicación de marcadores SSR puede proporcionar información sobre genes de interés no solamente asociados con resistencia, sino permitir una mejora más amplia del cultivo, así como determinar la historia evolutiva de la especie, puede construir un árbol filogenético y la caracterización genética de especies híbridas y especies emparentadas. En el Ecuador se ha realizado la caracterización genética de especies como; tomate de árbol (*Solanum betaceum*), el guayacán negro (*Handroanthus billbergii*), cacao (*Theobroma cacao*), trigo (*Triticum vulgare*) entre otros, utilizando marcadores microsatélite,

logrando obtener perfiles genéticos de las especies, así como determinar las diferencias entre poblaciones y la discriminación de sitios de origen lo que representa un avance dentro del campo de la biotecnología en el país.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través del departamento de Biotecnología ha considerado la necesidad de caracterizar un set de marcadores microsatélite específicos para *Solanum quitoense* que permita obtener información genética y molecular para el planteamiento futuro de programas para el mejoramiento genético del frutal y especies afines.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Solanum quitoense*, características generales

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), es una fruta tropical que se encuentra clasificada dentro del reino vegetal, división angiosperma, como se describe en la tabla 1. Pertenece al género *Solanum* dentro de la sección *Lasiocarpa*, la cual incluye entre 11 a 13 especies (Revelo *et al.*, 2010, Heiser, 2003, Heiser, 1985). Este frutal es considerado como un cultivo propio de la región andina principalmente en el noreste de Suramérica. El origen de diversidad genética del taxón se localiza entre Ecuador, Colombia y Perú. (Lobo *et al.*, 2007).

Clasificación taxonómica

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Solanum quitoense.

Reino:	Vegetal
Subreino:	Espermatophyta
División:	Angiosperma
Subdivisión	Dicotiledónea
Clase:	Simpetala
Subclase:	Pentacíclica
Orden:	Tubifloras
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Nombre científico:	<i>Solanum quitoense Lam.</i>

Tomado de (Fory *et al.*, 2005)

2.1.1 Descripción botánica

La naranjilla es una planta dicotiledónea de la cual existen dos variedades *Solanum quitoense var quitoense* y *Solanum quitoense var septentrional*. Está compuesta por una raíz principal que llega a penetrar hasta 50 cm de profundidad y posee un amplio desarrollo de las raíces superficiales (Vásquez, 2012).

El tallo es leñoso, y en sus primeros años de desarrollo es verdoso y delgado. Sin embargo, en su fase adulta se forma un tallo robusto y leñoso que llega a alcanzar hasta 3 metros de altura. Dependiendo de la genética del cultivar, este puede poseer vellosidades o espinas. *Solanum quitoense var quitoense* posee

tallo con espinas, mientras que *Solanum quitoense var septentrional* posee tallo con vellosidades. Las ramas son leñosas con un crecimiento radial y pueden llegar hasta los 5 cm de diámetro (Gómez *et al.*, 2014, Vásquez, 2012).



Figura 1. Tallo de *Solanum quitoense var quitoense*.

Tomado de (Fory *et al.*, 2005, Lobo *et al.*, 2007).



Figura 2. Tallo de *Solanum quitoense var septentrional*.

Tomado de (Fory *et al.*, 2005, Lobo *et al.*, 2007).

Las hojas poseen forma amplia, oblonga de hasta 40 cm de largo y 35 cm de ancho son de color verde por el haz y verde claro con tonos violáceos por en el envés. Dependiendo la variedad del cultivar poseen vellosidades o espinas la variedad *septentrional*, muestra presencia de espinas que llegan a cubrir a la

nervadura y al peciolo, el cual une a las hojas con las ramas y puede llegar a medir hasta 15 cm de largo (Gómez *et al.*, 2014, Vásquez, 2012).



Figura 3. Hojas de Solanum quitoense var septentrional

Tomado de (Fory *et al.*, 2005, Lobo *et al.*, 2007).



Figura 4. Hojas de Solanum quitoense var quitoense

Tomado de (Fory *et al.*, 2005, Lobo *et al.*, 2007).

Las inflorescencias presentan 5 pétalos de color blanco y violáceo por el detrás, 5 sépalos pubescentes de color verde, los estambres alternan con los pétalos y un pistilo que pueden ser de tres tipos: de pistilo corto, medio y largo y pueden encontrarse en una misma planta, sin embargo, solo el pistilo largo es fértil. La planta posee un cojín floral de hasta 30 flores siendo las de los extremos del racimo flores estériles y las del interior hermafrodita presentando un sistema sexual andromonoecia. (Gómez *et al.*, 2014, Lobo *et al.*, 2007).



Figura 5. Inflorescencia de *Solanum quitoense* con pistilo largo.

Tomado de (Silva *et al.*, 2016).

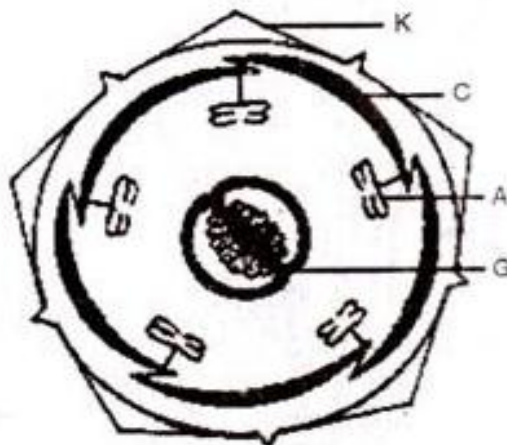


Figura 6. Diagrama floral de género *Solanum*; G) Ovario A) Estambres C) Pétalos K) Sépalos.

Tomado de (Andrade *et al.*, 2015).

El fruto es una baya redondeada entre 4 y 8 cm de diámetro con un peso aproximado a los 80 gr. Es de color naranja o amarillo intenso dependiendo la variedad del cultivar. Está cubierta por vellosidades de color naranja y rojo durante la etapa de desarrollo, sin embargo, suelen irse desprendiendo conforme el fruto madura. La pulpa es de color verde y posee múltiples semillas pequeñas, lisas y redondeadas, pudiendo ser hasta 1000 semillas por fruto (Gómez *et al.*, 2014, Vásquez, 2012, Lobo *et al.*, 2007).



Figura 7. Fruto de *Solanum quitoense* semimaduro.

Tomado de (Andrade *et al.*, 2015).

Este fruto se desarrolla óptimamente en zonas de clima cálido húmedo, en un rango de temperaturas entre los 17°C a 26°C siendo la temperatura ideal 20°C, una humedad relativa de 78% y una altitud de 600 m.s.n.m a 2000 m.s.n.m. (Revelo *et al.*, 2003).

2.2 Importancia de la naranjilla en el Ecuador

La naranjilla se cultiva desde la época de la Real Audiencia de Quito, sin embargo, se inició la comercialización en la provincia de Pastaza (en el cantón Mera específicamente) en los años sesenta. Con la aparición de plagas, enfermedades y el poco conocimiento de manejo agronómico, estos cultivos

fueron desapareciendo, lo cual obligó a los agricultores a trasladarse a nuevas plantaciones. Estos inconvenientes disminuyeron drásticamente la producción del cultivo y su desarrollo (Guayasamín, 2015).

El cultivo de naranjilla representa una de las principales fuentes de ingreso para la región amazónica sobre todo para las provincias de Napo, Morona Santiago, Pastaza y Sucumbíos las cuales generan hasta el 93% de la producción nacional con una productividad de 20005 toneladas en 2010 (Silva *et al.*, 2016, Guayasamín, 2015). Dentro de las variedades más cultivadas tenemos a Puyo híbrido (61%), INIAP-Palora híbrido (38%) y las variedades comunes constituyen el 1% de la producción. Las variedades más apetecidas son: Baeza, Baeza roja, Dulce, Agria y Bolona, las cuales son conocidas como naranjilla “común” o “de jugo”. Los híbridos tienden a ser menos apreciadas en cuanto a sabor y aroma ya que surgieron en respuesta a la susceptibilidad del fruto a plagas, por lo que se suelen comercializarse con precios más bajos. Las hectáreas sembradas a nivel nacional según MAGAP-SIGAGRO (2011) fueron de 3643, lo que constituye un aumento en el cultivo y el rendimiento de esta solanácea., Por ejemplo, el rendimiento solamente en Tungurahua fue de 6.54 toneladas/hectárea en 2011, comparado con las 5.49 toneladas/hectáreas reportadas a nivel nacional en 2010. Esto se debió al uso del híbrido Puyo por parte de los agricultores, dado que muestra resistencia al hongo *Fusarium oxysporum*, lo que ha permitido impulsar nuevamente el rubro (MAGAP-SIGAGRO, 2011).

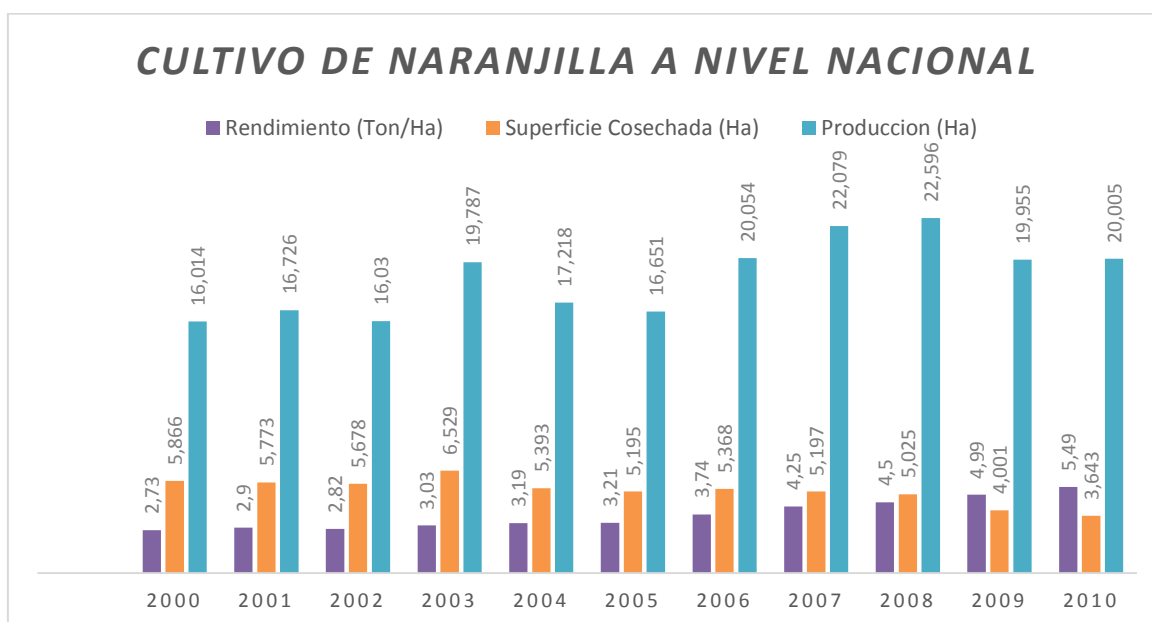


Figura 8. Estadísticas de cultivo de naranjilla a nivel nacional.

Adaptado de (MAGAP-SIGAGRO, 2011).

Durante las últimas décadas el cultivo de naranjilla ha sido inestable en producción, rendimientos y superficie cosechada. En 1997 se obtuvo un rendimiento de 8.36 toneladas/hectárea y en 2000 se alcanzó solamente 2.73 toneladas/hectárea. Lo mismo se evidenció en superficie cosechada, en 1992 se cultivó 8720 hectáreas en comparación con 2011 que solo fueron 3643 hectáreas (Guayasamín, 2015. Revelo *et al.*, 2010). El mayor porcentaje de pérdidas es debido a la susceptibilidad del cultivo a enfermedades y plagas como fusarium (*Fusarium oxysporum*, que ataca al sistema vascular de la planta provocando una marchitez temprana), nematodos (*Meloydogine.sp*, los cuales producen daños en las raíces, lo que conlleva al deterioro de hojas y fruto hasta la marchitez), gusano del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*, que causa daños en la corteza y en la pulpa del fruto), lancha (*Phytophthora sp.*, los cuales invaden las hojas y tallos e impiden la circulación de nutrientes, lo que lleva a la muerte de la planta), entre otros (Revelo *et al.*, 2010, Lozano *et al.*, 2007). Estas plagas y enfermedades no solamente han generado pérdidas de producción sino han conllevado al uso excesivo de los plaguicidas, ya que el agricultor debe realizar hasta 15 controles por año con una mezcla de químicos inadecuados como es el carbofuran y metanidofos. Esto ha ocasionado

problemas en la salud del agricultor y al mismo tiempo causa daños al ambiente e incrementa los costos de producción (Andrade, 2005).

2.3 Mejoramiento del cultivar

La naranjilla al ser la principal fuente de ingresos del sector agrónomo de la región amazónica, siendo cerca del 89% de los agricultores los que se dedican a la producción del cultivo y a su vez por sus atractivas características organolépticas y aporte nutricional es una fruta apetecida por el mercado extranjero, sin embargo, la pérdida en producción ha limitado el crecimiento y desarrollo del rubro (Guayasamín, 2015, Andrade, 2005)

Este cultivo ha sido objeto de investigaciones enfocadas en solucionar los problemas de plagas y enfermedades los cuales son la principal debilidad del frutal (Revelo et al. 2010). Para esto, se han realizado injertos con diferentes Solanáceas como; *S. hirtum*, *S. marginatum* y *S. sessiliflorum*, de donde se obtuvieron híbridos con mejores características en cuanto a resistencia a enfermedades como el híbrido Palora y el híbrido Puyo. Sin embargo, las características de sabor y aroma fundamentales de la naranjilla han disminuido (Jurado et al., 2013).

En diferentes especies, el mejoramiento genético ha permitido generar variedades con características superiores, resolviendo problemas agronómicos como la tolerancia a la salinidad, sequía, resistencia a plagas y enfermedades que los tratamientos convencionales no han podido resolver (Estrada, 2000)

En naranjilla se desarrollaron poblaciones segregantes mediante cruzamientos interespecíficos de *Solanum quitoense* y otras solanáceas que poseen genes de resistencia a plagas, obteniendo una nueva variedad híbrida (*Solanum quitoense* vs *S. sessiliflorum*) que mostró mayor resistencia a plagas, aunque se evidenció disminución en características organolépticas propias de la naranjilla (Silva, et al. 2016).

2.4 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que están localizadas dentro del genoma de un organismo y son capaces de diferenciar entre genotipos. Estos fragmentos pueden estar situados fuera o dentro de regiones codificantes y puede brindar información directa o indirecta de un rasgo de interés. Los marcadores moleculares proveen información sobre la variación de un alelo en un locus dado (Azofeifa, 2006, Schlötterer Christian, 2004, Mohan *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares discriminan diferencias (polimorfismos) en las secuencias de ADN, lo cual genera información valiosa del genoma de individuos o poblaciones (Azofeifa, 2006, Schlötterer Christian, 2004, Nuez Viñals, Carrillo Becerril and Lozano, 2000).

