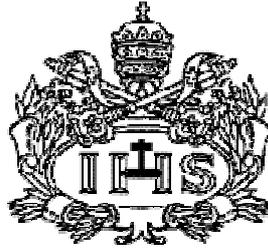


**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS EN LULO (*Solanum quitoense* Lam.) Y TOMATE  
DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) MEDIANTE EL USO DE MARCADORES COSII**

**ZULMA ESPERANZA CÁRDENAS CONTRERAS**

**ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**Bogotá, D. C., Colombia  
Octubre 2009**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS EN LULO (*Solanum quitoense* Lam.) Y TOMATE  
DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) MEDIANTE EL USO DE MARCADORES COSII**

**ZULMA ESPERANZA CÁRDENAS CONTRERAS**

Directora:  
**LUZ STELLA BARRERO MENESES**  
PhD. Genética Molecular Vegetal

**Trabajo de Grado Presentado como requisito parcial  
Para optar al título de:**

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Énfasis en Biotecnología Vegetal**

**Bogotá, D. C., Colombia  
Octubre 2009**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Pontificia Universidad Javeriana no se hace responsable por los conceptos, criterios, opiniones y conclusiones expresados por sus alumnos, solo velará por que el trabajo no tenga ataques personales y únicamente se vea en él, el anhelo de buscar la verdad y justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1996.

**IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS EN LULO (*Solanum quitoense* Lam.) Y TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) MEDIANTE EL USO DE MARCADORES COSII**

**Zulma Esperanza Cárdenas Contreras**

**APROBADO**

---

**Dra. Luz Stella Barrero Meneses**  
PhD. Genética Molecular Vegetal  
Directora

---

**Dra. María del Pilar Márquez**  
MSc. Agricultura Ecológica  
Jurado

---

**Dr. Gerardo Moreno**  
MSc. Ciencias Biológicas  
Jurado

---

**Dr. Wilson Terán**  
PhD. Bioquímica y Biología Molecular  
Jurado

**IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS EN LULO (*Solanum quitoense* Lam.) Y TOMATE DE  
ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) MEDIANTE EL USO DE MARCADORES COSII**

**Zulma Esperanza Cárdenas Contreras**

---

**Dra. Ingrid Schuler PhD.**  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

**Dr. Manuel Franco PhD.**  
Director de Posgrados  
Facultad de Ciencias

## *Dedicatoria*

*Con todo mi amor:*

*A Nuestro Dios y la Virgen Santísima que me permiten con su inmenso amor, reflejado mi familia, amigos y las cosas más sencillas, crecer como profesional y sobre todo en mi vida espiritual soy mejor gracias a ustedes y es mi deber seguir mejorando.*

*Mi hermosa Madre Presentación, digna de admirar y un ejemplo permanente de amor, con tus enseñanzas y oraciones fue posible y será posible todo lo que me proponga.*

*Mi padre, Gabriel soñador y luchador incansable.*

*Mis hermanos: Andrés, Nelson, Wilson, Gabriel y Ma Helena, su apoyo, enseñanzas y amor llenan cada día mi vida de la mejor energía.*

*Mis sobrinas Gabrielle, Marianne y Valerie, mis princesas, me enseñan a cada instante que amar es la mejor forma de aprender.*

*A mis abuelas, abuelos y Susana que desde el cielo están apoyándome.*

*A mi país Colombia, a toda su buena gente, a los campesinos y agricultores que de una u otra forma aportan al mejoramiento fitogenético por quienes profeso gran admiración y respeto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Doctora Luz Stella Barrero, directora y orientadora de este proyecto, por permitirme hacer parte de este estudio, por su paciencia y colaboración.

Doctor Mario Lobo y Doctora Clara Medina, por suministrar el material híbrido desarrollado en el programa de mejoramiento del C.I. La Selva para los análisis moleculares y su orientación.

Doctores Rodrigo Martínez y Víctor Núñez por su asesoría conceptual y de laboratorio.

MSc. Oscar Bedoya, por su colaboración en el análisis de datos, bioinformática y revisión de estilo, en la parte final de este proyecto.

Mis compañeras de laboratorio y sobre todo amigas Girley Collazos, Silvia Gómez, Linda Gómez, Natalia Espinosa y Carolina Ospina, por todos sus aportes y apoyo permanentes que hicieron posible el éxito en el laboratorio.

Iván Fernando Calixto, por su colaboración en la etapa final de la parte experimental y análisis de secuencias, pero sobre todo por su amistad y constante preocupación.

Aura Yaneth Camargo y Félix Enciso por su colaboración y permanente apoyo en la asistencia técnica y logística. A Felix gracias por suministrarme información valiosa para el documento.

Mis hermanos Andrés Cárdenas y Gabriel Cárdenas, por su apoyo incondicional, por impulsarme en este reto académico y su apoyo económico permanente.

Mis mejores amigas Diana Millán, Heydi Manrique y Saira Espinosa, por su valioso y permanente apoyo desde su condición de madres y excelentes profesionales.

Ivanov Pineda por su apoyo y por todos los momentos compartidos en estos años.

Ligia Suescun por su aporte en el manejo de cultivo de tejidos de una parte del material vegetal.

Al profesor Steven D. Tanksley y Feinan Wu, Universidad de Cornell, por suministrar información sobre los marcadores COSII, a través de la directora de este proyecto.

A COLCIENCIAS por el apoyo financiero y a CORPOICA por facilitar las instalaciones de laboratorio.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al buen término de este trabajo, a todos gracias.

## INDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>1.1. Planteamiento del problema y Justificación</b>	3
<b>1.2. Objetivos</b>	5
1.2.1. Objetivo general	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
<b>1.3. Alcance del proyecto</b>	5
<b>2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	6
<b>2.1. Familia solanácea</b>	6
<b>2.2. Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>, Cav. Sent.)</b>	6
2.2.1. Origen y distribución	7
2.2.2. Taxonomía	7
2.2.3. Morfología	8
2.2.4. Variedades	8
2.2.5. Producción Nacional	8
2.2.6. Composición físico-química y uso del fruto	9
2.2.7. Caracterización morfoagronómica y molecular	9
<b>2.3. Lulo (<i>Solanum quitoense</i>, Lam.)</b>	10
2.3.1. Origen y distribución	10
2.3.2. Taxonomía	11
2.3.3. Morfología	11
2.3.4. Variedades	12
2.3.5. Producción Nacional	12
2.3.6. Composición físico-química y uso del fruto	12
2.3.7. Caracterización morfoagronómica y molecular	13
<b>2.4. Marcadores Moleculares</b>	14
2.4.1. Marcadores moleculares COS II	15
2.4.2. Polimorfismos usando la técnica CAPS	17
2.4.3. Polimorfismos SNPs e InDels	18

2.5. Híbridos	18
2.6. Mejoramiento de Plantas	20
2.6.1. Desarrollo de híbridos en tomate de árbol	21
2.6.2. Desarrollo de híbridos en lulo	22
2.6.3. Estudios de identificación de híbridos a nivel molecular	24
2.7. Análisis de variación genética y estructura poblacional	25
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1. Localización	27
3.2. Material vegetal	27
3.3. Extracción de ADN	28
3.4. Selección de marcadores <i>in silico</i>	28
3.5. Amplificación y visualización de marcadores en laboratorio	29
3.6. Análisis estadísticos	30
3.6.1. Análisis de conglomerados	30
3.6.2. Análisis de variación genética, estructura poblacional y PCA	30
3.6.3. Análisis de paternidad	31
3.6.4. Selección de marcadores recomendados para uso en programas de mejoramiento	32
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>33</b>
4.1.Extracción de ADN y cuantificación	33
4.2.Identificación de marcadores COSII polimórficos	33
4.3. Análisis del híbrido control de lulo	36
4.3.1. Análisis de conglomerados híbrido control	37
4.3.2. Análisis de componentes principales híbrido control	39
4.4.Análisis de híbridos de lulo del C. I. La Selva	40
4.4.1. Análisis de conglomerados y componentes principales padres lulo	41
4.4.2. Análisis de conglomerados y componentes principales híbridos lulo	44
4.4.3. Análisis de madres probables vs. PCA por híbrido	47
4.4.4. Marcadores recomendados para uso inmediato en programas de mejoramiento del C.I. La Selva.	57
4.4.5. Estructura poblacional y heterocigosidad en híbridos de lulo	59
4.5.Identificación de híbridos tomate de árbol	62
4.5.1. Análisis de conglomerados y componentes principales tomate de árbol	63

4.5.2.	Análisis padres probables en tomate de árbol	65
4.5.3.	Marcadores recomendados para uso inmediato en programas de mejoramiento	66
4.5.4.	Análisis estructura poblacional y variabilidad híbridos tomate de árbol	68
4.6.	<b>Inferencias generales del estudio</b>	69
5.	<b>CONCLUSIONES</b>	72
6.	<b>RECOMENDACIONES</b>	73
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	74
	<b>ANEXOS</b>	81

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición química, del tomate de árbol</i>	9
<i>Tabla 2. Composición química, del lulo</i>	13
<i>Tabla 3. Principales marcadores moleculares, utilizados en plantas.</i>	15
<i>Tabla 4. Material vegetal de lulo y tomate de árbol evaluado</i>	27
<i>Tabla 5. Madres más probables en cruces de lulo</i>	48
<i>Tabla 6. Marcadores recomendados para la identificación de híbridos 1H a 10H</i>	58
<i>Tabla 7. Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión de padres, madres híbridos y parentales e híbridos de lulo.</i>	60
<i>Tabla 8. Madres más probables en cruces de tomate de árbol</i>	65
<i>Tabla 9. Marcadores recomendados para identificación de híbridos Tomate de árbol</i>	69
<i>Tabla 10. Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión de híbridos tomate de árbol</i>	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Diseño de cebadores universales para especies de Euasteride I (UPA) en un grupo COS II</i>	17
<b>Figura 2.</b> <i>Ejemplo de marcadores CAPS</i>	18
<b>Figura 3.</b> <i>Análisis de madres más probables</i>	31
<b>Figura 4.</b> <i>Visualización calidad del ADN y productos de amplificación por PCR</i>	33
<b>Figura 5.</b> <i>Casos de polimorfismos en el híbrido control 11H.</i>	33
<b>Figura 6.</b> <i>Casos en gel de agarosa para identificación de híbridos lulo</i>	35
<b>Figura 7.</b> <i>Dendograma UPGMA de padres e hijos del cruce control 11H, generado con el Software PAUP4b10 y algoritmo UPGMA.</i>	38
<b>Figura 8.</b> <i>Visualización en gel, marcador 2g34470 polimórfico por InDel.</i>	39
<b>Figura 9.</b> <i>Análisis de componentes principales para híbrido control 11H.</i>	40
<b>Figura 10.</b> <i>Árbol consenso de poblaciones de padres y madres de híbridos de lulo UPGMA</i>	42
<b>Figura 11.</b> <i>Análisis de componentes principales (PCA) para los individuos paternos y maternos de los cruces 1H a 11H</i>	43
<b>Figura 12.</b> <i>Árbol consenso de poblaciones híbridas de lulo utilizando UPGMA.</i>	45
<b>Figura 13.</b> <i>Análisis de componentes principales (PCA) para híbridos 1H a 11H.</i>	46
<b>Figura 14.</b> <i>Dendogramas UPGMA de padres e hijos del cruce 10H</i>	47
<b>Figura 15.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 1H</i>	50
<b>Figura 16.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 4H</i>	51
<b>Figura 17.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 6H</i>	52
<b>Figura 18.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 8H</i>	53
<b>Figura 19.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 9H</i>	54
<b>Figura 20.</b> <i>Caso heterogéneo de la población del híbrido 10H para determinación de madre probable</i>	55

<b>Figura 21.</b> <i>Análisis de componentes principales PCA en tres dimensiones híbrido 10H.</i>	57
<b>Figura 22.</b> <i>Árbol consenso de padres e híbridos de tomate de árbol y taxa relacionados utilizando el método de agrupamiento UPGMA</i>	63
<b>Figura 23.</b> <i>Ejemplos visualización de marcadores COSII en gel de agarosa 2% para Identificación de híbridos en tomate de árbol</i>	64
<b>Figura 24.</b> <i>Análisis de componentes principales (PCA) en tres dimensiones para los individuos paternos, maternos e híbridos <math>Su \times Sb</math> y <math>Su \times Sm</math>.</i>	65
<b>Figura 25.</b> <i>PCA con marcadores COSII seleccionados en tomate de árbol</i>	68

## LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Accesiones y genealogías de lulo usadas como parentales</i>	82
<i>Anexo 2. Accesiones y genealogías de tomate de árbol usadas como parentales</i>	82
<i>Anexo 3. Composición buffer de extracción ADN</i>	82
<i>Anexo 4. Marcadores Moleculares COSII evaluados para padres híbrido 11H, lulo.</i>	83
<i>Anexo 5. Marcadores moleculares COSII evaluados para tomate de árbol (Solanum betaceum)</i>	91
<i>Anexo 6. Proporciones de compuestos para amplificación por PCR</i>	95
<i>Anexo 7. Estimación de la concentración y calidad del ADN de lulo, a través de la lectura de absorbancia con Espectro UV (260/280 nm).</i>	96
<i>Anexo 8. Estimación de la concentración y calidad del ADN de tomate de árbol, a través de la lectura de absorbancia con Espectro UV (260/280 nm).</i>	97
<i>Anexo 9. Árboles consenso de poblaciones de padres, madres e híbridos de lulo generados por PHYLIP 3.5, (UPGM)A, valores de “bootstrap” sobre 10000 repeticiones.</i>	98
<i>Anexo 10. Valores acumulados de los cuatro componentes principales de los parentales de los híbridos 1H a 11H generado por GENETIX 4.03 versión 5</i>	100
<i>Anexo 11. Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión</i>	100
<i>Anexo 12. Árbol consenso de poblaciones de padres, madres e híbridos de tomate de árbol</i>	101



## RESUMEN

Híbridos interespecíficos y parentales de 11 cruces de lulo (*Solanum quitoense*) y 2 de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), pertenecientes a programas de mejoramiento de frutales andinos en Colombia, fueron evaluados usando marcadores moleculares COSII, para ser usados como herramienta confiable para discriminar individuos en programas de mejoramiento. Se encontraron 26 marcadores COSII polimórficos en lulo y 17 en tomate de árbol en todas las poblaciones analizadas. Los análisis UPGMA permitieron evidenciar una alta similitud genética dentro de las accesiones con índices entre 0 y 0,05 tanto para lulo como para tomate de árbol; a su vez, permitieron seleccionar los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H y 9H de lulo para análisis de madres probables. Los análisis UPGMA, PCA y frecuencias de parentales probables tanto en lulo como en tomate de árbol fueron congruentes entre sí. El híbrido testigo 11H y el híbrido 10H en lulo explicaron los mayores porcentajes de madres probables con 100 y 96%, respectivamente, y en tomate de árbol entre 90 a 100%. El PCA arrojó porcentajes de varianza total acumulada en cuatro componentes que oscilaron entre 76 y 98% por lo que fue posible seleccionar del primer y segundo componente los marcadores COSII más informativos para la identificación de cada híbrido. Para híbridos y parentales, se encontraron índices  $F_{IS}$  negativos reflejo de exceso de heterocigotos e índices  $F_{ST}$  promedio por accesión de 0,18 para lulo y 0,37 para tomate de árbol, indicando alta diferenciación genética entre subpoblaciones. Este es el primer estudio de identificación de híbridos en lulo y tomate de árbol utilizando marcadores COSII; con estos resultados, se espera que a futuro se plantee la certificación molecular y seguimiento de híbridos en programas de mejoramiento convencional.



## ABSTRACT

Interspecific hybrids and 11 parental crosses of Lulo (*Solanum quitoense*) and 2 of tree tomato (*Solanum betaceum*), belonging to Andean fruit breeding programs in Colombia, were evaluated using COSII molecular markers as a reliable tool to discriminate individuals in breeding programs. Twenty-six polymorphic COSII markers in lulo and 17 in tree tomato were found in all populations analyzed. The UPGMA analysis showed a high genetic similarity within accessions with values between 0 and 0,05 for both lulo and tree tomato; in turn, UPGMA allowed to select the hybrids 1H, 4H, 6H, 8H and 9H of lulo for analysis of more likely mothers. The UPGMA analysis, PCA and frequencies of likely parents both in lulo and tree tomato were consistent with each other. The 11H and 10H lulo hybrids explained the highest percentage of most likely mothers with 100 and 96% respectively, and from 90 to 100% in tree tomato hybrids. The PCA yielded cumulative percentages of total variance into four components ranging between 76 and 98% so it was possible to select the most informative COSII located in the first and second component for the identification of each hybrid. For hybrids and parentals  $F_{IS}$  indexes were negative reflecting heterozygote excess and  $F_{ST}$  average per accession of 0,18 to 0,37 for lulo and tree tomato, respectively, indicating high genetic differentiation among subpopulations. This is the first study to identify hybrids in lulo and tree tomato using COSII markers; with these results, it is expected the future certification and monitoring of molecular hybrids in conventional breeding programs.



## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio, conservación y utilización de los recursos genéticos de plantas andinas de la familia de las Solanáceas, son de gran importancia y potencial para el país (Lobo, 2000). El Lulo (*Solanum quitoense* Lam.), y el tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) se destacan en la familia como frutales de gran aceptación en los mercados nacionales e internacionales (Lobo, 2006). La susceptibilidad a enfermedades causadas por nemátodos, hongos y bacterias, así como la falta de materiales superiores, son limitantes importantes para su cultivo masivo, impidiendo generar una producción que supla las necesidades locales así como la calidad y cantidad requeridas para su exportación (Lentini, 2003). Los programas de mejoramiento convencional han permitido introducir características deseadas a través de la generación de híbridos entre genotipos comerciales y relativos silvestres con características organolépticas y resistencia mejorada (Vivar and Pinchinat, 1970; Heiser, 1972; Heiser and Anderson, 1999; Lobo, 2000; Lobo 2006).

El Centro de Investigación (C. I.) Corpoica “La Selva”, ha conformado colecciones de estos frutales y ha desarrollado actividades de premejoramiento y mejoramiento, incorporando resistencia a nematodos y la antracnosis de los frutos (Lobo, 2006; Lobo *et al.*, 2007). Este centro generó para el año 1998, la primera variedad de lulo mejorado conocido como “Lulo La Selva” (Bernal *et al.*, 1998).

El cumplimiento de los objetivos del mejoramiento en frutales por medios convencionales, presenta varias dificultades: períodos juveniles prolongados, incompatibilidades inter e intraespecíficas, alto grado de heterocigosidad y presencia de atributos importantes en especies silvestres, por lo cual el mejoramiento tradicional se hace difícil, costoso y requiere de períodos prolongados de tiempo (Lobo, 2006). Así mismo, los programas de mejoramiento tradicionales, se apoyan en análisis fenotípicos acertados, pero con procesos prolongados de selección de genotipos (Stephens *et al.*, 2001). De esta manera, una alternativa para apoyo a los programas de mejoramiento es el uso de marcadores moleculares, los cuales permiten identificar directamente los genotipos y mejorar el proceso de selección en diferentes aspectos: a) facilitando el control y manejo de la base genética de poblaciones de mejoramiento, b) ahorrando recursos para el mantenimiento de cultivos de prueba, y c) garantizando la pureza genética de nuevas variedades desarrolladas a partir de programas de mejoramiento completos.

### 1.1. Planteamiento del problema y Justificación

Los nuevos sistemas de producción requieren la generación de cultivares (líneas endogámicas, híbridos o clones) altamente productivos y mejor adaptados, producto de programas de mejoramiento. Una estrategia biotecnológica valiosa para apoyar el mejoramiento de frutales son los marcadores moleculares, basados en PCR, que han demostrado ser útiles en la identificación de cultivares (Stephen and Mumm, 2008). Por medio de esta herramienta, los híbridos, variedades o clones, producto de programas de mejoramiento genético, podrían ser detectados en estados



tempranos del desarrollo, antes de su trasplante definitivo a campo. Esto permitiría por un lado asegurar en etapas muy tempranas del desarrollo que los genotipos que avanzan para ensayos de campo son las selecciones deseadas y no escapes (i.e. en el caso de híbridos escapes por autopolinización o polinización cruzada con genotipos no deseados), lo cual ahorraría tiempo y dinero para el mejorador; por otro lado, permitiría certificar molecularmente la semilla de las selecciones deseadas para su venta comercial.

Como herramienta molecular para identificación de híbridos, este estudio propone el uso de marcadores COSII. Estos marcadores, conocidos como Secuencias de Ortólogos Conservados (COS) provienen de secuencias de genes expresados (ESTs), los cuales son de naturaleza conservada en diferentes especies de la familia de las solanáceas (Wu *et al.*, 2006). Debido a que los COSII son genes expresados y a que algunos de ellos podrían eventualmente estar asociados a características de interés agronómico (calidad, resistencia, producción), su uso en las solanáceas lulo y tomate de árbol permitiría no solo evaluar la diversidad funcional de las colecciones de germoplasma sino también evaluar materiales para selección de características de interés asistida por marcadores (MAS) en los programas de mejoramiento genético.

Con el propósito de contribuir al desarrollo de estrategias eficientes de mejoramiento de lulo y tomate de árbol, en este estudio se evaluaron 105 marcadores COSII para lulo y 67 marcadores COSII para tomate de árbol, para la identificación de 11 poblaciones híbridas de lulo, *S. quitoense* y su relativo silvestre *S. hirtum* y 2 de tomate de árbol, *S. betaceum* y sus relativos silvestres *S. unilobum* y *S. maternum*, desarrolladas por L. Barrero (una población control) y por el programa de mejoramiento de CORPOICA C.I. La Selva dirigido por M. Lobo. El proyecto plantea el siguiente interrogante de investigación: ¿Es posible identificar híbridos interespecíficos en lulo y tomate de árbol utilizando marcadores moleculares COSII para apoyar los programas de mejoramiento que se realizan en el país?



## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Identificar híbridos interespecíficos de lulo (*S. quitoense*), tomate de árbol (*S. betaceum*) y taxa relacionados utilizando marcadores provenientes de Secuencias Ortólogas Conservadas (COSII) como apoyo a programas de mejoramiento.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Encontrar polimorfismos SNPs o InDels *in silico*, mediante el análisis de secuencias COSII entre parentales de *S. quitoense* y *S. hirtum*, *S. betaceum* y *S. unilobum*.
- Evaluar los COSII polimórficos *in silico*, en el laboratorio para 13 juegos de parentales e híbridos de *S. quitoense* x *S. hirtum*, *S. quitoense* x (*S. quitoense* x *S. hirtum*), *S. unilobum* x *S. betaceum* y *S. unilobum* x *S. maternum*.
- Establecer diferencias genéticas en poblaciones híbridas y parentales llevando a cabo análisis de conglomerados, estructura poblacional y análisis de paternidad.

## 1.3. Alcance del proyecto

Mediante este estudio se pretende demostrar que los marcadores moleculares COSII de tipo codominante son útiles para la identificación de híbridos, siendo este el primer trabajo en el ámbito nacional e internacional en el uso de este tipo de marcadores para la identificación de materiales provenientes de programas de mejoramiento de lulo y tomate de árbol. Los resultados fueron sujetos a análisis estadísticos apropiados (estructura poblacional, conglomerados, análisis de componentes principales y pruebas de paternidad), que permitieron realizar inferencias útiles para los programas de mejoramiento que se adelantan en el país. Se encontraron marcadores para identificar algunos de los híbridos evaluados, que son recomendados para uso inmediato en trabajo de campo. Estos marcadores pueden a futuro ser utilizados para determinar su asociación con características de interés agronómico y comercial y para selección asistida en programas de mejoramiento genético.



## 7. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 7.1. Familia Solanácea

Las solanáceas son el tercer taxa más importante de plantas, económicamente el más valioso y variable en términos de vegetales cultivados, siendo una de las más importantes en el abastecimiento de plantas útiles para la humanidad (Heiser, 1993). La familia Solanácea está compuesta por más de 3000 especies distribuidas en 147 géneros (Judd *et al.*, 2002). Esta familia tiene una amplia distribución mundial, la mayoría distribuidas a través de climas cálidos del Neotrópico lo que comprende la concentración más grande de géneros y especies en Sur y Centro América. Esta familia ha tenido gran interés durante mucho tiempo por investigadores, cultivadores y consumidores (Mueller *et al.*, 2005). Entre las especies más destacadas se encuentran los tubérculos como la papa (*Solanum tuberosum*), frutos vegetales como el tomate (*S. Lycopersicum*), la berenjena (*S. melongena*) y la pimienta (*Capsicum* spp.), plantas ornamentales, plantas con hojas comestibles y plantas medicinales (Knapp *et al.*, 2004). Adicionalmente, a la familia pertenecen especies exóticas con gran potencial comercial para la región andina como el lulo (*S. quitoense*), el tomate de árbol (*S. betaceum*), la uchuva (*Physalis peruviana*) y la papa criolla (*S. phureja*) (Lobo, 2006; Pickersgill, 2007; Salazar *et al.*, 2008; Jansky, 2009).

Los genomas de las Solanáceas han sufrido relativamente pocas reestructuraciones y duplicaciones y por consiguiente conservan similar contenido y orden genético (Wu *et al.*, 2006). Este aspecto hace de esta familia un modelo para explorar las bases de diversidad fenotípica, adaptación natural y agricultura ambiental, en sus diferentes especies (Mueller *et al.*, 2005). El proyecto SOL, del inglés “International Solanaceae Genome Project” o proyecto internacional del genoma de las solanáceas, (<http://sgn.cornell.edu/>), en el que se estudian el genoma del tomate y la papa como modelos para otras especies de la familia, provee información cada vez más enriquecedora que puede ser utilizada para hacer más eficiente la investigación y desarrollo de especies exóticas del género *Solanum* de la región andina, para las que existe poca o nula información genómica (Pratt *et al.*, 2008). Una de las herramientas del proyecto SOL ha sido la generación de Secuencias Ortólogas Conservadas de Segunda Generación (COSII) para estudios de diversidad, genómica comparativa y filogenia de solanáceas y especies asociadas (Wu, *et al.*, 2006, 2009a, 2009b).

### 7.2. Tomate de árbol (*Solanum betaceum*, Cav. Sent.)

El tomate de árbol, *S. betaceum*, fruta exótica de la región andina, es uno de los frutales considerado como alternativa en la diversificación de áreas de cultivos ilícitos, se cultiva en altitudes entre 1500 hasta 2600 m.s.n.m., con temperaturas que oscilan entre 15 °C y 22 °C. Ocupa el cuarto lugar en producción de frutas frescas a nivel nacional, y representa para Colombia la tercera fruta de exportación, después de la uchuva y banano bocadillo (MADR y OAC, 2005; Legiscomex, 2008).



### 7.2.1. Origen y distribución

El tomate de árbol, *S. betaceum* es originario de los Andes de Bolivia y norte de Argentina (Bohs, 1994), es una fruta exótica que está estrechamente relacionada con un complejo de taxones bolivianos, de acuerdo con evidencias moleculares, junto a estudios morfológicos y datos de trabajo de campo, por lo que se cree que el taxón se originó en dicha zona (García *et al.*, 2002). Se encuentran individuos silvestres en Bolivia, Brasil y algunas especies relacionadas en Colombia (Bohs, 1988), la especie presenta un centro de diversidad importante en la región amazónica de Brasil, área en la cual se encuentran 19 especies, de las cuales 8 son endémicas (Bohs, 1991, 1994, 1995).

En el tomate de árbol y especies relacionadas, se calcula que existe un amplio número de taxa, de 30 a 50, distribuidas en América del Sur (Pringle and Murray, 1991; Bohs, 1994; Bohs, 1995). Todas las especies relacionadas con el tomate de árbol, son originarias de América Tropical y están dispersas en América del sur, Nueva Zelanda y África (Bohs, 1994; García, *et al.*, 2002). Se cultiva en áreas tropicales y subtropicales; en América Latina es cultivado en forma marginal en Perú, Chile, Bolivia, Argentina, Brasil, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Jamaica, Puerto Rico y Haití, pero es en Colombia y Ecuador donde se produce más extensamente (Bohs, 1994). En la actualidad también es cultivado en Zambia, Nueva Zelanda, Sri Lanka, Kenia, Zimbabwe e India (MADR y OAC, 2005; Prohens and Nuez, 2005).

### 7.2.2. Taxonomía

El tomate de árbol anteriormente llamado *Cyphomandra betacea*, ha sido retransferido a su nombre actual: *Solanum betaceum* (Bohs, 1995). La ubicación de esta especie en el sistema jerárquico vegetal, la sitúa en el género *Solanum*, en la sección *Pachyphylla*, de acuerdo a la base de datos de plantas del Natural Resources Conservation Service, del departamento de agricultura de E.U. USDA (United States Department of Agriculture) y un estudio de filogenia con marcadores moleculares ITS realizadas por Bohs, (2007), que confirma esta clasificación.

Reino:	<i>Plantae</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Subgénero:	<i>Bassovia</i>
Sección:	<i>Pachyphylla</i>
Especie:	<i>Solanum betaceum</i>

Fuente: United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation. Plants Database, (2009)



### 7.2.3. Morfología

El tomate de árbol es una planta arbustiva, de tallo semileñoso que alcanza buen desarrollo bajo condiciones favorables y puede alcanzar una altura de 2 a 5 metros. Cuando la reproducción se hace por semilla, las raíces son profundas y ramificadas, cuando se hace por estaca las raíces son superficiales y ramificadas presentando volcamiento. El tallo es de consistencia leñosa y se ramifica entre los 8 y 10 meses de edad en forma casi paralela al suelo (Prada y Basto, 2004).

Las hojas son simples, grandes, persistentes, alternas, dispuestas en espiral en el tallo. Tiene una nervadura central predominante, las primeras hojas son de gran tamaño, de consistencia coriácea y color verde pálido en el envés, las hojas nuevas son de color carmelita, color morado cuando jóvenes y verde oscuro cuando maduras (Prada y Basto, 2004). La inflorescencia está compuesta por largos ejes glabros, flores perfectas, hermafroditas. Presentan cinco sépalos, cinco pétalos y presenta cono estaminal con estambres entre sí. Esta planta es alógama (polinización cruzada), aunque también se ha reportado como autocompatible (Bohs, 1994). El fruto es una baya, bilocular de color rojo o amarillo, según la variedad (García *et al.*, 2002).

### 7.2.4. Variedades

Colombia produce dos tipos de variedades: el *tomate de árbol común* que produce frutos de color amarillo-naranja y el *tomate tamarillo* que produce frutos rojos. Este último es el que exporta Colombia (Legiscomex, 2008). Dentro de éstas variedades, los agricultores reconocen cuatro clasificaciones: Rojo morado, tomorro o tamarillo de frutos grandes redondos y pulpa morada; Amarillo común, de frutos ovalados y elongados; Amarillo redondo y Rojo común, esta última es la variedad más conocida y de mayor comercialización (Prada *et al.*, 2004).

Se destaca una tercera variedad que produce frutos morados: este tipo es también conocido como “rojo oscuro” o “negro”, los frutos tienen un color rojo oscuro de piel, con muy tenues rayas verticales verdes, es ovalado y la carne es de color púrpura. Esta variedad es la más ampliamente cultivada en las plantaciones de Nueva Zelanda en 1982, y fue obtenida por selección en la década de 1920 (Prohens and Nuez, 2005).

### 7.2.5. Producción Nacional

Para el año 2008 el tomate de árbol participó con el 4,1% de la producción de frutas frescas sin contar el banano. Ocupa el cuarto puesto después de cítricos, piña y mango, con una producción de 135.997 toneladas, con un área cosechada de 7429 ha, creciendo a una tasa de 4,1% anual en el período 1992-2008. Esto implicó una mejora en los rendimientos aunque no muy significativa, pues en el mismo período sólo crecieron un 0,4% anual, con fluctuaciones entre los 16,4 t/ha y 19,3 t/ha (Agronet, 2009).



En Colombia, los principales lugares de cultivo del tomate de árbol son en orden de participación: Antioquia, Cundinamarca, Tolima, Boyacá, Huila, Santander, Cesar, Valle y Nariño, que en conjunto suman el 90% del área cosechada total en el 2008. La zona de concentración está en la región cafetera que posee un clima templado y una altura de 1.200 a 2.200 m.s.n.m. (Legiscomex, 2008). Las plantaciones efectuadas se han logrado en áreas donde por efecto de costos de producción se ha sustituido papa y frijón por tomate de árbol.