Entre la tecnología aplicada para el mapeo genético y mejoramiento genético asistido por marcadores se cuentan marcadores como los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), fragmentos DNA amplificados aleatorio (RAPD) y polimorfismo de repetición de secuencia (SSR o SSRP). Los marcadores moleculares son específicos y son en extremo útiles para distinguir entre genotipos, así como medir sus niveles de heterocigosidad (Azofeifa, 2006).

2.4.1 Microsatélites

Los marcadores microsatélite o secuencias repetidas simples (SSR) son fragmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten en tándem y al azar a lo largo de genoma y están en forma abundante en los genomas de eucariotas. Los tri y tetra nucleótidos son los menos comunes siendo los di los más repetidos. En genomas vegetales el (AT) n es el más abundante. Estos marcadores poseen ventajas sobre otras técnicas de marcadores RAPDs, RFLPs ya que poseen un elevado nivel de polimorfismo, son co-dominantes, confiables, de simple análisis y reproducible (Aranguren *et al.*, 2005, Provan *et al.* 1996).

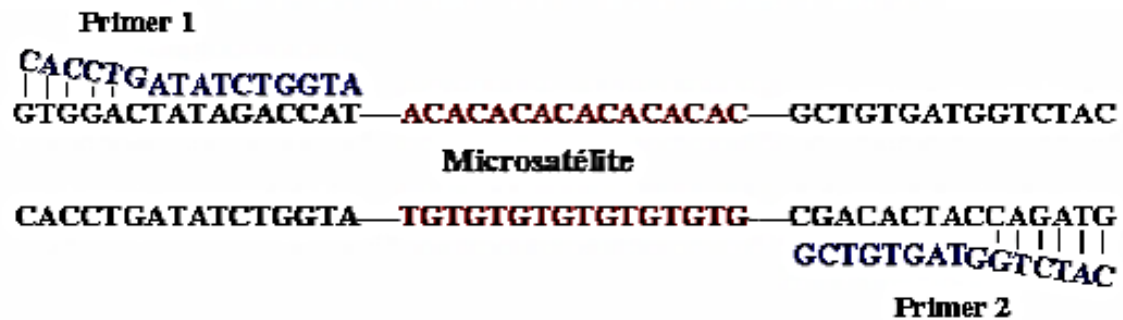


Figura 9. Estructura de microsatélites, ejemplo de un SSR di nucleótido A-C(n).

Tomado de (Aranguren et al., 2005).

Los SSR pueden estar situados en regiones codificantes y no codificantes, aunque el número y tipo de repeticiones varía según la especie. Los microsatélites presentan altos niveles de polimorfismo debido a las diferencias de longitud y permiten discriminar un individuo homocigoto o heterocigoto para un determinado locus (Santamaría, 2015).

Se han desarrollado SSR en diferentes cultivares de importancia a nivel mundial como: *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Oriza sativa*, *Zea mays*, entre otros cultivos de interés agronómico (Provan et al., 1996).

En el maíz (*Zea mays L.*), existe un amplio desarrollo, sin embargo, la información recopilada se considera insuficiente para el avance de la investigación. Sharopova y colaboradores (2002), desarrollaron y mapearon SSR para maíz, generando 1051 nuevos marcadores microsatélites utilizando información de secuencias de ADN de librerías genómicas. En este estudio se utilizaron tres poblaciones cartográficas para posicionar 978 marcadores en conjunto con información preexistente en librerías públicas como un aporte complementario a la investigación de esta especie (Sharopova et al., 2002)

Otra especie caracterizada ampliamente es el arroz (*Oryza sativa L.*) el cual también se considera un cultivo gran impacto a nivel mundial. En 2002, McCouch y colaboradores desarrollaron 2414 nuevos pares de SSR di, tri, y tetra-nucleótidos que fueron utilizados en clones de BACs Y PACs los cuales contenían un 83% de total del genoma del arroz. Se descubrió que el 65% de los marcadores alcanzaron un clon de BAC o PAC, sumados a los 500 SSR

mapeados y, con la contribución hecha, se dispone de 2740 SSR confirmados para estudios de este cultivo. Este estudio sugiere que los marcadores microsatélites son útiles para ubicar genes a lo largo del genoma, como aplicación inmediata en genética, la principal ventaja que presentaron los SSR es su multiallelismo y co-dominancia, su facilidad de obtención mediante bioinformática y en la mayoría de los casos generando repeticiones perfectas para la caracterización del polimorfismo del genoma (McCouch *et al.*, 2002)

Song Q. y colaboradores (2005), desarrollaron y marcadores moleculares microsatélites para caracterizar trigo hexaploide. Pese a la dificultad debido al tamaño del genoma de este cultivo, su polipliodía y su alto nivel de repetición de las secuencias se logró determinar a partir de 540 cebadores iniciadores un total de 112 genes de los cuales solo se pudo posicionar 32 sobre el mapa actual de trigo y se concluyó que los microsatélite pueden estar situados en regiones codificantes contradiciendo a lo previamente sugerido que los SSR se localizan en regiones pobres de genes (Song *et al.*, 2005)

Dentro del género *Solanum* se ha descrito varias especies, una de ellas y entre las más significativas e importantes esta la papa (*Solanum tuberosum*). Kawchuk y colaboradores (1996), examinaron 252 secuencias para *S. tuberosum*. Para evaluar la precisión y especificidad utilizaron secuencias simples y compuestas. Se obtuvieron 40 SSR únicos de las 252 secuencias y se demostró que los SSR presentaron perfiles de ADN únicos. Se concluyó que los microsatélite son útiles para identificación de cultivares por ser informativos, precisos y reproducibles. Feingold y colaboradores (2005) sintetizaron 61 nuevos SSR de papa y lograron ubicarlos en mapas genéticos existentes. Los evaluaron en cultivares de regiones de América y Europa dando resultados positivos para identificación de variedades, así como, cartográfica genética y estudios taxonómicos (Feingold *et al.*, 2005, kawchuk *et al.*, 1996)

Otra de las aplicaciones útiles de los microsatélites está la determinación de diversidad genética. En 2008, Benor y colaboradores evaluaron 39 líneas endogámicas de tomate (*Solanum lycopersicum*) que fueron recolectadas alrededor de todo el mundo. Se utilizaron 34 marcadores SSR polimórficos encontrando 150 alelos de diferentes niveles de diversidad. El promedio de

contenido de índice polimorfismo encontrado fue de 0.31. También se determinó la ubicación geográfica y se estableció la distancia filogenética entre los cultivares. Se concluyó que la información proporcionada por los SSR es útil para estudios de diversidad genética y para futuros cruces entre las especies (Benor *et al.*, 2008)

Los SSR permiten la identificación genética de especies intraespecíficas así como la diversidad genética de plantas que han sufrido polinización cruzada natural como el caso de la naranjilla. En 2008, Torres y colaboradores realizaron la caracterización de *Solanum quitoense* utilizando SSR polimórficos de *Solanum tuberosum*, obteniendo que solamente 13 marcadores fueron trasferidos exitosamente y con un bajo índice de polimorfismo. Se concluyó que los SSR utilizados son filogenéticamente muy distantes para una caracterización exitosa en *S. quitoense*, sin embargo, se logró obtener un total de 25 alelos con un rango de 2 a 6 alelos por locus (Torres *et al.*, 2008).

La naranjilla se considera una especie nativa de Sudamérica que no han sido domesticada y su cultivo es limitado. Esta no ha sido de interés investigativo, siendo su primera caracterización el estudio de Torres y colaboradores (2008). La naranjilla es un representante cultural y de interés socioeconómico y un potencial rubro de exportación para el Ecuador, esto ha motivado el desarrollo de SSR específicos para *Solanum quitoense* por medio de nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación (Silva *et al.*, 2016, Morillo, sin publicar).

2.5 Secuenciación de nueva generación (NGS)

La tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) o secuenciación masiva en paralela permite entre otras aplicaciones la identificación rápida y eficiente de marcadores microsatélite. Las técnicas de NGS alcanzan un mayor número de bases secuenciadas (profundidad) y un menor costo en términos de tiempo y dinero con respecto a la secuenciación tradicional por el método Sanger (Zalapa, 2011).

La principal ventaja de la secuenciación masiva es la posibilidad de descubrir todas las variantes genómicas en un mismo experimento, incluyendo variaciones de único nucleótido, variantes estructurales (translocaciones, e inversiones) y mutaciones puntuales (delecciones, inserciones). El NGS obtiene grandes cantidades de datos de secuencias de todo el genoma a partir de los que se pueden desarrollar marcadores SSR versátiles (Rodríguez & Armengol, 2012).

Wei y colaboradores (2011) desarrollaron marcadores moleculares para el sésamo (*Sesamum indicum* L.) ya que se considera un cultivo oleícola de importancia y la información genética y molecular es limitada. Se realizó la transcripción de sésamo y utilizando la tecnología de NGS se obtuvo un total de 86222 unigenes, de estos se convirtió 7702 unigenes en SSR: 5166 en di nucleótidos, 1917 SSR trí nucleótido, 332 tetra nucleótido y 202 en penta nucleótidos. 50 SSR fueron seleccionados para su validación y como resultado se obtuvieron 40 microsatélites que amplificaron exitosamente y calcularon un índice polimórfico significativo entre 24 accesiones de sésamo (Wei *et al.*, 2011)

Otro de los casos exitosos de la tecnología NGS fue con el crisantemo. Este cultivo posee un número muy reducido de EST-SSR disponibles. Wang y colaboradores (2013), utilizaron la NGS para esta especie obteniendo 70895 unigenes, a partir de los cuales se construyeron 1788 pares de primers. Se seleccionaron al azar 100 pares de cebadores, obteniendo 81 amplificaciones exitosas y 20 marcadores con polimorfismo significativo para análisis genético del crisantemo. Se concluyó que los SSR son transferibles a especies del género y son útiles en ensayos de diversidad alélica (Wang *et al.*, 2013)

En el Ecuador se ha utilizado la tecnología NGS en ecosistemas endémicos que son de prioridad en cuanto a conservación de biodiversidad. El guayacán negro (*Handroanthus billbergii*) ha sido expuesto a la explotación indiscriminada por las características de su madera, lo que está reduciendo considerablemente su biodiversidad. Mediante la tecnología de Secuenciación de Nueva Generación se desarrollaron 61074 marcadores microsatélites de estos se seleccionaron 26893 entre di, tri, tetra y penta nucleótidos. Se

evaluaron 55 pares de cebadores, de estos, 30 SSR presentaron patrones polimórficos útiles para genotipar la especie y en adición se publicaron 26893 secuencias para la continuación de desarrollo investigativo de esta especie (Morillo *et al.*, 2016).

Morillo en 2014 desarrolló librerías genómicas para el análisis molecular por NGS en *Solanum quitoense*, frutal del que no existe una amplia caracterización genética y molecular ni SSR específicos. Se obtuvieron 32073 contigs con secuencias microsatélites, 14918 fueron analizados para el desarrollo de cincuenta marcadores moleculares SSR, los cuales serán utilizados en el presente proyecto (Morillo, sin publicar).

2.6 Metodología *M13 Tailing*

La metodología *M13 Tailing* es una variante de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se basa en marcar el cebador iniciador con una molécula fluorescente IRDye que se excita a longitudes de onda de 700 o 800nm. Esta técnica adiciona el fragmento 5'- CAC GAC GTT GTA AAA CGA C – 3' en el primer forward en el extremo 5'.

Durante la reacción de amplificación el marcador IRDye M13 se une al extremo de la secuencia de uno de los marcadores microsatélites, los productos de la PCR son visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida mediante el equipo LI-COR 4300S el cual es un secuenciador de ADN. La fluorescencia es detectada y luego esta es interpretada a través del Software SAGA-GT, el cual permite un lectura clara y reproducible de los datos de los alelos marcados (Morillo y Miño, 2011, LI-COR, 2005, Lorenz *et al.*, 2001).

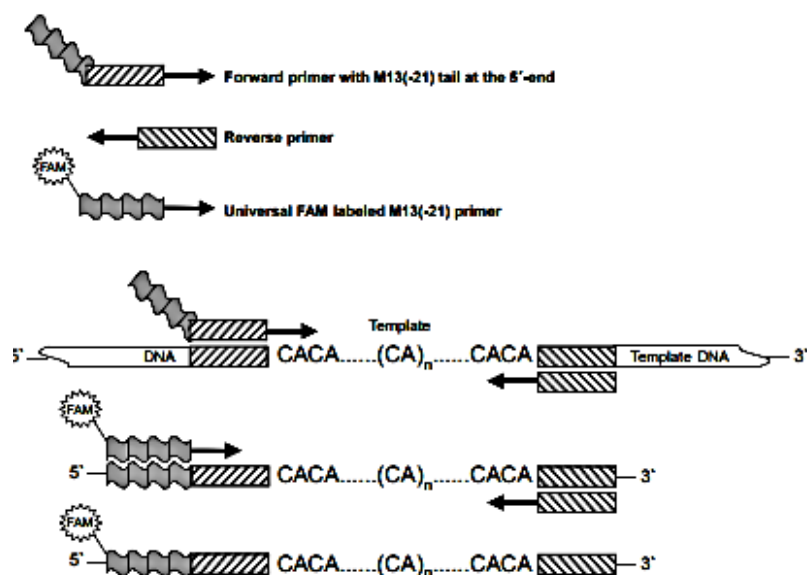


Figura 10. Esquema de metodología M13 Tailing.

Tomado de (Schuelke, 2000).

La técnica de M13 genera una etiqueta en el alelo amplificado y permite la diferenciación y análisis de alelos por locus. Se han realizado diferentes investigaciones utilizando la metodología M13. En el Ecuador se han discriminado poblaciones de trigo utilizando marcadores SSR, dando como resultado la diferenciación de las colecciones y generando subpoblaciones de trigo, la caracterización de 125 alelos y un elevado porcentaje de diversidad genética dentro de esta especie (Carrillo, 2014)

Otro cultivo que ha sido caracterizado con éxito y es de importancia para el Ecuador es el cacao (*Theobroma cacao L.*). Se obtuvo el perfil genético de árboles pertenecientes a la Colección de Genotipos de Cacao Nacional en Pichilingue INIAP utilizando marcadores microsatélites y la técnica M13 Tailing. La técnica permitió generar un perfil genético de las colecciones y determinar el índice de diversidad genética que fue de 0.616 y un promedio de 6.15 alelos por locus. Estos resultados muestran la utilidad y éxito de la técnica y muestran la factibilidad de aplicación de esta metodología por su reproducibilidad, bajo costo y facilidad de desarrollo (Lozada *et al.*, 2014)

La aplicación exitosa de la técnica de M13 se ha evidenciado en más de un área de estudio. Se comprobó su éxito en la caracterización de marcadores microsatélites polimórficos para un *Culex tarsalis* Coquillett el cual es un vector de arbovirus. Utilizando este método de M13 y su visualización en gel de poliacrilamida se pudo identificar loci útiles en la investigación del virus, así como la evolución de su diversidad genética (Venkatesan *et al.*, 2007).