#### 7.2.6. Composición físico-química y uso del fruto

El tomate de árbol se caracteriza por ser una fruta altamente nutritiva, rica en vitaminas, minerales, alto contenido de pepsina y bajos niveles de calorías (Tabla 1). Tiene pH ácido y sabor agrídulce, factores que lo hacen atractivo para el procesamiento industrial (Orjuela *et al.*, 2006). La parte comestible del fruto es frecuentemente usada en jugos, refrescos, cócteles, gelatinas, helados, postres, ponches, dulces y también pueden fabricarse enlatados (Bernal *et al.*, 2003). Es considerado en frutoterapia como una de las frutas que fortalecen el cerebro, y contribuye a curar migrañas y cefaleas severas, tiene sustancias como el ácido gamma amino butírico que baja la tensión arterial (FAO, 2006).

**Tabla 1.** Composición química, del tomate de árbol, *S. betaceum*  
(Contenido en 100 g de parte comestible)

Composición	Contenido
Calorías	57 kcal
Agua	85,84 g
Proteínas	1,7 g
Grasa	0,1 g
Carbohidratos	10,3 g
Fibra	1,1 g
Ceniza	0,8 g
Calcio	6,0 mg
Fósforo	22,0 mg
Hierro	0,40 mg
Vitamina A	100 mg
Tiamina	0,05 mg
Riboflavina	0,03 mg
Niacina	1,1 mg
Ácido ascórbico	25,0 mg

Fuente: ICBF. Tablas de composición de alimentos Colombianos. 2009

#### 7.2.7. Caracterización morfoagronómica y molecular

Se realizaron estudios de variabilidad morfológica de 34 materiales de la colección Colombiana de tomate de árbol y taxa silvestres relacionadas, mediante la aplicación de descriptores morfológicos tanto cualitativos, como cuantitativos, encontrándose una alta variabilidad entre los individuos analizados en 52 de las 55 características cualitativas estudiadas, con polimorfismo en 45 atributos



en *S. betaceum* (García *et al.*, 2002, Medina *et al.*, 2004). Posteriormente, Bohs (2007), realizó con marcadores ITS de la región nuclear un análisis filogenético del clado *Cyphomandra*, al cual pertenece *S. betaceum*, entre 61 accesiones de 35 especies del clado; cuatro grupos de especies pudieron ser reconocidos dentro del clado *Cyphomandra*, lo cual fue parcialmente similar a los resultados obtenidos con características morfológicas. En cuanto a la caracterización molecular en tomate de árbol usando marcadores COSII, se realizaron evaluaciones tanto en CORPOICA como en la Universidad de Cornell con cerca de 400 cebadores COSII distribuidos en los 12 cromosomas de tomate de mesa en diferentes accesiones de tomate de árbol obteniéndose una amplificación por PCR en el 76,5% de los casos, lo cual sugiere una alta conservación de genes COSII en especies solanáceas (Olarte *et al.*, 2006; Pratt *et al.*, 2008). Posteriormente, Enciso *et al.* (sometido), utilizando COSII realizaron un estudio de variabilidad a nivel molecular de 30 accesiones de tomate de árbol de la colección manejada por CORPOICA, encontrándose 5 marcadores polimórficos informativos, a partir de los cuales se evidenció un alto índice de diferenciación genética entre subpoblaciones o accesiones ( $F_{ST}$  de 0.99) y una baja diferenciación dentro de las mismas, lo cual estuvo relacionado con un déficit de heterocigotos y alta homocigosis (fijación de los alelos) dentro de accesiones y una alta estructura poblacional.

### 7.3. Lulo (*Solanum quitoense*, Lam.)

Lulo o naranjilla, *S. quitoense*, fruta tropical exótica de clima frío moderado, se adapta a temperaturas comprendidas entre 12 y 20 °C, crece entre los 1500 y 3000 m.s.n.m., requiere de alta humedad relativa cercana a 80% y de poca luminosidad. El lulo tiene un interesante potencial de mercado tanto a nivel internacional como nacional. El mercado de frutas exóticas de Europa y Estados Unidos son mercados activos y abiertos para esta fruta exótica, siempre y cuando se cumplan las expectativas de calidad, volumen y disponibilidad (CCI, 2005; Pickersgill, 2007; Pulido, 2008).

#### 7.3.1. Origen y distribución

El centro primario de diversidad de *S. quitoense*, comprende la región andina de Colombia, Ecuador y Perú (Heiser and Anderson, 1999; Bohs, 2004), y se encuentran taxa relacionadas en Venezuela, Brasil, Centro América y Asia (Lobo, 1983; Heiser and Anderson, 1999). Actualmente este fruto se cultiva en Venezuela, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, Panamá, Perú y Colombia (Bohs, 2004; FAO, 2006). Algunos países de la zona templada se han interesado en el establecimiento de este cultivo, pero su adaptación es deficiente como en el caso del estado de la Florida en Estados Unidos, ya que las condiciones climáticas no son propicias para su desarrollo (Bermeo, 2005).

#### 7.3.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *S. quitoense* Lam., de acuerdo a la base de datos de USDA (United States Department of Agriculture), se complementa con los rangos taxonómicos como subfamilia y tribu, que se fundamentan en estudios de filogenia, basados a partir de secuencias de DNA de cloroplasto (Bohs and Olmstead, 1999; Bohs 2004), así como también, en observaciones



morfológicas, en el caso del subgénero (Millar and Diggle, 2003). Al igual que el tomate de árbol, el lulo pertenece al género *Solanum* pero se sitúa en la sección *Lasiocarpa*.

Reino:	<i>Plantae</i>
Sub-reino:	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión:	<i>Spermatophyta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Solanales</i>
Familia:	<i>Solanaceae</i>
Género:	<i>Solanum</i>
Subgénero:	<i>Leptostemonum</i>
Sección:	<i>Lasiocarpa</i>
Especie:	<i>Solanum quitoense</i>

Fuente: United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation plants database, (2009).

### 7.3.3. Morfología

El lulo presenta una raíz pivotante principal que le sirve de anclaje acompañada de un sistema radical fibroso y superficial, el cual penetra hasta 50 cm de profundidad con un gran desarrollo de raíces laterales. El tallo es semileñoso, robusto, cilíndrico y veloso, con o sin espinas, a veces ramificado, presenta de 4 a 6 ramificaciones laterales que sirven de sostén de toda la parte aérea, puede crecer hasta 3 metros de altura. Las ramas son fibrosas y resistentes, con diámetros de hasta 5 cm, su distribución es radial y suculenta (Heiser, 1972; Heiser and Anderson, 1999).

Las hojas son grandes, con pubescencia lanosa, con o sin espinas, dependiendo de la temperatura las hojas pueden alcanzar hasta cerca de 1 metro de largo y 1 metro de ancho en su extensión, son de color verde oscuro con nervaduras de color púrpura en el haz y blancas o purpúreas en el envés. Las flores son de color blanco o lila claro, se agrupan en racimos en el peciolo corto que contiene hasta 10 flores justamente debajo y frente a las hojas. El fruto es una baya globosa entre 4 y 6,5 cm de diámetro, cubierta de tricomas de color amarillo. La corteza del fruto es de color amarillo intenso cuando alcanza la madurez. La pulpa es de color verde oscuro, pegajoso, ácida con un pH entre 3,5 a 5,0.

La planta tiene un ciclo biológico de tres a cuatro años en producción constante (Heiser and Anderson, 1999). Esta planta es comúnmente alógama o de polinización cruzada, aunque también se ha reportado como autocompatible (Heiser, 1972; Benítez *et al.*, 1991).



#### 7.3.4. Variedades

En Colombia, las variedades de lulo conocidas son la *S. quitoense* var. *septentrionale*, que se caracteriza por tener espinas (CE), en ramas y tallos, es una variedad adaptada al sotobosque y la *S. quitoense* var. *quitoense*, conocida comercialmente como Lulo de Castilla, especie sin espinas (SE), con sabor menos ácido y con mayor adaptación a la exposición solar (Medina *et al.*, 2008). De acuerdo a lo reportado por Medina (2008), el fenotipo con espinas es condicionado por un gene dominante y la eliminación de esta característica con fines de cultivo es consecuencia de procesos de selección antrópica durante la domesticación.

#### 7.3.5. Producción nacional

En Colombia se siembran alrededor de 6.382 hectáreas, con una producción anual de 51.452 toneladas y un rendimiento promedio de 7,5 t/ha. De acuerdo con las evaluaciones agrícolas, el área cosechada de lulo creció en los últimos años a una tasa promedio anual del 4,1% lo que significa que pasó de 3,411 a 6,494 ha entre 1992 y 2008 (Agronet, 2009).

El cultivo de lulo se encuentra disperso y las principales zonas productoras se localizan al sur del país, donde el departamento del Huila es el mayor productor, con una participación del 25% de área cosechada, le sigue en importancia el Valle del Cauca, con el 18%, Boyacá con el 7,5%, Nariño con el 7,4%, Cauca y Cesar cada uno con el 6,2%, Cundinamarca con el 5,3%, Caldas con el 4,1% y Risaralda y el Quindío aportan en conjunto el 3,2%. En los últimos años ha tenido un importante desempeño en la producción de lulo los departamentos de Tolima, Caquetá y Antioquia (CCI, 2005), sin embargo la demanda nacional de lulo se suple con importaciones de lulo desde Ecuador, a pesar de que la calidad es inferior al lulo colombiano es atractivo por presentar menor precio comercial. En los últimos años se ha impulsado la exportación de lulo y ocupa actualmente el noveno puesto de las frutas exóticas de exportación de Colombia, después de frutas como uchuva, banano bocadillo, tomate de árbol y pitaya, entre otras, representando el 0,1% de las exportaciones de frutos exóticos (Legiscomex, 2008.).

#### 7.3.6. Composición físico-química y uso del fruto

Las características que más llaman la atención del lulo son el sabor, el aroma y el color llamativo de la pulpa, junto con su contenido nutricional, en el que sobresalen las Vitaminas A y C, elementos que le confiere propiedades antioxidantes, diuréticas, regeneradoras de tejidos, por su contenido de Hierro se le atribuyen propiedades tonificantes y para el buen funcionamiento de los riñones. El jugo de lulo disuelve algunas toxinas en el organismo, es recomendado para las personas que sufren gota, ya que disminuye la acumulación de ácido úrico en la sangre, responsable de esta enfermedad. (CCI, 2005; FAO, 2006, Tabla 2). El lulo se emplea en la preparación de jugo fresco, en la producción de mermeladas, jugo concentrado congelado, helados, pulpa congelada, jalea, pudines y pasteles (Bermeo, 2005).



**Tabla 2.** Composición química, del Lulo, *S. quitoense*  
(Contenido en 100 gr de parte comestible)

Composición	Contenido
Calorías	37 kcal
Agua	90,1 g
Proteínas	0,7 g
Grasa total	0,1 g
Carbohidratos	8,4 g
Fibra	0,3 g
Ceniza	0,8 g
Calcio	8,07 mg
Fósforo	13,0 mg
Hierro	1,1 mg
Magnesio	19,01 mg
Potasio	39,0 mg
Vitamina A	37,0 mg
Vitamina C	18-20 mg
Tiamina	0,04-0,09 mg
Riboflavina	0,03-0,04 mg
Niacina	1,19 – 1,76 mg

Fuente: ICBF. Tablas de composición de alimentos Colombianos. Bogotá D. C. 2009

### 7.3.7. Caracterización morfoagronómica y molecular

En CORPOICA, en el Centro de Investigaciones C.I. La Selva, se realizó un estudio sobre la variabilidad morfológica de 116 accesiones de la colección de lulo y especies de la sección *Lasiocarpa*, se evaluaron y caracterizaron 86 variables de la planta de las cuales 58 fueron de carácter cualitativo y 28 cuantitativo, encontrándose una alta variabilidad cualitativa en 57 de las 58 variables estudiadas y variabilidad en todos los atributos cuantitativos, de los cuales los primeros 8 componentes principales explicaron el 79,27% de la variabilidad total; las variables cuantitativas relacionadas con diferentes características del fruto fueron las más informativas, ubicándose en el primer componente principal que aportó el 41,6% de la variabilidad total (Bermeo, 2005). Este estudio se realizó con el fin de seleccionar poblaciones con atributos deseables para programas de mejoramiento con la especie *S. quitoense*.

Complementando los estudios basados en el fenotipo de la especie, se realizó un estudio de variabilidad genética usando marcadores AFLPs en 159 accesiones del banco de germoplasma de CORPOICA La Selva con 2 combinaciones polimórficas; en el estudio se encontró una importante diversidad entre las especies de la sección *Lasiocarpa* (silvestres), con perspectivas para ser usadas en el mejoramiento de especies cultivadas y una separación clara entre las especies Andinas y Amazónicas (Fory *et al.*, sometido). En cuanto a la caracterización molecular en lulo usando marcadores COSII, Olarte *et al.* (2006), realizaron evaluaciones tanto en CORPOICA como en la Universidad de Cornell con 460 cebadores COSII distribuidos en los 12 cromosomas del tomate de mesa en diferentes accesiones de lulo. Se obtuvo una amplificación por PCR del 84,4%, sugiriendo una alta homología de genes COSII en esta especie (Pratt *et al.*, 2008). Adicionalmente,



Enciso *et al.* (sometido), realizó un estudio de variabilidad con COSII en 32 accesiones de lulo de la colección CORPOICA usando 6 marcadores polimórficos, a partir de los cuales se observó un alto índice de diferenciación entre subpoblaciones y una baja diferenciación dentro de las mismas ( $F_{ST}$  de 0,93) relacionado con un déficit de heterocigotos dentro de accesiones, con una alta homocigocis ( $F_{IS}$  de 0,99) o fijación de alelos, y una alta estructura poblacional.

Recientemente, Torres *et al.* (2008), evaluaron la diversidad genética y las relaciones fenéticas de la sección *Lasiocarpa* en 40 accesiones provenientes del Departamento de Recursos Filogenéticos del Ecuador (DENAREF, Quito) y del Jardín Botánico de Nijmegen (Netherlands), a partir de marcadores heterólogos de *Solanum tuberosum* tipo SSRs, 7 marcadores polimórficos, de un total de 48 marcadores evaluados, produjeron un total de 25 alelos y entre 2 a 6 alelos por locus, un contenido de información polimórfica (PIC) o índice de diversidad genética de 0,403 y un coeficiente de similaridad entre todas las accesiones analizadas de 0,46, datos que concuerdan con estudios morfológicos previos en el Ecuador, demostrando el potencial de los marcadores SSR heterólogos en la caracterización de especies de la sección *Lasiocarpa* y el conocimiento de estas especies para su preservación y mejoramiento.

#### 7.4. Marcadores Moleculares

Hasta hace medio siglo los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, los cuales contribuyeron significativamente al desarrollo teórico de los análisis de ligamiento y a la construcción de los primeros mapas genéticos (Spooner *et al.*, 2005). Estos marcadores poco informativos, fueron relevados por los marcadores isoenzimáticos (Ferreira *et al.*, 1998). Con el desarrollo de la biología molecular surgieron métodos de detección de polimorfismo genético a nivel de ADN; el uso de enzimas de restricción permitió el desarrollo y el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) y más recientemente el descubrimiento de la amplificación en cadena mediante el uso de una ADN polimerasa, PCR, llegó al desarrollo de nuevos y eficientes marcadores moleculares, definidos simplemente como sitios de algún tipo de variación neutral del ADN (Griffiths, 1999).

El uso de marcadores moleculares en mejoramiento fitogenético, es una estrategia valiosa para reducir de forma eficiente los tiempos de un programa de mejoramiento, para tal fin es posible usar diversos tipos de marcadores en su mayoría de tipo codominante que provean información valiosa a corto plazo para la identificación, discriminación y selección de genotipos, valorar la variabilidad genética y a largo plazo para la elaboración de mapas moleculares y selección asistida por marcadores (SAM) o por genómica (Stephen and Mumm, 2008; Heffner *et al.*, 2009). En la Tabla 3 se presentan los principales marcadores moleculares que se han utilizado para la identificación de híbridos, identificación de parentales, control de cruzamientos y certificación de pureza genética.



Tabla 3. Principales marcadores moleculares utilizados en plantas.

Técnica	Marcador	Ventaja	Desventaja
No basados en PCR	<b>RFLP</b> Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción	Moderadamente polimórficos, especificidad de locus, codominantes y alta reproducibilidad	Requiere grandes cantidades de ADN, pocos loci detectados por ensayo, procedimientos laboriosos y exigentes
	<b>VNTR</b> Repeticiones en Tándem de Número Variable	Alto polimorfismo y reproducibilidad	Requiere grandes cantidades de ADN y procedimientos laboriosos
Basados en PCR	<b>SSR</b> Secuencias Simples Repetidas	Se encuentran a lo largo del genoma, alta especificidad, alto nivel de polimorfismo, codominantes, técnica eficiente y económica.	Alto Costo para la generación de cebadores. Puede darse la presencia de alelos nulos.
	<b>CAPS</b> Secuencia Polimórfica Amplificada Cortada con Enzimas	Codominante, baja cantidad de ADN y alta reproducibilidad, técnica eficiente.	Requiere análisis con enzimas y en algunos casos secuenciación que incrementa el costo.
	<b>RAPD</b> ADN Polimórfico Amplificado Aleatoriamente	Alto número de fragmentos, requiere poca cantidad de ADN, procedimiento rápido y económico.	Baja reproducibilidad
	<b>ISSR</b> Secuencias Inter-Simples Repetidas	Bajas cantidades de ADN, distribución aleatoria a través del genoma, no se requiere conocer la secuencia para elaborar los cebadores.	Al ser multiloci, puede haber una no homología entre fragmentos similares, baja reproducibilidad
	<b>SCAR</b> Secuencia caracterizada de región amplificada	Alta reproducibilidad, locus específico. Se requieren pequeñas cantidades de ADN.	Necesidad de obtener datos de secuencia para el diseño de los cebadores.
	<b>SNPs</b> Polimorfismos de un solo nucleótido	Diversos tipos de análisis, permite que sea altamente eficiente. Altamente informativos; permite generar mapas de alta densidad Técnicas en su mayoría totalmente automatizadas y eficientes.	Alto costo en la mayoría de los tipos de métodos usados para su detección; aunque tendientes a reducirse con secuencia de segunda generación
	<b>InDels</b> Polimorfismos de Longitud Inserción y Deleción	Codominante. Alta especificidad y estabilidad, técnica sencilla, eficiente en regiones largas, bajo costo.	En algunos casos requiere análisis con enzimas lo que incrementa el costo

Fuente: Spooner *et al.*, 2005; Khlestkina and Salina, 2006; Cun-hong, *et al.*, 2008.

#### 7.4.1. Marcadores moleculares COSII

En los últimos años se han obtenido mapas de ligamiento génico utilizando herramientas de genómica comparativa, en especies económicamente importantes como las Poáceas, Leguminosas y Solanáceas, a través de un sistema común de genes ortólogos. Este se basa en la identificación de secuencias altamente conservadas a través de la evolución, tomando como referencia el genoma de



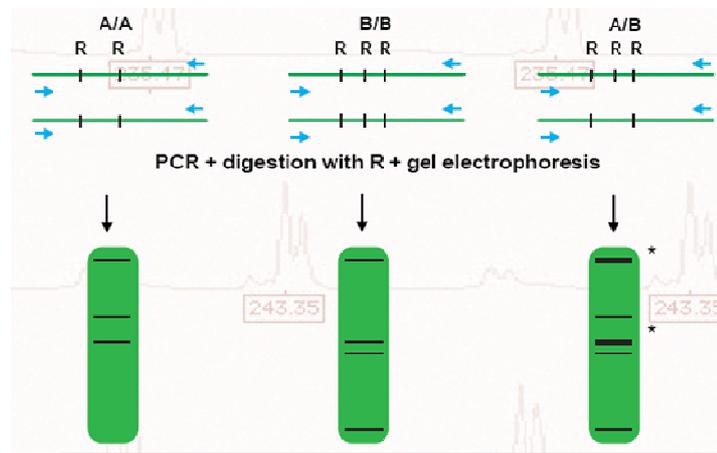
*Arabidopsis* (Fulton *et al.*, 2002). Estos genes, denominados marcadores COS (Secuencias Ortólogas Conservadas), son marcadores universales que han permanecido estables durante el curso de la especiación y pueden ser utilizados para estudios de genómica comparativa entre genomas altamente divergentes como lo son los del tomate (*Solanum lycopersicum*) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), para establecer redes de sintenia en especies del clado Euasteride I, estudios de filogenia, taxonomía, diversidad, evolución y para la identificación de loci conservados de importancia económica (QTLs) (Fulton *et al.*, 2002; Wu, *et al.*, 2006; 2009a; 2009b; Labate *et al.*, 2009).

El primer grupo de COS desarrollado (COSI) está basado en RFLPs de secuencias de DNA conservadas entre tomate y *Arabidopsis* (Fulton *et al.*, 2002). La segunda generación o COSII representan un juego de genes ortólogos, de copia única, son basados en PCR, son altamente conservados entre diferentes especies dicotiledóneas ya que se desarrollaron a partir de secuencias ortólogas de diferentes especies de la familia Solanácea como; tomate, papa, pimentón, y especies relacionadas como café (Wu *et al.*, 2006).

Los cebadores universales COSII para especies del clado Euasteride I (conocidos como UPA), fueron diseñados a partir de una secuencia consenso de un grupo de genes COSII, los cuales amplificaban tanto regiones intrónicas (iUPA), aumentando la probabilidad de encontrar polimorfismos, como exónicas (eUPA), en varias especies de Solanáceas y taxas relacionados (Figura 1, Wu *et al.*, 2006). Cada gen COSII, está referido en un locus correspondiente en *Arabidopsis* y en base a esto, los cebadores se diseñaron a partir de exones conservados. Los resultados para obtener COSII son más eficientes y ventajosos con respecto a los COSI, ya que se pueden visualizar en un tiempo más corto al ser basados en PCR, pueden ser utilizados para evaluaciones a gran escala, los análisis filogenéticos permiten con alta probabilidad clasificarlos como ortólogos y el diseño de cebadores universales, pueden amplificar contrapartes ortólogas (exónes y/o intrones) de otras especies de solanáceas relacionadas (Wu *et al.*, 2006).

Los COSII presentan ciertas características que los hacen valiosos en el estudio de especies de la familia Solanácea; pueden ser convertidos a marcadores codominantes y de bajo costo y están distribuidos en los 12 cromosomas del tomate. Su uso en especies con poco desarrollo genómico como el lulo y el tomate de árbol facilitará la ubicación de cromosomas al ser comparados con sus posiciones en el cromosoma del tomate, los estudios de diversidad, la selección asistida por marcadores o por genómica acoplada con la identificación de QTLs de importancia económica, como apoyo a programas de mejoramiento genético. En Colombia se han desarrollado trabajos en diferentes especies Solanáceas que han permitido explorar el uso de estos marcadores para diferentes propósitos. Por ejemplo, para la evaluación de la variabilidad genética de colecciones de germoplasma de lulo, tomate de árbol (Enciso *et al.*, sometido) y uchuva (*Physalis peruviana*) y para la elaboración de mapas genéticos en una población de papa criolla (*Solanum phureja*) segregante para resistencia a *Phytophthora infestans* (Calixto, 2008).





**Figura 2. Ejemplo de marcadores CAPS.** Se observan CAPS para tres genotipos: los dos primeros homocigotos (A/A y B/B) y el tercero heterocigoto (A/B). El producto de PCR es el resultado de amplificar los mismos cebadores (flechas azules), no detectándose polimorfismo. Aplicando la misma enzima de restricción se encontró para A/A dos cortes visualizándose tres bandas y para B/B tres cortes visualizándose 4 bandas. En consecuencia, el individuo heterocigoto A/B debe tener una copia del fragmento digerido dos veces y del fragmento digerido tres veces, visualizándose siete bandas. El diagrama muestra sólo 5 bandas, ya que dos de ellas (asteriscos), migran distancias similares. **Fuente:** De Vicente and Fulton, 2004.

### 7.4.3. Polimorfismos SNPs e InDels

Los SNPs (Polimorfismos en un Solo Nucleótido) es una especie de polimorfismo genético que se presentan cuando existe la sustitución de un solo nucleótido por otro en una región específica del material genético que puede pertenecer a un gen, el cual codificará una cadena polipeptídica, probablemente con características diferentes a la cadena original y a su vez, presentará o no un posible cambio en el fenotipo. Son cambios comunes o mutaciones inducidas provenientes de una base a otra (transiciones y transversiones), o inserciones y deleciones de una base (InDels). La gran mayoría de secuencias polimórficas en una porción eucromática de la mayoría de los genomas son SNPs (Spencer and Gibson, 2004). Los InDels (Polimorfismos de Logitud por Inserción y Delección), están representados en un rango de longitud entre 1 a 640 bp (Cun-hong, *et al.*, 2008) o mayores respecto al tipo, evolución y tamaño del genoma (Ryan, 2004), pueden ser de 1-2 pb de longitud, o de menos de 20 pb, estos dos últimos no es posible distinguirlos en un gel de agarosa. Tanto SNPs como InDels pueden ser transformados o crear a partir de ellos marcadores CAPS, ya que se pueden identificar uno o varios sitios de restricción. La aplicación al estudiar este tipo de polimorfismos se encuentra en la comparación de las secuencias entre poblaciones que incluye inferencia de la historia demográfica, estudio de conservación genética, pruebas de maternidad y paternidad y análisis de factores evolutivos experimentados por un loci individual. Estos marcadores son valiosos por su alta especificidad, codominancia, estabilidad y son altamente informativos (Cun-hong, *et al.*, 2008).



## 7.5. Híbridos

A comienzos del siglo 20, el descubrimiento fundamental de Darwin y las leyes de Mendel establecieron las bases científicas para la genética y mejoramiento de plantas (Stephen y Mumm, 2008). Para su época, Darwin utilizó la palabra híbrido para referirse a la descendencia de los cruces entre especies; hoy el concepto de híbrido se refiere de forma similar a un organismo vivo procedente del cruce de dos organismos de diferente subespecie o taxonomía (Kumar y Sing, 2005). En el último siglo, el desarrollo de híbridos promovió estudios para examinar la posible explotación de la heterosis (o vigor híbrido) en semillas - híbridas F1 en diversas especies cultivadas. Así, se desarrollaron nuevas variedades comercialmente activas, que permitieron obtener cosechas con un mejor rendimiento, resistencia, adaptabilidad y sobre todo uniformidad (Gepts, 2002).

Los híbridos pueden ser de tipo intraespecíficos (resultado del cruce de individuos dentro de la misma especie) o interespecíficos (resultado del cruce de dos especies diferentes de la misma sección taxonómica o población) (Spooner *et al.*, 2005). En programas de mejoramiento, un híbrido interespecífico es un nuevo genotipo con alta probabilidad de heterosis, producto de la combinación de atributos genéticos altamente variables en los parentales: por ejemplo, un taxón silvestre con un taxón cultivado. Esto permite crear una base genética amplia, obtener genotipos con características de resistencia, calidad o producción mejoradas y en algunos casos promover la evolución adaptativa y la especiación (Lobo, 2006; Hegarty and Hiscock, 2004).

En diferentes especies de plantas como maíz y arroz, se ha hecho un desarrollo considerable de semillas de híbridos F1 con alto vigor o heterosis, estas semillas se obtienen a partir de mecanismos de polinización económicamente factibles (Hegarty and Hiscock, 2005). Ejemplos de generación de híbridos en solanáceas altamente productivos o con mejores características que los padres se encuentran en el tomate (*S. lycopersicum*) del cual se han desarrollado híbridos resistentes a partir de relativos contrastantes con los cuales se ha obtenido por ejemplo resistencia a la enfermedad producida por el virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate en inglés; “*Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)*” (Vidavski, 2007; Dueñas *et al.*, 2008); dos híbridos de tomate agrónomicamente potenciales, fueron desarrollados en el Instituto Indio de Investigación Vegetal (IIVR), estos híbridos F1 de tomate son variedades altamente productivas, ofreciendo también algunas otras ventajas inherentes como uniformidad, calidad y resistencia a enfermedades (Singh *et al.*, 2007). Para berenjena (*S. melongena*), en China se reportó el híbrido llamado “Ziteng” nuevo híbrido F1 desarrollado por cruce de dos líneas puras, tiene diferentes características agronómicas favorables; crecimiento rápido y maduración temprana, puede ser cosechado 40 días después de la plantación, alto rendimiento, produce frutos con piel brillante y violeta, tiene resistencia a la *Fusariosis* vascular, resistencia media a la marchitez bacteriana y a la marchitez por *Verticillium* (Mao *et al.*, 2008). En el caso de papa, por ser un cultivo de importancia mundial, se han desarrollado híbridos F1 en variados estudios, un ejemplo de ello fue la obtención de híbridos diploides (F1 y retrocruce), entre dos especies silvestres *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schltl., y especies comerciales dihaploides de *S. tuberosum* L., las plantas de híbridos interespecíficos F1 que se obtuvieron fueron más robustas en comparación con los padres silvestres



y se caracterizaron por la formación tardía del tubérculo así como de larga duración con relación a la latencia de los tubérculos (Voronkova *et al.*, 2007).

## 7.6. Mejoramiento de Plantas

Los híbridos y variedades son el resultado de un proceso de mejoramiento, en el cual se utilizan métodos para la creación, selección y fijación de fenotipos de plantas superiores en el desarrollo de la mejora de cultivares adaptados a las necesidades de los agricultores y los consumidores (Stephen and Mumm, 2008). La adaptación de los recursos naturales útiles ha sido una constante a través de la historia humana y son la base del fitomejoramiento y la producción agrícola (Lobo, 2006). Los programas de mejoramiento convencional tienen largos procesos de desarrollo hasta la obtención de nuevas variedades y requieren la utilización del potencial genético de cualquier cultivo, dependen de la disponibilidad de una base genética amplia para poder aplicar procesos de selección, así mismo, se relacionan con la existencia de colecciones representativas de la variabilidad genética, tanto de la especie problema como de los taxa relacionados, así como de un buen conocimiento de los atributos presentes en los materiales de las colecciones (Lobo y Medina, 2000; Lobo, 2006).

El mejoramiento de plantas se puede describir como un proceso en tres etapas; las poblaciones o las colecciones de germoplasma con variación genética útil se cruzan, los individuos con fenotipos superiores se identifican, y la mejora de los cultivares se elabora a partir de individuos seleccionados. Una amplia diversidad de enfoques se han desarrollado y adaptado para la mejora de diferentes cultivares teniendo en cuenta el objetivo, procedimientos de selección y resultados esperados del proceso de mejoramiento (Stephen and Mumm, 2008; Lobo, 2006).

De acuerdo con Lobo (2006), el enfoque en la metodología del mejoramiento genético de frutales andinos en Colombia, se resume en tres pasos: a) Etapa de **domesticación** que consiste en un proceso selectivo para la adaptación de las plantas a diversos agroecosistemas por parte del hombre para su beneficio, puede tardar miles de años, sin embargo se contempla dentro de las etapas del proceso ya que las especies de frutales andinos en la actualidad se pueden considerar como no domesticadas o en una etapa o síndrome parcial de domesticación, ya que la mayoría pasaron de ser silvestres a cultivados. b) Etapa de **premejoramiento** se refiere al conjunto de acciones que se realizan antes de los programas de mejoramiento como son la ampliación de la base genética de los cultivos, los procesos de conocimiento del germoplasma y la transferencia de atributos de importancia a partir de taxa relacionados y materiales “primitivos”, así por ejemplo combinar atributos genéticos de un taxón silvestre y de uno cultivado da como resultado el enriquecimiento de la base genética de este último y la posibilidad de clonación de heterosis presente en los materiales derivados del proceso. Esta etapa tiene, al menos, tres consecuencias distintas: prevenir la uniformidad genética, elevar los rendimientos e incorporar atributos no presentes en los materiales locales. c) Etapa de **mejoramiento**, se basa en los aspectos presentados en las etapas de domesticación y premejoramiento, con visión de siembra de varios genotipos, con características morfoagronómicas definidas y producción de variedades registradas.