2.7 Análisis de Diversidad genética

La variabilidad genética de las poblaciones es dilucidada mediante recursos estadísticos que permiten cuantificar y entender más exactamente las variables respecto a diversidad genética entre las poblaciones, cada apartado estadístico considera diferentes variables respecto a la diversidad genética entre los más utilizados están la heterocigosidad esperada (H_e), riqueza alélica y el índice de contenido polimórfico (PIC), que nos permiten determinar la medida de diferenciación e intercambio genético en nivel intrapoblacional (Sosa *et al.*, 2002).

Los parámetros más importantes que se emplean en el análisis de diversidad genética son: el número de observaciones y disponibilidad, heterocigosidad esperada y observada y el índice de contenido polimórfico.

2.7.1 Número de observaciones (Obs)

El número de observaciones es el número de alelos en un respectivo locus observado en una muestra. Se define como el número de alelos o genotipos no perdidos observados dentro de la muestra. Se presume que un genotipo está perdido cuando un alelo no se hace presente. Al existir datos genotípicos perdidos como consecuencia el número de observaciones disminuye (Gonzales, 2011, García, 2008, Nuez Viñals, Carrillo Becerril and Lozano, 2000).

El número de observaciones está relacionado directamente con la disponibilidad. Esta se define como la relación entre los individuos observados y los individuos muestreados.

$$Disponibilidad = \frac{(1-Obs)}{n} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde: *Obs* es el número de observaciones y *n* es número de individuos muestreados.

2.7.2 Heterocigosidad observada (H_o)

Se describe como la proporción de individuos heterocigotos dentro de una población para un locus determinado. Se considera homocigoto cuando posee dos alelos idénticos en el mismo locus y heterocigoto cuando tiene dos alelos diferentes en el mismo locus. La heterocigosidad hace referencia a la diversidad dentro de una población y a las relaciones directas de consanguineidad entre individuos (Lozada, 2014, Nuez Viñals, Carrillo Becerril and Lozano, 2000)

La heterocigosidad observada puede medir contando el número de individuos heterocigotos en relación a toda la población. La fórmula se describe de la siguiente manera; p_{ii} es el número genotipos heterocigóticos/el total de individuos muestreados (Lozada, 2014, Santamaría, 2015).

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^k p_{ii} \quad (\text{Ecuación 2})$$

2.7.3 Heterocigosidad esperada (H_e)

La heterocigosidad esperada o conocida como diversidad genética es la heterocigosidad que se esperaría si las condiciones fueran acorde al equilibrio de Hardy-Weinberg (una población infinita, apareamiento al azar, no exista selección natural, migración y mutaciones).

Dentro de estas condiciones las frecuencias génicas son el resultado del producto de las frecuencias alélicas. La heterocigosidad esperada se explica

como la probabilidad de que los alelos que fueron escogidos al azar dentro de una población no sean los mismos y se describe mediante la siguiente formula:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Dónde p_i^2 es la frecuencia del alelo i (Santamaría, 2015, Gonzales, 2011).

2.7.4 Índice de contenido polimórfico (PIC)

El índice de contenido polimórfico describe que tan informativo es un marcador molecular en relación al número de alelos por locus y de las frecuencias alélicas. El PIC se relaciona directamente con la heterocigosidad.

Los valores de PIC varían desde 0 hasta 1, siendo 0 un marcador monomórfico es decir muestra un solo alelo por locus amplificado y 1 un marcador altamente polimórfico, presenta 2 o más alelos en la misma frecuencia (Lozada, 2014, Santamaría, 2015).

El índice de contenido polimórfico está definido por la siguiente formula:

Donde $1 - \sum p_i^2$ es la heterocigosidad esperada He menos el porcentaje de heterocigotos idénticos, para dos alelos i y j con frecuencias alélicas p_i y p_j (heterocigosidad) (Santamaría, 2015, Gonzales, 2011).

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^k p_i^2) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2 \quad (\text{Ecuación 4})$$

3. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El plan experimental ilustra brevemente la metodología a seguir para la caracterización y validación de marcadores SSR de *Solanum quitoense*.

Inicialmente la obtención y selección del material vegetal procedente de banco de germoplasma DENAREF-INIAP y colecciones activas pertenecientes al Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV), extracción, cuantificación y validación de ADN de semillas secas de variedades de naranjilla, posteriormente la amplificación y selección de set de marcadores microsatélite; la amplificación de SSRs en *singleplex* y combinaciones *multiplex* por metodología *M13 Tailing*, por ultimo genotipaje en equipo LICOR 4300S y análisis de datos.

El diseño del plan experimental se encuentra detallado a continuación en la Figura 11.

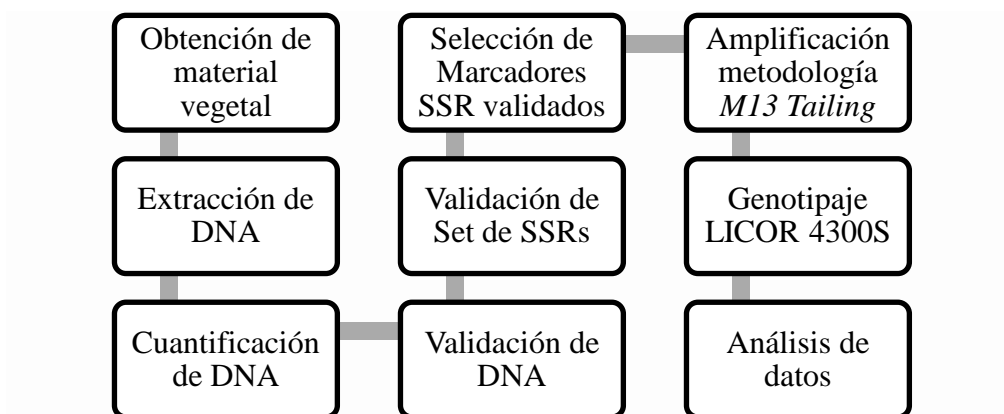


Figura 11. Diseño del plan experimental

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestreo

4.1.1 Población

Variedades de *Solanum quitoense* pertenecientes a la colección de: banco de germoplasma de INIAP-DENAREF y colecciones activas pertenecientes al Departamento Nacional de Protección Vegetal de especies nacionales de INIAP.

4.1.2 Muestras

Se analizaron 6 variedades de *Solanum quitoense* y una variedad (N3) de *Solanum quitoense* como control positivo. El material se obtuvo de las colecciones del banco de germoplasma (DENAREF), así como de colecciones activas del DNPV. La lista de materiales a utilizarse se detalla en la tabla 2.

Tabla 2.

Muestras seleccionadas de Solanum quitoense.

Nº	Nombre común/ Cultivares	Código /Identificación	Origen	Fuente
Sq1	Espinosa	ECU-3567	Pichincha-Ecuador	DENAREF
Sq2	Naranjilla agria	ECU-3817	Bolívar-Ecuador	DENAREF
Sq5	Naranjilla bolona	ECU-6235	Morona Santiago- Ecuador	DENAREF
Sq8	Morada	No disponible	Morona Santiago- Ecuador	DNPV
Sq9	Baeza	No disponible	Morona Santiago- Ecuador	DNPV
Sq14	Baeza roja	No disponible	Morona Santiago- Ecuador	DNPV
N3	Palora	No disponible	Morona Santiago- Ecuador	D. Biotecnología

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material de laboratorio: reactivos y equipos

Los materiales de laboratorio, incluyendo equipos y reactivos utilizados en métodos de extracción, cuantificación y amplificación de DNA, electroforesis en gel de agarosa se encuentran detallados en el Anexo 1.

4.2.2 Extracción de ADN de variedades de *Solanum quitoense*

Se empleó el protocolo de extracción de ADN descrito por Kang *et al.*, (1998) para las semillas de *Solanum quitoense*.

Se colocó la semilla fragmentada del cultivar de *Solanum quitoense* en un tubo eppendorf y se añadieron 400 μ L buffer SDS (Tris-HCl 200 mM (pH 8.0), NaCl 200 mM, EDTA 25 mM y 0.5 % SDS) que contenía 50 μ g de Proteinasa K, se incubó durante 1 hora a 37°C. Se trituró nuevamente la semilla y se añadieron 400 μ L de buffer CTAB al 2% (Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), NaCl 1.4 M, CTAB 2%, EDTA 20 mM (pH 8.0), 1% PVP. Se adicionó 700 μ L de una solución de cloroformo alcohol-isoamílico (24:1) con fenol al 5% y se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpms. Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos. Posteriormente se añadió 2/3 del volumen de isopropanol y se incubó a -20°C durante 1 hora para la precipitación del DNA. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min para remover el sobrenadante, se realizaron dos lavados al pellet con etanol al 70%. Posteriormente se secó el *pellet* y se resuspendió en 50 μ L de buffer TE. Una vez disuelto el *pellet* se agregó 1 μ L de ARNasa y se incubó a 37°C durante 30 min (Kang *et al.*, 1998).

4.2.3 Cuantificación y validación del ADN de *Solanum quitoense*

La cuantificación de ADN genómico de las muestras se realizó mediante la técnica de espectrofotometría empleando el equipo EPOCH™ de Biotek® para microplacas.

Se empleó el programa GENE5 para la lectura. Se colocaron 0.2 μ L de muestra en cada pocillo de la microplaca Take3 y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 260 y 280nm, para determinar la concentración de ADN presente y el índice de pureza (BioTeK Instruments, 2011).

Una vez obtenidas las concentraciones de ADN se realizó una dilución a una concentración de 5 ng/ μ L de ADN para su posterior validación mediante PCR,

(ver tabla 3), empleando un marcador ISSR 844A. Se utilizó el programa detallado en la Tabla 4.

Tabla 3.

Mezcla de PCR para la validación de muestras de Solanum quitoense empleando un marcador ISSR 844A.

REACTIVOS	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.8
Buffer PCR (10X)	10	1	1
MgCl ₂ (mM)	50	3	0.6
dNTP's (mM)	5	0.1	0.2
Cebador (μM)	10	0.2	0.2
Taq polimerasa (U/μL)	5	0.1	0.10
Muestra (ng/μL)	5	2.5	5
Volumen Total (μL)			10

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

Nota: *CI: Concentración inicial de los reactivos, *CF: Concentración final de los reactivos.

Tabla 4.

Programa de amplificación para la validación de las muestras de Solanum quitoense con los marcadores ISSR 844A.

	°T (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	94	5 min	1 ciclo
2	94	45 seg	
3	37	1 min	30 ciclos
4	72	2 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	5 min	1 ciclo

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

Los resultados de la amplificación fueron visualizados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe DNA de INVITROGEN® utilizando el buffer TAE 1X. Los geles fueron visualizados en un fotodocumentador Bio-Doc.

4.2.4 Rastreo de marcadores

Se realizó un rastreo de 50 marcadores SSR (ver anexo 2). Para la verificación de la amplificación se emplearon 7 muestras ADN de variedades de *Solanum quitoense* validadas y un control negativo (ADN se sustituye por H₂O). Los componentes para la reacción se describen en la Tabla 5, al igual que el programa de amplificación en la Tabla 6.

La visualización de los resultados de la amplificación fue por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe DNA de INVITROGEN® empleando el buffer TAE 1X.

Tabla 5.

Mezcla de PCR para la validación de 50 marcadores microsatélite empleando muestras de ADN de la frutal naranjilla.

REACTIVOS	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.18
Buffer PCR (10X)	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.60
dNTP's (mM)	5	0.25	0.38
Cebador (μM) F	10	0.50	0.38
Cebador (μM) R	10	0.50	0.38
Taq polimerasa (U/μL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/μL)	5	1.33	2
Vol. Total (μl)			7.50

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

Nota: *CI: Concentración inicial de los reactivos, *CF: Concentración final de los reactivos.

Tabla 6.

Programa de amplificación (PCR) para la validación de los 50 marcadores microsatélite con las muestras de ADN de naranjilla.

	°T (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	94	5 min	1 ciclo
2	94	45 seg	
3	55	1 min	30 ciclos
4	72	2 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	5 min	1 ciclo

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

4.2.4.1 Optimización de PCR

Se realizó un gradiente de temperatura para los marcadores que presentaron ausencia de banda a 55°C. La reacción se llevó a cabo a 45, 48, 55 y 60°C de temperatura de hibridación como única modificación (Morillo y Miño, 2011).

Tabla 7.

Programa de amplificación (PCR) para validación de SSR con gradiente de temperatura.

	°T (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	94	5 min	1 ciclo
2	94	45 seg	
3	TA	1 min	30 ciclos
4	72	2 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	5 min	1 ciclo

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

4.2.5 Validación del polimorfismo de los marcadores SSR amplificados.

4.2.5.1 Amplificación mediante la metodología M13 *Tailing*.

Se seleccionaron treinta y tres marcadores microsatélites validados y se los amplificó empleando la metodología *M13 Tailing*, en la cual se adiciona un fragmento 5´- CAC GAC GTT GTA AAA CGA C – 3´ en el primer forward en el extremo 5´.

Durante la reacción en cadena de la polimerasa, el marcador IRDye M13 se une al extremo 5´ de las secuencias de los marcadores microsatélites, los cuales son separados por electroforesis. La fluorescencia es detectada en dos

longitudes de onda: a 700 y 800 nm, obteniendo imágenes para el posterior genotipado (Morillo y Miño, 2011).

Se realizaron nueve combinaciones con los marcadores escogidos: cuatro reacciones tríplex, cinco reacciones dúplex y doce marcadores en mónoplex detallados en la tabla 8.

Tabla 8.

Combinaciones en dúplex, tríplex y mónoplex con los marcadores seleccionados.

Combinación	Primer	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de anealing (°C)	Marcaje M13 (nm)
Dúplex1	mSq004	164 pb	55°C	700
	mSq040	221 pb		
Dúplex 2	mSq046	246 pb	55°C	700
	mSq047	133 pb		
Dúplex 3	MSq020	210 pb	55°C	700
	mSq024	152 pb		
Tríplex 1	mSq007	147 pb	55°C	800
	mSq035	233 pb		
	mSq049	107 pb		
Tríplex 2	mSq003	221 pb	55°C	800
	mSq017	117 pb		
	mSq029	145 pb		
Tríplex 3	mSq008	167 pb	55°C	800

	mSq016	256 pb		
	mSq036	118 pb		
Triplex 4	mSq026	132 pb	48°C	700
	mSq031	190 pb		
	mSq037	246 pb		
Singleplex 1	mSq006	170pb	55°C	700
Singleplex 2	mSq012	194 pb	55°C	700
Singleplex 3	mSq013	145 pb	55°C	800
Singleplex 4	mSq018	143 pb	55°C	700
Singleplex 5	mSq019	158 pb	55°C	700
Singleplex 6	mSq021	136 pb	55°C	700
Singleplex 7	mSq023	134 pb	55°C	800
Singleplex 8	mSq025	129 pb	55°C	800
Singleplex 9	mSq027	104 pb	48°C	700
Singleplex 10	mSq028	168 pb	55°C	700
Singleplex 11	mSq033	143 pb	55°C	800
Singleplex 12	mSq038	137 pb	55°C	800
Singleplex 13	mSq043	137 pb	55°C	700
Singleplex 14	mSq044	134 pb	55°C	700
Singleplex 15	mSq050	172 pb	48°C	700

Los componentes de amplificación para las combinaciones tríplex, dúplex y singleplex se detallan en la tabla 9 y el programa térmico descrito en la tabla 10.

Tabla 9.

Mezcla de PCR para la amplificación de combinaciones tríplex, dúplex y singleplex.

PCR	CI	CF	Vol. 1 rx (μ L) Tríplex	Vol. 1 rx (μ L) Dúplex	Vol. 1 rx (μ L) Singleplex
AguaUP			0.08	0.19	0.32
Buffer PCR (10X)	5	1	1.40	1.00	1.00
MgCl ₂ (mM)	25	2.5	0.70	0.50	0.50
dNTP's (mM)	5	0.2	0.28	0.20	0.20
M13 700/800	1	0.16	1.12	0.80	0.80
Cebador (μ M) F -M13	1	0.01	0.07	0.05	0.05
Cebador (μ M) R	10	0.16	0.11	0.08	0.08
Cebador (μ M) F -M13	1	0.01	0.07	0.05	-
Cebador (μ M) R	10	0.16	0.11	0.08	-
Cebador (μ M) F-M13	1	0.01	0.07	-	-
Cebador (μ M) R	10	0.16	0.11	-	-
Taq polimerasa (U/ μ L)	5	0.05	0.07	0.05	0.05
Muestra (ng/ μ L)	5	2	2.80	2.00	2
Vol. Total (μ L)			7.00	5.00	5.00

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

Nota: *CI: Concentración inicial de los reactivos, *CF: Concentración final de los reactivos.

Tabla 10.

Programa de amplificación, metodología M13 Tailing.

	T °C	TIEMPO	CICLOS
1	94	2 min	1 ciclo
2	95	4 min	1 ciclo
3	95	1 min	
4	TA	2 min	25 ciclos
5	72	2 min	
6	72	10 min	1 ciclo
7	4	10 min	1 ciclo

Adaptado de (Morillo y Miño, 2011)

4.2.5.2 Electroforesis y Genotipado.

La corrida electroforética se realizó en gel de poliacrilamida al 6.5%. Para el análisis se empleó el analizador ADN- LI-COR 4300S de LI-COR Biosciences®

El gel de poliacrilamida al 6.5% se preparó utilizando 20 ml de gel matriz de acrilamida KB Plus de LI-COR Biosciences® al 6.5%, 150 µl persulfato de amonio (APS) al 10% y 15 µl de TEMED de Thermo Fisher Scientific®, se colocó esta mezcla entre dos placas de vidrio, previamente lavadas con isopropanol. Se invirtió el peine para generar una línea base y formar los pocillos donde se colocó la muestra, se dejó polimerizar el gel durante una hora. Se colocó la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR, el buffer que se utilizó fue TAE 1X KB PLUS LI-COR de LI-COR Biosciences®.

Para la corrida electroforética se anexó en el programa SAGA GT-SSR la información requerida como el rango de tamaño de amplificación de cada marcador SSR, tallas del marcador de peso molecular IRDye de LI-COR Biosciences® así como los nombres y las posiciones de las muestras a genotiparse.

Los productos de la amplificación por PCR fueron diluidos en Blue Stop de LI-COR Biosciences® proporción 1:2. Se sometió a denaturación previamente las

muestras a 95°C por 3 minutos para pasarlos posteriormente a hielo y se colocó 1uL de cada producto en el gel para la corrida.

Se realizó la corrida electroforética durante 90 minutos a 1200 voltios. Se obtuvo un gel digital donde se efectuó el marcaje de cada banda donde representa un alelo con una “x” para poder obtener los tamaños de los alelos de cada locus y el porcentaje de frecuencias alélicas.

La imagen se analizó en el programa SAGA GT el cual generó un reporte de datos genotípicos los cuales fueron posteriormente analizados.

4.3 Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el software SAGA GT-SSR, el cual es un procesador de imágenes emitidas por el equipo LI-COR 4300S de LI-COR Biosciences® a fin de obtener una matriz genotípica de datos de dimensiones $n \times m$ donde n es el número de genotipos y m el número de loci. El analizador SAGA integra los datos de cada muestra, así como de cada marcador molecular, incluyendo el *motif*, los pesos moleculares y los pesos del marcador de peso IRDye, el software exporta los datos en el programa Microsoft Office Excel para elaborar una matriz genotípica utilizando los tamaños de los alelos que presenta cada locus.

4.3.1 Análisis de Diversidad genética

El análisis de diversidad genética fue determinado por el software Power Marker V3.25 (Liu y Muse, 2005), para lo cual se importó la matriz genotípica previamente obtenida en el programa Microsoft Office Excel en formato “txt” para la determinación de las variables descritas en el apartado 2.7.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Validación del DNA de cultivares de *Solanum quitoense*.

Se empleó el protocolo de extracción de ADN descrito por Chunwongse *et al.*, (1993) y modificado por Kang y colaboradores (1998) para semillas secas del cual se obtuvieron concentraciones adecuadas de ADN, las cuales están descritas en el Anexo 3, para la amplificación de las variedades por PCR (ver figura 12).

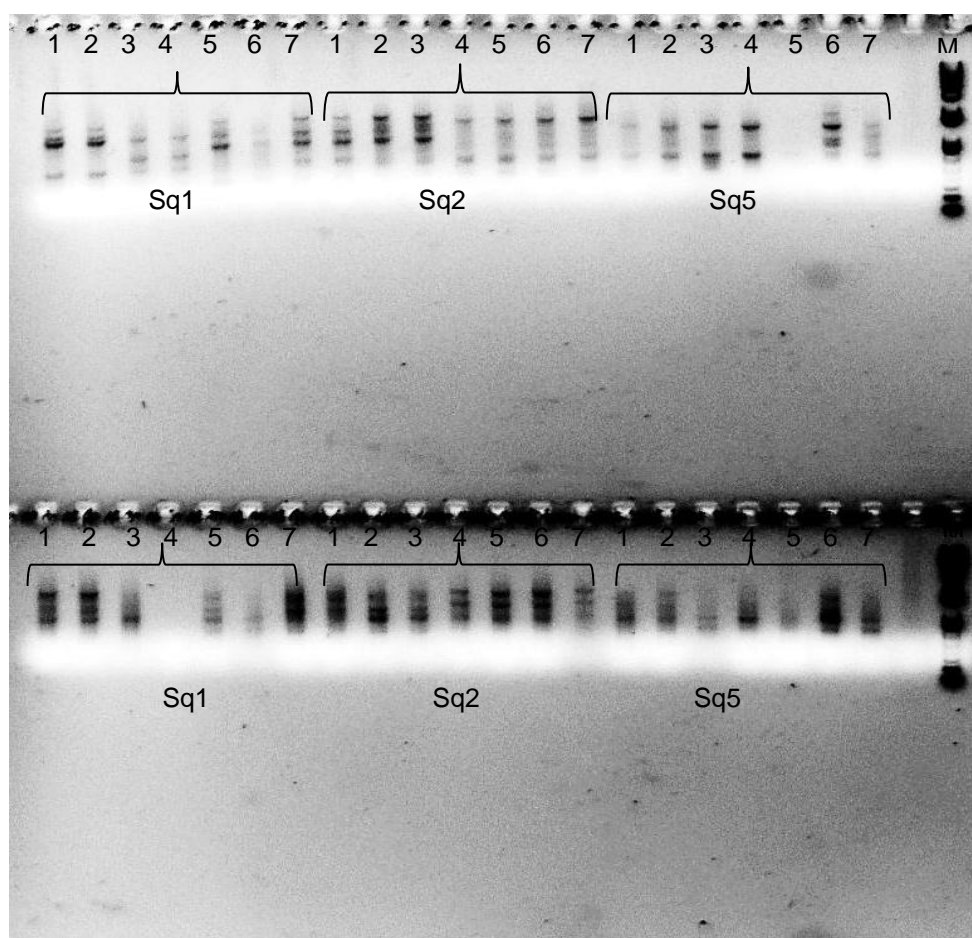


Figura 12. Resultados de amplificación por PCR de las variedades de *Solanum quitoense*.

En la figura 12 se empleó el marcador ISSR 844A para la validación del DNA extraído por el protocolo descrito por Kang *et al.*, (1998). Los carriles del 1-7 poseen muestras de ADN de los cultivares de naranjilla.

Aparentemente las concentraciones de ADN obtenidas con este protocolo son bajas (ver anexo 3), esto puede deberse al tamaño, estructura y anatomía del embrión, puesto que las solanáceas tienen una semilla pequeña con altas cantidades de almidón lo que dificulta la recuperación del ADN, sin embargo, Kang y colaboradores (1998), comparó el protocolo de extracción de Chunwongse *et al.*, 1993 modificado con el método estándar de Rogers y colaboradores (1988), en semillas secas de arroz obteniendo cantidades similares a las descritas en el Anexo 3. Esto demuestra que las cuantificaciones son aceptables y suficientes para proceder con una eficiente amplificación, tal como se muestra en la Figura 12. (Chunwongse *et al.*, 1993, Kang *et al.*, 1998, Rogers *et al.*, 1998).

5.2 Validación de amplificación de Marcadores SSR.

A partir del reporte de investigación denominada “Desarrollo de librerías genómicas” (Morillo, sin publicar), se realizó la verificación de la amplificación de los 50 marcadores sintetizados con 10 muestras de DNA de *Solanum quitoense* validadas previamente (véase figura 12).

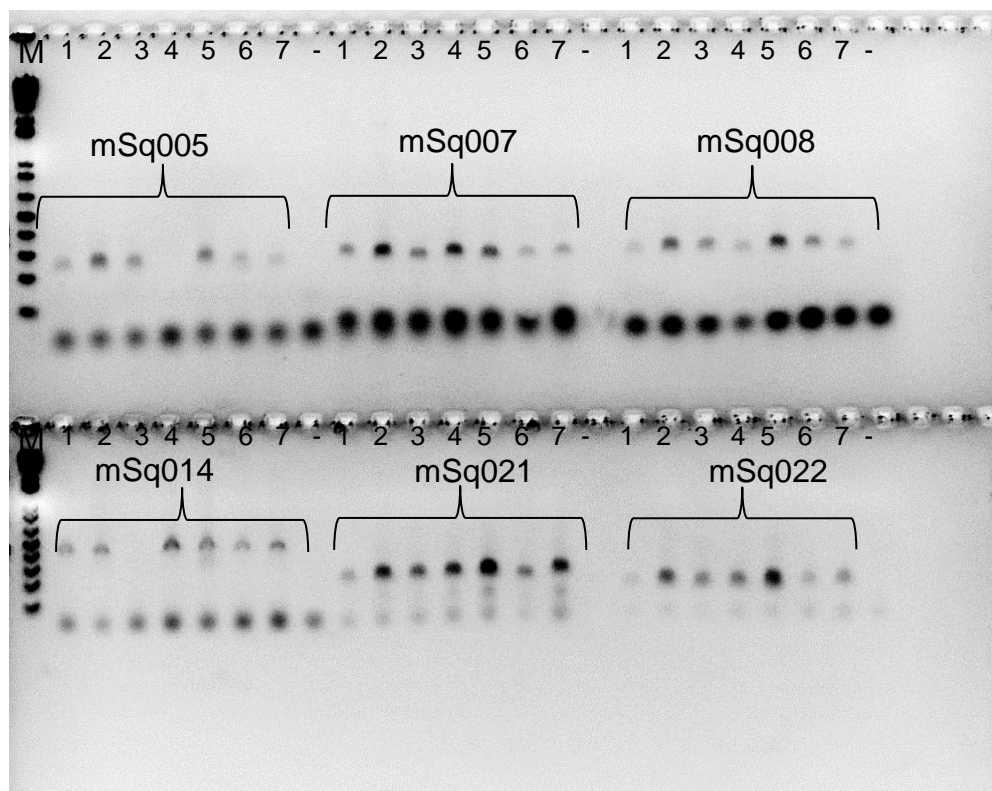


Figura 13. Visualización de productos de PCR en gel de agarosa.

En la figura 13 se visualiza los productos de PCR con los cebadores: mSq005, mSq007, mSq008, mSq014, mSq021 y mSq022. En los carriles 1-7 muestras de ADN de *Solanum quitoense*, (-) control negativo y (M) marcador de peso molecular (1kb Plus Ladder INVITROGEN®).

De los 50 marcadores microsatélite reportados, 42 mostraron una exitosa amplificación. El criterio de selección fue presencia o ausencia de banda en la visualización en gel de agarosa (ver figura. 13) De los 8 marcadores restantes: mSq011, mSq015, mSq026, mSq031, mSq037, mSq027, mSq045FM13 y mSq050, se realizó la optimización de PCR modificando la gradiente de temperatura (ver figura. 14). La temperatura promedio en donde dichos cebadores mostraron un bandaje fue a 48°C, mientras que el mSq045 no amplificó en ningún ensayo. (Morillo *et al.*, 2016, Tamayo, 2016)

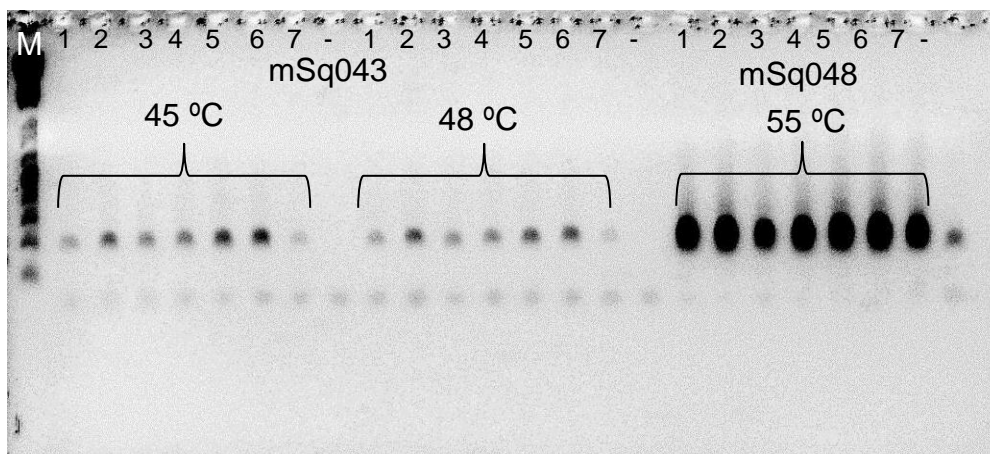


Figura 14. Visualización de productos de PCR en gel de agarosa.