El mejoramiento de plantas se ha favorecido con herramientas de biotecnología como la producción de transgénicos y los marcadores moleculares, los cuales se empezaron a utilizar en la década de los 80s (Gepts, 2002). Los marcadores moleculares, han permitido aumentar el conocimiento y la capacidad para caracterizar la diversidad genética de cualquier especie cultivada, han enriquecido la información de la evolución de las plantas, la comprensión de la estructura de poblaciones, el establecimiento de las medidas empíricas de las respuestas a la selección genética y la identificación y mantenimiento de la información de la variabilidad genética. Con ello, el conocimiento de las relaciones genéticas entre las fuentes de germoplasma pueden orientar la elección de los padres para la producción de híbridos o la mejora de las poblaciones (Stephen and Mumm, 2008).

### 7.6.1. Desarrollo de híbridos en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*)

El estudio y desarrollo de programas de mejoramiento y obtención de híbridos de tomate de árbol son escasos, se destacan los trabajos de L. Bohs, de la Universidad de Utah, USA, los de M. Lobo, en el Centro de Investigaciones C.I. “La Selva” de CORPOICA, Colombia y en Nueva Zelanda donde se han realizado estudios de polinización y compatibilidad de diferentes variedades (Prohens and Nuez, 2005).

Bohs (1991), desarrolló híbridos inter e intraespecíficos del taxón *Cyphomandra* utilizando ocho especies que fueron la pauta para interpretar las relaciones sistemáticas entre estos taxones y los mecanismos evolutivos del género. Encontró que la mayoría de taxa *Cyphomandra*, hoy perteneciente al género *Solanum* (Bohs, 1995), exhiben autoincompatibilidad, con excepción de *C. betacea* (*Solanum betaceum*), que presentó autofecundación. Sólo 5 de 44 combinaciones interespecíficas produjeron semillas viables, de los cuales evaluó tres híbridos vigorosos que presentaron reducción de la fertilidad: *C. betacea* (*S. betaceum*) x *C. acuminata*, *C. uniloba* (*S. unilobum*) x *C. betacea* (*S. betaceum*) como polinizador y obtuvo retrocruzamientos hacia *C. betacea* (*S. betaceum*) y *C. corymbiflora* x *C. doiploconos*.

En la colección colombiana establecida en el C. I. “La Selva” de CORPOICA, ha sido posible obtener cuajamiento espontáneo de frutos en *C. uniloba* (*S. unilobum*), *C. corymbiflora*, *C. diversifolia*, al igual que en *C. materna* (*S. maternum*) y *C. amotapensis*, entidades biológicas no incluidas en el estudio de Bohs. Al igual que Bohs obtuvieron híbridos vigorosos en el cruzamiento *S. unilobum* x *S. betaceum*, y retrocruzamientos con buen nivel productivo. En este sentido, siguiendo los parámetros descritos para el desarrollo de programas de mejoramiento, los híbridos interespecíficos entre una accesión resistente a la antracnosis del fruto en campo de la especie *S. unilobum*, y una accesión de *S. betaceum*, permitieron generar un primer paso para la caracterización genética del posible atributo de resistencia. Adicionalmente, se han generado híbridos entre *S. maternum* e híbridos triples (*S. unilobum* x *S. betaceum*) x *S. maternum*, lo cual ha permitido crear una base genética amplia, que permita sustentar hacia el futuro, programas de desarrollo de cultivares de tomate de árbol. Hasta el momento, se ha observado que los híbridos interespecíficos presentan vigor híbrido, especialmente los cruzamientos dobles, resistencia a la



antracnosis y aparentemente buena calidad en las bayas, aspectos que se encuentran en proceso de evaluación (Lobo, 2006; M. Lobo, comunicación personal).

El tomate de árbol fue introducido a Nueva Zelanda a finales del siglo 19, hoy es uno de los países con mayor producción de esta especie, fue renombrado en 1967 en este país como “tamarillo”, nombre con el que se le conoce internacionalmente. Los trabajos de mejoramiento empezaron con la selección en la década de 1920 y comercialización final de la variedad “negra” o “black” apetecida por su color y tamaño (Prohens and Nuez, 2005). En 1991 Pringle and Murray (1991), intentaron sin éxito la manipulación de diferentes padres a nivel de ploidía para evitar la incompatibilidad interespecífica de especies *Cyphomandra*; posteriormente Lewis and Considine (1999), realizaron estudios de polinización con el fin de conocer los patrones de fructificación y floración para usarlos como base para el mejoramiento convencional de esta especie; sin embargo, hasta ahora la selección y los programas de mejoramiento de tomate de árbol han sido reducidos, la mayoría de los estudios han consistido en la selección de los mejores materiales entre un grupo de accesiones y no hay detalles disponibles acerca de la herencia de caracteres de interés (Prohens and Nuez, 2005).

#### **7.6.2. Desarrollo de híbridos en lulo (*Solanum quitoense* Lam.)**

Al igual que el tomate de árbol, los trabajos de mejoramiento genéticos en lulo son escasos, sin embargo se han obtenido variedades mejoradas y comercialmente activas. Se conocen los híbridos desarrollados por Viteri y Soria en Ecuador, por C. Heiser en la Universidad de Indiana, USA y los desarrollados por el grupo de M. Lobo en el C. I. “La Selva” de Corpoica.

Diversos estudios de investigación han documentado cruza interespecífica entre diferentes especies de plantas de este grupo, donde los híbridos viables con rasgos agronómicos deseables se han obtenido (Heiser, 1993; Heiser, 2001; Soria, 1997; Lobo 2006). El primer híbrido conocido de lulo, el “híbrido Puyo” fue desarrollado en Ecuador por un agricultor local, Raúl Viteri, quien cruzó *S. quitoense* con la variedad silvestre de *S. sessiliflorum*, obteniendo híbridos vigorosos, de semilla estéril y altamente productivos (Torres y Camacho, 1981). Este híbrido fue propagado vegetativamente, aunque tenía algunas desventajas como frutos muy pequeños, con respecto a los de *S. quitoense*, y un periodo productivo que no superaba un año (Heiser, 1993).

Después de aprender de R. Viteri, C. Heiser en colaboración con El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Palora (INIAP), Ecuador, desarrolló un híbrido entre *S. quitoense* y cocona, *S. sessiliflorum* como madre y en 1989, se logró obtener el híbrido llamado “Palora” con alto vigor o heterosis (Heiser 1993). En 1991 J. Soria, introdujo en Ecuador 10 estacas del híbrido Palora que luego el INIAP, reprodujo y distribuyó. El cultivo del híbrido Palora fue reconocido en Ecuador y se propagó en el sur de Colombia. Presentó características especiales como: mayor tamaño de la fruta, duración de tres años de la planta en campo, cosecha dos veces año y una lenta oxidación del jugo (Heiser and Anderson, 1999). Aunque no fue de gran aceptación por parte de los



consumidores, debido al sabor insípido y color naranja de la pulpa, se sigue cultivando e incluso importando a Colombia por presentar un precio de venta más bajo en el mercado (Lobo, 2006).

Posteriormente, al ser descubierta en plantas de *S. hirtum* la resistencia al nematodo de nudo radicular producido por *Meloidogyne incognita* (Heiser and Anderson, 1999), esta especie se cultivó en invernadero en la Universidad de Indiana, donde se obtuvieron semillas híbridas de *S. hirtum* X *S. quitoense* y la F2 de estas semillas fueron enviadas a mejoradores de plantas en el CATIE, Costa Rica, donde se encontró que muchas de estas plantas eran resistentes (Heiser, 1972). En Colombia se entregaron a M. Lobo en 1984 y a partir de estas semillas F2 se obtuvo un cultivar resistente llamado “Lulo La Selva”, el cual fue generado después de llevar a cabo un proceso de domesticación en donde se realizaron dos retrocruzamientos hacia una población sin espinas del taxón cultivado originaria de Ecuador y se clonaron dos plantas en la generación F2 del segundo retrocruzamiento, lo cual condujo a la entrega de este primer material mejorado (Bernal *et al.*, 1998; Lobo, 2006). “Lulo La Selva” se adaptó a plena exposición solar, fue resistente al nematodo formador de los nudos radiculares y recobró la calidad del fruto común (Bernal *et al.*, 1998).

Este nuevo cultivar resistente se propagó vegetativamente y en pruebas en diferentes partes del país demostró un buen desempeño, reportada como la segunda variedad de lulo cultivada, después del lulo de Castilla (CCI, 2005). Posee características importantes para uso industrial entre las que se destacan: frutos más pequeños en comparación con *S. quitoense*, menor susceptibilidad al daño por manipulación y transporte, aroma y color deseables para la industria, rendimiento industrial, mayor precocidad, mayor vida útil del cultivo, frutos con tricomas o vellosidades de fácil desprendimiento y pulpa de color verde (Bernal *et al.*, 1998).

En la actualidad, los programas de entrega de nuevas variedades de lulo deben focalizarse en diferentes aspectos: oferta de materiales para sistemas agroforestales o para la siembra bajo condiciones de plena exposición solar, con mayor capacidad productiva y una combinación de atributos organolépticos requeridos por los consumidores de la fruta. Utilizando la experiencia adquirida con el cultivar “Lulo La Selva”, que presentó una base genética relativamente estrecha en sus parentales, se tiene en marcha un proceso de domesticación para producir poblaciones adaptadas a plena exposición solar con amplia diversidad. Se partió de cinco demes del taxón silvestre *S. hirtum* cruzados con poblaciones élite de la colección de *S. quitoense*, en un proceso de retrocruzamientos diseñados para eliminar espinas, obtener frutos de pulpa verde, buena calidad y suprimir el rajamiento de las bayas (Lobo, 2006). Adicionalmente, con el propósito de contribuir a verificar la variabilidad genética y de realizar una identificación y certificación de materiales premejorados o mejorados (i.e. híbridos), el grupo de mejoramiento genético de lulo y tomate de árbol en Colombia ha manifestado la necesidad de implementar el uso de marcadores moleculares informativos (M. Lobo, comunicación personal; Lobo, 2006).

En Ecuador se encuentra en marcha en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en San Luis Nanegalito, la caracterización agromorfológica de 18 ecotipos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), encontrándose de acuerdo al último reporte, 5 ecotipos promisorios para



mejorar algunas características de las variedades de naranjilla común, principalmente el tamaño del fruto y otros ecotipos promisorios para aprovechar la calidad agronómica y resistencia a *M. incognita* y *F. oxysporum* (Soria *et al.*, 2005).

### 7.6.3. Estudios de identificación de híbridos a nivel molecular

Para asistir la identificación y selección directa de genotipos, previos estudios han reportado el uso de marcadores moleculares RFLP, VNTR y basados en PCR de tipo RAPD, SSR y ISSR, con resultados exitosos. Los reportes indican el uso de marcadores moleculares en la identificación de variedades, evaluación de pureza genética y determinación de la huella genética de genotipos. Este tipo de estudios se han llevado a cabo en diferentes especies vegetales y se ha destacado su uso en especies de valor altamente comercial como; arroz, maíz, tomate y papa, entre otros (Ferreira *et al.*, 1998, Spooner *et al.*, 2005, Tabla 3).

En la década de 1990, el uso de marcadores moleculares tomó el mayor impulso, destacándose el uso de isoenzimas y RAPD para apoyo a mejoramiento de cultivos (Spooner *et al.*, 2005). Estudios reportados en la última década, han utilizado marcadores moleculares para la evaluación de genotipos con resultados favorables:

Ilbi (2003), reportó la identificación de variedades y la pureza genética de semillas F1 de pimiento, *Capsicum annuum*, utilizado RAPD, destacado por ser un marcador de tipo dominante. Usó 12 marcadores de los cuales 11 fueron útiles para determinar pureza genética de las semillas y cuatro resultaron ser marcadores cultivar-específicos para las variedades híbridas, lo que permitió concluir la utilidad de los marcadores RAPD para la identificación de cultivares e híbridos de pimiento especialmente para un eficaz programa de control de la calidad de la semilla a bajo costo. Nandakumar *et al.* (2004), usaron microsatélites sitio etiquetados STMS, para el estudio de híbridos, con el que fue posible determinar la huella genética y realizar la evaluación de la variación dentro de las líneas parentales y las pruebas de pureza genética de semillas híbridas de arroz, encontrando 9 marcadores polimórficos informativos. Shasany *et al.* (2005), utilizaron marcadores RAPD y AFLP para identificar híbridos inter e intraespecíficos de Menta, *Mentha arvensis*, evaluando tres híbridos controlados. Kyndt *et al.* (2006), reportaron la identificación de híbridos silvestres del género *Vasconcellea* con microsatélites (SSRs) y su uso en la clasificación de germoplasma. Li-Wang *et al.*, (2007) usaron tres diferentes marcadores en la evaluación de la pureza genética de dos híbridos comerciales de tomate, *Solanum lycopersicum*, planta modelo de la familia solanácea y evaluaron 218 RAPD, 54 ISSR y 49 SSR; de estos 321 marcadores, se encontraron 7 para los híbridos analizados; los resultados combinados del análisis de marcadores mostró que solamente los marcadores RAPD y SSR suministraron una herramienta práctica y eficiente en el control cualitativo de las semillas híbridas de tomate comercial.

Hasta el momento, el uso de marcadores COSII no ha sido reportado para la identificación de híbridos; Sin embargo, dado su carácter codominante y la información previa en relación a su utilidad para estudios de diversidad y mapeo genético en la familia solanácea (Wu *et al.*, 2006, 2009a, 2009b; Labate *et al.*, 2009) incluyendo el lulo y tomate de árbol (Enciso *et al.*, sometido;



Pratt *et al.*, 2008), se sugiere que pueden ser de gran utilidad para la identificación molecular de híbridos en estas especies.

### 7.7. Análisis de variación genética y estructura poblacional

Existen diferentes métodos estadísticos para estudiar la variabilidad genética y estructura de las poblaciones, lo cual facilita la interpretación de resultados. A continuación se hace una breve descripción de los métodos utilizados en este estudio:

**Medida de la variación genética:** La más apropiada medida de la variación genética es el promedio de heterocigosis o diversidad genética. Esta medida puede ser definida en términos de frecuencias génicas, así la heterocigocidad para cada locus esta definida como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Donde m, es el numero de alélos, x, es la frecuencia del alelo i. El promedio de heterocigocidad (H), es el promedio de la cuantía sobre todos los alélos (Nei, 1987; Hartl, 1987).

**Medida de la estructura poblacional:** Es de particular importancia para la conservación de los recursos genéticos, ya que esta concierne con la forma en la cual la variación genética es dividida entre y dentro de poblaciones (Hamrick, 2003). En 1926, Wrigth propuso un método para medir las desviaciones de las frecuencias genotípicas en una población subdividida en términos de 3 parámetros;  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ , llamados frecuentemente índices de fijación o estadística F (Nei, 1987). Donde  $F_{IS}$ ; coeficiente de consanguinidad o endogamia,  $F_{IT}$ ; medida de la diferenciación genética de las poblaciones, y  $F_{ST}$ ; varianza de frecuencias de los alelos entre poblaciones (Wright, 1965). Estos son descritos a partir de la siguiente fórmula:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST}).$$

Nei (1987), demostró que los índices de fijación, pueden ser definidos usando las heterocigocidades esperadas y observadas para la población bajo investigación, usando las siguientes ecuaciones:

$$F_{IS} = 1 - (H_I/H_S)$$

$$F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$$

$$F_{IT} = 1 - (H_I/H_T)$$

Donde  $H_I$  es el promedio de la heterocigocidad observada en todas las subpoblaciones,  $H_S$  es el promedio de la heterocigocidad esperada en equilibrio de Hardy – Weinberg, en todas las subpoblaciones, y  $H_T$  la heterocigocidad esperada en equilibrio de Hardy – Weinberg, para el total de la población (Frankham *et al.*, 2004).



Así, los valores de  $F_{ST}$  entre ciertos rangos, indican el nivel de **diferenciación génica** en una población:

- ✓ El rango entre 0 y 0,05 es considerado como un indicativo de poca diferenciación génica.
- ✓ El rango entre 0,05 y 0,15 indica moderada diferenciación genética.
- ✓ El rango entre 0,15 y 0,25 indica gran diferenciación genética.
- ✓ Valores por encima de 0,25 indican una diferenciación génica muy grande.

Generalmente los valores de  $F_{ST}$  por encima de 0,15 se consideran como indicativos de diferenciación significativa entre subpoblaciones (Frankham *et al.* 2004).

En el caso del coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  éste puede tomar un valor de  $-1$  a  $1$ . Si es de  $0$  no hay endogamia y la población está en equilibrio de Hardy Weinberg. Cuando el valor es negativo, significa que hay un exceso de heterocigotos y si es positivo que hay un exceso de homocigotos, ya que cuando  $H_o < H_e$  se asume que en esa población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar (Eguiarte, *et al.*, 2007).

**Análisis de componentes principales (PCA):** Es una técnica estadística que ante un banco de datos y variables amplio, tiene el objetivo de reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales y serán independientes entre sí (Pla, 1986).

**Análisis de paternidad:** En genética de poblaciones las pruebas de paternidad se realizan comúnmente por dos métodos; a) paternidad de exclusión y b) asignación fraccionada y categórica o asignación de paternidad, (Philip, 2005). Este último es utilizado cuando la exclusión completa no es posible y se recurre a métodos probabilísticos que pueden discriminar entre los candidatos de un grupo de datos. Un método similar a este último fue diseñado y utilizado en este trabajo.



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Localización

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) sede Tibaitatá, kilómetro 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

### 8.2. Material vegetal

Para este estudio, L. Barrero desarrolló una población control de lulo a partir de un cruce entre la planta 3 de *S. quitoense* 04T-142 y la planta 28 de *S. hirtum* 05T-1688 en condiciones controladas en invernadero de la Universidad de Cornell (colaborador internacional) en 2006. Posteriormente, se llevó a cabo el establecimiento *in vitro* de parentales y semillas de población F1, obteniéndose 13 individuos F1 germinados en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal de CORPOICA.

Los demás parentales e híbridos incluidos en el presente estudio fueron desarrollados por el grupo de investigación del C.I. La Selva de CORPOICA, Rionegro, Antioquia, (Tabla 4).

**Tabla 4.** Material vegetal de lulo y tomate de árbol evaluado

Padre <sup>a</sup>	Madres <sup>b</sup>	Hijos <sup>d</sup>
Sq Se	Sq 120101 x Sh120057	1H_101x57
	Sq 120044 x Sh 120061	2H_44x61
	Sq 120101 x Sh 120071	3H_101x71
	Sq 120103 x Sh 120071	4H_103x71
	Sq 120052 x Sh 120057	5H_52x57
	Sq 120089 x Sh 120071	6H_89x71
	Sq 120052 x Sh 120062	7H_52x62
	Sq 120038 x Sh 120051	8H_38x51
	Sq 120039 x Sh 120060	9H_39x60
	Sh 120071 = Sh 130005 <sup>c</sup>	10H_13005
Sq 04T142 03	Sh 05T1688 028	11H <sup>e</sup>
Sb 620021	Su 620019	Su x Sb
Sm 6002059		Su x Sm

<sup>a,b</sup> Se indica la especie seguida por el código de accesión del C.I. La Selva. <sup>a</sup> Sq Se = *Solanum quitoense* Sin Espinas, Sb= *S. betaceum*, Sm= *S. maternum*. <sup>b</sup> Sq = *S. quitoense*, Sh = *S. hirtum*, Su= *S. unilobum*. <sup>c</sup> Se analizaron para todas las poblaciones 5 individuos tanto de padres como de hijos excepto para la madre Sh 120071 = Sh 130005 donde se utilizaron 4 individuos. <sup>d</sup> Los híbridos de lulo (H) se listan de 1H a 10H seguido por información de la madre. <sup>e</sup>El híbrido control de lulo se nombra como 11H del cual se analizaron 13 individuos de la F1, 2 individuos del padre Sq 03 y 1 individuo de la madre Sh 28.



Se evaluaron parentales e híbridos de 10 poblaciones híbridas de lulo (9 de ellas son retrocruces hacia el parental cultivado) que comparten a *S. quitoense* sin espinas como padre y 2 cruces de tomate de árbol que comparten al relativo silvestre *S. unilobum* como madre (Tabla 4). La genealogía y procedencia de los parentales (genotipos antes de su cruzamiento) de lulo y tomate de árbol se presentan en los Anexos 1 y 2.

### 8.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Arias y Rocha (2004), con las siguientes modificaciones: 2 gramos de hoja joven de cada planta se maceraron en nitrógeno líquido manteniéndoles en tubos eppendorf a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A cada tubo se adicionaron 1000  $\mu\text{L}$  de solución tampón de extracción (Anexo 3), a  $90^{\circ}\text{C}$ , con agitación hasta homogenizar su contenido. Los tubos se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos, agitando por inmersión cada 15 minutos. Luego, se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos. Al sobrenadante de cada tubo ( $\sim 600 \mu\text{L}$ ) se le adicionó un volumen proporcional de Fenol:Cloroformo-Isoamílico (24:1). El contenido fue homogenizado y centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos, se extrajo el sobrenadante ( $\sim 500 \mu\text{L}$ ) y se realizó un lavado con un volumen proporcional de Cloroformo-Isoamílico (24:1). Cada tubo se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos y se extrajo la fase acuosa. Se precipitó el ADN con Isopropanol:Acetato de sodio pH 8 (10:1), se resuspendió el ADN precipitado en agua y se precipitó y lavó nuevamente con Isopropanol:Acetato de sodio pH 8 (10:1), seguido por dos lavados con etanol al 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN seco se diluyó en 100  $\mu\text{L}$  de TE 1X – RNAsa (4%), se llevó a baño recirculante  $37^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos, se visualizó en agarosa al 1% (p/v) y se almacenó a  $-20$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ .

La calidad del ADN se visualizó en gel de agarosa al 1% (buffer TAE 1x), con tinción de bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , el gel se corrió en cámara electroforesis marca BIORAD, a 100 V por 30 min., en buffer TAE 1X, y se visualizó con transiluminador (documentador) con luz UV (300 nm). La cuantificación de ADN se realizó usando espectrofotómetro ultravioleta marca Beckman (DU530), realizando dilución 1:50 y midiendo con un cociente de absorbancia A260/A280.

### 8.4. Selección de marcadores *in silico*

Para evaluar los cruces de lulo se escogieron 105 marcadores COSII y para los cruces de tomate de árbol se escogieron 67 marcadores COSII, los cuales se encuentran distribuidos en los 12 cromosomas del mapa genético del tomate (*Solanum lycopersicum* x *S. penellii*) (<http://www.sgn.cornell.edu/>, Mueller et al., 2005) (Anexos 4 y 5). Estos marcadores fueron seleccionados de un estudio previo a partir de 400 por presentar polimorfismos *in silico* entre los parentales *S. quitoense* 04T-142-03 y *S. hirtum* 05T-1688-28 para lulo (utilizados en el presente estudio) y diferentes accesiones de *S. unilobum* y *S. betaceum* para tomate de árbol y por originar productos de amplificación de banda simple (Olarte et al., 2006; Pratt et al., 2008; L. Barrero, comunicación personal).

Para lulo, los polimorfismos *in silico* de los parentales fueron analizados previa limpieza de las secuencias utilizando el programa CAPS designer (Mueller et al., 2005), disponible en página web



([http://www.sgn.cornell.edu/tools/caps\\_designer/caps\\_input.pl](http://www.sgn.cornell.edu/tools/caps_designer/caps_input.pl)), el cual, a partir de alineamientos de dos secuencias genera una lista de enzimas de restricción que cortan dichas secuencias en diferentes productos de longitud, detectando polimorfismos SNPs o InDels menores de 20 pares de bases, los cuales normalmente no se detectan después de visualización en electroforesis en agarosa. Se seleccionaron aquellas enzimas que presentaron como máximo 3 cortes para facilitar su posterior visualización (Anexo 4). Esta información fue verificada para el híbrido 11H y posteriormente se extrapoló en los híbridos de lulo 1H a 10H para corroborar marcadores polimórficos informativos para su identificación.

Para tomate de árbol, primero se extrapolaron los marcadores que amplificaron en las poblaciones híbridas 1H a 10H y adicionales se evaluaron *in silico* secuencias de 57 marcadores COSII de diferentes individuos de *S. unilobum* y *S. betaceum*, editadas a partir de un conjunto de secuencias consenso “contig” de 2 a 5 individuos, la información obtenida de estas secuencias se extrapoló a las dos poblaciones de híbridos estudiadas, ya que no se contó con las secuencias específicas para los parentales del presente estudio. Estas secuencias se ensamblaron y a partir de esta información se editaron utilizando el programa Consed (Gordon *et al.*, 1998), disponible para Linux y Unix (<http://www.phrap.org/consed/consed.html>). Se identificaron polimorfismos y se generaron en formato FASTA dos secuencias, la primera fue la secuencia consenso generada por el programa para cada alineamiento y la segunda fue la secuencia editada con los polimorfismos SNPs. Estas dos secuencias guardadas en el mismo archivo fasta se utilizaron para ser analizadas en el programa CAPS designer de la misma forma que se realizó con lulo.

### 8.5. Amplificación y visualización de marcadores en laboratorio

Para cada marcador COSII seleccionado, se estandarizaron las concentraciones de cebadores y ADN de acuerdo con el protocolo usado por Wu *et al.* (2006). Para un volumen final por reacción de 15  $\mu$ L se utilizó Buffer PCR 1X,  $MgCl_2$  2,0 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq 0,375 u, 0,2 mM de cada cebador COSII y concentración final de ADN de 20  $\mu$ g/mL (Anexo 6).

Las condiciones de amplificación por PCR se estandarizaron de acuerdo al siguiente perfil de temperatura: ciclo inicial de denaturación a 94°C por 5 min, segundo ciclo de 35 repeticiones: denaturación a 94°C por 1 min, alineamiento 56°C por 0:45 s y extensión a 72°C por 2:10 min, y un tercer ciclo de extensión final de 72°C por 10 min. Las amplificaciones se realizaron en termocicladores de 384 pozos marca i-Cycler de BIORAD.

Los polimorfismos fueron rastreados en geles de agarosa al 2% (p/v) elaborados y corridos en buffer TAE 1x, en cámaras de electroforesis BIORAD, a un voltaje de 140 V por 1 hora 30 minutos identificando su tamaño con el marcador de peso molecular 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), con tinción de Bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml adicionado directamente al gel.

Los polimorfismos producidos por inserciones-delecciones (InDels) mayores de 20 pares de bases fueron corroborados por su diferencia de tamaño en los corridos electroforéticos de las



amplificaciones de PCR. Para la detección de polimorfismos vía CAPS, las enzimas predichas por el análisis *in silico* fueron evaluadas en el laboratorio después de la amplificación por PCR con los cebadores correspondientes. Los productos de amplificación por PCR fueron sometidos a digestión con la correspondiente enzima (Anexos 4 y 5) bajo las siguientes condiciones: para un volumen final por digestión de 10  $\mu$ L se utilizó 1 $\mu$ L de Buffer 10x (correspondiente al 100% de actividad para cada enzima; A – K), 0,1 $\mu$ L BSA (albúmina suero bovino 0,1mg/ $\mu$ L), enzima 0,25  $\mu$ L (2,5 u/ $\mu$ L), y 5  $\mu$ L de producto de amplificación PCR óptimo, se realizó la digestión enzimática a la temperatura constante indicada para cada enzima durante 3 horas (termociclador de 384 pozos marca i-Cycler de BIORAD), condiciones casa comercial Promega. Los productos de digestión enzimática se visualizaron en geles de agarosa 2% (p/v) como se describió anteriormente, sembrando la totalidad de producto de digestión obtenido garantizando así una óptima visualización.

## 8.6. Análisis estadístico

A partir de los fragmentos de PCR visualizados directamente o después de las digestiones enzimáticas en gel de agarosa, se realizaron análisis estadísticos utilizando los Software PAUP 4b10 (Swofford, 2004), GENETIX 4,03 versión 5 (Belkhir *et al.*, 1996) y PHYLIP 3,5 (Felsenstein, 1989) para análisis de conglomerados, variación genética, estructura poblacional y componentes principales. Adicionalmente, se llevo a cabo un análisis de frecuencias de parentales probables para cada cruce.

### 3.6.1. Análisis de conglomerados

Para el programa PAUP 4b10 los marcadores fueron tratados como dominantes, para lo cual se generaron matrices de presencia (1) o ausencia (0) por individuo y marcador. Los dendogramas fueron generados con el algoritmo UPGMA (Método de la Media Aritmética no Ponderada) (Gronau and Moran, 2007) y se calculó el coeficiente de distancia por defecto del programa "P-distance" (distancias sin correcciones para sustituciones sobreimpuestas) a partir del programa PAUP 4b10 (Swofford, 2004).

Para los programas GENETIX 4.03 versión 5 (Belkhir *et al.*, 1996) y PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989) los marcadores fueron tratados como codominantes, para lo cual el número de alelos por locus COSII fue contado y a cada alelo se le asignó un número consecutivo, generando una matriz de datos de alelos por locus versus individuos. Los agrupamientos se generaron utilizando UPGMA. El soporte estadístico del árbol consenso se realizó mediante "Bootstrapping" de 10000 repeticiones, utilizando los programas Gendist (Nei, 1978), UPGMA, Seqboot y Consense del paquete PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989). El algoritmo de distancia genética utilizado fue Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Eduars, 1967).

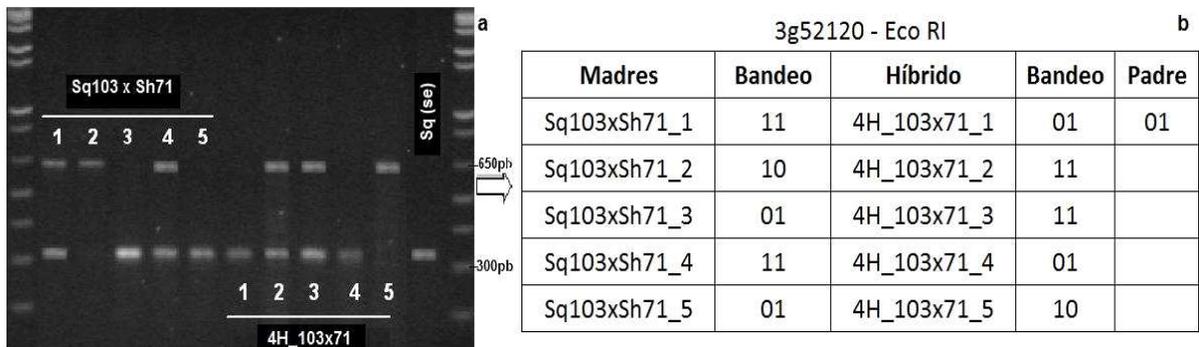


### 3.6.2. Análisis de variación genética, estructura poblacional y componentes principales (PCA)

Se midió la heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y la heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), según el método descrito por Hartl (1987). La estructura de la población se estimó a través del estadístico F-Wright, que arrojó los coeficientes  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ , y  $F_{ST}$  (Wright, 1965). El análisis de componentes principales (PCA) se determinó mediante el programa GENETIX 4.03 versión 5 (Belkhir *et al.*, 1996).

### 3.6.3. Análisis de paternidad

Se realizó un análisis de frecuencias teniendo claro que las muestras de cada cruce no representan el 100% de los padres e híbridos utilizados en campo. Para determinar la frecuencia de posibles madres en cada cruce se analizaron los grupos de híbridos obtenidos; en lulo, identificados consecutivamente de 1H a 10H y el cruce control 11H (Tabla 4). Los híbridos 1H a 10H provienen de un solo individuo paterno de la accesión Sq SE (*S. quitoense* Sin Espinas) y un grupo de madres con accesión conocida pero se desconoce que individuo dentro de la accesión se utilizó para cada cruce (M. Lobo, comunicación personal). Se analizaron cinco individuos por cada madre y cinco individuos híbridos, excepto para la madre del cruce 10H de la que se evaluaron cuatro individuos (Tabla 4). Para tomate de árbol se analizaron dos poblaciones híbridas, cada una con cinco individuos tanto de híbridos como de parentales (Tabla 4).



**Figura 3. Análisis de madres más probables, para la población 4H\_103x71 de híbridos utilizando el marcador 3g52120. a.** Bandas rastreadas para 5 madres de la accesión *S. quitoense* 103 x *S. hirtum* 71 (Sq103 x Sh71), 5 individuos híbridos del cruce (4H\_103 x 71), y el padre *S. quitoense* Sin espinas (Sq Se). **b.** Cuadro de análisis de bandas: 1 (presencia), 0 (ausencia). Se infiere que las madres más probables de los híbridos 2 y 3 (caso AB) son los individuos 2 (Sq103 x Sh71-2) (caso AA), 1 y 4 (caso AB) con un padre único (BB), asumiendo que no hay presencia de alelos nulos. A mayor número de marcadores e individuos mayor es la probabilidad de encontrar los individuos maternos. Un análisis similar se aplicó para cada marcador en cada cruce y se estimó el % de bandas maternas respecto a lo esperado.

La posible madre de cada híbrido se determinó comparando su perfil de bandeo con el del individuo híbrido y el de su padre y se infirieron los tamaños de bandas que se esperarían en la posible madre. Dentro de cada accesión materna, se seleccionaron aquellos individuos que tuvieran el mayor



número de bandas esperadas como las madres más probables. Los resultados se presentan como porcentajes o frecuencias de bandas encontradas en las madres más probables para lulo y padres y madres más probables para tomate de árbol, del total esperado, ver ejemplo en Figura 3. Se tuvieron en cuenta solamente los marcadores polimórficos codominantes con bandeo diferencial excluyendo marcadores monomórficos para cada población híbrida estudiada.

#### **3.6.4. Selección de marcadores recomendados para uso en programas de mejoramiento**

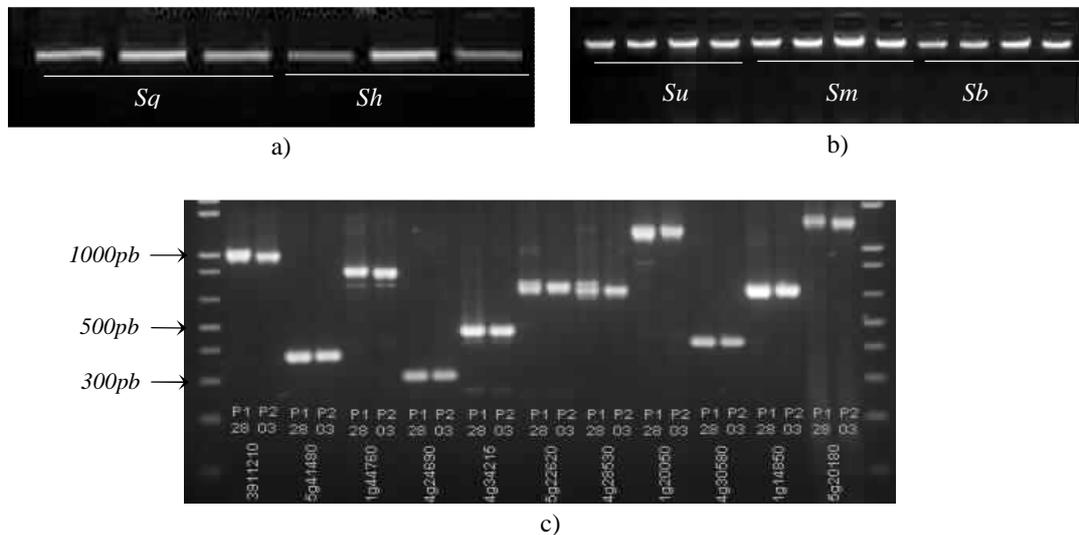
La selección de marcadores que se pueden recomendar para uso en programas de mejoramiento de lulo y tomate de árbol se realizó basado en el análisis PCA, en el cual el primer factor recoge la mayor proporción posible de la variabilidad total de la muestra bajo estudio; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente (Terradez, 2007). El PCA inicial se realizó para cada población híbrida con todos los loci COSII, con esta información se escogieron aquellos marcadores que aportaron en el primer componente principal y los del segundo (más del 90% de la variabilidad total), de tal forma que realizando un nuevo análisis de PCA con los marcadores elegidos el porcentaje acumulado en CP y la distribución espacial de los individuos fuese similar a la presentada por el híbrido testigo de lulo 11H (de individuos parentales conocidos). De esta forma, del total de factores se eligieron aquéllos que recogían el mayor porcentaje de variabilidad en los dos primeros componentes principales.



## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1. Extracción de ADN y cuantificación

El protocolo para extracción de ADN descrito por Arias y Rocha (2004), modificado en este estudio, permitió obtener un ADN de excelente calidad y buena concentración en lulo y tomate de árbol (Figura 4a-b). Estos resultados son corroborados con la cuantificación en espectrofotómetro ultravioleta donde el radio o cociente de absorbancia de A260/280 fue entre 1.6 a 1.9 (Anexos 7 y 8), y con los productos de PCR obtenidos (Figura 4c).



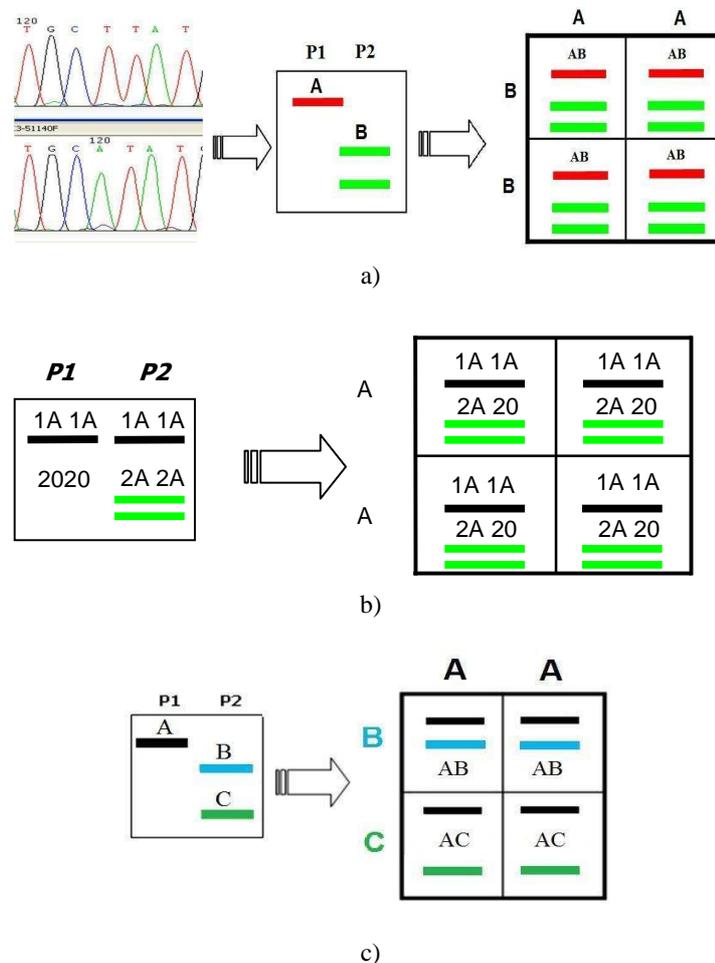
**Figura 4. Visualización del ADN y productos de amplificación por PCR.** a) Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v), mostrando el ADN de lulo *S. quitoense* (03)=*Sq* y *S. hirtum* (28)=*Sh*. b) ADN de tomate de árbol *S. unilobum*=*Su*, *S. maternum*=*Sm* y *S. betaceum*=*Sb*. c) Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) mostrando productos de PCR en dos accesiones de lulo utilizando 11 marcadores COSII; marcador de peso 1 Kb plus invitrogen, P1: *S. quitoense* (03) y P2: *S. hirtum* (28)

### 9.2. Identificación de marcadores COSII polimórficos

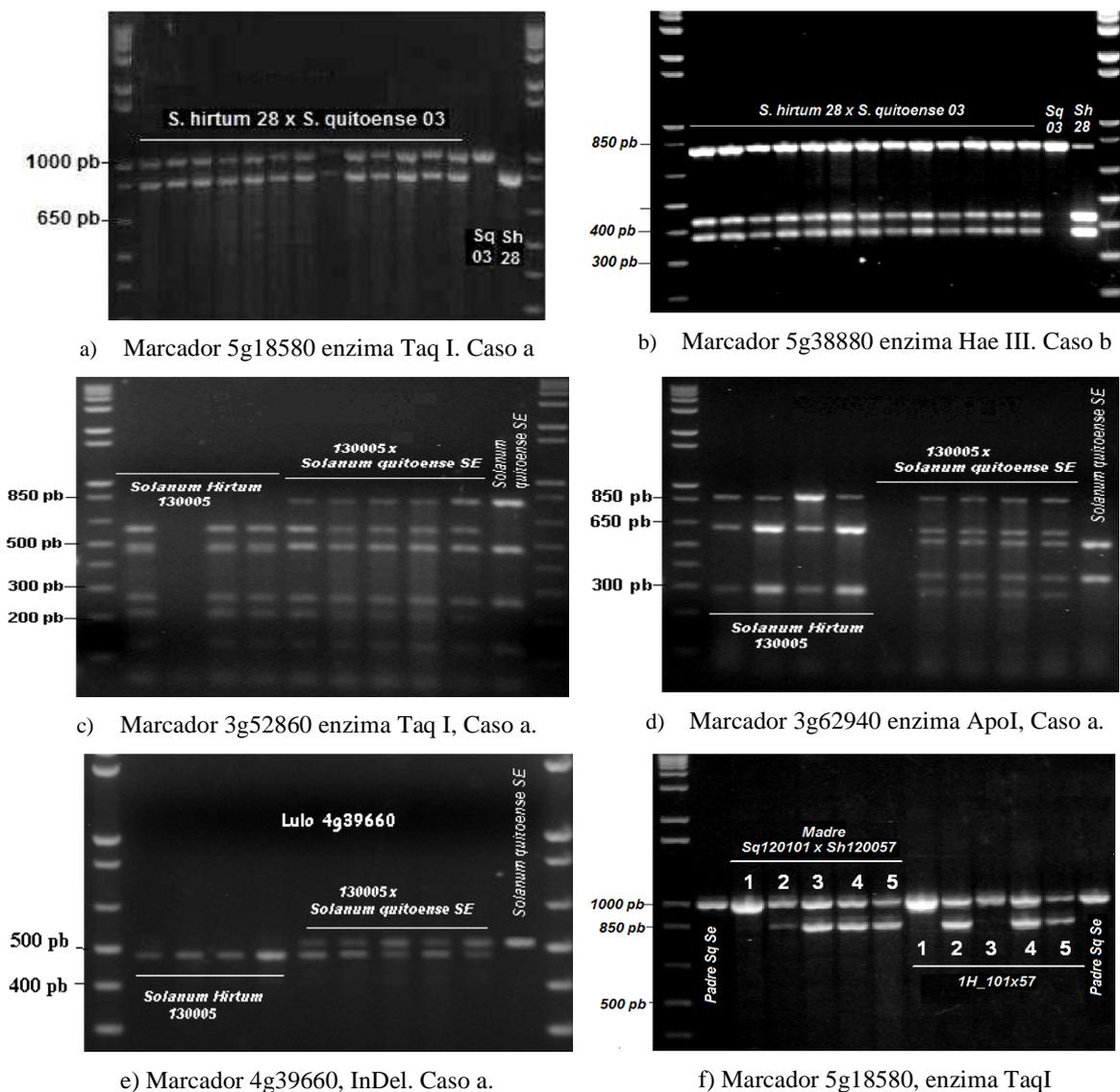
Se realizó la amplificación de 105 marcadores en 13 individuos F1 del híbrido control 11H y sus parentales *S. quitoense* 04T142-03 y *S. hirtum* 05T1688-28. De éstos, 60 marcadores fueron considerados polimórficos: diez fueron polimórficos por InDel (inserción / deleción) mayor de 20 pb; 50 fueron inicialmente monomórficos por tamaño de banda en gel de agarosa pero polimórficos por CAPS (Anexo 4). Se presentaron los siguientes casos: a) 48 marcadores (8 InDels mayores de 20 pb y 40 CAPS) presentaron el caso ideal, en el cual los padres son homocigotos para alelos diferentes y la F1 es heterocigota homogénea (Figura 5a y 6a). b) 10 marcadores adicionales presentaron el caso de un locus homocigoto para *S. quitoense* 04T142-03 (P1) y un locus



heterocigoto o dos loci (duplicación génica) para el padre *S. hirtum* 05T1688-28 (P2) con un alelo de tamaño similar al de P1; en todos los 10 casos la F1 fue homogénea sugiriendo que el P2 presentó dos loci diferentes y no 2 alelos diferentes de un mismo locus, ya que en este último caso se esperaría una F1 con segregación 1:1, lo cual no fue observado; en este caso el segundo locus parece poseer un alelo nulo en el P1 (Figura 5b y 6b). c) Los 2 marcadores restantes polimórficos por InDel 2g34470 y 3g46780 presentaron un padre homocigoto y el otro padre heterocigoto, para 3 alelos diferentes y la F1 segregante en proporción 1:1 (Figura 5c).



**Figura 5. Casos de polimorfismos en el híbrido control 11H. a).** Caso AA/BB en padres y AB en F1. En este ejemplo, el polimorfismo in silico es debido a una timina (T; banda roja) en los dos alelos de un parental (P1), y una adenina (A; banda verde) en los dos alelos del otro parental (P2), por tanto una enzima de restricción que corte en la región de este polimorfismo en P2 permite diferenciar 2 bandas en gel. La población F1 en este caso es heterocigota homogénea. **b).** En este caso la explicación más probable es la presencia de dos loci (1 y 2) con alelos homocigotos (A y 0), ambos padres comparten el mismo alelo en el locus 1 (1A) mientras en el locus 2 un padre presenta alelos nulos (20), la población F1 es homogénea para los dos loci. **c).** Caso AA/BC en padres y F1 segregante, la banda negra representa el alelo A, la banda azul el alelo B, y la banda verde alelo C, la F1 es heterocigota segregando en proporción 1:1.



**Figura 6. Casos en gel de agarosa para identificación de híbridos lulo; a-b:** Híbrido testigo 11H, de izquierda a derecha: 13 individuos F1 (AB) población homogénea, padre *S. quitoense* (Sq) 04T142-03 y madre *S. hirtum* (Sh) 05T1688-28. **c-d:** Híbrido 10H, de izquierda a derecha, 4 individuos madre Sh 130005, 5 individuos hijos F1 10H (AB), único padre Sq SE. **e:** Híbrido 10H, caso polimórfico por InDel (inserción-delección) **f:** Ejemplo observado en la mayoría de cruces (1H-9H) y en 2 marcadores de 10H, madres e hijos son heterogéneos. De izquierda a derecha: Padre Sq SE, 5 individuos madre Sq 120101 x Sh 120057, 5 individuos hijos 1H\_101x57. En los extremos de cada figura a-e se observa el marcador de peso 1 Kb Plus.

Para el análisis de los 10 híbridos de lulo (1H-10H) y sus parentales, se evaluaron los 60 marcadores polimórficos en 11H, de los cuales 29 fueron exitosamente amplificados en todos los individuos. De estos, se encontraron 26 marcadores polimórficos informativos (43,33%): Cuatro fueron polimórficos por tamaño de amplificación del producto de PCR (InDel > 20 pb) y los 22



restantes presentaron tamaño de banda similar en gel de agarosa, por lo que fueron convertidos a CAPS mediante el corte con las enzimas de restricción usadas en el cruce control 11H (ver metodología). El Anexo 4 muestra la información de los 26 marcadores seleccionados para los diez cruces de lulo (filas sombreadas), los cuales se encuentran distribuidos en 10 de los 12 cromosomas, 23 amplifican secuencias intrónicas (iUPAs) y los tres restantes amplifican secuencias exónicas (eUPAS).

Los casos encontrados en el cruce 10H, para los 26 marcadores fueron: 15 que presentaron el caso ideal (Figura 5a), de los cuales 13 fueron CAPS (Figura 6c y d) y 2 fueron polimórficos por InDel (Figura 6e); 6 marcadores presentaron el caso b (Figura 5b); 3 marcadores fueron monomórficos; los 2 marcadores restantes de 10H y la mayoría de marcadores evaluados en las poblaciones híbridas 1H a 9H, presentaron polimorfismos CAPS en el que las madres fueron heterogéneas entre sí (algunas homocigotas, otras heterocigotas) y en su mayoría con un alelo de igual tamaño que el presentado por el padre Sq SE (*S. quitoense* Sin Espinas), dando como resultado híbridos heterogéneos (Figura 6f).

En el laboratorio para tomate de árbol, se evaluaron en parentales de los híbridos descritos en la Tabla 4, un total de 67 marcadores COSII. Inicialmente, se evaluaron 29 que corresponden a los que resultaron exitosos en la amplificación para los cruces de lulo, de los cuales, solo el marcador 5g13450 resultó polimórfico informativo por CAPS usando la enzima Dra I. Posteriormente, se analizaron *in silico* secuencias consenso “contig” de *S. betaceum* y *S. unilobum* de 57 marcadores de los cuales 38 marcadores COSII resultaron polimórficos *in silico*. De estos, 16 fueron informativos para la identificación de híbridos con 3 polimórficos por InDels y 13 polimórficos por CAPS, con un porcentaje de eficiencia polimórfica de 42,1% (16 de 38 marcadores). En el Anexo 5 se encuentra la información de los 17 marcadores polimórficos seleccionados a partir de los 67 para los dos cruces de tomate de árbol, los cuales se encuentran distribuidos en 7 de los 12 cromosomas, 16 amplifican secuencias intrónicas (iUPAs) y uno amplifica secuencias exónicas (eUPAS).

### 9.3. Análisis del híbrido control de lulo

El híbrido 11H fue seleccionado como un caso testigo en esta primera aproximación al análisis de híbridos de lulo y tomate de árbol desarrollados en C. I. La Selva de CORPOICA. 11H fue desarrollado a partir de un cruce entre un individuo de *S. quitoense* (03) y uno de *S. hirtum* (028) en condiciones controladas en invernadero.

Dada la naturaleza heterocigota de estas especies, los padres e hijos de este cruce fueron introducidos *in vitro* para tener una disponibilidad permanente de sus genotipos, se obtuvieron 13 individuos F1 a partir de 450 semillas, es decir, un porcentaje de germinación bastante bajo (cerca de 3%). *S. hirtum* 028 proveniente de Venezuela y *S. quitoense* 03 proveniente del Valle, Colombia, son ejemplo de accesiones muy alejadas entre sí, lo cual corroboró Enciso *et al.* (sometido), en un estudio de diversidad de lulo, en el que *S. hirtum* 028 fue la accesión más alejada en términos de distancias genéticas medidas con marcadores COSII en 32 accesiones de la colección de



germoplasma del C.I. La Selva. El cruce entre accesiones muy alejadas entre sí en muchas ocasiones provoca bajos porcentajes de germinación debido a que podrían presentar rearrreglos cromosómicos durante la meiosis, algunos de naturaleza letal (Dinu *et al.*, 2005).

De otro lado, la lejanía entre las dos accesiones es favorable en términos de conseguir un alto número de polimorfismos. De esta forma, se encontró que del total de 400 marcadores COSII inicialmente evaluados en lulo (Pratt *et al.*, 2008), el híbrido control 11H presentó 60 polimórficos (60 de 400, cerca del 15%) y de los 105 marcadores COSII analizados *in silico* y amplificados en este estudio se extrapola un porcentaje de eficiencia en polimorfismo del 57% (60 de 105).

Este porcentaje es superior a lo reportado en diferentes estudios de evaluación de genotipos y pureza genética en diferentes especies y con diferentes marcadores. Por ejemplo, en la identificación de dos híbridos de tomate en el que se evaluaron 218 RAPD, 54 ISSR y 49 SSR se encontraron 7 marcadores funcionales, cerca del 3% del total (Li, *et al.*, 2007), de forma similar Sing, *et al.*, (2007), evaluaron dos híbridos de tomate en la India en uno de ellos (NTH-1) un total de 394 marcadores RAPD fueron evaluados obteniendo sólo 6 polimórficos (1.6%), en el caso del segundo híbrido (NTH-7) se seleccionaron 253 marcadores RAPD de los cuales 51 (20.15%) generaron amplicones y de estos sólo 6 (11.8% y 2.7% del total) generaron fragmentos polimórficos. Para estos ejemplos el bajo nivel de polimorfismos detectados se debe a la baja variabilidad entre las líneas paternas de tomate estudiadas (Sing, *et al.*, 2007) caso contrario a los dos parentales de lulo usados en el desarrollo del híbrido control 11H.

Otros ejemplos muestran porcentajes variables de polimorfismo, es el caso de la evaluación de la pureza genética de híbridos de arroz en el que utilizaron 44 microsatélites STMS de los cuales 9 (20%) fueron polimórficos informativos para los 11 híbridos analizados (Nandakumar *et al.*, 2004); la identificación de polimorfismos y herencia en una población F1 de uva usando marcadores RAPD de 280 cebadores, 250 (89%) amplificaron, pero sólo 39 (14%) resultaron ser polimórficos con diferentes tipos de segregación en la F1 (Luo *et al.*, 2002).

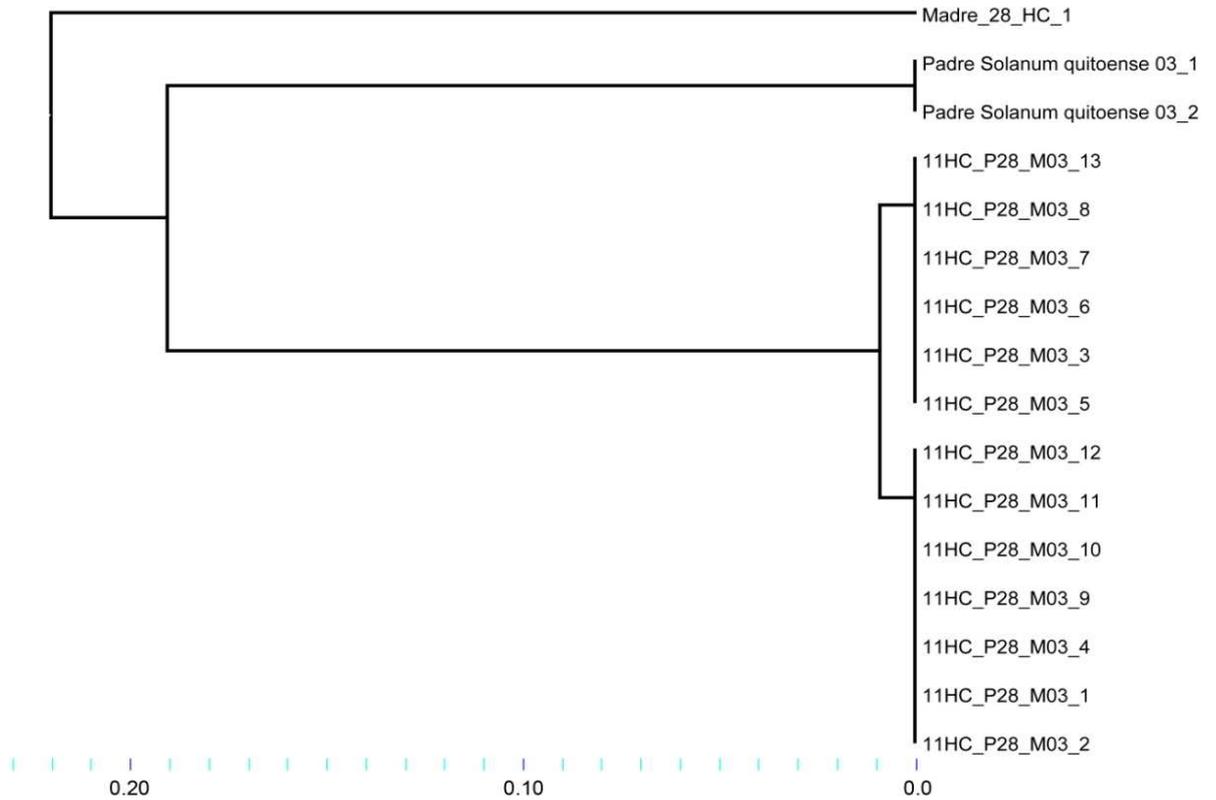
El éxito en la amplificación de marcadores COSII en el híbrido 11H se debió a la forma metódica de seleccionar los marcadores, una evaluación inicial general con aproximadamente 400 cebadores, la posterior selección de marcadores polimórficos por InDel, monomórficos con comportamiento homocigoto en los padres de este híbrido, secuenciación de productos de amplificaciones monomórficas y el posterior análisis *in silico* para detectar CAPS informativos, lo que garantizó un alto porcentaje (57%) de aciertos del caso ideal para la identificación de híbridos en el laboratorio (Figura 5a; Figura 6a y 6e).

### 9.3.1. Análisis de conglomerados para el híbrido control

Para el análisis estadístico del híbrido control 11H se usaron 26 de los 60 marcadores COSII polimórficos por ser los mismos cebadores usados en el análisis de los híbridos 1H a 10H, de esta manera se garantizó la comparación estricta de los resultados.

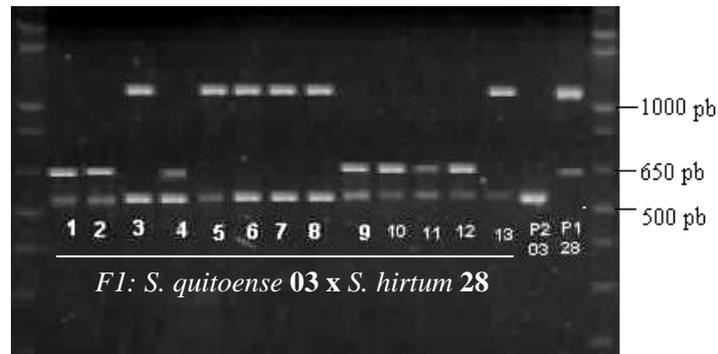


El análisis de conglomerados mostró 3 grupos claramente definidos en el cruce control 11H, los 13 híbridos F1 se agrupan a una muy alta similitud (cercana a 0), lo cual concuerda con el carácter principalmente homogéneo de esta población F1 con individuos parentales conocidos (Figura 7).



**Figura 7. Dendrograma UPGMA de padres e hijos del cruce control 11H generado con el Software PAUP4b10.**

El árbol UPGMA generado por PAUP 4b10 fue similar al generado por PHYLIP 3.5 (no mostrado), con la ventaja que PAUP4b10 muestra todos los individuos y la escala de similitud de éstos en la parte inferior. En ambos árboles se observó una formación de dos grupos en la población F1, con una similitud de 0,01 debido a que se incluyó en el análisis el marcador 2g34470, el cual fue polimórfico por InDel y segregante en proporción 1:1 (Figura 8), ejemplo claro del caso representado en la Figura 5c de polimorfismos informativos. En el caso del grupo de los dos individuos paternos *S. quitoense* 03, es claro que son idénticos debido a que son clones de la misma planta, con la que se realizaron los cruces, para obtener la F1.



**Figura 8.** Visualización en gel, marcador 2g34470 polimórfico por InDel, caso particular de segregación en proporción 1:1, en padres e híbridos del cruce control 11H.

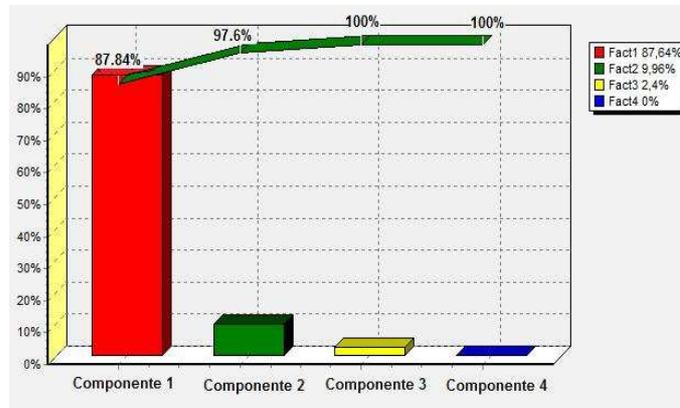
### 9.3.2. Análisis de componentes principales para el híbrido control

En el análisis de componentes principales (PCA) del híbrido control 11H el 100% del conjunto de 26 marcadores COSII utilizados para la identificación de este cruce, proporcionan información altamente confiable que captura la varianza total acumulada en tres componentes (Figura 9a), de los cuales el primero explica una variación del 87,84%, donde 23 de los 26 marcadores (excepto 4g01940, 3g62940 y 1g01350), aportan información en este componente en diferente proporción, este resultado se debe al comportamiento de los polimorfismos detectados para identificar este híbrido, en los que 19 marcadores (16 polimórficos por CAPS y 3 por InDel) presentan el caso ideal para la identificación de híbridos (Figura 5a), 3 marcadores (5g13450, 2g01720 y 1g14850) aportan en menor proporción a la variación posiblemente por la presencia de alelo nulo en uno de los 2 loci identificados (Figura 5b) y el marcador 2g34470 aporta en menor proporción a la variación al ser segregante en proporción 1:1 (Figura 5c; Figura 8). En el segundo componente que explica una variación del 9.96%, aportan en mayor proporción el marcador 2g34470, seguido de los 3 marcadores (5g13450, 2g01720 y 1g14850) y en el tercer componente con un porcentaje de 2.4% se ubican aquellos marcadores que en menor proporción explican la variación, 3 marcadores monomórficos para estos individuos (4g01940, 3g62940 y 1g01350).

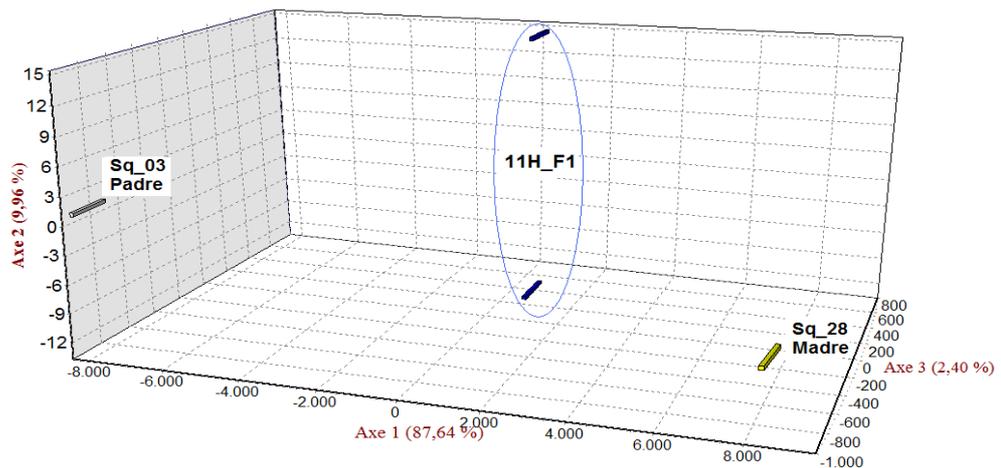
En el PCA (Figura 9b), se observan tres grupos definidos en las tres dimensiones, este es el comportamiento esperado entre parentales e híbridos de un cruce completamente controlado; un grupo es el padre *S. quitoense* (Sq 03), en el que los dos individuos se ubican y sobreponen en el eje central aproximado al eje 2 (coeficiente de similitud = 0), esta sobreposición corrobora que estos individuos son clones de la misma planta y no se generó variación somaclonal con la multiplicación *in vitro* a la cual fueron sometidos. Un segundo grupo que corresponde al único individuo analizado *S. hirtum* (Sh\_028) que se ubica al otro extremo del eje 1 de la especie comercial, lo cual corrobora la importante distancia genética entre las dos especies. El tercer grupo cercano al centroide de los ejes corresponde a la F1 de 11H, se observan dos conjuntos, en los que se sobreponen los individuos que se comportan de forma idéntica (coeficiente de similitud = 0) en todos los



marcadores y se diferencian dos conjuntos debido al locus 2g34470 (Figura 8), igual que en el árbol UPGMA.



a)



b)

Figura 9. Análisis de componentes principales (PCA) para el híbrido control 11H. a) Valores acumulados de los cuatro componentes principales. b) PCA en tres dimensiones.