Se observa en la figura 14 los productos de PCR con los cebadores mSq043 a temperatura de 45 y 48 ° C, como control positivo el mSq048 a 55 ° C. Los carriles 1-7 poseen ADN de *Solanum quitoense*, (-) control negativo y (M) marcador de talla molecular (1kb Plus Ladder INVITROGEN).

De los 49 SSR seleccionados se realizó la verificación y validación de la amplificación en singleplex de cada marcador por el método M13 Tailing (ver figura 15). Se descartaron 15 marcadores por presentar múltiples bandas inespecíficas y una banda de amplificación poco clara. Según Torres y colaboradores (2008), la presencia de múltiples bandas podría ser el resultado de subproductos de la DNA *Taq* polimerasa o inespecificidad de los cebadores, por lo que dichos SSRs deben ser descartados para evitar lecturas incorrectas de alelos y generar un perfil genético alterado (Torres et al., 2008).

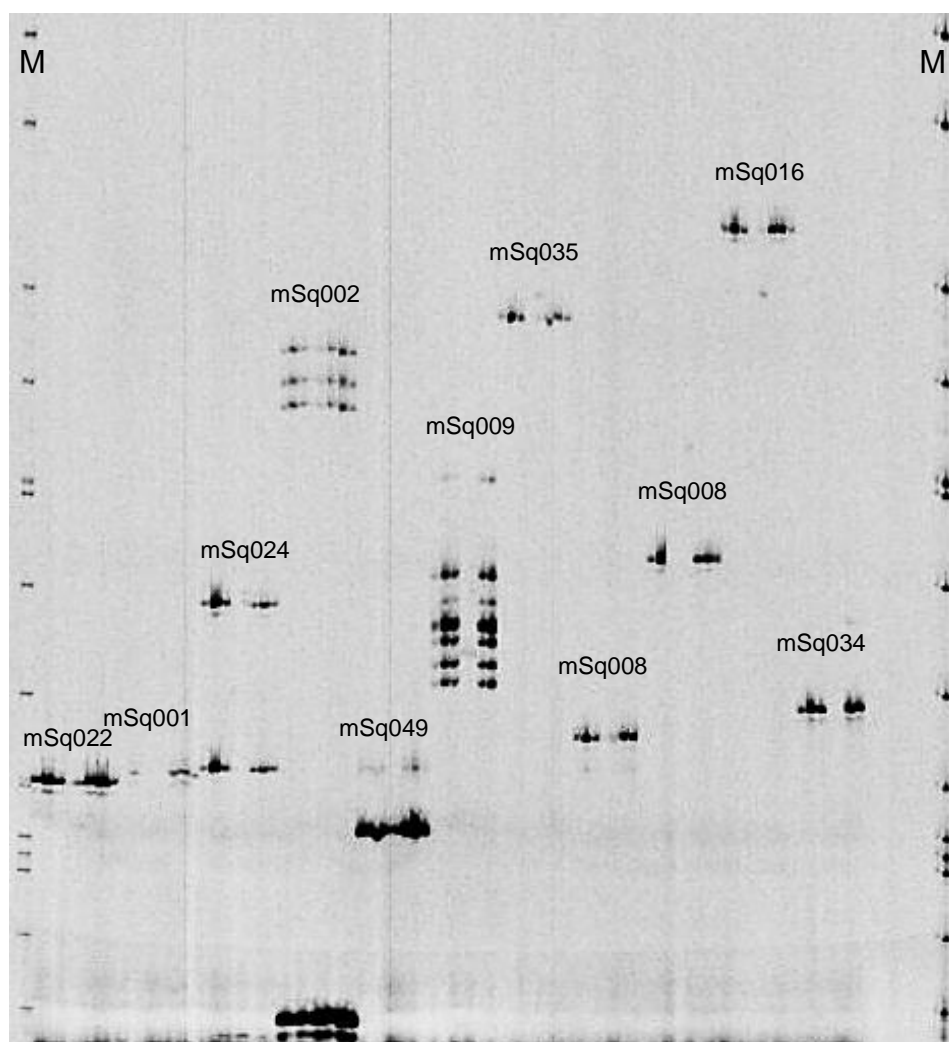


Figura 15. Visualización de productos de PCR por método M13 Tailing.

Amplificación de marcadores en singleplex se muestra en la figura 15, utilizando los cebadores mSq022, mSq001, mSq024, mSq002, mSq049, mSq009, mSq035, mSq036, mSq008, mSq016 y mSq034 respectivamente. (M) marcador de peso molecular IRDye 700 nm de longitud de onda.

5.3 Estandarización de amplificación de combinaciones singleplex, dúplex y tríplex por *M13 Tailing*.

La PCR multiplex optimiza el proceso de amplificación y análisis de resultados permitiendo evaluar mayor cantidad de muestras y marcadores en una misma PCR, lo que reduce tiempo y costos (Lozada, 2014). Se seleccionaron 33

marcadores en 3 combinaciones dúplex, 4 tríplex y 15 singleplex, las cuales fueron validadas por el método M13 Tailing como se puede apreciar en la figura 16. Combinaciones tríplex con los marcadores mSq026 - mSq050 - mSq037 y mSq031 - mSq027 - mSq015 que se seleccionaron inicialmente fueron descartadas por presentar superposición de alelos y dificultad de lectura durante el genotipado. En PCR multiplex según Cryer y colaboradores (2005), las bandas de amplificación de los marcadores moleculares no deben presentar superposición de rangos alélicos, por esta razón se generó una nueva combinación tríplex con los marcadores: mSq026 - mSq031 - mSq037 y dos singleplex: mSq050 y mSq027 (Cryer *et al.*, 2005, Lozada, 2014).

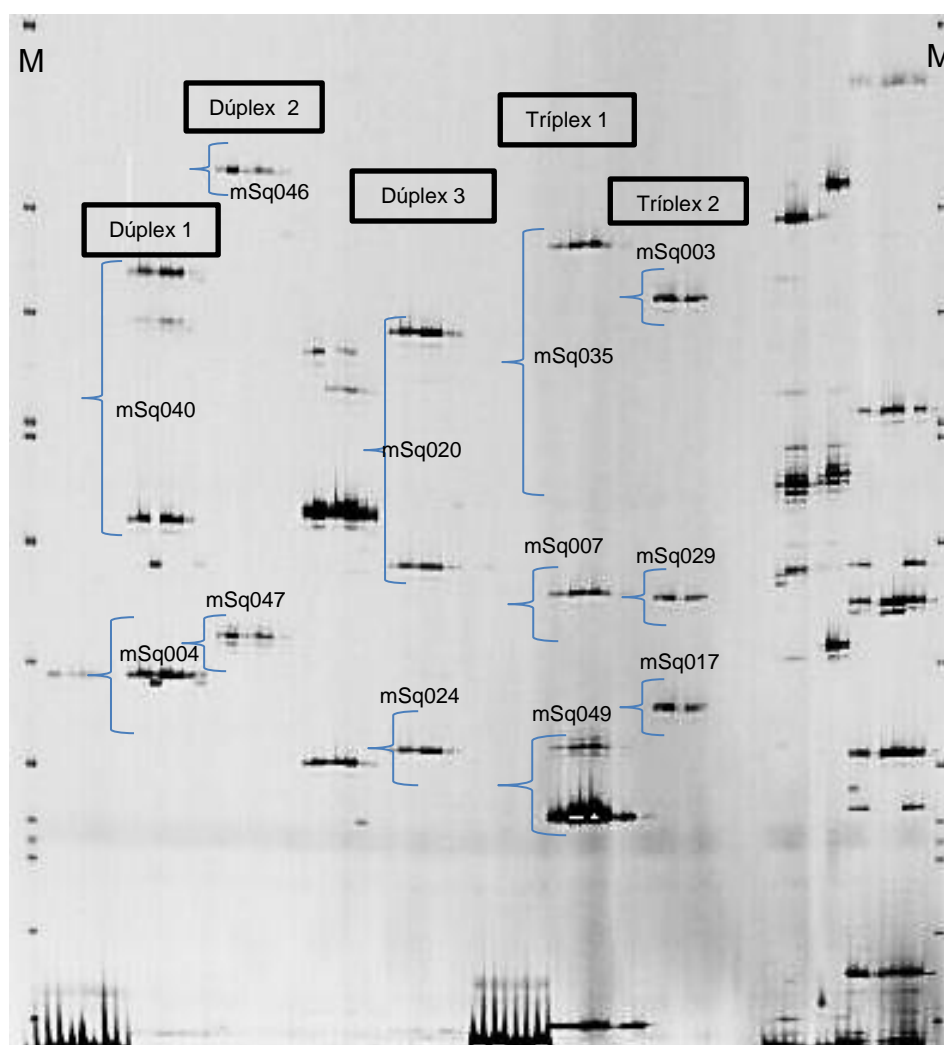


Figura 16. Estandarización de combinaciones dúplex y tríplex en LI-COR 4300S. (M) marcador de peso molecular IRDye 700 nm de longitud de onda.

5.4 Genotipado de SSR en el equipo LI-COR 4300S.

Se realizó el análisis de 22 geles (ver figuras 17, 18 y 19) a través del programa SAGA-GT, el cual arroja datos de cada marcador molecular. Se recopilaron los datos en una matriz en Microsoft Office Excel en la que se incluyó las 44 muestras de las variedades de naranjilla y la información de perfiles genéticos de cada marcador microsatélite (Ver anexo 4).

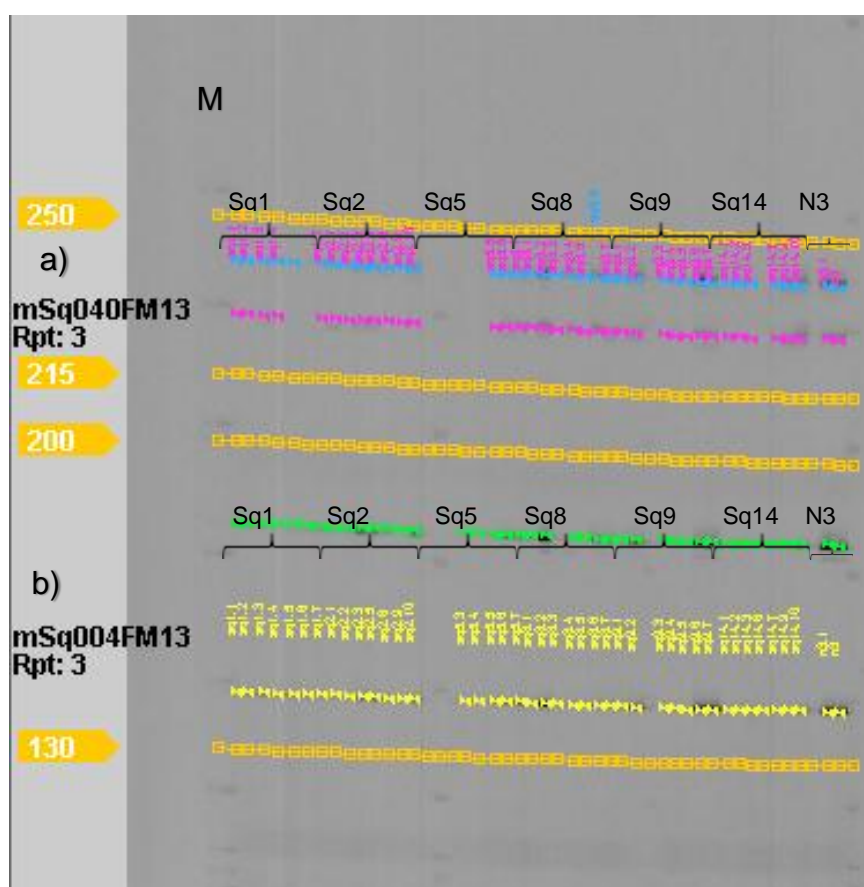


Figura 17. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR obtenidos con el equipo LI-COR 4300S.

En la figura 17 se muestra amplificación de las variedades de *Solanum quitoense* Sq1, Sq2, Sq5, Sq8, Sq9, Sq14 y N3 (Control positivo) con la combinación dúplex 1 (ver tabla 6) con los marcadores: a) mSq040 (formas en x en sucesión color fucsia y azul corresponde a alelos diferentes) b) mSq004 (formas en x en sucesión color verde y amarillo corresponde a alelos diferentes). (M) marcador de peso molecular IRDye (50-350 pb). Las líneas en

forma de cadena de color amarillo son los marcajes de pesos moleculares ingresadas como datos al programa SAGA GT.

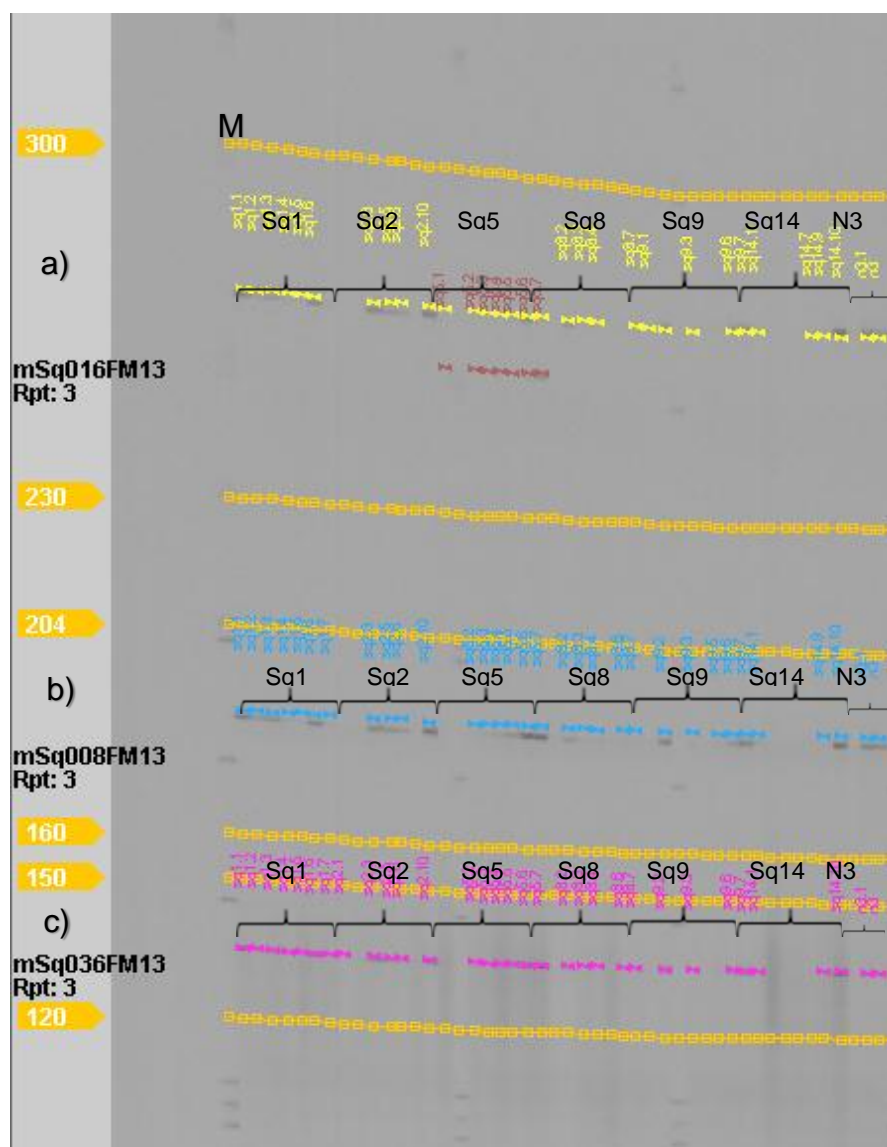


Figura 18. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR obtenidos con el LI-COR 4300S.