#### 9.4. Análisis de híbridos de lulo del C.I. La Selva

Para el análisis de los híbridos 1H a 10H, desarrollados por el programa de mejoramiento de Corpoica C.I. La Selva, se utilizaron 26 marcadores COSII (Anexo 4) siguiendo los mismos parámetros del híbrido control 11H, el cual se incluyó también en los análisis. Se realizó un análisis de conglomerados y componentes principales (PCA) de padres e híbridos por separado. Se llevó a cabo un análisis de diversidad, estructura poblacional y paternidad para cada población que presentó resultados de similitud más cercanos teniendo en cuenta la naturaleza heterogénea de las



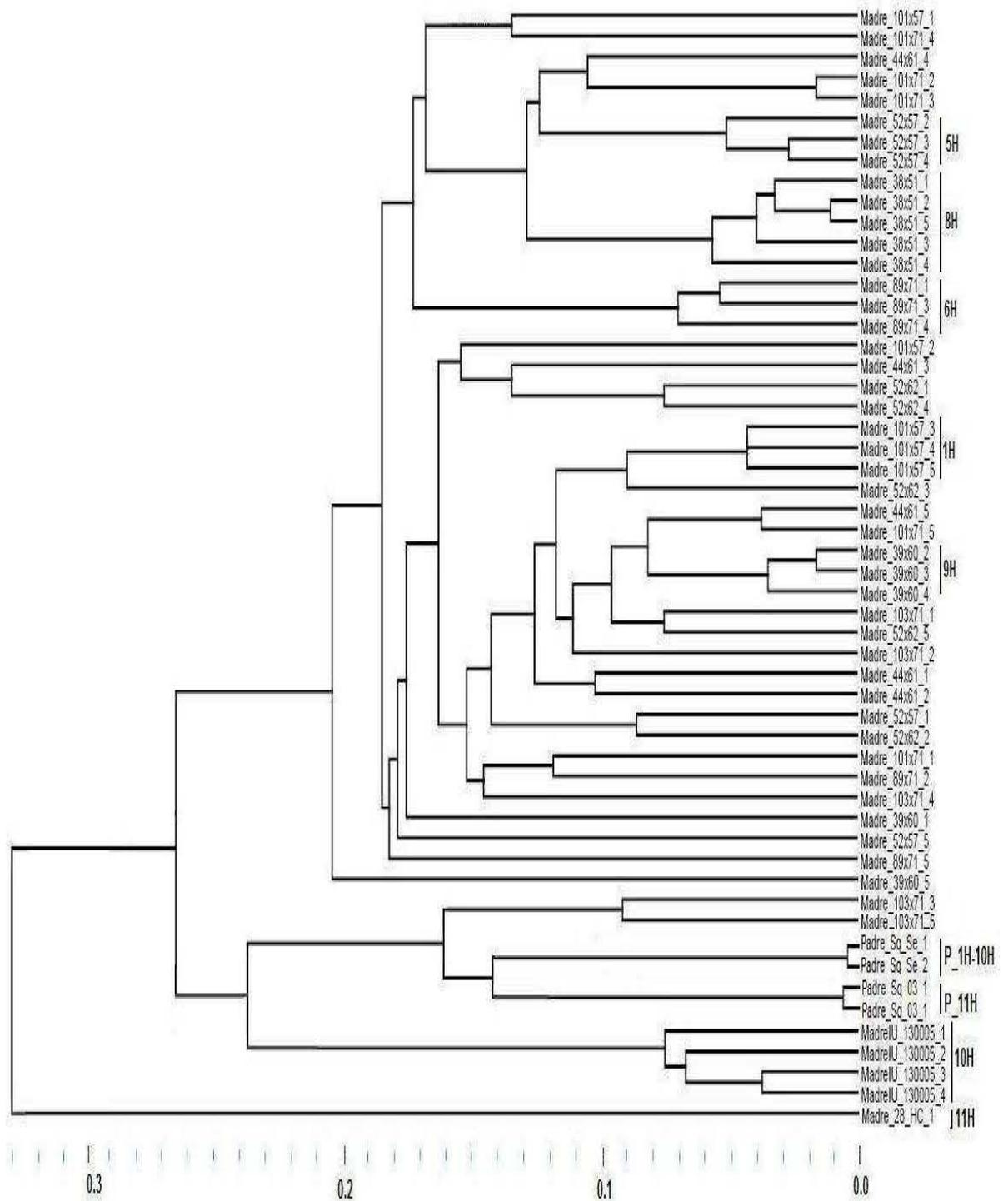
poblaciones 1H a 9H. Y finalmente se destacaron aquellos marcadores que permitieran identificar de forma acertada cada híbrido.

#### 9.4.1. Análisis de conglomerados y componentes principales de padres de lulo

El análisis de conglomerados utilizando el programa PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989) y el algoritmo UPGMA (Gronau and Moran, 2007), mostró valores de “bootstrap” de 10000 repeticiones, entre el 35 a 100%, indicando un buen soporte estadístico para los grupos formados por encima del 80%. En la Figura 10 se muestra el árbol consenso arrojado por el programa PAUP 4b10 (Swofford, 2004), el cual es similar al originado por PHYLIP 3.5 (Anexo 9a), con la diferencia que éste agrupa los individuos por población o accesión y PAUP 4.0b10 permite ver similitud genética por individuo.

En el árbol se observaron varios grupos definidos, de los cuales 6 agruparon por lo menos 3 individuos de acuerdo al número de accesión (1H, 5H, 6H, 8H, 9H, 10H, Figura 10), los demás se encontraron dispersos en el dendograma. Este resultado corrobora el comportamiento heterogéneo de estas accesiones, dado que cada individuo dentro de una accesión puede representar un único genotipo con bandeo COSII diferencial, lo que ocasiona dispersión de los individuos. Las dos accesiones de los padres *S. quitoense* (Sq SE, padre común de los cruces 1H-10H, y Sq 03, padre del cruce 11H) formaron grupos independientes cada uno con índices de similitud cercanos a cero pero a su vez se consolidaron en un grupo con un índice de similitud de 0,16 entre ellos; esta cercanía se debe a que son accesiones de la misma especie *S. quitoense* sin cruzamiento con otra especie, las dos son especies comerciales provenientes de Colombia, y comparten la característica morfológica de no poseer espinas (SE). Con respecto a los dos grupos *S. hirtum* Sh 130005 y Sh 028, individuos maternos de los híbridos 10H y 11H, fueron las accesiones más alejadas del árbol y se encontraron a un índice de similitud de 0,24 y 0,33, respectivamente de los padres *S. quitoense*, lo cual confirma los resultados del estudio realizado por Enciso *et al.* (sometido) donde el padre Sh 028 procedente de Venezuela fue el más distante a pesar que en ambos estudios sólo se comparten 4 accesiones (*S. hitum* 130005=06L063, *S. hirtum* 028, *S. quitoense* 03 y *S. quitoense* SE). Adicionalmente, los resultados obtenidos se asemejan con el estudio de Fory *et al.* (sometido), quien reporta un índice de similaridad entre las especies cultivadas de lulo *S. quitoense* y silvestres *S. hirtum* de 0,45 usando marcadores AFLPs.

El criterio de selección de parentales para el programa de mejoramiento de CORPOICA C.I. La Selva, ha sido lograr la incorporación de genes a los materiales cultivados asociados con características favorables provenientes de genotipos exóticos o silvestres como son; resistencia a enfermedades, características fenotípicas contrastantes y atributos ecológicos favorables (Lobo, 2006); entre otros, *S. quitoense* (especie comercial) y *S. hirtum* (especie silvestre), de diferentes genealogías han sido las especies representativas, aunque no las únicas. El dendograma de la Figura 10 evidencia la variabilidad existente en parentales escogidos para los programas de mejoramiento del país (ver también diferentes genealogías en Anexo 1).



**Figura 10.** Árbol consenso de poblaciones de padres y madres de híbridos de lulo utilizando UPGMA. Se observan 6 grupos de por lo menos 3 individuos de madres agrupados a alta similitud (5H, 8H, 6H, 1H, 9H, 10H). El padre Sq SE (común para los cruces 1H-10H), el padre 11H y la madre 11H formaron a su vez grupos independientes.



En el análisis de componentes principales (PCA) el 61,5% del conjunto de 26 marcadores COSII utilizados, proporcionan información confiable que captura la varianza total acumulada en cuatro componentes (Anexo 10), de los cuales el primero explica una variación del 27,75% al cual aportan 17 marcadores, el segundo componente el 16,93% explicado por 9 marcadores y el tercer y cuarto componentes con porcentajes que explican la varianza individual de forma similar del 8,99% (6 marcadores) y 7,83% (5 marcadores). El porcentaje restante de la varianza es atribuible al azar, sin embargo un 61,5% explica en buena proporción la varianza acumulable, en comparación con lo obtenido por Enciso *et al.* (sometido) a partir de 6 marcadores COSII polimórficos en donde se encontraron cuatro componentes principales explicando el 36,82% de la variabilidad total, lo cual indica que al aumentar el número de variables (loci COSII) se incrementa la captura de variabilidad total en las poblaciones bajo estudio.

En el PCA (Figura 11), se observan claramente los grupos definidos en el árbol UPGMA (Figura 10); los individuos maternos *S. hirtum* (Sh 130005 y Sh 028) forman dos grupos cercanos al eje 3 al extremo de los padres *S. quitoense* (Sq SE y Sq 03); los individuos maternos de los híbridos 1H a 9H se agrupan sobre el centroide cercanos al eje 1 entre las especies *S. quitoense* y *S. hirtum* por ser producto del cruzamiento entre diferentes accesiones de estas dos especies la similitud genética entre estas accesiones es alta (0,1 – 0,2) aunque existe diferenciación genética entre individuos de la mismas accesiones; únicamente la accesión materna 38x51 (8H) agrupa claramente los 5 individuos maternos con índice de similitud genética entre 0,02 y 0,06.

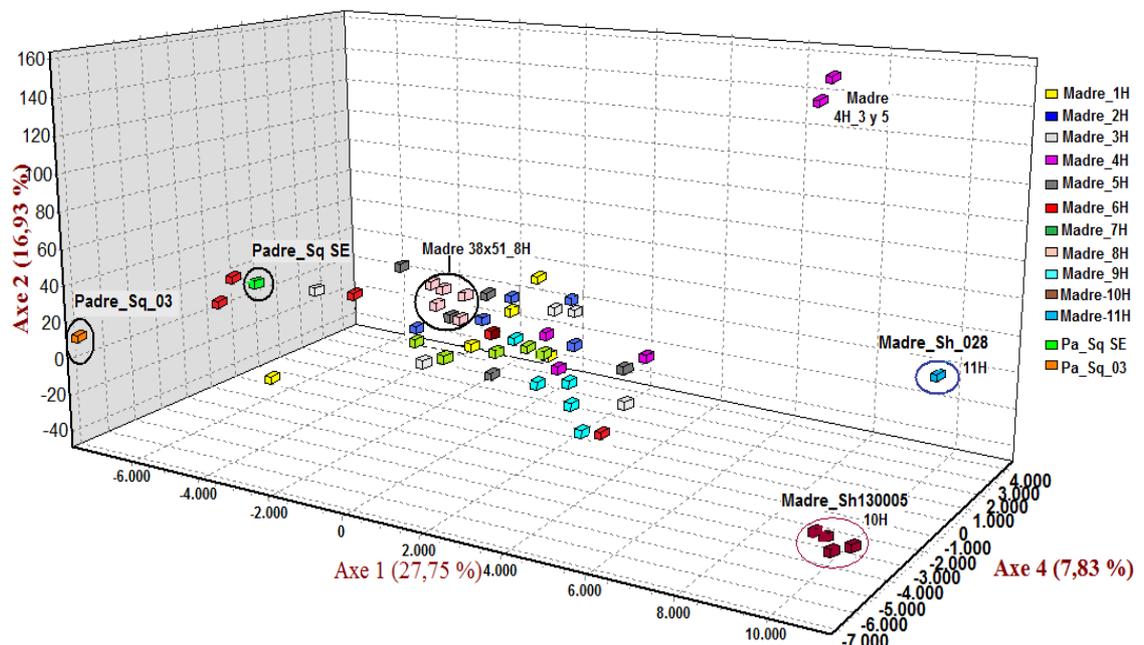


Figura 11. Análisis de componentes principales (PCA) para los individuos paternos y maternos de los cruces 1H a 11H.



#### 9.4.2. Análisis de conglomerados y componentes principales de híbridos de lulo C.I. La Selva

El análisis de conglomerados utilizando el programa PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989) y el algoritmo UPGMA (Gronau and Moran, 2007) mostró valores de “bootstrap” de 10000 repeticiones, entre el 24 al 100%, indicando un buen soporte estadístico para los grupos formados por encima del 80%. El árbol consenso elaborado con el programa PAUP 4b10 (Swofford, 2004), (Figura 12) y el árbol PHYLIP 3.5 (Anexo 9b), muestran estructura similar.

En el árbol UPGMA se observan 7 grupos de por lo menos 3 individuos por cruce con similitudes por grupo cercanas a 0,1 (1H, 6H, 8H, 9H, 10H y 11H; excepto para 4H que fue cercana a 0,2); en donde las mayores similitudes se observaron para el híbrido 10H que agrupó los 5 individuos y el testigo 11H que agrupó los 13 individuos con similitudes cercanas a cero. Los híbridos restantes están dispersos de forma variable en el dendograma (Figura 12). Únicamente los híbridos que agruparon por lo menos 3 individuos se tuvieron en cuenta en el análisis de paternidad y estructura poblacional dado que su agrupamiento en el árbol indica alta similitud, facilitando este tipo de análisis.

El comportamiento heterogéneo de los híbridos 1H a 9H (Figura 12) se explica con el comportamiento de los parentales que también fueron heterogéneos (Figura 10). Como se mencionó en el numeral 4.4.1., las madres son genotipos producto del cruzamiento entre diferentes accesiones de dos especies *S. quitoense* x *S. hirtum* (Tabla 4) y un único padre *S. quitoense* sin espinas (Lobo, 2007, comunicación personal); por lo anterior, cada híbrido es el producto del primer retrocruce al taxón cultivado. Estos híbridos fueron parte de un proceso de domesticación (que finaliza luego del segundo retrocruzamiento) y pueden considerarse como acciones de premejoramiento desarrolladas por M. Lobo y colaboradores; el objeto de estos cruzamientos usando accesiones de diferente procedencia y realizando retrocruces, fue el de obtener una base genética amplia y combinar atributos genéticos del taxón silvestre *S. hirtum* y del cultivado *S. quitoense*, con enriquecimiento de la base genética de este último y con posibilidades de clonación de heterosis presente en los materiales derivados del proceso (Lobo, 2006).

Los grupos definidos y la información que proporciona el árbol UPGMA, se complementa con el análisis de componentes principales que permite ver en tres dimensiones la variabilidad entre las accesiones y entre los individuos de cada accesión de los híbridos 1H a 11H. En el PCA (Figura 13) los híbridos 1H a 10H se ubican en el centroide cercanos a los ejes 1 y 2, los individuos de los híbridos 5H y 7H son los más dispersos y alejados entre sí. Los híbridos 4H, 6H y 8H son los que presentan mayor similitud entre individuos y se destacan los híbridos 10H y 11H con la menor distancia entre sus individuos lo cual concuerda con lo observado en el árbol UPGMA.

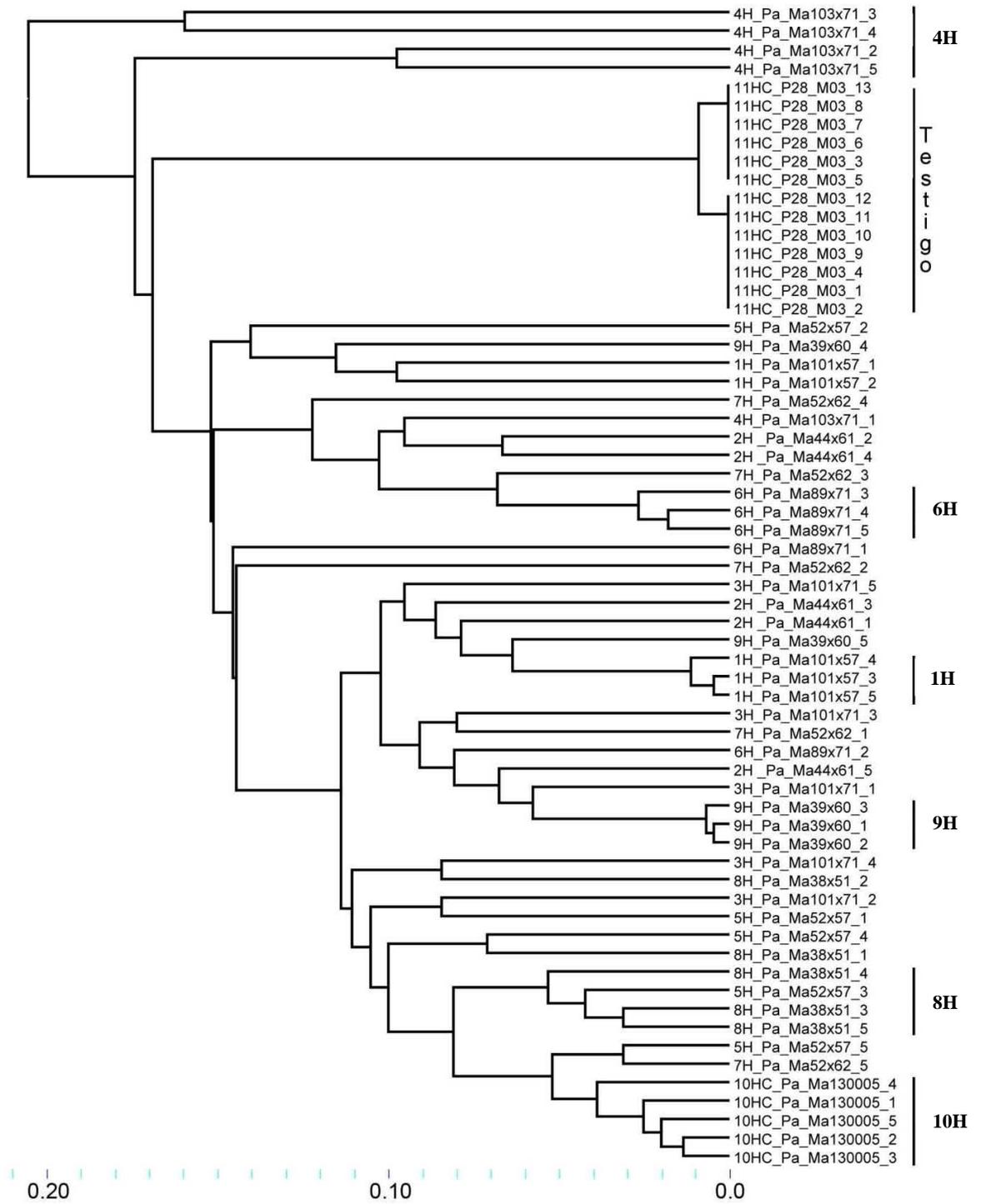
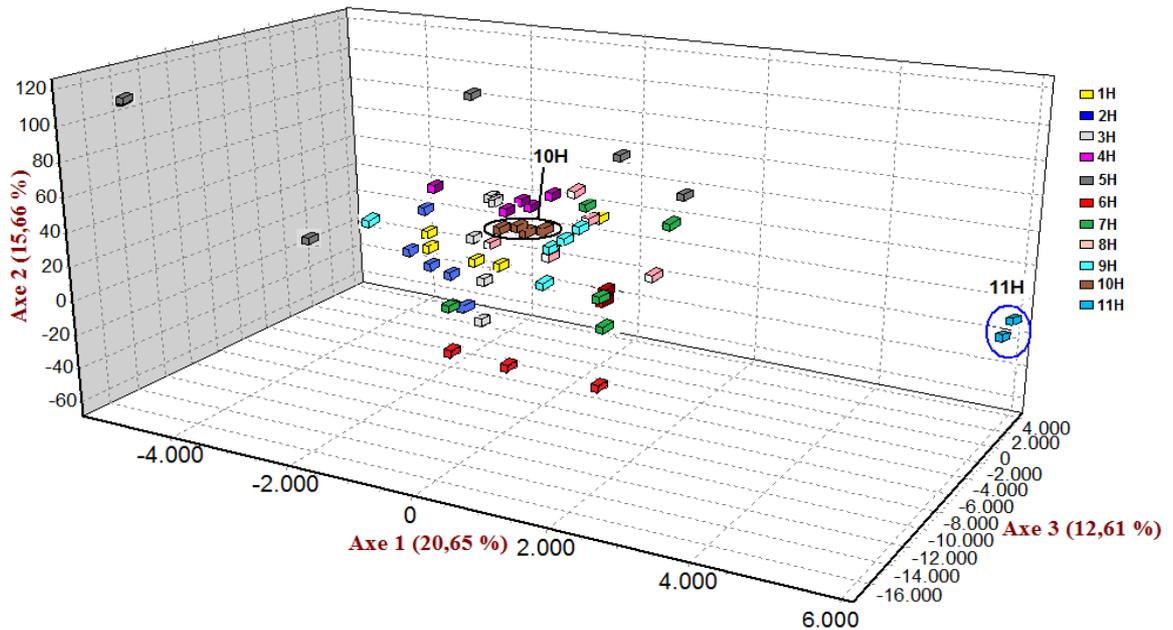


Figura 12. Árbol consenso de poblaciones de híbridos de lulo utilizando UPGMA. Se observan 6 grupos (4H, 6H, 1H, 9H, 8H y 10H) y el híbrido control de por lo menos 3 individuos del mismo híbrido agrupados a alta similitud.



Cuatro componentes principales explicaron el 56,99% de la varianza total acumulada (Anexo 10b) para las accesiones de híbridos; el primer componente aporta el 20,65% al cual aportan 10 marcadores, el segundo componente el 15,66% aportan 15 marcadores, el tercer y cuarto componentes explican el 12,61 y 8,07% de varianza respectivamente, con 7 y 4 marcadores, respectivamente. Tanto loci COSII como accesiones aportan de forma similar en los cuatro componentes.



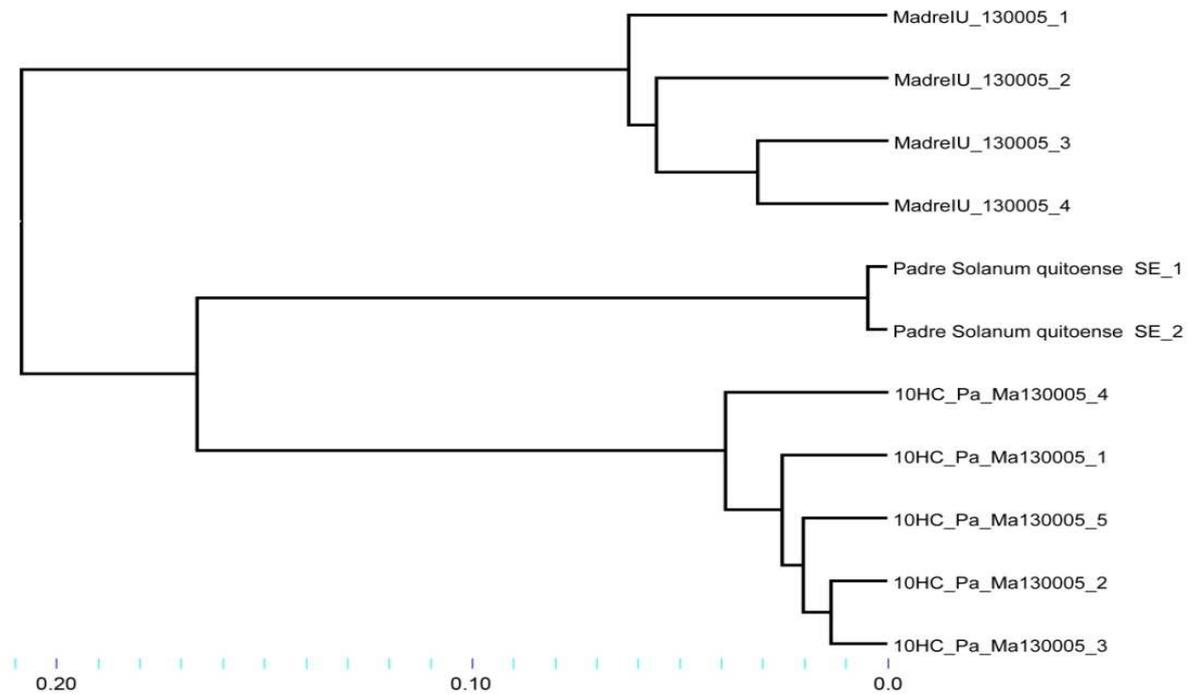
**Figura 13.** Análisis de componentes principales (PCA) para híbridos 1H a 11H.

Los híbridos 1H, 6H, 8H y 9H que agruparon tres o más individuos en el dendrograma UPGMA concuerdan con las accesiones maternas que agruparon igualmente tres o más individuos en el dendrograma de parentales, excepto para la accesión materna 103x71(4H), que solo agrupó dos individuos (Figura 10); Las similitudes entre accesiones maternas, paterna e híbridos se comprobó mediante el árbol generado por PHYLIP 3.5 (Anexo 9c), donde se observan grupos definidos entre estos híbridos incluyendo 4H, y las accesiones maternas correspondientes, sugiriendo que hubo éxito en la polinización de estos cruces o que los marcadores COSII utilizados son funcionales para su identificación.

Para el cruce 10H se generó un dendrograma usando PAUP 4b10 en donde se observó que los cinco hijos formaron un grupo a una muy alta similitud (0,04), al igual que los individuos de la accesión paterna (0,05) y de la materna (0,065) y que tanto padres como hijos formaron grupos independientes entre sí (Figura 14). Este comportamiento es similar al presentado por el híbrido 11H (Figura 7) y concuerda con el hecho de que la mayoría de marcadores (15) en el cruce 10H se comportaron siguiendo el caso de padres homocigotos (AA/BB) e hijos F1 heterocigotos (AB), 6



presentaron el caso de dos loci, de los cuales uno es heterocigoto con alelo nulo (Figura 5b) y dos fueron del tipo heterogéneo en madres e hijos (Figura 6f).



**Figura 14. Dendogramas UPGMA de padres e hijos del cruce 10H. Se forman tres grupos claramente definidos como madre, padre e híbrido 10H.**

#### 4.4.3. Análisis de madres probables vs. PCA por híbrido

La paternidad se determinó a partir de alelos que se heredan y que por análisis de frecuencias, si estos no están presentes en los individuos hijos, es posible excluir madres. Para determinar la maternidad con mayor certeza fue necesario utilizar una gran cantidad de loci, en el caso de lulo se estudiaron 26 marcadores COSII, los cuales suministraron suficiente información al sistema de caracterización genética de los individuos.

Dado que los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H, 9H, 10H y 11H presentaron por lo menos 3 individuos que agruparon con alta similitud, estos fueron sometidos a un análisis de frecuencias de madre más probable. Con los datos obtenidos se encontraron madres de cada cruce con éxito variable (Tabla 5).

Como control positivo, se realizó un análisis de madre más probable en el híbrido 11H. Con los datos obtenidos se corroboró la madre de este cruce, la cual explicó el 100% del bandeo esperado del cruce, resultado que concuerda con la alta similitud encontrada dentro de los hijos (Tabla 5, Figura 7). El alto porcentaje es consistente con cruces controlados donde se conocen los individuos



parentales de los hijos evaluados y los marcadores moleculares presentaron el caso homocigoto en padres (AA/BB) y heterocigoto en hijos (AB) para todos los individuos.

Tabla 5. Madres más probables en cruces de lulo <sup>a</sup>.

1H_101 x 57 23 marcadores		4H_103 x 71 20 marcadores		6H_89x71 17 marcadores		8H_38x51 15 marcadores		9H_39x60 20 marcadores		10H_130005 23 marcadores		11H_028 x 03 24 marcadores	
MP <sup>b</sup>	H <sup>c</sup>	MP	H	MP	H	MP	H	MP	H	MP	H	MP	H
1 <sup>d</sup> (0,65)	1H_1	2 (0,64) 4 (0,51)	4H_1	2, 5 (0,78)	6H_1	1, 2, 3, 4 y 5 (0,73)	8H_1	1, 2, 3, 4 (0,80)	9H_1	1,2,3,4 (0,96)	10H_1	28 (1,00)	
1, 2 (0,65)	1H_2	2(0,6)	4H_2	2, 5 (0,83)	6H_2		8H_2	1, 2, 3, 4 (0,75), 5(0,6)	9H_2		10H_2		11H_1 11H_2 11H_3 11H_4 11H_5 11H_6 11H_7 11H_8 11H_9 11H_10 11H_12 11H_13
5 (0,70)	1H_3	5(0,77)	4H_3	1(0,72), 3 (0,89)	6H_3		8H_3	1, 2, 3, 4 (0,75), 5(0,65)	9H_3		10H_3		
5 (0,61)	1H_4	3(0,76), 5(0,77)	4H_4	1(0,83), 3(0,72)	6H_4		1, 2, 3, 4 y 5 (0,87)	8H_4	1, 2, 3, 4 (0,55), 5(0,7)		9H_4		10H_4
1, 5 (0,6)	1H_5	1(0,65) 2(0,6) 3(0,57) 5(0,51)	4H_5	1, 3 (0,77)	6H_5		8H_5	1, 2, 3 (0,75), 4, 5 (0,65)	9H_5		10H_5		

<sup>a</sup> En paréntesis se indica el porcentaje de bandas encontradas en las madres respecto a lo esperado. El número de marcadores reportados son los informativos (polimórficos). <sup>b</sup> MP: Madre probable, <sup>c</sup> H: híbridos, <sup>d</sup> Indica el número del individuo correspondiente a la madre o madres más probables para cada híbrido.

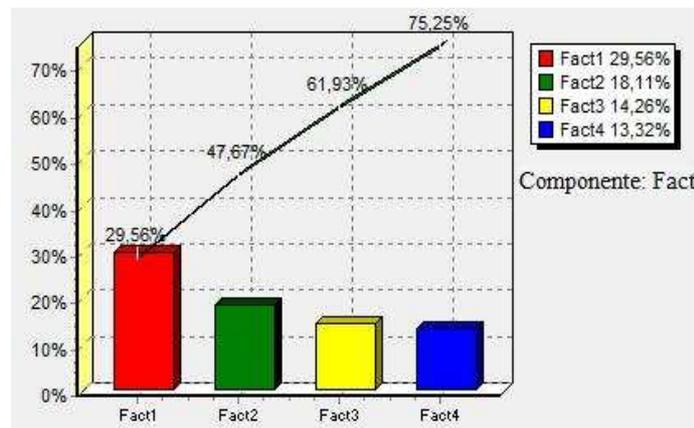
Para los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H y 9H el porcentaje de madres probables osciló entre el 51% y el 89% (Tabla 5), indicando porcentajes más bajos que el cruce testigo 11H y el cruce 10H (96%). Los bajos porcentajes entre el número de bandas esperado y el observado en las madres de los cruces 1H, 4H, 6H, 8H, y 9H concuerdan con la alta variabilidad entre individuos de la misma accesión observada en UPGMA y PCA. Como se mencionó anteriormente, los cruces 1H a 9H se realizaron entre accesiones conocidas pero no se tiene certeza de la planta materna dentro de cada accesión que se utilizó para cada cruce. El lulo es una especie de polinización cruzada y también ha sido descrita como autocompatible (Heiser, 1972; Benitez *et al.*, 1991; Bohs, 1994). De esta forma, se puede inferir que cada accesión no necesariamente es homogénea, aspecto confirmado dada la heterogeneidad de las accesiones maternas evaluadas, lo cual concuerda con el bajo grado de domesticación de la especie (Lobo, 2006; Lobo *et al.*, 2007). El uso de poblaciones heterogéneas para propósitos de incrementar la base genética, lo cual es el objetivo de los programas de mejoramiento (Lobo, 2006), puede ser ventajoso; sin embargo, al mismo tiempo, al no tener certeza de los individuos parentales, se hace más complicada la identificación y seguimiento molecular de los híbridos. De otro lado, es importante considerar que en el estudio se analizó sólo una muestra de las poblaciones maternas e híbridas (4-5 individuos de cada una) que pudo no haber sido representativa del total de las poblaciones en estudio, especialmente para los híbridos con madres desconocidas 1H - 9H que presentaron la mayor variabilidad. Adicionalmente, para todos los casos analizados, se debe considerar que durante la reacción de PCR se podrían estar amplificando



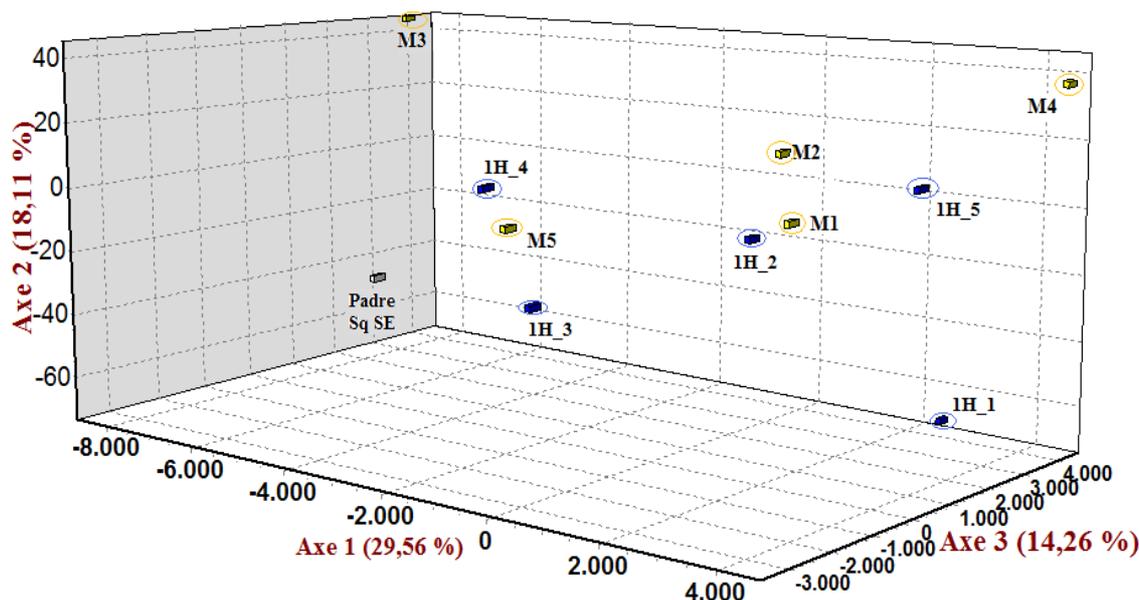
regiones no homólogas en parentales y/o híbridos, lo que podría conducir a un sesgo en la interpretación de los geles.