En la figura 18 se observa la amplificación de las variedades de *Solanum quitoense* Sq1, Sq2, Sq5, Sq8, Sq9, Sq14 y N3 (Control positivo) con la combinación tríplex 3 (ver tabla 6) con los marcadores: a) mSsq016 (formas en x en sucesión color amarillo y café corresponde a alelos diferentes) b) mSsq008 (formas en x en sucesión color azul corresponde a alelos diferentes) c) mSsq036 (formas en x en sucesión color fucsia corresponde a alelos diferentes). (M)

marcador de peso molecular IRDye (50-350 pb). Las líneas en forma de cadena de color amarillo son los marcajes de pesos moleculares ingresadas.

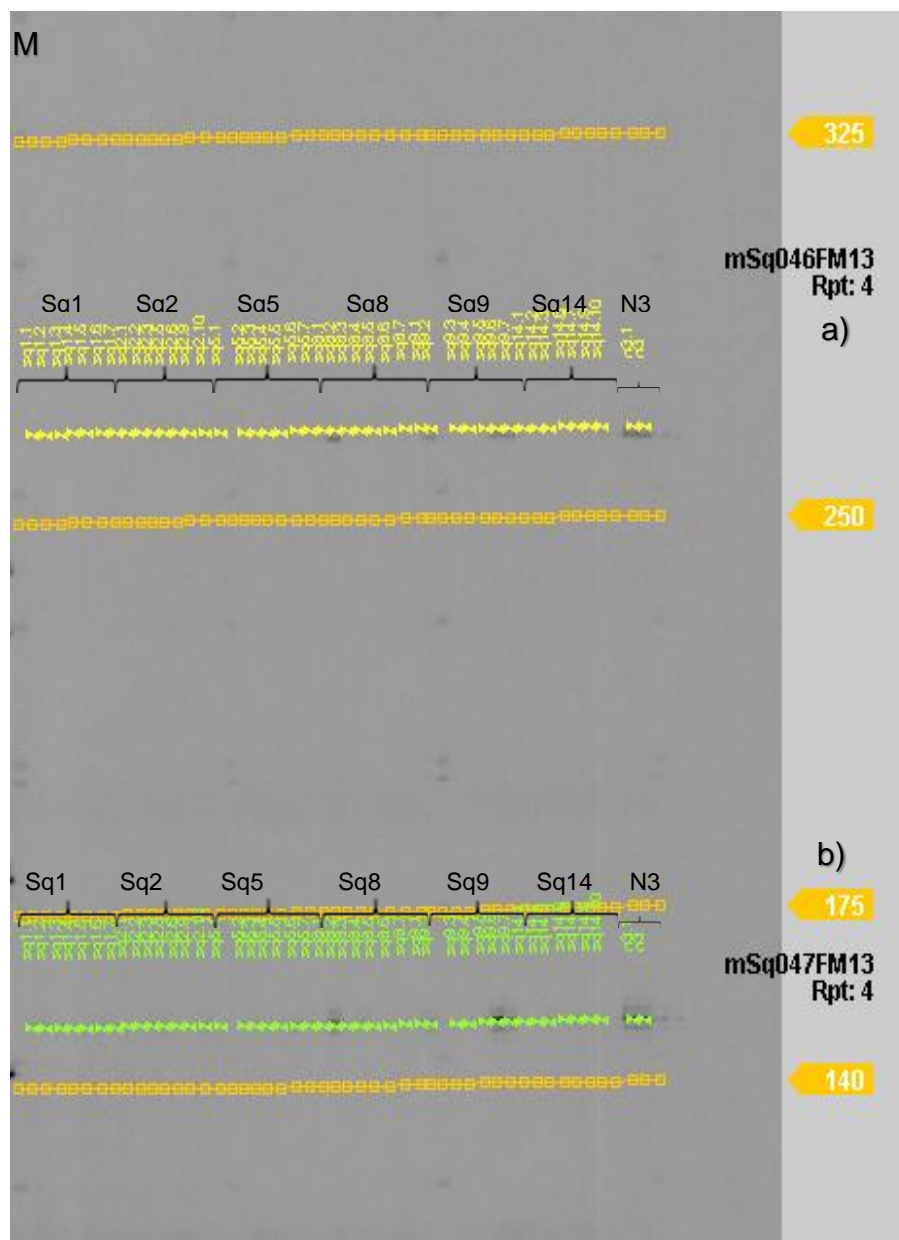


Figura 19. Gel de poliacrilamida con patrones de amplificación de SSR obtenidos con el LI-COR 4300S.

En la figura 19 se muestra la amplificación de las variedades de *Solanum quitoense* Sq1, Sq2, Sq5, Sq8, Sq9, Sq14 y N3 (Control positivo) con la combinación dúplex 2 (ver tabla 6) con los marcadores: a) mSq046 (formas en x en sucesión color amarillo corresponde a alelos diferentes) b) mSq047 (formas en x en sucesión color verde corresponde a alelos diferentes). (M)

marcador de talla molecular IRDye (50-350 pb). Las líneas en forma de cadena de color amarillo son los marcajes de pesos moleculares ingresadas.

En la tabla 11 se pueden apreciar los alelos reportados por locus de cada marcador SSR. Se obtuvieron 43 alelos con un peso de entre 104 a 256 pares de bases.

Tabla 11.

Alelos reportados por locus en variedades de Solanum quitoense.

Combinación	Marcador	Peso de alelos secuenciados del control N3 (Morillo, sin publicar)	Peso de alelos obtenidos en este estudio
Dúplex1	mSq004	164 pb	164-125 pb
	mSq040	221 pb	209-221 pb
Dúplex 2	mSq046	246 pb	246 pb
	mSq047	133 pb	133 pb
Dúplex 3	MSq020	210 pb	210 pb
	mSq024	152 pb	104-152 pb
Tríplex 1	mSq007	147 pb	147 pb
	mSq035	233 pb	233 pb
	mSq049	107 pb	107 pb
Tríplex 2	mSq003	221 pb	221 pb
	mSq017	117 pb	117 pb
	mSq029	145 pb	145 pb
Tríplex 3	mSq008	167 pb	167 pb
	mSq016	256 pb	256-244 pb
	mSq036	118 pb	118 pb
Tríplex 4	mSq026	132 pb	132 pb
	mSq031	190 pb	190 pb
	mSq037	246 pb	246 pb
Singleplex 1	mSq006	170pb	170 pb
Singleplex 2	MSq012	194 pb	203-194 pb

Singleplex 3	mSq013	145 pb	145- 247 pb
Singleplex 4	mSq018	143 pb	143-140 pb
Singleplex 5	mSq019	158 pb	158 pb
Singleplex 6	mSq021	136 pb	136 pb
Singleplex 7	mSq023	134 pb	134-110 pb
Singleplex 8	mSq025	129 pb	129-123 pb
Singleplex 9	mSq027	104 pb	104 pb
Singleplex 10	mSq028	168 pb	168 pb
Singleplex 11	mSq033	143 pb	143 pb
Singleplex 12	mSq038	137 pb	137-113 pb
Singleplex 13	mSq043	137 pb	137 pb
Singleplex 14	mSq044	134 pb	134 pb
Singleplex 15	mSq050	172 pb	172 pb

El análisis de diversidad genética de los 33 marcadores microsatélite fue obtenido a través del programa Power Market Software. En la tabla 12 se observa el resumen de los datos de diversidad genética obtenidos.

Tabla 112.

Diversidad genética presente en variedades de Solanum quitoense.

Marcador	Número de Observaciones	Número de Alelos	Heterocigosidad Esperada (He)	Heterocigosidad observada (Ho)	PIC
mSq004	42	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq040	43	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq046	44	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq047	44	1	0,0000	0,0000	0,0000

mSq02 0	44	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 4	43	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq04 9	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq03 5	42	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq00 7	43	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq00 3	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq01 7	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 9	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq00 8	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq01 6	44	2	0,1464	0,1591	0,1357
mSq03 6	43	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 6	41	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq03 1	40	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq03 7	40	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq00 6	42	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq01 2	40	2	0,3488	0,0000	0,2879
mSq01	40	2	0,5000	1,0000	0,3750

3					
mSq01 8	40	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq01 9	43	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 1	42	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 3	41	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq02 5	44	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq02 7	44	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq02 8	43	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq03 3	42	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq03 8	44	2	0,5000	1,0000	0,3750
mSq04 3	44	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq04 4	44	1	0,0000	0,0000	0,0000
mSq05 0	43	1	0,0000	0,0000	0,0000
Prome dio	43	1,8	0,1412	0,2472	0,1113

De los 33 marcadores SSR, 23 fueron monomórficos (es decir presentaron una sola banda de amplificación para todas las variedades de *Solanum quitoense*) y 10 presentaron patrones heterocigóticos, de estos se obtuvo un total de 20 alelos con patrones polimórficos con rango de 2 alelos por locus. Se presume que la mayor parte de los loci están altamente conservados entre las

variedades, ya que se observó un patrón de banda uniforme en casi todas las variedades con los SSR. Sin embargo, se pudo diferenciar en el marcador mSq016, la accesión Sq5 con un PIC 0.1357 donde presenta una banda monomórfica diferente al resto de las variedades. Según Torres *et al.*, 2008 las variedades de *Solanum quitoense* poseen limitada variabilidad molecular y solo se pueden diferenciar morfológicamente por la presencia o ausencia de espinas (Heiser, 1993, Torres *et al.*, 2008).

Los marcadores más informativos fueron los mSq004 (2 alelos/ PIC: 0,3750), mSq040 (2 alelos/ PIC: 0, 0,3750), mSq024 (2 alelos/ PIC: 0,3750), mSq020 (2 alelos/ PIC: 0,2879), mSq013 (2 alelos/ PIC: 0,3750), mSq018 (2 alelos/ PIC: 0,3750), mSq023 (2 alelos/ PIC: 0,3750), mSq025 (2 alelos/ PIC: 0,3750) y mSq038 (2 alelos/ PIC: 0,3750). En el presente estudio se obtuvo un valor promedio de PIC de 0,1113 en donde 0,0000 para los marcadores monomórficos y para los heterocigóticos entre 0.1357 a 0.3750, estos resultados muestran baja diversidad genética en todas las variedades de *Solanum quitoense*. La información obtenida en este estudio preliminar coincidiría con el estudio de Torres *et al.*, 2008 el cual obtuvo índices de polimorfismos de entre 0.0000 y 0,7219 con SSR de *Solanum tuberosum*. Esto sugiere que probablemente exista pérdida de riqueza alélica dentro de las variedades de *S. quitoense* (Torres *et al.*, 2008)

La naranjilla al ser autógama y poseer un nicho ecológico exclusivo y aislado ha sufrido de deriva génica (Fory *et al.*, 2011). La disminución de la riqueza alélica afecta principalmente a aquellos alelos que son menos frecuentes dentro de la población. Posiblemente esto se deba a la fragmentación de sus poblaciones y disminución de individuos, debido a la reducción de la siembra de las variedades a causa de las susceptibilidades y ser reemplazadas por variedades híbridas. Esto se ha podido corroborar en los bajos índices de variabilidad morfológica, fisiológica y genética descritos (Heiser, 1993, Sosa *et al.*, 2002, Lobo *et al.*, 2007, Torres *et al.*, 2008). Se observa que existe una alta similitud entre los cultivares. Se determinó que solamente el 3.4% de los loci mostraron patrones polimórficos, lo que indica una reducida diversidad genética. A su vez las distancias génicas obtenidas varían entre 0.0000 y 0.0173, mostrando que las poblaciones no se diferencian significativamente

entre ellas en relación a los loci evaluados. Esto concuerda con el estudio de Fory y colaboradores (2011) donde obtuvieron en el análisis de conglomerados entre el 80-100% de similitud en las accesiones de *S. quitoense* (Fory *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2008)

En otro estudio del género *Solanum*, Peñafiel y colaboradores (2009), realizaron la caracterización molecular de accesiones de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Obtuvieron un porcentaje del 2.8% de loci amplificados donde la mayor parte de los cebadores mostraron un patrón homocigótico. El índice de contenido polimórfico estuvo entre 0.077 y 0,051, lo que indica baja variabilidad. Los valores de similitud se situaron entre 80-100%. Se sugiere que existe pérdida de diversidad debido a la reducción de la población y la disminución de las variedades de genotipos (Peñafiel *et al.*, 2009). A su vez Loor y colaboradores (2002), en su estudio de caracterización de cacao nacional y especies híbridas, obtuvieron patrones monomórficos dentro de las colecciones ancestrales de cacao nacional, sin embargo, al evaluar las colecciones híbridas introducidas de la especie, se obtuvo un PIC entre 0.901 hasta 0.6839. Se cree que posiblemente dado que las poblaciones de cacao eran aisladas, con una población limitada y existía un reducido intercambio génico, previo a la introducción de especies extranjeras, las mínimas variaciones moleculares indican pérdida riqueza alélica dentro de este grupo ancestral, mientras que al expandirse la población y el cruzamiento con nuevas variedades el número de alelos y diversidad genética ha ido en aumento (Torres *et al.*, 2008, Loor, 2002, Soria 1997). Se realizó también la caracterización con SSR de 55 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa*) donde se obtuvieron distancias genéticas de entre 0.080 y 0,092 mostrando que las variedades son altamente homogéneas y con limitada variabilidad génica (Jarvis *et al.*, 2008). Se cree que el aislamiento de las especies, la fragmentación de las poblaciones, el tipo de fecundación y el limitado intercambio genético entre variedades han conllevado a la pérdida de diversidad genética. Se sugiere que estos eventos han llevado a la naranjilla y otras especies a una disminución de su riqueza alélica (Fory *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2008, Jarvis *et al.*, 2008, Loor, 2002, Soria 1997).

Estos resultados y aportes apuntan a la hipótesis probable, que la naranjilla ha sufrido de deriva génica y por tanto presenta diversidad genética reducida. En consecuencia, es necesario ampliar la base genética de *S. quitoense*, incluyendo especies híbridas y parientes silvestres, que podrían generar un aporte a nivel molecular de esta especie.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Se determinó que el set de marcadores microsatélites propuesto no mostró patrones polimórficos significativos, el porcentaje de alelos obtenido fue bajo y el perfil genético que se obtuvo de la especie fue limitado.

Los resultados de este estudio muestran que las variedades de naranjilla no presentaron diferencias significativas a nivel molecular. Las distancias génicas, la heterocigosidad y el PIC obtenidos apuntan hacia la posibilidad que la naranjilla posee baja diversidad genética.

El reducido número de alelos diferentes indican que la especie puede haber sufrido un proceso de deriva génica, debido al aislamiento, la fragmentación de las poblaciones, la autogamia, la preferencia a la siembra de variedades híbridas debido a la susceptibilidad a plagas y enfermedades, todo esto ha ocasionado la disminución de su diversidad genética.

Debido a la pérdida de riqueza alélica y diversidad y como una estrategia para la conservación de especies de interés se ha llegado a la conclusión que una exploración molecular más profunda incluyendo especies híbridas de naranjilla, así como parientes silvestres permitirá obtener un perfil genético más completo de la especie al evaluar una mayor cantidad de loci.

La metodología M13 Tailing utilizada en este estudio permitió la caracterización molecular exitosa del frutal siendo validada para estudios posteriores. Así mismo se logró generar varias combinaciones multiplex las cuales permitieron una exploración más ágil, logrando un consumo eficiente de reactivos y reduciendo el tiempo de análisis.

6.2 Recomendaciones

Se sugiere estandarizar las temperaturas de hibridación y concentración de cloruro de magnesio en la mezcla de PCR antes de amplificación por método M13 Tailing para evitar bandas inespecíficas y subproductos que dificulten el análisis.

Se recomienda la amplificación de cada marcador microsatélite en singleplex previo al establecimiento de las combinaciones multiplex, a fin de evitar la superposición de bandas y errores de lectura durante el genotipado.

Se propone la ampliación de la base genética de la naranjilla incluyendo especies híbridas y parientes silvestres, así como la caracterización de un mayor número de marcadores SSR, a fin de obtener un perfil genético que pueda ser útil para futuros programas de mejoramiento.

REFERENCIAS

- Acuña, C., Fernández, P., Villalba, P., García, M., Hopp, H., & Marcucci Poltri, S. (2011). Discovery, validation, and in silico functional characterization of EST-SSR markers in *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics & Genomes*, 8(2), 289-301. Doi:10.1007/s11295-011-0440-0.
- Andrade, R. (2005). Limitantes y potencialidades agro-socio-económicas de las familias productoras de naranjilla en las provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago y Sucumbíos. (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica, Quito, Ecuador. Recuperado el 28 de abril de 2017 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4551/1/T-UCE-0004-17.pdf>.
- Andrade, M., Moreno, C., Guijarro, M., Concellón, A. (2015). Caracterización de la naranjilla (*Solanum quitoense*) común en tres estados de madurez. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 16(2), 215–221. Recuperado el 30 de abril de 2017 de: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81343176010.pdf>.
- Aponte, L., & Cardona, C. (2009). Educación ambiental y evaluación de la densidad poblacional para la conservación de los cóndores reintroducidos en el Parque Nacional Natural Los Nevados y su zona amortiguadora (tesis de pregrado). Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. Recuperado el 27 de mayo de 2017 de:
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Arch. Latinoam. Prod. Animal*, 13(11), 30–42. Recuperado el 15 de mayo de 2017 de: <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/7085>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales el trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241. Doi: 10.15517/am.v17i2.5163
- Benor, S., Zhang, M., Wang, Z., & Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum L.*) inbred lines using SSR molecular markers. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 35(6), 373–379. Doi:10.1016/S1673-8527(08)60054-5

- BioTeck Instrumets. (2011). Manual de operaciones Espectrofotómetro para Microplacas Epoch. Recuperado el 17 de enero de 2017 de: <https://www.biotek.es/es/products/detection-microplate-readers/epoch-2-microplate-spectrophotometer/>
- Bolívar, A., Rojas, A., García, P. (2013). PCR and PCR-Multiplex: Critical parameters and standardization protocol. *Avances en Biomédica*, 3(1), 25-33. Recuperado el 17 de enero de 2017 de: <http://Dialnet-PCRYPCRMultiple-4796903.pdf>
- Casierra-Posada, F., García, E. J., & Lüdders, P. (2004). Determinación del punto óptimo de cosecha en el lulo (*Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense* y *septentrionale*). *Agron. Colomb*, 22, 32–39. Recuperado el 22 de abril de 2017 de : <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/17765>.
- Carrillo, M. (2014). Caracterización molecular de 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo e inferencia de su estructura genética. (Tesis de grado). Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador. Sangolquí, Ecuador. Recuperado el 3 de junio de 2017 de: <https://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/8016>
- Cheng, Z., Raman, H., Wu, H., Lemerle, D., Burrows, G., Stanton, R. (2012). Development of SSR Markers for Genetic Analysis of Silverleaf Nightshade (*Solanum elaeagnifolium*) and Related Species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 31(1), 248-254. Recuperado el 22 de abril de 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11105-012-0473-z>
- Chunwongse, J., Martin, G., & Tanksley, S. (1993). Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(6). Doi: 10.1007/bf00222658.
- Feingold, S., Lloyd, J., Norero, N., Bonierbale, M., & Lorenzen, J. (2005). Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(3), 456-466. Doi; 10.1007/s00122-005-2028-2.

- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia, D.F: EmbrapaCenargen. Recuperado el 21 de abril de 2017 de: <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064700.pdf>
- Fory Sánchez, P. A., Sánchez Mosquera, I., Bohórquez Cháux, A., Ramírez, H., Medina Cano, C. I., & Lobo Arias, M. (2010). Genetic variability of the Colombian collection of lulo (*Solanum quitoense* Lam.) and related species of section Lasiocarpa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5465-5476. Recuperado el 21 de abril de 2017 de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200001
- Gao, S., Martinez, C., Skinner, D., Krivanek, A., Crouch, J., & Xu, Y. (2008). Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Molecular Breeding*, 22(3), 477-494. Doi:10.1007/s11032-008-9192-
- García, D. (2008). Diversidad Genética y establecimiento de prioridades en esquemas de conservación. Ejemplo de aplicación en la raza de Lidia. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid-España. Recuperado el 3 de junio de 2017 de: http://www.ucm.es/data/cont/docs/345-2013-11-11-Diversidad_conservacion_Toro_Lidia_Tesis_D_Garcia.pdf
- Gonzales, E. (2011). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex Perado* ssp. *Lopezlilloi* (aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (rosaceae). (Tesis Doctoral). Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Gran Canaria- España. Recuperado el 3 de junio de 2017 de: <https://repositorio.ulpgc.es:8443/bitstream/10553/1285/1/82.pdf>
- Guayasamin, M. (2015). Evaluación ex ante del impacto socio-económico del manejo convencional y mejorado del cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense*) en el Ecuador. (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4551>

- Heiser Jr, C. B. (1972). The relationships of the naranjilla, *Solanum quitoense*. *Biotropica*, 4(2), 77-84. DOI: 10.2307/2989729
- Heiser, C. (2001). Interspecific hybridization and the improvement of the naranjilla (*Solanum quitoense*). R. Van den Berg *et al.* (ed.) *Solanaceae V: Advances in taxonomy and utilization*. Nijmegen Univ. Press, Nijmegen, the Netherlands.
- Heiser, C. 1985. Ethnobotany of the naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. *Econ. Bot.* 39:4–11. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de: https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-1-4899-1136-0_3
- Heiser, C. 1993. The naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid. In J. Gustafson *et al.* (ed.) *Gene conservation and exploitation*. Plentum Press, New York. Recuperado el 21 de febrero de 2017 de: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4899-1136-0_3
- INIAP- DENAREF (2016). *Informe anual Banco de Germoplasma de especies Nacionales*. Departamento Nacional de Recursos Forestales. INIAP. Mejía-Ecuador.
- INIAP- PALORA. (2000). Híbrido Interespecífico de alto Rendimiento. Boletín divulgativo. *Programa Nacional de Fruticultura*. No.276. Recuperado el 3 10 de enero de 2017 de: <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Naranjilla%20INIAP%20PALORA.%20H%C3%ADbrido%20interespecifico%20de%20alto%20rendimiento..pdf>
- INIAP. (2009). Naranjilla de jugo (*Solanum quitoense Lam.*) injerta en patrones de solanáceas silvestres resistentes a *Fusarium oxysporum* y a *Meloidogyne incognita*. Boletín divulgativo. *Programa Nacional de Fruticultura*. No. 354. Recuperado el 3 10 de enero de 2017 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/305/1/iniapscbd354n.pdf>
- Jarvis, D. E., Kopp, O. R., Jellen, E. N., Mallory, M. A., Pattee, J., Bonifacio, A., Maughan, P. J. (2008). Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Journal of Genetics*, 87(1), 39–51. Doi: 10.1007/s12041-008-0006-6
- Jurado, J., Pérez, J., Lagos, T., Benavides, C. (2012). Comportamiento agronómico de injertos de lulo de castilla *Solanum quitoense Lam.* En

- patrones de *Solanum* spp. Revista de ciencias agrícola, 30 (1), 54 – 6. Recuperado el 11 de enero de 2017 de: <http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/969/1191>
- Kang, H., Cho, Y., Yoon, U., & Eun, M. (1998). *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(1), 90-90. Doi: 10.1023/a:1007418606098.
- Kang, T.-J., & Yang, M.-S. (2004). Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology*, 4, 20. Doi:10.1186/1472-6750-4-20.
- Kawchuk, L.M., Lynch, D.R., Thomas, J. et al. *American Potato Journal* (1996) 73: 325. Doi:10.1007/BF02849164
- Kovach, M., Calingacion, M., Fitzgerald, M., & McCouch, S. (2009). The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 106(34), 14444-14449. Doi: 10.1073/pnas.0904077106.
- Licor. (2005). Saga GT version 3.2. Automated Microsatellite Analysis software – user guide. Recuperado el 4 de junio de 2017 de: http://biosupport.licor.com/docs/2005/SagaGT_UG-07545.pdf
- Licor. (2012). Applications Manual Model 4300 DNA analyzer. Recuperado el 30 de mayo de 2017 de: http://biosupport.licor.com/docs/Applications_Manual_4300_DNA_Analyzer.pdf
- Lima, L., Gramacho, K., Pires, J., Clement, D., Lopes, U., & Carels, N. et al. (2010). Development, characterization, validation, and mapping of SSRs derived from *Theobroma cacao* L.–*Moniliophthora perniciosa* interaction ESTs. *Tree Genetics & Genomes*, 6(5), 663-676. Doi: 10.1007/s11295-010-0282-1
- Liu, K., Muse, S. (2005). Bioinformatics. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis, 21(9), 2128-2129. Recuperado el 30 de mayo de 2017 de: <http://statgen.ncsu.edu/powermarker/downloads/Manual.pdf>
- Lobo Arias, M., Medina Cano, C. I., Delgado Paz, O. A., & Bermeo Giraldo, A. (2007). Variabilidad morfológica de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 60(2),

- 3939-3964. Recuperado el 15 de mayo de 2017 de:
<http://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24454>
- Loor, R. G., Risterucci, A., Courtois, B., Fouet, O., Jeanneau, M., Rosenquist, E., Amores, F., Vasco, A., Medina, M. & Lanaud, C. (2009). Tracing the native ancestors of the modern *Theobroma cacao* L. population in Ecuador. *Tree Genetics & Genomes*, pp. 421 – 433. Recuperado el 17 de junio de 2017 de:
http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=554030
- Lozada, P. (2014). Caracterización molecular de 42 accesiones de la colección de genotipos de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de la EET Pichilingue INIAP, mediante el uso de marcadores microsatélites (SSRs) (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador. Recuperado el 17 de junio de 2017 de:
<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/4489>
- M.B., A., Dadlani, M., Kumar, R., & Jacob, S. (2014). Identification and validation of informative SSR markers suitable for ensuring the genetic purity of brinjal (*Solanum melongena* L.) hybrid seeds. *Scientia Horticulturae*, 171, 95-100. Doi.10.1016/j.scienta.2014.03.034
- MAGAP-SIGAGRO. (2011) Naranjilla: Superficie, Producción y Rendimiento a Nivel Provincial. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de:
<http://201.219.3.97/sinagap/index.php/component/phocadownload/category/53-semipermanentes>.
- Mccouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M. Stein, L. (2002). Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.), 207, 199–207. Recuperado el 18 de junio de 2017 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597280>
- Merino, F. C. G., Téllez, L. I. T., Albarado, J. C. G., & Íñiguez, J. C. (2014). Lulo (*Solanum quitoense* [Lamarck.]) como cultivo novedoso en el paisaje agroecosistémico mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, (9), 1741-1753. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de:
<http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/403>
- Morillo, B., Miño. G. (2011). Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola, Manual de procedimientos y técnicas. Instituto Nacional Autónomo de

- investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental "Santa Catalina". Mejía, Ecuador, 126. Recuperado el 10 de abril de 2017 de: https://www.researchgate.net/publication/258803041_MANUAL_Biologia_Molecular_INIAP
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590. Recuperado el 22 de abril de 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17248844>
- Nuez Viñals, F., Carrillo Becerril, J. and Lozano, R. (2000). Genómica y mejora vegetal. 1st ed. Madrid: Mundi Prensa.
- Paredes, D. (2014). Recolección y caracterización morfológica y molecular de la colección nacional de camote (*Ipomoea batata Lam.*). (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador. Recuperado el 30 de junio de 2017 de: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8901/1/AC-B-ESPE-048130.pdf>
- Peñafiel, N., Atahana, V., Torres, M. (2007). Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatélites. *Usfq*, 7, 6. Recuperado el 18 de junio de 2017 de: http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_1/Avances_2009_vol1_69-74.pdf
- Provan, J., Powell, W., & Waugh, R. (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 92(8), 1078-1084. Recuperado el 30 de junio de 2017 de: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00224052?LI=true>
- Reid, A., & Kerr, E. (2007). A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources*, 5(1), 7-13. Doi: 10.1017/S1479262107192133
- Revelo, J., Sandoval, P. (2003). Factores que afectan la Producción y Productividad de Naranjilla (*Solanum quitoense Lam.*) en la región amazónica del Ecuador. INIAP, Estación experimental Santa Catalina. Departamento de Protección Vegetal. Recuperado el 22 de febrero de 2017 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/2434>