El análisis de componentes principales (CP) para cada uno de los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H y 9H evaluados mostró valores acumulados distribuidos en 4 componentes principales que explican en alta proporción de 75,25% a 91,97% el total de la variación (ver adelante). Dado que estos marcadores explican en un alto porcentaje el total de la variación existe una alta probabilidad de encontrar marcadores COSII altamente informativos para la identificación de estos híbridos especialmente en los primeros componentes principales. A continuación se describe el análisis CP para cada híbrido.

El análisis de PCA, para el **híbrido 1H** explica en cuatro componentes principales el 75,25% (Figura 15a) de la variación acumulada, el primer componente explica el 29,56% aportan a este componente 12 marcadores COS II, al segundo componente de 18,11% aportan 11 marcadores, al tercer componente de 14,25% aportan 8 marcadores y al cuarto componente de 13,32% aportan 8 marcadores COSII. La distribución de las poblaciones en tres dimensiones mostró grupos definidos con acercamiento de madres a híbridos, debido a la cantidad de alelos compartidos entre ellos. De acuerdo a la gráfica de PCA (Figura 15b), la madre más próxima al híbrido 1H\_1 es la madre 1 (M1) por estar en el mismo eje vertical, 1H\_2 es claro que las madres más cercanas son 1 y 2 (M1 y M2) que se encuentran en el mismo eje vertical; 1H\_3 y 1H\_4 la madre más cercana es la 5; y 1H\_5 está próximo a 1 y 2; los 5 individuos que representan el híbrido 1H están relativamente alejados de la madre 4 (M\_4); estos resultados concuerdan con los obtenidos aplicando el método de frecuencia de madre probable (Tabla 5).



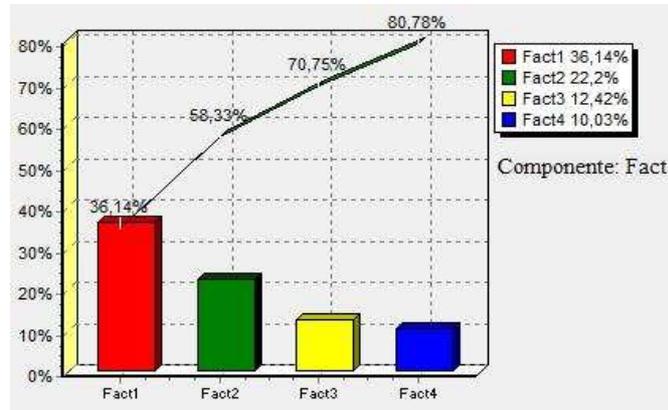
a) Valores acumulados de Componentes Principales híbrido 1H



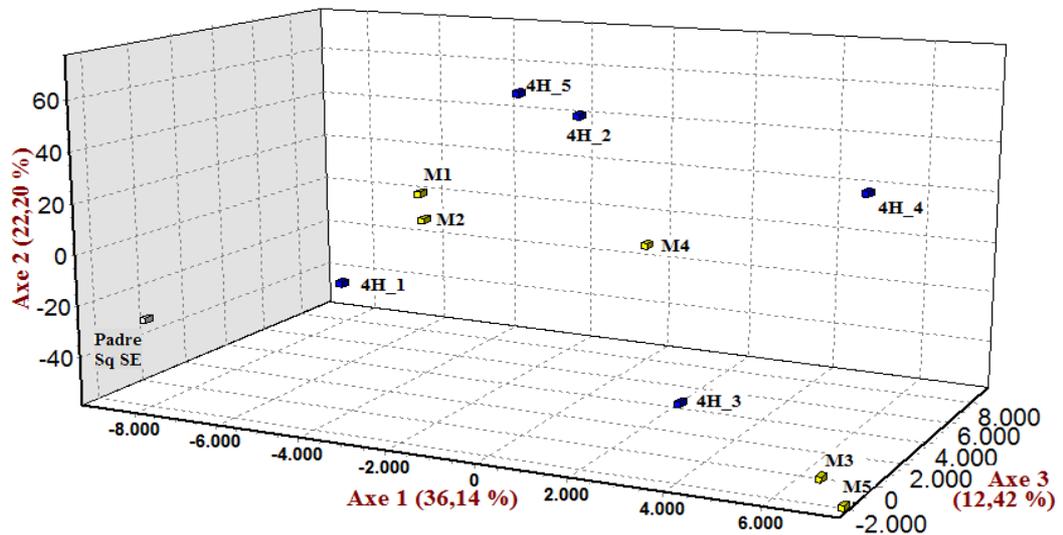
b) PCA en tres dimensiones híbrido 1H

Figura 15. Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 1H (101x57). En b) en amarillo se muestran las madres (M) Sq 120101 x Sh120057, en azul los individuos híbridos 1H, y en gris el padre Sq SE.

El análisis de PCA, para el **híbrido 4H** explica en cuatro componentes principales el 80,78% de la variación acumulada (Figura 16a); el primer componente explica el mayor porcentaje (36,14%), aportan a este componente 15 marcadores COS II; al segundo componente de 22,2% aportan 12 marcadores; al tercer componente de 12,42% aportan 7 marcadores; y al cuarto componente de 10,3% aportan 6 marcadores. La distribución de las poblaciones en tres dimensiones mostró grupos definidos con acercamiento de madres a híbridos, de acuerdo a la gráfica de PCA (Figura 16b); la madre más próxima al híbrido 4H\_1 es la madre 2 (M2); para 4H\_2 la madre más cercana que también fue madre probable en el análisis de frecuencias es la M2, sin embargo se observa que la madre M1 también está muy próxima a este individuo con respecto a los ejes 1 y 2; para 4H\_3 la madre más cercanas son 3 y 5 aunque existe una mayor cercanía con la madre 5 paralela a la profundidad del eje 1 y 3; 4H\_4 exhibe un acercamiento con las madres 3 y 5 pero en especial con M3; y 4H\_5 está próximo a 1 y 2; estos resultados concuerdan con los obtenidos aplicando el método de frecuencia de madre probable excepto en el individuo 4H\_5 en el que se descartan las madres 3 y 5 aunque en menor frecuencia (Tabla 5). Es importante aclarar que las gráficas PCA pueden moverse en las 3 dimensiones directamente en el programa GENETIX 4.03 de tal forma que las cercanías aquí mencionadas fueron corroboradas desde diferentes ángulos.



a) Valores acumulados de Componentes Principales para el híbrido 4H



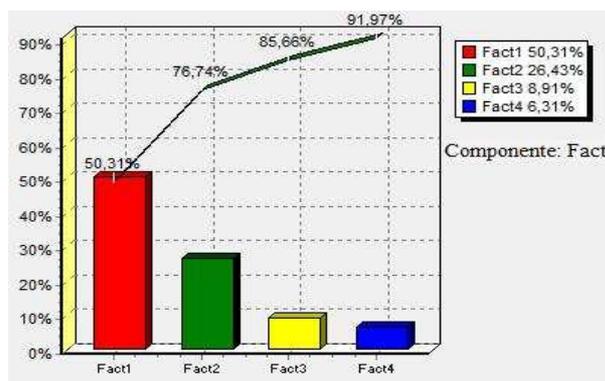
b) PCA en tres dimensiones para el híbrido 4H

Figura 16. Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 4H (103x71). b) En amarillo madres Sq 120103 x Sh120071, en azul individuos híbridos 4H, en gris padre Sq SE.

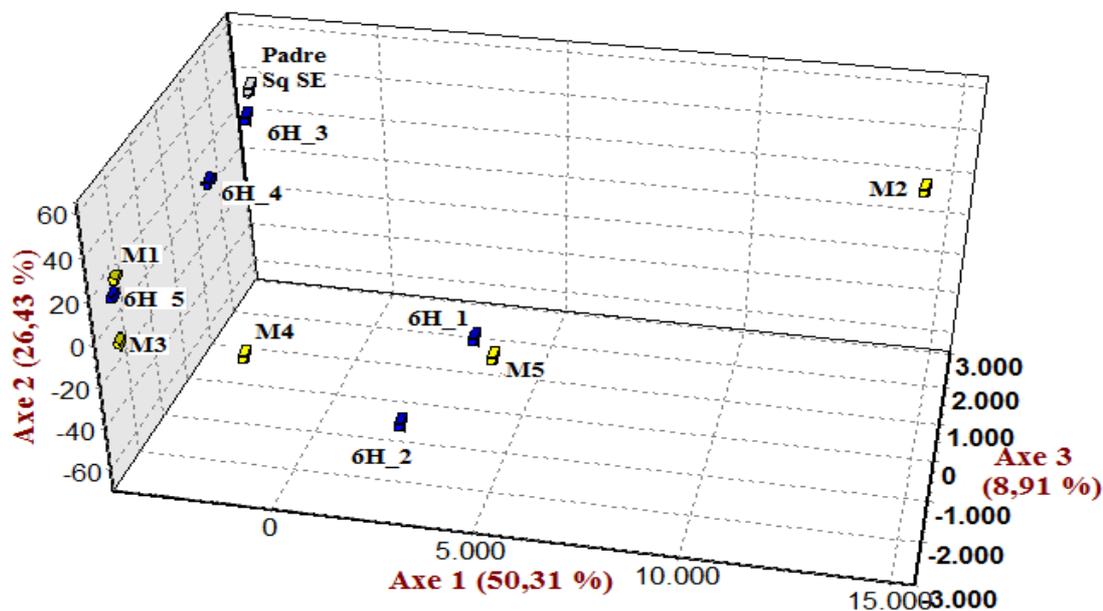
En el caso del **híbrido 6H** el análisis de PCA, explica en cuatro componentes principales el 91.97% (Figura 17a) de la variación acumulada, el primer componente explica el mayor porcentaje (50.31%), aportan a este componente 14 marcadores COS II; al segundo componente de 26.43% aportan 11 marcadores; al tercer componente de 8.91% aportan 5 marcadores; y al cuarto componente de 6.31% aportan 4 marcadores. El PCA en tres dimensiones mostró acercamiento de madres a híbridos (Figura 17b), la madre más próxima al híbrido 6H\_1 es la madre M5 cercanos en los ejes 1 y 2 que suman el mayor porcentaje de variación; para 6H\_2 la madre más cercana es M5 con respecto a los ejes 1 y 2, la madre M2 se ve alejada en comparación con lo encontrado en el análisis de frecuencias (Tabla 5); para 6H\_3 las madres más cercanas son 1 y 3 aunque existe una



mayor cercanía con la madre 1 con respecto a los ejes 1 y 2 haciendo que entre estos exista un mayor acercamiento; 6H\_4 exhibe un acercamiento con las madres 1, 3 y 4 pero en especial con M1; y 6H\_5 individuo más próximo a las madres 1 y 3 (Tabla 5). Los resultados concuerdan con los obtenidos aplicando el método de frecuencia de madre probable planteado en la metodología excepto en el individuo 6H\_2 para la madre M2.



a) Valores acumulados de Componentes Principales para 6H



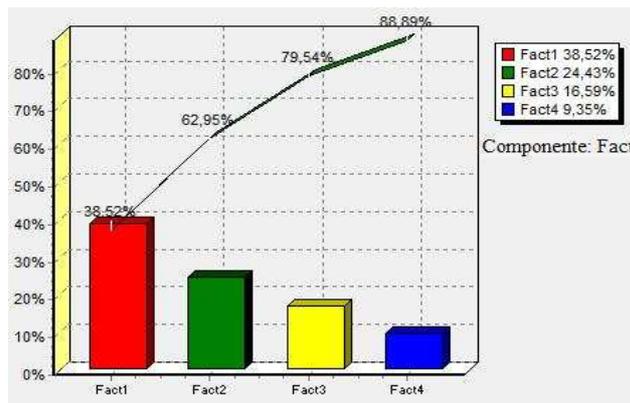
b) PCA en tres dimensiones para el híbrido 6H

Figura 17. Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 6H (89x71). b) En amarillo madres Sq 120089 x Sh120071, en azul individuos híbridos 6H, en gris padre Sq SE.

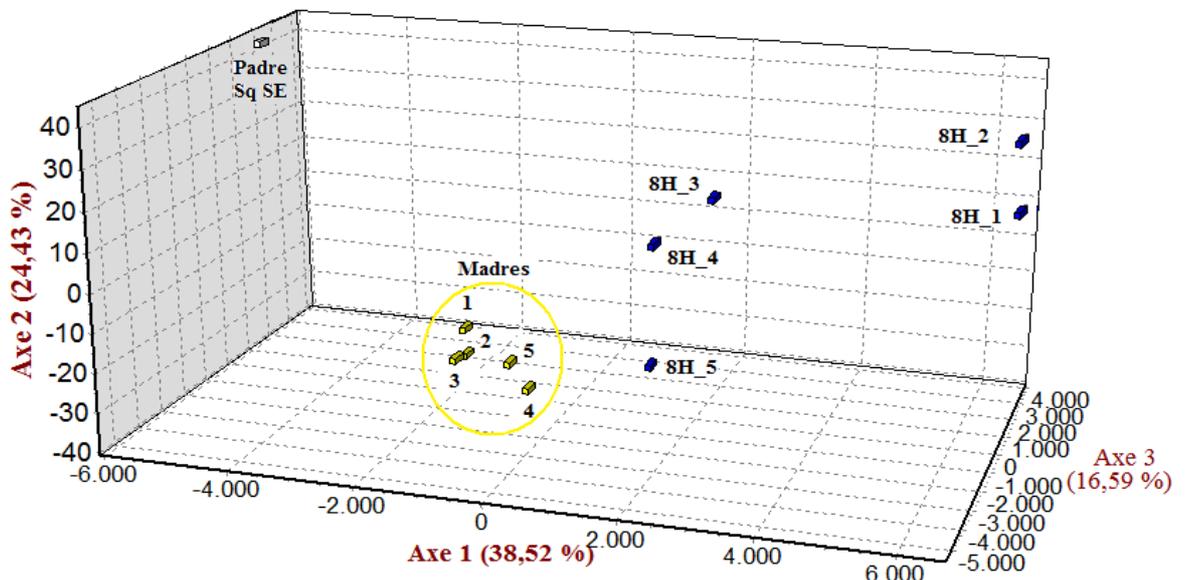
El **híbrido 8H** presentó un análisis de PCA que explica en cuatro componentes principales el 88.89% (Figura 18a) de la variación acumulada, el primer componente explica el 38.52% aportan a



este componente 13 marcadores COS II; al segundo componente de 26.43% aportan 11 marcadores; al tercer componente de 16.59% aportan 9 marcadores; y al cuarto componente de 9.35% aportan 8 marcadores. El PCA en tres dimensiones (Figura 18b) mostró un comportamiento particular dado que los 5 individuos maternos presentaron alta similitud (entre 0,02 y 0,06, Figura 12), se observa que los híbridos 8H\_1 y 8H\_2 son los más alejados, lo cual concuerda con la frecuencia de madre más probable de 0,73, los híbridos 8H\_3, 4 y 5 presentaron mayor similitud y una mayor frecuencia 0,87 (Tabla 5).



a) Valores acumulados de Componentes Principales para el híbrido 8H



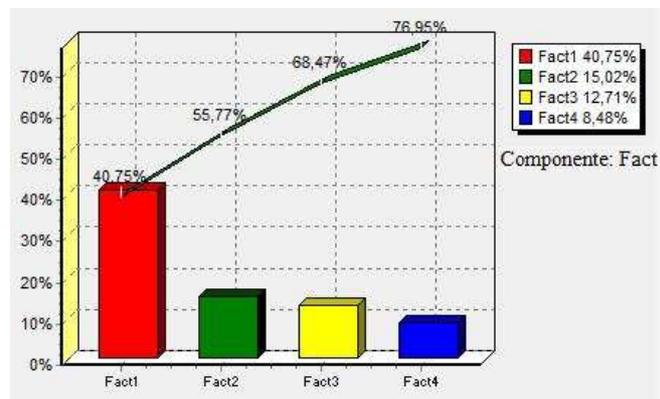
b) PCA en tres dimensiones para el híbrido 8H

Figura 18. Análisis de componentes principales PCA en tres dimensiones híbrido 8H (38x51). b) En amarillo madres Sq 120038 x Sh120051, en azul individuos híbridos 8H, en gris padre Sq SE.

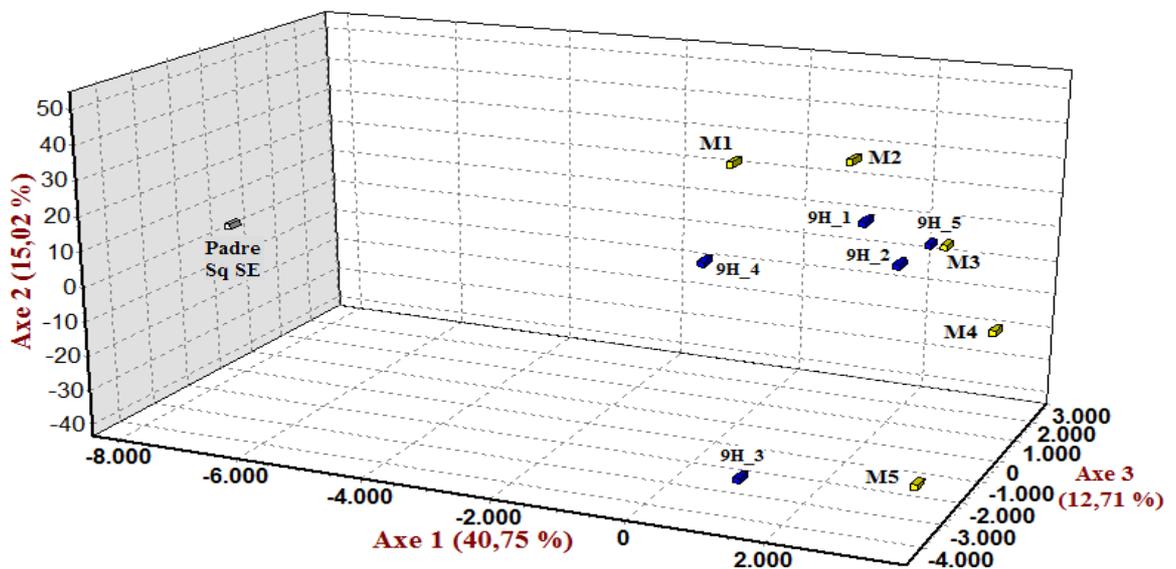
En el **híbrido 9H** el análisis de PCA explica en cuatro componentes principales el 76,95% de la variación acumulada (Figura 19a): el primer componente explica el mayor porcentaje (40,75%),



aportan a este componente 16 marcadores COS II; al segundo componente de 15,02% aportan 9 marcadores; al tercer componente de 12,71% aportan 7 marcadores; y al cuarto componente de 8,48% aportan 6 marcadores. El PCA en tres dimensiones mostró acercamiento de madres a híbridos (Figura 19b); en esta población 9H se observa un comportamiento particular ya que los 5 individuos maternos rodean los individuos hijos bastante cercanos, comportamiento similar al esperado con respecto al híbrido testigo 11H, a los extremos de los individuos híbridos se encuentran ubicados los individuos maternos y paterno. El individuo 9H\_1 de acuerdo al análisis de frecuencia tendría como madres probables las madres 1 a 4 descartando la madre M5, lo cual concuerda con lo observado en el PCA; por otra parte, los individuos 9H\_2, 9H\_3, 9H\_4 y 9H\_5 están ubicadas con frecuencias variables (Tabla 5), pero muy cercanos a los 5 individuos maternos.



a) Valores acumulados de Componentes Principales para el híbrido 9H

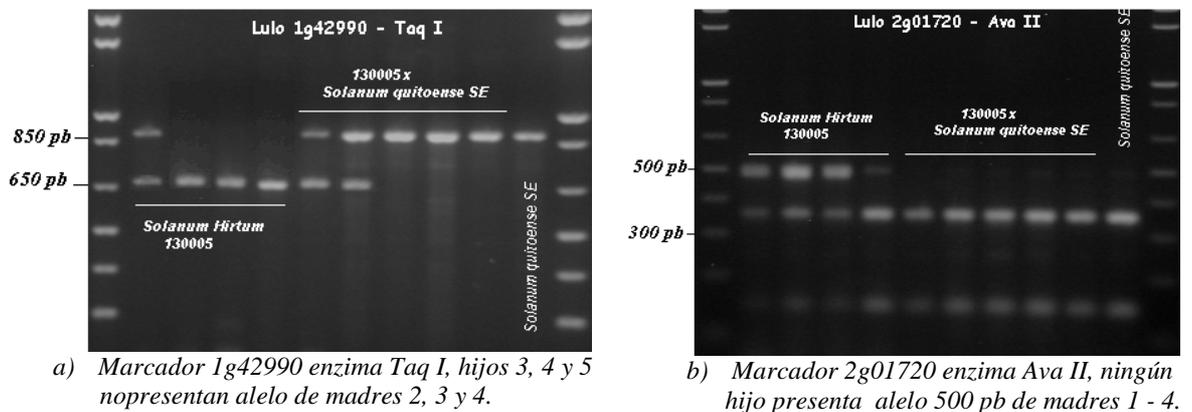


b) PCA en tres dimensiones para el híbrido 9H

Figura 19. Análisis de componentes principales PCA para el híbrido 9H (39x60). b) En amarillo madres Sq 120039 x Sh120060, en azul individuos híbridos 9H, en gris padre Sq SE.



Para el **híbrido 10H**, de los 26 marcadores analizados se encontraron madres que explicaron el 96% del bandeo esperado del cruce, lo cual concuerda con la alta similitud entre individuos maternos *S. hirtum* 130005 y entre los individuos hijos (Figura 15), y los diferentes casos de bandeo presentados destacándose el caso ideal en el que las madres son homocigotas homogéneas AA, el padre homocigoto BB y los hijos F1 AB (Figura 6a) para 15 de los 23 marcadores, como se mencionó en el numeral 4.4.2. Sin embargo, dos de los 23 marcadores COSII seleccionados explican porque no se observó una frecuencia del 100% en las madres de este cruce; el marcador 1g42990 (enzima Taq I) en donde las madres 2, 3 y 4 presentan bandeo homocigoto pero no heredado en los híbridos 3, 4 y 5 (Figura 20a), y el marcador 2g01720 (enzima Ava II) en donde las madres presentan bandeo heterocigoto con una banda a 500 pb no heredada en ninguno de los individuos híbridos (Figura 20b).



**Figura 20. Caso heterogéneo de la población del híbrido 10H para determinación de madre probable. a-b:** Población 10H, de izquierda a derecha; 4 individuos maternos *S. hirtum* 130005, 5 individuos F1 *S. hirtum* 130005 x *S. quitoense* SE y único padre *S. quitoense* SE.

Por otra parte, el híbrido 10H, al presentar un comportamiento similar al híbrido control en el análisis de conglomerados y las características de los tipos de polimorfismos informativos, fue sometido a análisis de componentes principales PCA junto al híbrido control 11H, para hacer una comparación visual de su comportamiento y corroborar los datos de madre probable, (Figura 21).

El análisis de componente principales (PCA) para el híbrido 10H, exhibe un porcentaje de valores acumulados de los cuatro componentes principales del 98,86% (Figura 21a), el primer componente explica el 82,27%, aportan a este componente 19 marcadores COS II de los cuales 15 marcadores son los que presentaron el caso ideal padres AA x BB e hijos AB heterocigotos homogéneos (Figura 6a) y 4 fueron caso de la Figura 6b; al segundo componente principal de 11,69% aportan 6 marcadores donde se ubican todos los marcadores del caso de la Figura 6b; al tercer componente de



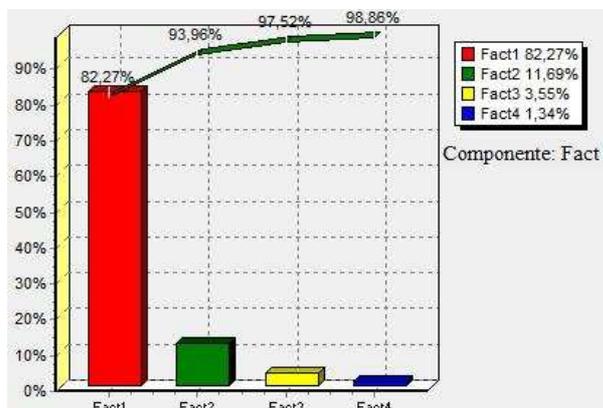
3,55% aportan 5 marcadores; y al cuarto componente de 1,34% aportan 3 marcadores, estos últimos son marcadores monomórficos; este comportamiento indica que los marcadores COSII en el primer componente explican el mayor porcentaje de la varianza total acumulada, resultado que concuerda con el tipo de polimorfismos detectados para identificar este híbrido.

En el PCA de la Figura 21b se observan seis grupos definidos en las tres dimensiones; los tres primeros corresponden al híbrido control 11H, padre (Sq\_03) y madre (Sh\_028); los otros tres grupos pertenecen al híbrido 10H, padre (Sq\_SE) y madre (Sh\_130005). Los parentales por cruce se ubican a cada extremo de la gráfica y en línea recta destacando una marcada distancia genética entre ellos; de forma simétrica y conservando la linealidad entre padres e hijos por cruce, en el centro y cercano al centroide de los ejes se ubican los individuos F1 de cada híbrido. De esta forma, el comportamiento de los dos híbridos es muy similar.

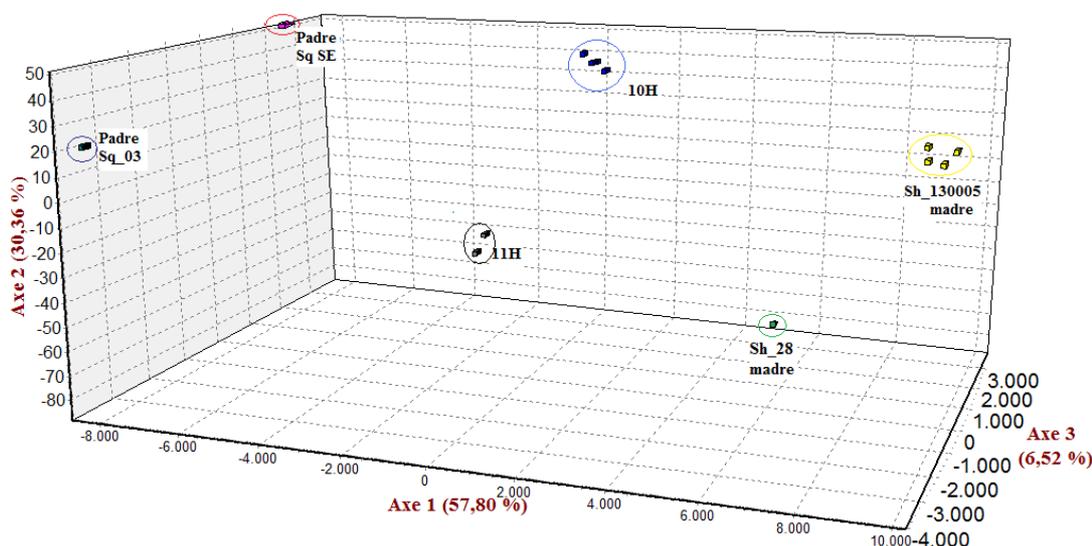
Este análisis concuerda con los dendogramas UPGMA del cruce testigo 11H y del cruce 10H (Figuras 7 y 15). Para el cruce 11H, como se mencionó anteriormente, se conoce exactamente cuáles fueron los dos individuos parentales utilizados. Para el cruce 10H, en el caso del padre *S. quitoense* sin espinas (SE), también se tiene certeza del individuo parental ya que este proviene de una sola planta clonada por lo que las dos plantas analizadas presentan una similitud cercana a cero (ver distancia 0.005 en UPGMA y cercanía en PCA); la madre *S. hirtum* procedente del departamento de Santander (130005) es una accesión que aunque refleja cierta variabilidad, también agrupa los individuos a muy alta similitud (ver distancia 0.065 en UPGMA y cercanía en PCA). Dado que el padre es un clon y la madre contiene genotipos muy similares, no es sorprendente que el comportamiento del cruce 10H sea parecido al presentado por 11H.

El análisis PCA para 11H y 10H también muestra que las accesiones parentales de la misma especie se agrupan más cercanamente entre sí; es decir, los padres *S. quitoense* son más cercanos entre sí, al igual que las madres *S. hirtum* y a su vez *S. quitoense* y *S. hirtum* son más alejados. Esto indica que la confiabilidad de los marcadores COSII es alta, dado que se espera que las dos especies (una cultivada y otra silvestre) sean distantes.

En general es importante destacar que los análisis de PCA para los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H, 9H y 10H confirman los datos y resultados de frecuencias para la determinación de madre probable usada en el presente estudio, así, la esencia de los análisis de paternidad radica en identificar las similitudes y diferencias de los patrones de bandeo de los marcadores moleculares, entre individuos de una población, y por lo tanto se basa en la variación genética que se encuentre a nivel de ADN (Eguiarte, *et al.*, 2007).



a) Valores acumulados de Componentes Principales para el híbrido 10H



b) PCA en tres dimensiones para los híbridos 10H y testigo 11H

Figura 21. Análisis de componentes principales PCA. b) de izquierda a derecha; Abajo: en azul oscuro padre Sq 03, en gris híbrido 11H, en verde madre Sh\_29; Arriba: en rojo padre Sq SE, en azul híbrido 10H, en amarillo madre Sh 130005.

### 9.4.3. Marcadores recomendados para uso inmediato en programas de mejoramiento del C.I. La Selva

A partir de los análisis realizados se encontraron marcadores específicos para seis de los híbridos 1H, 4H, 6H, 8H, 9H y 10H, se destaca entre estos, el híbrido 10H que exhibe un comportamiento similar al híbrido 11H, estos marcadores se esperan encontrar en el primer y segundo componentes principales que aportan en mayor proporción a la variación genética. En la Tabla 6 se relacionan los marcadores recomendados para uso en campo para programas de mejoramiento en curso e



identificación de genotipos. Los marcadores relacionados fueron seleccionados, producto del análisis de conglomerados, análisis de paternidad donde se evaluó el bandeo de los marcadores y el tipo de polimorfismo informativo presentado y el análisis de componentes principales PCA, que constituyó la herramienta para comprobar la eficiencia de estos marcadores.