- Revelo, J., Viteri, P., Vasquez, W., Vaiverde, F., Leon, J., Gallegos, P. (2010). Manual de cultivo Ecológico de la Naranjilla. Manual Técnico No. 77. INIAP. Mejía, Ecuador. Recuperado el 27 de enero de 2017 de: https://books.google.com.ec/books/about/Manual_del_Cultivo_Ecologico_de_la_Naran.html?hl=es&id=KqUzAQAAMAAJ
- Santamaría, D. (2015). Estudio de la variabilidad genética en poblaciones de cedro de monaña (*Cedrela montana* J. Morotz ex Turczaninov) y porton (*Erihtyna edulis* Triana ex Michaelhi) con marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador. Recuperado el 30 de junio de 2017 de: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4500/1/6.-%20Estudio%20de%20variabilidad%20gen%C3%A9tica%20en%20poblaciones%20de%20cedro%20de%20monta%C3%B1a%20y%20porot%C3%B3n%20con%20marcadores%20SSR%20e%20ISSR.pdf>
- Schlötterer, C. (2004). PCR-based markers, 64(5), 3–9. Doi.10.1038/nrg1249
- Silva, W., Gómez, P., Sotomayor, A., Viteri, D., & Ron, L. (2016). Selección de líneas promisorias de naranjilla para mejorar la calidad de la fruta. *Ecuador es Calidad*. 3(593), 23-30. Recuperado el 20 de enero de 2017 de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3610/1/iniapscCD86.pdf>
- Sharopova, N., McMullen, M. D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Coe, E. H. (2002). Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*, 48(5–6), 463–481. Doi.10.1023/A:1014868625533
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Cregan, P. B. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), 550–560. Doi.10.1007/s00122-004-1871-x
- Soria, J. 1997. Genetic improvement of the “naranjilla” (*Solanum quitoense* Lam.) through interspecific crosses. M. Ríos and H. Pedersen (ed.) Utilization and management of phyto-resources. Abya-Yala, Quito, Ecuador Recuoerado el 28 de marzo de 2017 de: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/48/6/2289>

- Sosa, P., Batista, F., Gonzalez, M., & Bouza, N. (2002). *La conservación genética de las especies vegetales amenazadas* (1st ed). ULPGC. Biblioteca Universitaria. Madrid-España. Recuperado el 28 de marzo de 2017 de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3316319>
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233–234. Doi.10.1038/72708
- Torres, A. F., Arias, A. S., Arahana, V., & Torres, M. L. (2008). Preliminary Assessment of Genetic Diversity and Phenetic Relations for Section by Means of Heterologous SSR Markers. *Crop science*, 48(6), 2289-2297. Doi: 10.2135
- Venkatesan, M., Hauer, M. C., & Rasgon, J. L. (2007). Using fluorescently labelled M13-tailed primers to isolate 45 novel microsatellite loci from the arboviral vector *Culex tarsalis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(2), 204–208. Doi.10.1111/j.1365-2915.2007.00677.x
- Wang, H., Jiang, J., Chen, S., Qi, X., Peng, H., Li, P., Chen, F. (2013). Next-Generation Sequencing of the *Chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) Transcriptome Permits Large-Scale Unigene Assembly and SSR Marker Discovery. *PLoS ONE*, 8(4), 1–10. Doi: 10.1371/journal.pone.0062293
- Wang, X. W., Kaga, A., Tomooka, N., & Vaughan, D. A. (2004). The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean (*Vigna angularis* Willd.) (Ohwi & Ohashi)]. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2), 352–360. Doi: 10.1007/s00122-004-1634-8
- Wang, Z., Li, J., Luo, Z., Huang, L., Chen, X., & Fang, B. et al. (2011). Characterization and development of EST-derived SSR markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Plant Biology*, 11(1), 139. Doi: 10.1186/1471-2229-11-139
- Wei, W., Qi, X., Wang, L., Zhang, Y., Hua, W., Li, D., Zhang, X. (2011). Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics*, 12(1), 451. Doi: 10.1186/1471-2164-12-451
- Zahida, H., Malik, A., Stephen, R., & Salman, A. (2009). Determination of genetic variability of Asian rice (*Oryza sativa* L.) varieties using

microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5641-5651.

Doi: 10.5897/ajb09.827

Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., Simon, P. (2011). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99(2), 193-208. Doi: 10.3732

ANEXOS

Anexos

Anexo 1. Equipos, materiales y reactivos

Materiales y reactivos	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Alcohol potable • Alcohol antiséptico • Etanol 100% • Etanol 70% • Alcohol Isoamílico • Isopropanol • Agua destilada • EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) • Tris-HCl • PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone) • CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) • NaCl (Cloruro de sodio) • 2-mercaptoetanol • Cloroformo • ARNasa INVITROGEN® • Agua ultra pura INVITROGEN® • Buffer de PCR INVITROGEN® • MgCl₂ INVITROGEN® • dNTP's (Desoxinucleótidos) • Cebadores INVITROGEN® • <i>Taq</i> ADN Polimerasa INVITROGEN® • Agarosa • Marcador molecular de peso (Invitrogen 1Kb) LI-COR Biociense® • Blue juice LI-COR Biociense® • Sybr Safe ADN INVITROGEN® 	<ul style="list-style-type: none"> • Cámara de flujo • Vórtex • Balanza • Estufa • Incubadora • Refrigeradora • Centrífuga CentriVap Concentrador de DNA • Termociclador • Cámara de electroforesis • Transluminador • Autoclave • Micropipetas de 10, 100 y 1000 µL • Li-Cor4300s • CentriVap Concentrador de DNA

Anexo 2. Marcadores microsatélite para la amplificación de variedades de *Solanum quitoense*.

Primer ref	FORWARD PRIMER1 (5'-3')	REVERSE PRIMER1 (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO(PB)	TIPO
mSq001	CATTGTTGGTAATTGGTGCT	CCGCTCTCCATTTTCCTT	104	TRI
mSq002	AGAAACCAGTAAAGGAAAAG	TACTCTAAATGATCTCCTCTG T	224	TRI
mSq003	GCCTAACTCGACAGCCC	CTGGTGTGGGTAGATGTCTTT	221	TRI
mSq004	CTCAAACAGCAAACCCAA	GGCATAGAAAATGAGGTGG	164	TRI
mSq005	TAATGCAGCAAAAGGG	GAAGGATAATAACCGAAAAG	149	TRI
mSq006	TTACAGGGGAAGAGGGG	CGTATTTGTGTCTTATGTGGG	170	TRI
mSq007	CTAATCTCTAGGGGTGAACAA	AGGACCTTCACGCTTTT	147	TRI
mSq008	AAAGCCTCAACCACAAGG	TCCCTTGATATTCATACCCC	167	TRI
mSq009	AGTTAAAGGGGAGGGGA	GGCATGATTTCTACGAGC	161	TRI
mSq010	GGAGGTTACTTGGGAGA	TTACGAGAGGACAATTTATG	210	TRI
mSq011	CATTAAGGGAGATTTACCAA	CGGTGAATTATCAAGGAA	254	TRI
mSq012	TTCAAGTGTCAAGATTCAAG	AATTGTGTCAACTCTTACCC	194	TRI
mSq013	ATTGGCAGGCACAAATC	ACTTAGAACAAAACGAGTGCT T	145	TRI
mSq014	TGTTTGTGCTATGCAGTT	TTTAGATGCACTTGACACTT	277	TRI
mSq015	TGAGTGGTGAAGCAAAAG	AATCGCGCAGACTTGA	152	TRI
mSq016	CCATTATGCCTATCAATTCC	CTCGTCCCAAGAACAAAA	256	TRI
mSq017	ACGTGACAATTAGATTTTGGAG G	TACAATGATAAAGTGCGGGT	117	TRI
mSq018	TCTCCAAGATCCATGATT	AGGATGCTTCTTTTGATG	143	TRI
mSq019	GAGCCTTGGATACTATGTTCTT	TCGTGGTCGGTAAAGGT	158	TRI
mSq020	CATTGAGCCAGAGGTAGG	AAATCAGTCCCCTTTAGTTTC	210	TRI
mSq021	TGGCAAATAAAGGCTAC	CGTTAAACTTGTAGACCAA	136	TRI
mSq022	ATTCCTCAACCGACCT	GATGATAACAGAGCAAGGATT T	103	TRI
mSq023	AGGTCCCAATTTCACTATTT	GATCGGAGGGAGGAGG	134	TRI
mSq024	AATATCGCAAATGTTC	ACTGACTTAACTTGCATCCTT	152	TRI
mSq025	AGCAAAGGAGGAAAGG	ATCATTCCGAGTGCTT	129	TRI
mSq026	ACCTCTATTTGGGGTG	TATTGTTTTGGTGTAGGAG	132	TRI
mSq027	CCTTAATGTTGATGGACAAA	AAAACACTCCCTTTAGCA	104	TRI

mSq028	CGTTGGCCTTGACTTTG	ACACAACCATAACCTACCGA	168	TRI
mSq029	GTGCTCTGGGATGGGA	GCAGACTGGTCGTGGAA	145	TRI
mSq030	TGTGGTTCACAAAGGTGTT	AGGCAACAATACCAACCA	274	TRI
mSq031	TCAAAGAGTGTGCAGAAA	ATAGGTTAATTCCTCTTCCA	190	TRI
mSq032	ATAGACTTTCACATAGGGTAG A	TCATCCGAACAACCTCAC	194	TRI
mSq033	AGGAAACTTGACATACTCCA	AAGGATTTTGCTGTGGTTG	143	TRI
mSq034	GATGAGGAGAAGGAGGAAGA	GAACAATCCAAAGGACCAA	125	TRI
mSq035	AAAAGACGCAGCAAGA	ACTGGTAGAGGATATTTAGTG A	233	TRI
mSq036	ACCAGCTTCAGAACATCAAA	GATTATTCTAGTAGCCGTCCC T	118	TRI
mSq037	CTCTGATGATGGTGTGTTT	TTGGGAGGAAGTGGTAG	246	TRI
mSq038	GCATGGGTAGTTTCAAGTATG	TGGAGGAATAGCATGGG	137	TRI
mSq039	CAGGTTTTGGGGTTTATCTT	ACAGTCTTGAACCATAGGCA	180	TRI
mSq040	AGTAAGTCACTCCAGTCTATTC A	CTAGTCCCCAAGCGAA	221	TRI
mSq041	TCGAAACTCTTAACTCTCCTCT T	TGACCAACTCTGGGGAA	125	TETRA
mSq042	GCCCAAACCTATGGAGGG	AGGTTAAGTTTCAAGGCTAAG G	119	TETRA
mSq043	CCTTGAGTTCATTCATCCTT	CATCCTTGAGTTTGAATAGTT G	137	TETRA
mSq044	ATTTCAAGCGCGACTATCT	GCTATCATGTGTTTCATGTTG T	134	TETRA
mSq045	TGGAATTAACCCGAATAGA	CATTCCTTCCATTGCAT	127	TETRA
mSq046	TGCTTGACTCCCGAA	AAATTCAGTGCCTTTG	246	TETRA
mSq047	TGCATCGGTATTTGTCTTT	GCCTGTAGTCAAGGGATG	133	DI
mSq048	TCCTTCCACTCCAACCA	GCTCCTTTATGATGTATCTGC T	145	DI
mSq049	ACAGGTATTACAAAGTCCACA	TTGGGAGCTTGTGTTGTT	107	DI
mSq050	AATGCGAGGTGTGATAAATG	CATGTTGATGGTTTGGGA	172	DI

Anexo 3. Cuantificación por espectrofotometría de DNA de cultivares de *Solanum quitoense*.

Código N°	260/280	ng/μL	Concentración AND a 5 ng/μL
Sq1.1	1,421	170,34	3
Sq1.2	0,773	46,465	10,8
Sq1.3	1,046	64,56	7,8
Sq1.4	1,01	68,824	7,3

Sq1.5	0,905	47,756	10,5
Sq1.6	0,83	48,503	10,4
Sq1.7	0,824	53,07	9,5
Sq1.8	0,782	48,539	10,4
Sq1.9	0,796	41,19	12,2
Sq1.10	0,832	87,261	5,8
Sq2.1	1,148	42,962	11,7
Sq2.2	1,125	67,111	7,5
Sq2.3	1,298	41,283	12,2
Sq2.4	0,95	47,1	10,7
Sq2.5	1,358	49,606	10,1
Sq2.6	1,091	55,034	9,1
Sq2.7	0,735	28,526	17,6
Sq2.8	1,002	69,38	7,3
Sq2.9	0,964	57,467	8,8
Sq2.10	1,568	99,682	5,1
Sq5.1	0,776	54,102	9,3
Sq5.2	0,891	47,001	10,7
Sq5.3	1,163	64,529	7,8
Sq5.4	0,838	59,998	8,4
Sq5.5	0,992	68,906	7,3
Sq5.6	0,811	38,103	13,2
Sq5.7	1,019	57,862	8,7
Sq5.8	0,581	29,976	16,7
Sq5.9	0,925	61,679	8,2
Sq5.10	0,761	51,692	9,7
Sq8.1	1,306	54,902	9,2
Sq8.2	1,311	39,898	12,6
Sq8.3	1,103	33,209	15,1
Sq8.4	1,165	25,965	19,3

Sq8.5	0,803	22,284	22,5
Sq8.6	1,2	36,978	13,6
Sq8.7	0,536	22,603	22,2
Sq8.8	1,098	19,764	25,3
Sq8.9	0,994	38,432	13,1
Sq8.10	0,875	17,766	28,2
Sq9.1	1,026	34,972	14,3
Sq9.2	1,247	35,069	14,3
Sq9.3	1,006	36,787	13,6
Sq9.4	1,065	42,008	12
Sq9.5	1,072	31,011	16,2
Sq9.6	1,137	45,761	11
Sq9.7	1,195	47,218	10,6
Sq9.8	0,774	15,766	31,8
Sq9.9	0,728	20,024	25
Sq9.10	0,671	18,577	27
Sq14.1	1,249	100,865	5
Sq14.2	0,623	17,896	28
Sq14.3	0,752	20,45	24,5
Sq14.4	0,644	18,32	27,3
Sq14.5	0,639	15,806	31,7
Sq14.6	0,706	18,161	27,6
Sq14.7	0,797	29,722	16,9
Sq14.8	0,638	16,755	29,9
Sq14.9	0,793	24,499	20,5
Sq14.10	0,862	24,277	20,6
N3	2,065	274,609	3,7