**Tabla 6.** Marcadores recomendados para identificación de híbridos 1H a 10H

Híbrido	Numero	Porcentaje Varianza acumulada PCA.	Marcador	InDel o Enzima
1H_101x57	7	64.15% (1° y 2° Componentes Principales)	3g10020	InDel
			3g52120	Eco RI
			4g39660	InDel
			2g34470	InDel
			1g46480	Nru I
			2g06530	Rsa I
			2g43770	Msp I
4H_103x71	7	85.00% (1° y 2° Componentes Principales)	3g52120	Eco RI
			4g39660	InDel
			2g01720	AvaII
			4g34215	Cfo I
			1g01350	Taq I
			3g63490	Alu I
			2g43770	InDel
6H_89x71	5	86.41% (1° y 2° Componentes Principales)	3g10020	InDel
			3g52120	Eco RI
			1g46480	Nru I
			2g01720	AvaII
			3g10220	InDel
8H_38x51	3	87.35% (1° y 2° Componentes Principales)	2g01720	Taq I
			3g10020	InDel
			2g34470	InDel
9H 39 x 60	4	73.31% (1° y 2° Componentes Principales)	2g01720	Taq I
			3g10020	InDel
			1g46480	Nru I
			3g27200	Alu I
10H_130005	21	93.96% (1° y 2° Componentes Principales)	2g01720	TaqI
			3g10020	InDel
			3g52120	EcoRI
			3g63490	AluI
			4g39660	InDel
			5g13450	DraI



10H_130005	21	93.96% (1° y 2° Componentes Principales)	5g18580	TaqI
			4g01940	ApoI
			3g62940	ApoI
			4g09040	AluI
			1g46480	NruI
			1g14850	MspI
			4g34215	CfoI
			4g30580	BglII
			4g17380	HaeIII
			3g10220	<b>InDel</b>
			3g52860	Xho I
			2g25950	DdeI
			2g06530	RsaI
			2g43770	MspI
5g09880	TaqI			

#### 9.4.4. Estructura poblacional y heterocigosidad en híbridos de lulo.

En el análisis de estructura poblacional, la evidencia teórica indica la importancia de mantener la variabilidad genética, particularmente porque aumenta las probabilidades de respuestas adaptativas (Holsinger, 2000). Las estimaciones de las diferencias genéticas entre las poblaciones paternas de lulo estudiadas, están descritas a través de los índices de fijación (Tabla 7). Un total de 58 alelos fueron detectados en los parentales de los híbridos 1H a 11H con promedio de 1,67 alelos por locus, en general los locus seleccionados polimórficos por InDel y SNPs amplificaron y detectaron un máximo de tres alelos.

Los promedios de índices de heterocigosidad observada  $H_o$  y heterocigosidad esperada  $H_e$  por locus y por accesión de los parentales son altos (Tabla 7), y presentan un rango de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) por accesión entre 0,07 a 0,67, rango que indica que los parentales para la mayoría de los locus presentan heterocigosidad variable, siendo los de menor valor aquellos que presentan loci homocigotos. El valor promedio del índice de fijación  $F_{IS}$ , para todos los individuos de la población parental fue -0,2196, valor negativo dado que  $H_o$  fue más alto que  $H_e$  ( $0,36 > 0,27$ ), lo que muestra un exceso de heterocigotos presentes en las poblaciones de parentales e indica un efecto de la división poblacional o endogamia nulos, cuando  $F_{IS} \leq 0$  (Hartl, 2005; Eguiarte, *et al*, 2007), lo cual es posible explicar dado que los individuos maternos de los híbridos 1H a 9H son producto de retrocruzamientos interespecíficos - generación BC1, y en el caso de los parentales de los híbridos 10H y testigo 11H, los locus para cada individuo en su mayoría fueron homocigotos pero con bandeo diferencial entre ellos.

El índice  $F_{ST}$ , que se refiere a la diferencia de frecuencias de los alelos entre las poblaciones indica alta diferenciación genética con índices promedio por accesión de 0,2473 y rango entre 0,22 a 0,27 (Tabla 7); sin embargo, al analizar únicamente las accesiones paternas de los híbridos 1H a 9H,  $F_{ST}$



varía considerablemente presentando un índice de 0,09, indicando que estas accesiones presentan entre sí una moderada diferenciación genética.

**Tabla 7.** Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión de padres y madres, híbridos y parentales e híbridos de lulo.

Especies	Promedio y rango de índices <sup>1</sup>						
		H <sub>o</sub> <sup>2</sup>	H <sub>e</sub> <sup>3</sup>	Alelos /locus	F <sub>IS</sub> <sup>4</sup>	F <sub>IT</sub> <sup>5</sup>	F <sub>ST</sub> <sup>6</sup>
<b>S. quitoense y S. hirtum (padres y madres)</b>	Accesión	0,369 (0,07_0,67)	0,27 (0,04_0,41)	1,677 (1 a 3)	-0,219 (-0,297_-0,13)	0,08208 (0,01_0,160)	0,2473 (0,22_0,27)
	Locus	0,353 (0,08_0,62)	0,25 (0,03_0,42)		-0,1987 (-0,04_-0,58)	0,0910 (0,25_0,17)	0,226 (0,23_0,29)
<b>Híbridos 1H a 11H</b>	Accesión	0,572 (0,21_0,88)	0,389 (0,23_0,44)	1,930 (2 a 3)	-0,473 (-0,53_-0,41)	-0,277 (-0,37_-0,16)	0,132 (0,09_0,18)
	Locus	0,563 (0,20_0,89)	0,372 (0,25_0,47)		-0,452 (-0,49_-0,39)	-0,212 (-0,32_-0,17)	0,129 (0,08_0,16)
<b>Parentales e Híbridos 1H a 11H</b>	Accesión	0,460 (0,07_0,47)	0,32 (0,03_0,41)	1,791 (1 a 3)	-0,367 (-0,42_-0,31)	-0,121 (-0,19_-0,04)	0,1802 (0,15_0,21)
	Locus	0,461 (0,07_0,47)	0,324 (0,03_0,44)		-0,452 (-0,49_-0,39)	-0,212 (-0,32_-0,17)	0,129 (0,08_0,16)

<sup>1</sup> El rango se indica entre paréntesis, <sup>2</sup> heterocigosidad observada, <sup>3</sup> heterocigosidad esperada,

<sup>4</sup> Coeficiente de consanguinidad, <sup>5</sup> Medida de la diferenciación genética en poblaciones, <sup>6</sup> Diferencia de frecuencias de los alelos entre las poblaciones

Varios factores influyen en los resultados de estructura poblacional de las accesiones paternas de los materiales de lulo: Uno, la distribución geográfica de estas accesiones dado que éstos individuos provienen de diferentes departamentos del país y otros países como Venezuela y Trinidad (Anexo 1), esto hace que existan amplios rangos de hábitat separados por barreras geográficas, lo que impide el flujo genético entre las accesiones e incrementa la diversidad genética; otro factor, es el modo de reproducción, que para lulo se ha reportado una alta tasa natural de polinización cruzada, aunque también se ha descrito como especie autocompatible (Heiser, 1972; Benítez et al., 1991; Bohs, 1994). En el caso de las accesiones paternas, 1H a 9H, a pesar de presentar estructura poblacional moderada ( $F_{ST} = 0.09$ ) por ser accesiones provenientes de retrocruces, existe alta heterocigosidad  $H_o = 0,499$  y  $H_e = 0,37$ , indicando que estas accesiones provienen de una base genética amplia y brindan la posibilidad de obtener híbridos igualmente amplios.

Estos resultados presentan diferencias en comparación con los obtenidos por Enciso *et al.* (sometido), en la caracterización de 32 accesiones de lulo usando marcadores COSII; en el estudio se encontró un índice promedio de  $F_{IS} = 0,93$  lo que indica una baja heterocigocis dentro de las accesiones; sin embargo, al igual que en este estudio, se observó una alta diferenciación genética entre las subpoblaciones, presentando un  $F_{ST} = 0,94$ , valor muy superior al encontrado en el presente estudio. Estas diferencias pueden ser explicadas por el bajo número de marcadores utilizados en el estudio de Enciso *et al.*, por las diferentes accesiones evaluadas, de las cuales sólo 4 fueron compartidas en los dos estudios (*S. hitum* 130005=06L063, *S. hirtum* 028, *S. quitoense* 03 y



*S. quitoense* SE), y porque la mayoría de los parentales de lulo (madres de 1H a 9H) son cruces entre *S. quitoense* y *S. hirtum*, por lo que se espera mayor flujo de alelos entre poblaciones y menor estructura poblacional. Sin embargo, a pesar de estas diferencias es notable identificar en los dos tipos de estudios una tendencia a la alta estructura poblacional cuando se consideran todos los individuos en el análisis.

En relación con las poblaciones híbridas 1H a 11H, se encontró un total de 59 alelos con un promedio de 1,93 alelos y entre dos y máximo tres alelos por locus, lo cual fue ligeramente superior a lo encontrado para los padres (Tabla 7). Una tendencia similar se reportó en un estudio de identificación de híbridos y pureza genética de arroz en el que utilizaron marcadores microsatélites SSR, donde se encontró de 2 a 3 alelos por locus en toda la población (Nandakumar, et al, 2004).

Los promedios de índices  $H_o$  y  $H_e$  por accesión para el grupo de híbridos son altos, 0,57 y 0,38, respectivamente; valores similares fueron encontrados por locus (Tabla 7), indicio de poblaciones heterocigotas. Los valores de  $F_{IS}$  son negativos, con un promedio de -0,473, es decir la  $H_o$  es mayor a la  $H_e$ , así, se asume que en la población se produce un bajo número de apareamientos endogámicos, lo que corrobora la alta heterocigosidad presente en las poblaciones de los cruces 1H a 11H.

En comparación con los padres, los híbridos presentan una mayor diferencia entre  $H_o$  y  $H_e$  y un índice  $F_{IS}$  que indica mayor heterocigocidad, esto se explica debido a que son accesiones híbridas producto de polinización cruzada entre padres heterocigotos, lo cual disminuye la posibilidad de cruces autocompatibles que es la forma más extrema de endogamia (Eguiarte, et al, 2007). El valor promedio de  $F_{ST}$  0,13, indica una diferenciación genética entre moderada y alta (Frankham, et al, 2004), siendo menor que la observada en los padres ( $F_{ST}$  0,2473), lo cual es esperado al incrementar el índice de heterocigosis en los híbridos, siendo esto el resultado de cruces y retrocruces entre individuos de variada procedencia geográfica y adaptación a diferentes ambientes, por lo que se evidencia que los objetivos del programa de mejoramiento del C.I. La Selva de incrementar la base genética en lulo están siendo cumplidos.

Dado que los híbridos 1H a 9H son producto de retrocruces a la especie cultivada, se comparó con respecto a híbridos F1 producto de cruces controlados, 10H y testigo 11H; la estructura poblacional varía ya que los índices de fijación varían (Anexo 11); esto se debe al tipo de población generada, para cada caso. Así, al comparar el índice  $F_{ST}$  de los híbridos 1H a 9H en relación con los híbridos 10H y 11H, este aumenta de 0,09 a 0,4346, indicando que los primeros presentan menor estructura poblacional al compartir más alelos entre subpoblaciones como resultado de los retrocruces. De igual manera al comparar el  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia) de los híbridos 10H y 11H en relación con los híbridos 1H a 9H éste aumenta de -0,94 a -0,19 dado que la heterocigosidad disminuye a medida que las poblaciones sufren retrocruzamiento, hasta el punto de alcanzar una medida de endogamia, disminuyendo la proporción de heterocigotos (Hartl, 2005).

Finalmente, al realizar un análisis conjunto de la estructura poblacional de accesiones parentales y accesiones híbridas 1H a 11H, se conserva el total de alelos (59) con un promedio de 1,79 alelos por



locus (Tabla 7). Los promedios de índices  $F_{ST}$  de 0,18 y 0,129 por accesión y por locus, respectivamente, indican una gran diferenciación genética y corroboran la tendencia a la estructura de la población total analizada.

### 9.5. Identificación de híbridos de tomate de árbol

Se amplificaron 67 marcadores COSII para dos cruces de tomate de árbol, de los cuales 17 fueron informativos para la identificación de híbridos sumando 3 polimorfismos InDels y 14 polimorfismos detectados por CAPS (Anexo 5); estos fueron utilizados para los análisis estadísticos.

#### 9.5.1. Análisis de conglomerados y componentes principales de tomate de árbol

El análisis de conglomerados utilizando el programa PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1989) y el algoritmo UPGMA (Gronau and Moran, 2007), mostró valores de “bootstrap” de 10000 repeticiones, entre el 85 y el 100%, lo que demuestra un buen soporte estadístico para los grupos (Anexo 12). Este análisis es similar al arrojado por el programa PAUP 4b10 (Swofford, 2004), usando el algoritmo UPGMA; se observan 3 grupos de parentales *S. unilobum* (Su), *S. betaceum* (Sb) y *S. maternum* (Sm), con similitudes dentro de accesiones de 0,07, 0,01 y 0,02, respectivamente, siendo la especie cultivada *S. betaceum* la que mayor similitud genética presenta entre individuos y la especie silvestre *S. unilobum* la de menor similitud genética (Figura 22).

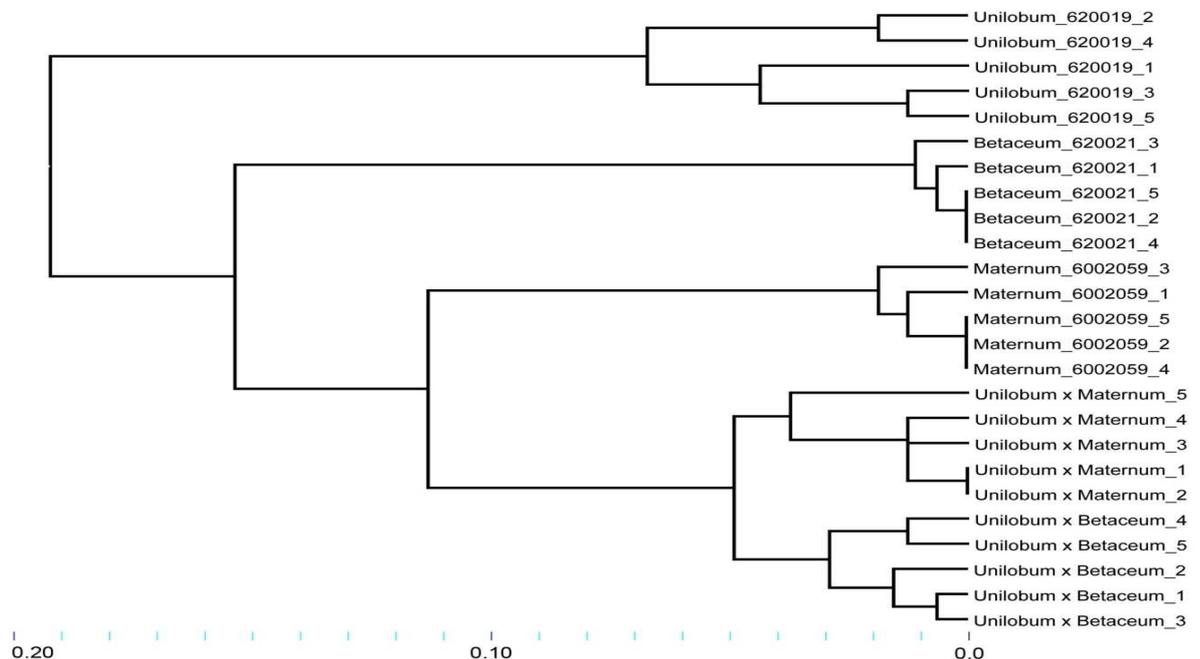
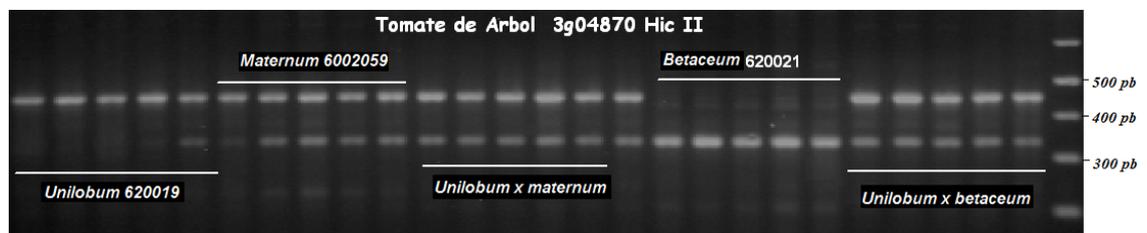


Figura 22. Árbol consenso de padres e híbridos de tomate de árbol y taxa relacionados utilizando el método de agrupamiento UPGMA

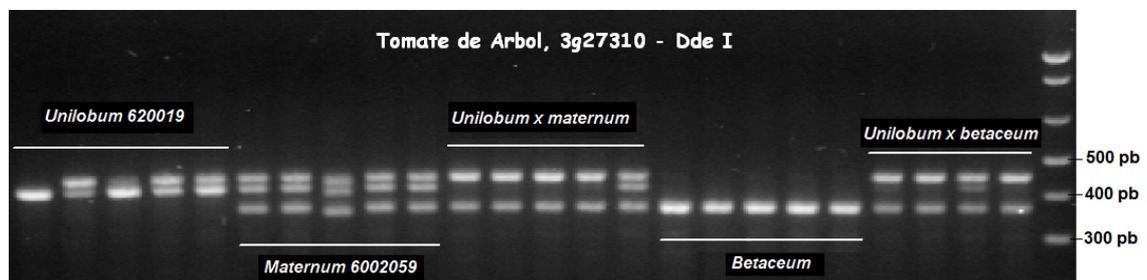


Los híbridos formaron los 2 grupos esperados, uno el híbrido Su x Sm (*S. unilobum* x *S. maternum*) y otro el Su x Sb (*S. unilobum* x *S. betaceum*) con una distancia de 0,05 entre ellos; la similitud genética entre individuos de la misma accesión presentó índices entre 0 y 0,04, lo cual permite deducir una alta homogeneidad genética dentro de cada población híbrida, e indica que los 17 marcadores son aptos para la identificación de las mismas.

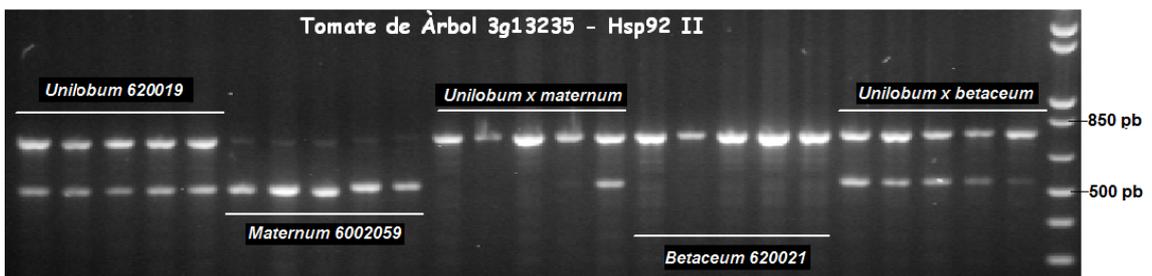
El híbrido desarrollado entre el relativo silvestre *S. unilobum* y la especie cultivada *S. betaceum*, presentó 10 marcadores del tipo AA/BB en padres y AB en F1 (Figura 23a). Para el híbrido *S. unilobum* x *S. maternum* (Su x Sm), se encontraron 6 marcadores de este tipo. El individuo 5 del híbrido Su x Sm se diferenció en 4 de los 17 marcadores COSII en relación con los demás, lo cual está relacionado con la menor similitud (0,04) de este individuo en el grupo (Figura 23b y c).



a) Caso AA/BB en padres y AB en F1, híbrido Su x Sb, marcador 3g04870 enzima Hinc II



b) Polimorfismos detectados en tomate de árbol usando el marcador 3g27310 enzima Dde I



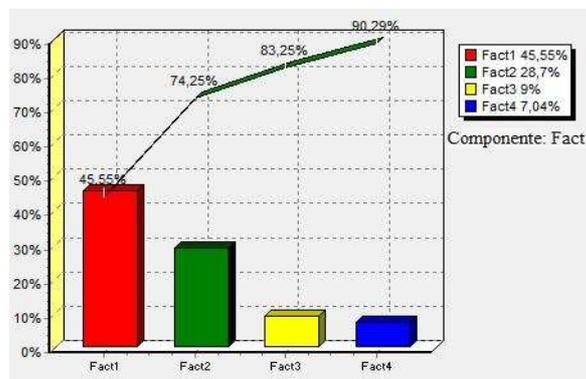
c) Polimorfismos detectados en tomate de árbol usando el marcador 3g13310 enzima Hsp92 II

**Figura 23.** Ejemplos de visualización de marcadores COSII en gel de agarosa al 2% para identificación de las dos poblaciones híbridas de tomate de árbol y taxa relacionados.

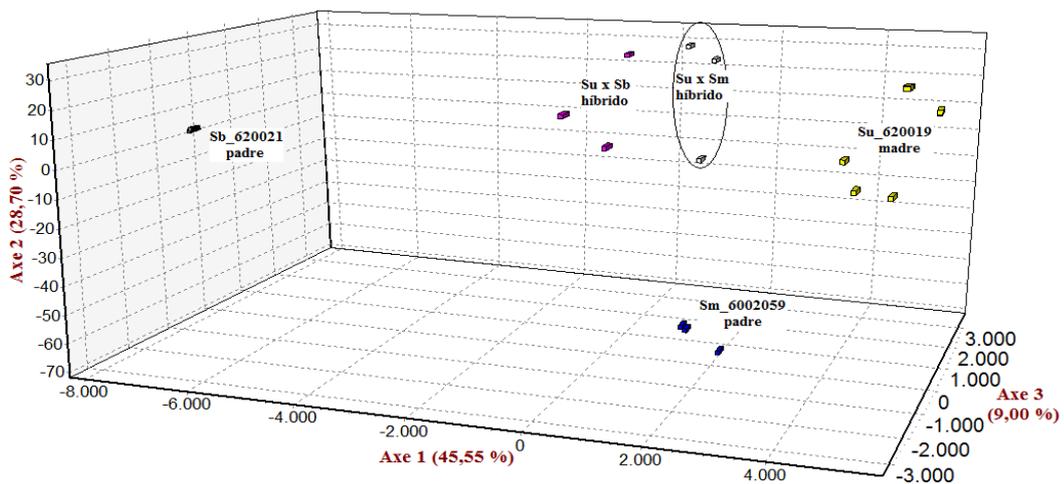


Adicionalmente, se observó mayor heterogeneidad en la población *S. unilobum* en comparación con *S. maternum* y *S. betaceum* (Figura 23a y 23b), lo cual concuerda con mayor distancia genética de *S. unilobum* en UPGMA (Figura 22).

El análisis de componentes principales que permite ver en tres dimensiones la variabilidad genética entre las accesiones y entre los individuos de cada accesión de los híbridos Su x Sb y Su x Sm, presentó cuatro componentes principales que explican el 90,29% de la varianza total acumulada entre estos cruces (Figura 24a); el primer componente aporta el 45,55% con 14 marcadores, de los cuales 6 marcadores son los que presentaron el caso ideal padres AA x BB e hijos AB (Figura 5a) y en 9 las accesiones paternas e híbridos fueron heterogéneas (Figura 6f); al segundo componente de 28,7% aportan 10 marcadores que presentan poblaciones heterogéneas con tamaños de banda similar; el tercer y cuarto componentes explican el 9,0 y 7,04% de varianza respectivamente, con 5 y 4 marcadores. Tanto loci como accesiones aportan de forma similar en los cuatro componentes.



a) Valores acumulados de Componentes Principales en poblaciones de tomate de árbol



b) PCA en tres dimensiones para parentales e híbridos de tomate de árbol

**Figura 24.** Análisis de componentes principales (PCA) para los individuos paternos, maternos e híbridos Su x Sb y Su x Sm.



El PCA (Figura 24b) muestra grupos bien definidos en las tres dimensiones cada uno correspondiente a los parentales e híbridos; se observa gran similitud genética entre los individuos de cada accesión y con ello se presenta sobreposición de algunos individuos; en el caso de *S. betaceum* se observa una única ubicación en el diagrama debido a que los individuos son prácticamente idénticos, *S. maternum* presentó tres ubicaciones diferentes dado que los individuos 2, 4 y 5 se comportaron de forma idéntica, el híbrido Su x Sm presentó 2 individuos idénticos y se observa claramente que el individuo 5 es el más alejado y en el híbrido Su x Sb los individuos 4, 5 y 1, 3 presentan similitudes cercanas a 0 entre ellos por lo cual también se sobreponen. De forma general los híbridos se ubican entre sus parentales, comportamiento esperado para una población híbrida. El comportamiento de poblaciones paternas que se ubican a los extremos de la gráfica PCA se explica debido a que existe gran variación genética entre ellos, y concuerda con los tres grupos observados en el análisis de conglomerados, UPGMA.

### 9.5.2. Análisis de padres probables en tomate de árbol

La Tabla 8 muestra el análisis de parentales más probables en tomate de árbol. Para los híbridos *S. unilobum* x *S. betaceum* se encontró que la totalidad de los padres evaluados podrían explicar el 100% del bandeo esperado. Este resultado puede ser explicado ya que los padres se encuentran a una alta similitud genética con índices de 0 a 0,015 (Figura 22). De otra parte, los resultados sugieren que una única madre (5) es parental de tres híbridos de este cruce (1, 3 y 4), ya que explica el 100% del bandeo esperado. Para los dos híbridos restantes 2 y 5, ninguna madre explicó el 100% del bandeo esperado; sin embargo, el individuo materno 5 presentó un porcentaje del 95% para el híbrido 2 y el 90% para el híbrido 5 (Tabla 8).

Tabla 8. Madres más probables en cruces de Tomate de árbol <sup>a</sup>.

Su x Sm (14 marcadores)									Su x Sb (16 marcadores)						
Híbrido Su x Sm	Su (Madres)					Sm (Padres)			Híbrido Su x Sb	Su (Madre)					Sb (Padres)
	1	2	3	4	5	1	3	2, 4 y 5		1	2	3	4	5	1,2,3,4 y 5
1	0,83	0,89	0,89	0,83	0,94	0,94	0,94	1,0	1	0,79	0,79	0,95	0,84	1,0	1,0
2	0,83	0,89	0,89	0,83	0,94	0,94	0,94		2	0,84	0,79	0,90	0,79	0,95	
3	0,83	0,77	0,77	0,72	0,83	0,88	1,0	0,94	3	0,79	0,74	0,95	0,84	1,0	
4	0,89	0,83	0,83	0,77	0,88	0,94	0,94	1,0	4	0,84	0,73	0,95	0,84	1,0	
5	0,83	0,83	0,94	0,88	1,0	0,94	0,94		5	0,84	0,84	0,84	0,84	0,90	

<sup>a</sup> Su= *S. unilobum*, Sm= *S. maternum*, Sb= *S. betaceum*. Se analizaron 5 individuos para todas las poblaciones de padres e hijos.

El porcentaje que explica la paternidad del cruce *S. unilobum* x *S. maternum* varió entre el 88% y el 100%. Los resultados sugieren que los padres más probables para los híbridos 1, 2, 4 y 5 son los padres 2, 4 y 5 quienes explican el 100% del bandeo (Tabla 12). Así mismo, los resultados sugieren



que el padre del híbrido 3 es el padre 3 explicando el 100% del bandeo esperado. A diferencia de los individuos del cruce *S. unilobum* x *S. betaceum*, sólo en un caso, una de las madres explicó el 100% del bandeo esperado (para el individuo 5, la madre 5). Para los híbridos 1 y 2, la madre que mejor explica el bandeo es el individuo 5, con porcentajes del 94%. De otra parte, para el híbrido 4 la madre que mejor explica el bandeo es la número 1 con el 89%; sin embargo, no se deben descartar otras madres como la 5, con porcentajes muy cercanos (88%).

Los porcentajes o frecuencias de parentales probables en tomate de árbol son mucho más altos que en lulo. Esto podría ser explicado por las altas similitudes genéticas encontradas dentro de las accesiones de parentales evaluadas. Este resultado es similar al obtenido por Enciso *et al.* (sometido), quienes encontraron que tomate de árbol presentó un mayor déficit de heterocigotos dentro de accesiones (subpoblaciones) con mayor fijación de alelos y una alta diferenciación genética entre ellas en comparación con lulo.

### 9.5.3. Marcadores recomendados para uso inmediato en programas de mejoramiento

En el PCA realizado con todas las accesiones y loci de tomate de árbol se encontraron altos porcentajes que explican la variabilidad en los dos primeros componentes principales; con respecto a esta información, se escogieron aquellos marcadores que aportaron en el primer componente principal y algunos del segundo, de tal forma que al realizar un nuevo análisis de PCA con los marcadores elegidos el porcentaje acumulado en CP y la distribución espacial de los individuos fue superior al 90%.

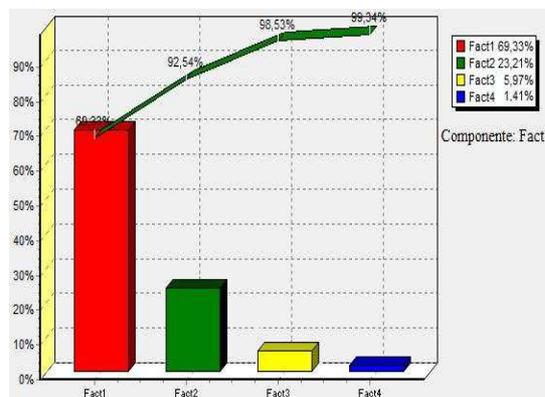
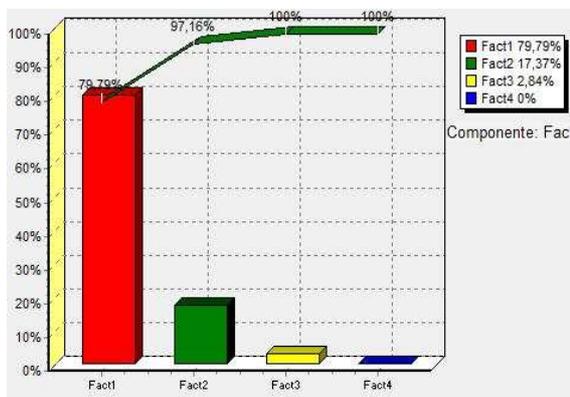
Para el híbrido Su x Sm se eligieron un total de 6 marcadores y para el híbrido Su x Sb se eligieron 10 marcadores COSII (Tabla 9), que exhiben un comportamiento similar al híbrido control 11H, con los cuales se obtuvo un porcentaje de varianza acumulada en los dos primeros componentes principales de 97,16% y 92,54% respectivamente (Figura 25a) y un PCA en tres dimensiones donde la accesión materna *S. unilobum* se encuentra ubicada sobre el eje 1 muy cerca al eje 3 (extremo derecho), la accesión paterna *S. maternum* y la accesión paterna *S. betaceum*, respectivamente, se encuentran sobre el eje 1 en el extremo del eje 2, formando una línea recta con una alta distancia genética entre ellas; en el centro se encuentran los individuos F1 de cada cruce, que comparten la mitad de la información del padre y la mitad de la madre (Figura 25a y 25b). Estos análisis concuerdan con UPGMA donde los individuos de la especie cultivada *S. betaceum* son menos variables que los de las especies silvestres *S. unilobum* y *S. materna*, con *S. unilobum* presentado la mayor variabilidad, lo cual indica la alta confiabilidad de los marcadores en relación con lo esperado para especies silvestres vs cultivadas.

Adicionalmente, los marcadores encontrados para cada uno de los híbridos de tomate de árbol permiten identificarlos de una forma acertada, esto se corrobora con el resultado obtenido en el PCA, que arrojó porcentajes altamente significativos de varianza acumulada.

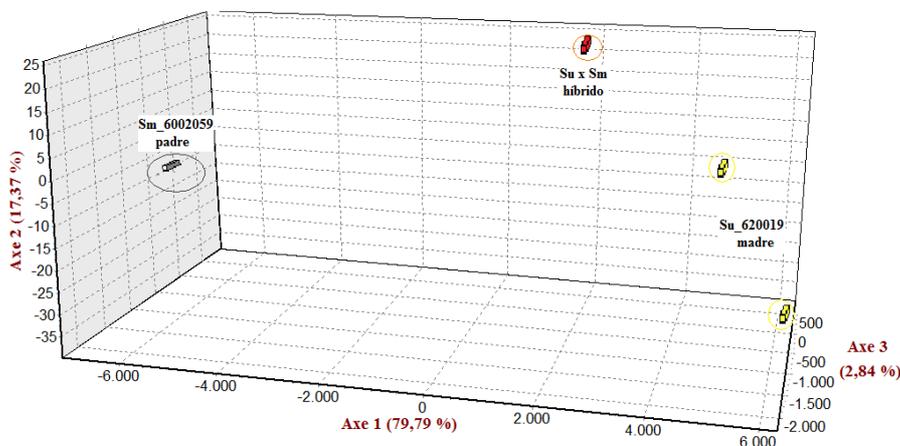


**Tabla 9.** Marcadores recomendados para identificación de híbridos Tomate de árbol

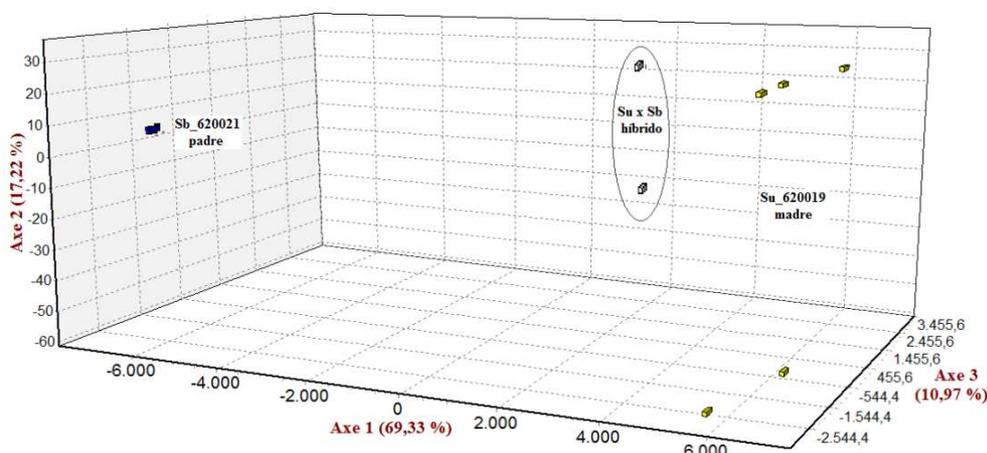
Híbrido	Numero	Porcentaje Varianza acumulada PCA	Marcador	Enzima
Su x Sm	6	97.16% (1 y 2 componentes principales)	1g11430	Hsp92II
			4g14110	InDel
			1g23890	Cfo I
			3g55360	Taq I
			4g00090	InDel
			3g08030	BamHI
Su x Sb	10	92.54% (1 y 2 componentes principales)	5g13450	Dra I
			3g62130	Hsp92II
			1g11430	Hsp92II
			3g27310	DdeI
			4g14110	InDel
			1g23890	Cfo I
			3g04870	Hinc II
			3g55360	InDel
			4g00090	InDel
			3g08030	BamHI



a) Valores acumulados de Componentes Principales de Híbridos Su x Sm y Su x Sb



b) PCA, híbrido Su x Sm utilizando 6 marcadores de tipo AA/BB en padres y AB en F1



c) PCA, Híbrido Su x Sb utilizando 10 marcadores de tipo AA/BB en padres y AB en F1

Figura 25. PCA con marcadores COSII seleccionados en tomate de árbol.

#### 4.5.4. Análisis de estructura poblacional y variabilidad de híbridos de tomate de árbol

Un total de 36 alelos fueron detectados a lo largo de los dos cruces de tomate de árbol Su x Sm y Su x Sb y sus respectivos parentales, con un promedio de 1,68 y un rango entre 1 a 3 alelos por locus (Tabla 10).

Los promedios de índices de heterocigosidad  $H_o$  y  $H_e$ , por accesión para los dos híbridos de tomate de árbol fueron altos, 0,59 y 0,31, respectivamente, presentandose de manera similar por locus; estos resultados se corroboran con el coeficiente de consanguinidad  $F_{IS}$  que dio valores negativos en promedio -0,84, indicando una alta heterocigosidad de individuos dentro de las poblaciones para los loci estudiados, el valor negativo de  $F_{IS}$  está dado porque la heterocigosidad observada es mayor a la heterocigosidad esperada ( $0,59 > 0,31$ ), lo que muestra un exceso de heterocigotos presentes en la



población, producto de un cruzamiento interespecífico entre dos genotipos heterocigotos. El valor  $F_{ST}$  0,37 indica una diferenciación genética muy grande (Frankham, et al, 2004), la cual fue mayor en comparación con lulo ( $F_{ST}$  0,18, Tabla 10) coincidiendo con el estudio de Enciso *et al.* (sometido), aunque en este último caso la diferenciación entre subpoblaciones fue mucho mayor ( $F_{ST}$  0,99), posiblemente dado por el número de marcadores y diferencias en las poblaciones analizadas.

Al igual que en lulo, esta alta diferenciación entre subpoblaciones en tomate de árbol se pueden explicar por las barreras geográficas, ya que las especies *S. unilobum* y *S. maternum*, provienen de Bolivia y son genotipos silvestres con una alta riqueza alélica y adaptación a condiciones ambientales específicas, y la especie comercial *S. betaceum* colectada en Colombia, posee características con un grado de domesticación significativo (Lobo, 2006); por lo tanto, estas barreras geográficas acompañado de condiciones ambientales diferentes pueden reducir el flujo génico. Adicional a esto, se comparte con lulo el tipo de reproducción sexual por ser una especie alógama con cierta tendencia a la andromonoecia y a autopolinizarse (Heiser, 1972; Benítez *et al.*, 1991; Bohs, 1994).

**Tabla 10.** Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión de poblaciones híbridas de tomate de árbol

Especies	Promedio y rango de índices <sup>1</sup>						
		$H_o$ <sup>2</sup>	$H_e$ <sup>3</sup>	Alelos /locus	$F_{IS}$ <sup>4</sup>	$F_{IT}$ <sup>5</sup>	$F_{ST}$ <sup>6</sup>
Híbridos tomate de árbol	Acc.	0,591 (0,09_0,63)	0,316 (0,06_0,47)	1,68 (1-3)	-0,84 (-0,95_-0,68)	-0,15 (-0,31_-0,01)	0,37 (0,30_0,44)
	Locus	0,59 (0,09_0,60)	0,32 (0,06_0,47)		-0,80 (-0,90_-0,68)	-0,17 (-0,31_-0,01)	0,34 (0,30_0,44)

<sup>1</sup>El rango se indica entre paréntesis, <sup>2</sup>heterocigosidad observada, <sup>3</sup>heterocigosidad esperada, <sup>4</sup>Coefficiente de consanguinidad, <sup>5</sup>Medida de la diferenciación genética en poblaciones, <sup>6</sup>Diferencia de frecuencias de los alelos entre las poblaciones

#### 4.6. Inferencias generales del estudio

Los resultados obtenidos en el presente trabajo tanto para las poblaciones de híbridos de lulo, como híbridos de tomate de árbol indican que los marcadores moleculares COSII son especialmente valiosos para la identificación de híbridos en estas dos especies Solanaceas, por varias razones; su naturaleza codominante, que permite identificar SNPs *in silico* o en laboratorio por la técnica CAPS; su naturaleza multiloci, que permite identificar inserciones y deleciones (InDels); se pueden considerar altamente polimórficos, reproducibles; se encuentran distribuidos en el genoma de la especie modelo tomate (*S. lycopersicum*), lo cual permite realizar estudios comparativos con genomas más desarrollados e incrementar la eficiencia de los programas de mejoramiento; generan patrones de bandeo en geles fácilmente interpretables al ser en su mayoría de copia única por tratarse de genes ortólogos; adicionalmente, al provenir de genes expresados (ESTs) derivados de



otras especies solanáceas cercanas permiten evaluar la diversidad funcional de las colecciones y eventualmente estar influenciando características de interés agronómico o económico de los cultivos; estas características permiten que este tipo de marcadores generen información específica para diferenciar accesiones e individuos en una población.

Los marcadores de COSII han mostrado ser útiles en diferentes aspectos, incluyendo diversidad, filogenia y genómica comparativa (Wu et al, 2006; 2009a y 2009b) y tienen un alto potencial en selección asistida por marcadores o por genómica. En lulo y tomate de árbol, en el estudio preliminar de Enciso *et al.* (sometido) se presentaron resultados similares en algunos aspectos con el presente trabajo, como alta diferenciación genética medida con el índice  $F_{ST}$ , aunque se encontraron índices mayores en el primero; adicionalmente Enciso *et al.*, reportaron coeficientes de endogamia  $F_{IS}$  positivos relacionados con fijación de alelos y alta homocigosis, contrario a este trabajo, donde se observó alta heterocigosis con  $F_{IS}$  negativos; aspecto que pudo ser influido por el número de marcadores analizados y el tipo de poblaciones bajo estudio (la mayoría de poblaciones del presente estudio son productos de cruces, lo que implica flujo de alelos y baja homocigosis). Los marcadores COSII también han sido utilizados para estudios de diversidad basados en secuencia de tomate (Nakitandwe et al., 2007; Van Deynze et al., 2007) y, en comparación con otros dos marcadores (arbitrarios y ESTs), los COSII han dado estimaciones similares de polimorfismo (Labate *et al.*, 2009).

Por otra parte el estudio del híbrido testigo 11H, que se consideró como el parámetro de comparación más adecuado, teniendo en cuenta que es el primer estudio de identificación de híbridos usando marcadores moleculares COSII, fue bastante enriquecedor en el sentido que permitió determinar el comportamiento y los parámetros fundamentales de lo esperado en cuanto a variabilidad genética, estructura poblacional, frecuencias de paternidad, usando herramientas como el programa GENETIX 3.5, útil en el estudio de marcadores de tipo codominante.

El presente trabajo puede por tanto considerarse como la primera aproximación a la estimación de parámetros que deben cumplir diferentes poblaciones híbridas de la familia Solanácea, usando marcadores COSII. Otros marcadores como los microsatélites, que tienen características similares y diferenciales en relación con los COSII, pueden también ser adecuados para la identificación de híbridos. Los parámetros estimados en el presente estudio se pueden resumir en tres pasos: Primero, análisis de conglomerados, donde se espera que las accesiones parentales e híbridos formen grupos diferenciables. Segundo, el análisis PCA es útil para confirmar los agrupamientos del análisis de conglomerados y las distancias genéticas, resultando útil para corroborar los análisis de frecuencias de paternidad. Tercero, PCA, al explicar la varianza total acumulable permitió discriminar y seleccionar marcadores eficientes para la identificación de híbridos ubicados en el primer y segundo componente principal, el cual se confirmó al realizar un nuevo análisis PCA con los marcadores seleccionados en el que la varianza total acumulada se ubicó en el primer componente con un porcentaje mayor a 80%. Este último paso es importante, ya que PCA posee una alta correlación con la varianza demostrando una alta potencialidad para usarlo en propósitos de selección, de



acuerdo a estudios realizados en mejoramiento genético en selección de bovinos (Ruales y Manrique, 2007).

Por otro lado, se sugiere a los programas de mejoramiento que al trabajar con especies heterogéneas y heterocigotas, como lulo y tomate de árbol y si se desea certificar híbridos molecularmente y de forma masiva, la manera más eficiente de lograrlo con marcadores moleculares es llevando registro de cada planta que se utiliza como parental (no solamente de la accesión) y en lo posible clonarla (como se demostró para el híbrido 11H), lo que facilita detectar aciertos en la polinización o individuos producto de autopolinización, los cuales se podrían descartar en estados tempranos del desarrollo ahorrando tiempo y dinero.



## 10. CONCLUSIONES

- Con el análisis de secuencias de los padres *S. hirtum* 028 y *S. quitoense* 03 de lulo y accesiones *S. unilobum* y *S. betaceum* de tomate de árbol, se seleccionaron 105 y 38 marcadores COSII, respectivamente, por originar productos de amplificación de banda simple y por presentar polimorfismos *in silico* entre InDels y SNPs (luego convertidos a CAPS).
- Al evaluar en laboratorio los marcadores polimórficos seleccionados *in silico* en diez poblaciones híbridas de lulo y dos de tomate de árbol, se encontraron loci entre polimórficos directos (debidos a InDels) y CAPS, con porcentajes de eficiencia polimórfica del 43,33% y 42,1%, del total evaluado *in silico*, por lo cual la metodología e información obtenida *in silico* usando marcadores COS II, se puede extrapolar al laboratorio y es relativamente útil para encontrar polimorfismos en diferentes accesiones de la misma especie.
- Los análisis de conglomerados y PCA permitieron detectar para lulo y tomate de árbol grupos claramente definidos de padres e híbridos, que presentaron alta similitud entre individuos y diferenciación entre accesiones. Los análisis de PCA mostraron la distribución espacial que confirmó los resultados de frecuencias para la determinación de madres probables; al mismo tiempo, PCA al explicar la varianza total acumulable, permitió discriminar y seleccionar marcadores eficientes para la identificación de estos híbridos, ubicados en el primer y segundo componente principal. Resultados que favorecen la utilización de PCA como una herramienta tanto para la confirmación de paternidad como la selección de marcadores.
- Lulo y tomate de árbol presentaron una tendencia a la alta estructura poblacional o alta diferenciación genética, así como altos índices de heterocigocidad dentro y entre poblaciones, y exceso de heterocigotos que se asumen como bajo número de apareamientos endogámicos; comportamiento esperado en poblaciones híbridas interespecíficas F1 y BC1 seleccionadas y contraladas en campo.
- Los marcadores COSII son útiles para identificar híbridos por su naturaleza codominante, son marcadores altamente polimórficos, reproducibles y generan patrones de bandedo en geles fácilmente interpretables, características que permiten confirmar el éxito de un cruce entre parentales contrastantes, convirtiéndose en una estrategia para apoyar y hacer más eficientes los programas de mejoramiento convencional en especies solanáceas como lulo y tomate de árbol, e incluso en otras especies de la familia por su carácter ortólogo.



## 11. RECOMENDACIONES

- La confirmación de la naturaleza híbrida usando marcadores COSII sería importante, práctica y viable en cultivos perennes o de prolongado ciclo reproductivo como los frutales lulo y tomate de árbol, lo cual permitiría la eliminación de plantas dudosas y podría ahorrar mano de obra, espacio y costo, en futuros programas de mejoramiento.
- Se recomienda a los programas de mejoramiento que al trabajar con especies heterogéneas y heterocigotas, la manera más estricta de certificar híbridos molecularmente es llevando registro de cada planta que se utiliza como parental. En el caso de cruces entre accesiones donde se desconoce el individuo parental (i.e. 1H a 9H) es conveniente analizar una muestra mayor o la totalidad de los parentales probables, para seleccionar con mayor certeza aquellos que mejor expliquen los híbridos obtenidos.
- Para certificar genotipos molecularmente es conveniente realizar un seguimiento de identificación molecular de los mismos desde el inicio de un programa de mejoramiento, lo que fortalecería la certificación de los genotipos desarrollados.
- Se recomienda a futuros programas de mejoramiento seleccionar preferiblemente marcadores que presenten bandeo claramente distinguible, como en el caso diferencial y homocigoto en padres (AA/BB) y homogéneo heterocigoto en híbridos F1(AB), lo cual facilitará el seguimiento e identificación de materiales de forma acertada evitando escapes por autopolinización o polinización cruzada con genotipos no deseados, y adicionalmente complementar la identificación del material con otros marcadores moleculares preferiblemente de tipo codominante como los microsatélites, en especial en individuos producto de retrocruces.
- Continuar elaborando estudios que sigan los parámetros establecidos en el presente estudio, con diferentes tipos de marcadores codominantes.



## BIBLIOGRAFIA

- Agronet, 2009. <http://www.agronet.gov.co/agronetweb/AnalisisEstadisticas/tabid/73/Default.aspx>. Reporte Rendimiento y Producción Nacional por Producto. Tomate de árbol y Lulo, 1992 a 2007. pdf 18 p. (Junio 13 de 2009).
- Arias, D. y P. Rocha. 2004. Análisis de diversidad genética en materiales tolerantes y susceptibles a la pudrición de cogollo en palma de aceite mediante marcadores moleculares. *Palmas (Colombia)*, 25(3):11-27.
- Belkhir, K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F., 1996-2004. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Benitez, A., Valencia, J., Estrada, E., and Baena, D., (1991) Phenotypic characterization of certain accessions in the lulo (*Solanum quitoense*) germplasm bank. In: Hawkes J, Lester RN, Nee M and Estrada N (eds) *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London, pp 437-450.
- Bermeo, A., 2005. Caracterización de la variabilidad morfológica y algunos atributos químicos de los frutos en una colección de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. Trabajo de grado Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Facultad de ciencias agropecuarias. p. 2 - 28.
- Bernal, J., Diaz, C., Amaya, A. y Vanegas, F. 2003. Generalidades del cultivo de tomate de árbol. En: Bernal, J. y Días, C. (Compiladores). 2003. Tecnología para el cultivo del Tomate de Árbol. Manual Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Bogotá D. C., Colombia. pg. 19 y 20.
- Bernal, J., Lobo M., y Londoño M., 1998. Documento de presentación del material "Lulo La Selva". Corpoica, Rionegro, Antioquia, Colombia. 77 p.
- Bohs L. and Olstead, R., 1999. A reassessment of *Normandia* and *Triguera* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 228:33-48.
- Bohs L., 1994. *Flora Neotropica*; *Cyphomandra* (Solanaceae). New York Botanical Garden Press on behalf of Organization for Flora Neotropica. New York, USA. Volume 63, pp. 1-175.
- Bohs L., 1995, Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and Its Species to *Solanum*. *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*. 44(4): 583-587.
- Bohs, L. 1988. The Colombian species of *Cyphomandra*. *Revista Colombiana de Ciencias Exactas*. 16: pp. 66-75.
- Bohs, L. 1989. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany*, 43(2):143-163.
- Bohs, L. 1991. Crossing studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and their systematic and evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 78(12): pp. 1683-1693.
- Bohs, L., 2004. Achloroplast DNA phylogeny of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. *Systematic Botany*. 29(1):177-187.



- Bohs, L. 2007. Phylogeny of the Cyphomandra clade of the genus *Solanum* (Solanaceae) based on ITS sequence data. *Taxon* 56:1012–1026.
- Calixto-Botía, I., 2008. Evaluación de polimorfismos mediante marcadores COSII de una población de *Solanum phureja* segregante para resistencia a *Phytophthora infestans*. Tesis de grado. Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC. Tunja, Colombia. 79 p.
- Cavalli-Sforza, LL. and Edwards, AW., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am J Hum Gen* 19:233-257.
- Corporación Colombia Internacional (CCI), 2005. Perfil de Producto. Inteligencia de mercados. Lulo generalidades del producto. Bogotá, Colombia. pdf. 13 p. Disponible en: <http://www.cci.org.co>. ISSN 0123-1338.
- Cun-hong, P., Ai-hong L., Zheng-yuan, D., Hong-xi, Z., Guang-qing, L., Zi-bin, W., Yu-yin, M., Yue-jun, Y., Ya-fang, Z., Shi-min, Z., Zong-xiang, C., Xue-biao, P., 2008. InDel and SNP Markers and Their Applications in Map-based Cloning of Rice Genes. *Rice Science*. 15(4): 251-258.
- De Vicente MC., Lopez, C., and Fulton T., 2004. Genetic diversity analysis with molecular marker data. Vol 2. Learning module. CD-ROM. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, Universidad Nacional Agraria 'La Molina', Peru, and Institute for Genomic Diversity, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Dinu, I., Hayes R., Kynast, R., and Phillips, R., 2005. Novel inter-series hybrids in *Solanum* section Petota. *Theoretical Applie Genetics*. 110: 403-415.
- Dueñas, F., Martínez, Y., Álvarez, M., Moya, C., Peteira, B., Arias, Y., Diez, M.J., Hanson, P., y Shagarodsky, T., 2008. Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la enfermedad. *Cultivos Tropicales*. 29(1): 53-60.
- Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre X. (Compiladores), 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), México D. F., 571 p.
- Enciso, F., Martínez R., Lobo, and Barrero, L.S., Genetic variation of the Solanaceae fruited species lulo and tree tomato revealed by Conserved Ortholog (COSII) markers. *Genetics and Molecular Biology*, submitted.
- FAO, 2006. Fichas técnicas, productos frescos y procesados. Tomate de árbol. Online: <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ae620s/Pfrescos/TOMATEDEARBOL.HTM#a3>. y /LULO.HTM#a3 (Junio, 2009).
- Frankham, R., Ballou, J., and Briscoe, D., 2004. A primer of Conservation Genetics. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP: Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Ferreira, M., y Grattapaglia, D., 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Primera edición. EMBRAMPA, CENARGEN. Brasilia D. F., Brasil. 220 p.
- Fory, P., Sánchez, I., Bohórquez, A., Ramírez, H., Medina, C., y Lobo, M., Submitted. Genetic variability of a colombian collection of lulo (*Solanum quitoense* Lam.) and related species of section Lasiocarpa. *Plant Genetic Resources Newsletters*.



- García, P., García, R., Medina, C. y Lobo, M. 2002. Variabilidad Morfológica cualitativa en una colección de tomate de árbol *Cyphomandra (Solanum) betacea (betaceum)*. En: Seminario Nacional de frutales de clima frío moderado. Corpoica, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. pg. 49-54.
- Gepts, P., 2002. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. *Crop Science*. 42(6): 1780-1790.
- Gordon, D., Abjian, Ch., and Green, Ph., 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res*. 1998 8: 195-202.
- Gronau, I., and Moran Sh., 2007. Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. *Information Processing Letters* 104:205–210
- Griffiths, A., *et al.* 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company. On line.
- Hartl. DL., 1987. *A primer of population genetics*. 2nd edition. Sinauer Associates, INC, Sunderland. 303 pp.
- Heffner, E.L., Sorrells, M.E., Jannink J-L. (2009). Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Science*. 49:1–12.
- Hegarty, M., and Hiscock. S., 2005. Hybrid Speciation in Plants: New Insights from Molecular Studies. *New Phytologist*. 165(2):411-423.
- Heiser, C. 1972. The Relationships of the Naranjilla, *Solanum quitoense*. *Biotropica*. 4(2): 77-84.
- Heiser, C. 1993. The Naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid. In: Gustafson, J. (edit.). *Gene Conservation and Exploitation*. New York: Plenum Press. pp. 29-34.
- Heiser, C. and G. Anderson. 1999. "New" Solanums. In: J. Janick (Editor). *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press. Alexandria, VA. pp. 379-384.
- Heiser, C. 2001. Interspecific hybridization and the improvement of the naranjilla (*Solanum quitoense*). In R. Van den Berg *et al.* (ed.) *Solanaceae V: Advances in taxonomy and utilization*. Nijmegen Univ. press, Nijmegen, the Netherlands.
- Holsinger, K.R. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of North America*, 97: 7037-7042.
- ICBF, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, 2009. Tabla de composición de alimentos colombianos. Online: [http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos\\_colombianos/consulta\\_alimento.asp](http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp). (Junio, 2009).
- Ilbi, H., 2003. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae* 97: 211–218.
- Jansky S., 2009. Breeding, Genetics, and Cultivar Development, In: *Advances in Potato Chemistry and Technology*, Academic Press. Jaspreet Singh and Lovedeep Kaur (editors), San Diego, USA, pp. 27 – 62.
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, E. and Donoghue, M., 2002. *Plant Systematics: Phylogenetic approach*. Massachusetts: Sinauer Associates. p. 115, 438.



- Khlestkina, E. and Salina, E., 2006. SNP markers: Methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics*. 42( 6): 585–594.
- Knapp, S., Bohs, L., Nee, M. and Spooner D. 2004. Solanaceae — a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Funcional Genomics*. 5: 285-291.
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Haegeman, A., Roldán-Ruiz, I., and Gheysen, G., 2006. Cross-species microsatellite amplification in *Vasconcellea* and related genera and their use in germplasm classification. *Genome. Health & Medical Complete*. 49(7):786-798.
- Labate, J.A., Robertson, L.D., Wu, F., Tanksley, S.D., Baldo, A.M., 2009. EST, COSII, and arbitrary gene markers give similar estimates of nucleotide diversity in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*). *Theoretical and Applied Genetics*. 118(5): 1005-1014.
- Legiscomex, 2008. Frutas exóticas en Colombia, Inteligencia de mercados. Exportaciones DANE. [http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est\\_col\\_frutas\\_exot\\_5.pdf](http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_col_frutas_exot_5.pdf). 16 p.
- Lentini, Z., 2003. Conservación y transformación genética de lulo (*Solanum quitoense*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). [http://www.ciat.cgiar.org/tropical\\_fruits/pdf/lulo3.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/tropical_fruits/pdf/lulo3.pdf).
- Lewis, D. H., and Considine, J. A., 1999. Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) 2. Patterns of flowering and fruit set. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 27:113-123.
- Li-Wang L., Yan, W., Yi-Qin, G., Tong-Min, Z., Guang, L., Xiao-Yan, L., Fan-Min, Y., 2007. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 115:7-12.
- Lobo, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 7(2): 40-54.
- Lobo, M., 2000. Papel de la Variabilidad Genética en el Desarrollo de los Frutales Andinos como Alternativa Productiva, Memorias 3er Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. C.D.T.F., Manizales, Caldas, Colombia. pg. 27-35.
- Lobo, M., Medina, C., Delgado O., y Bermeo 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*. 60:3939-3964.
- Lobo, M.; E. Girard, J. Jaramillo y G. Jaramillo. 1983. El cultivo del lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.). *ICA-Infoma* 17(1):10-20.
- MADR, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, y OAC, Observatorio Agrociencias Colombia. 2005. Espinal, C., Martínez, C., Peña, M., La Cadena de los Frutales de Exportación en Colombia. Documento de Trabajo No. 67. Una Mirada Global de su Estructura y Dinámica 1991-2005. Bogotá. 68 p. <http://www.agrocadenas.gov.co>
- Mao, W.H., Bao, C.L., and Hu, T.H., 2008. A new eggplant F1 hybrid –“Ziteng”. *China Vegetables*. 1:28-29.
- Medina, C., Sánchez, D., Camayo, G., Lobo, M., y Martínez E., 2008. Anatomía foliar comparativa de materiales de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) con y sin espinas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 9(1):5-13



- Medina, C.I., M. Lobo, R. García y L. García. 2004. Caracterización morfológica de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt. Solanaceae). En: Memorias VIII Congreso Venezolano de Fruticultura, 6 al 9 de julio de 2004. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
- Miller, J. y Diggle, P. 2003. Diversification of Andromonoecy in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): The roles of phenotypic plasticity and architecture. *American Journal of Botany*. 90: 707-715.
- Mueller, L., Solow, T., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E., Keyder, E., Menda, N., Zamir D. and Tanksley S., 2005. The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Physiol*. 138(3): 1310-1317.
- Nandakumar, N., Singh, A.K., Sharma, R.K., Mohapatra, T., Prabhu, K.V., and Zaman F.U., 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257–264.
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*., New York: Columbia University Press. 512 p.
- Orlarte, A., Barrero, L., Lobo M., and Tanksley S. (2006). Use of COS markers for the Andean fruited species lulo and tree tomato. *PAA / Solanaceae. Genomics meets biodiversity*. Madison, Wisconsin.
- Orjuela, J., Calderón, M. y Buitrago, S., 2006. La cadena agroindustrial de frutas. Uchuva y tomate de árbol. Editorial Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Centro de Investigación y Desarrollo Científico. Bogotá D. C., Colombia. 191 p.
- Pickersgill, B. 2007. Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany*, 100(5):925-40.
- Pla, L. E., 1986. Análisis multivariado: método de componentes principales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 97 p.
- Prada P. y Basto G., 2004. Prácticas recomendadas para el manejo del cultivo de Tomate de Árbol. Corpoica y Pronata. Editorial Produmedios. Bogotá D. C., Colombia. 89 p.
- Pratt R.C., Francis D.A., Barrero L.S., 2008. Genomics of Tropical Solanaceous species: Established and emerging crops. *In: Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, Volume 1*. P.H. Moore, R. Ming (editors); *Genomics of tropical Crop Plants*, Springer, New York, USA, p. 453-467.
- Pringle, G., and Murray B., Interspecific hybridization involving the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*. 19(2):103-111.
- Prohens, J. and Nuez, F., 2005, 'The Tamarillo (*Cyphomandra betacea*)'. *Small Fruits Review*,1(2), 43-68.
- Pulido, S., Bojaca, C., Salazar, M., Chaves, B., 2008. Node appearance model for Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) in the high altitude tropics. *Biosystems Engineering*. 101(4):383-387.
- Ruales, F., y Manrique, C., 2007. Uso del análisis de componentes principales para construir un índice tipo producción en ganado Romosinuano (*Bos taurus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 20: 124-128.



- Ryan, T., 2004. Insertion-deletion biases and the evolution of genome size. *Gene, An international Journal on genes and genomes*. 324: 15-34.
- Salazar M., Jones J., Chaves B., and Cooman A., 2008. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Scientia Horticulturae*, 115 (2):142-148.
- Shasany, A. K., Darokar, M. P., Dhawan, S., Gupta, A. K., Gupta, S., Shukla, A. K., Patra, N. K., and Khanuja S., 2005. Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*, 96(5):542-549.
- Singh, N., Singh, M., Kumar, S., Kumar, R., Singh, V., Prasanna, H., Rai, M., 2007. RAPD markers for hybrid seed purity testing in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Current Science*. 93(4): 462-463.
- Soria, J., 1997. Mejoramiento genético de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) mediante cruzamientos interespecíficos. En: M.- Ríos y H. Borgtoft Pedersen (Editors), *Uso y manejo de recursos vegetales. Memorias del Segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y botánica económica*. Ediciones Abya. Yala. Quito, Ecuador. 283-290 p.
- Soria, J., Perachimba, G., Leon, J., Viteri, P., Revelo J., y Heiser, C., 2005. Caracterización agromorfológica, pomológica y análisis sensorial de 18 ecotipos de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), para seleccionar ecotipos promisorios. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quito (Ecuador). Serie Informe Técnico Anual. pp. 125-127. On line [http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view\\_detail](http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view_detail).
- Spooner, D., Van Treuren, R., and De Vicente, M., 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 126 pp.
- Stephen, M., and Mumm, R., 2008. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*. 147(3):969-977.
- Stephens, M., Smith N., and Donnelly P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*. 68(4): 978-989.
- Swofford, D. 2004. Paup 4.0 for Macintosh: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (Software and User's Book for Macintosh). Sinauer Associates, Incorporated.
- Torres, A., Arias A., Arahana, V., and Torres M., 2008. Preliminary Assessment of Genetic Diversity and Phenetic Relations for Section *Lasiocarpa* by Means of Heterologous SSR Markers. *Crop Science*. 48: 2289-2297.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. [http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax\\_search.pl](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl) Solanum betaceum (15 June 2009).
- Vidavski, F., 2007. Exploitation of resistance genes found in wild tomato species to produce resistant cultivars; Pile up of Resistant Genes. In: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*. Volume 5. Henryk Czosnek (Editor). Springer Netherlands. p. 363-372.
- Vivar, H., and Pinchinat A., 1970. Viability of seed from interspecific crosses with Naranjilla. *Crop Science*. 10: 450-452.



- Voronkova, E.V., Lisovskaja, V.M., and Yermishin, A. P., 2007. Diploid Hybrids between Allotetraploid Wild Potato Species *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schltdl. and Dihaploids of *S. tuberosum* L. Russian Journal of Genetics. 43(8), 882–889.
- Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M.M., and Tanksley, S.D., 2009a. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 118:1279-1293.
- Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Tanksley, S.D., 2009b. A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. Theor. Appl. Genet. 118: 927-935.
- Wu, F., Mueller, L., Crouzillat, D., Petiard V. and Tanksley S., 2006. Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the euasterid plant clade. Genetics. 174(3): 1407-1420.



## ANEXOS

*Anexo 1. Accesiones iniciales y genealogías de lulo usadas como parentales.*

<b>Parcela (código accesión)</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen o genealogía</b>
120038	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Antioquia, Sonsón, Finca Quiebra, San Pablo,
120039	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Magdalena, Santa Marta, Corregimiento de Minca, vereda Campano, Finca: Betama, Cultivar primitivo.
120044	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Sachamute Pasto Nariño, colecta mercado de Pasto.
120051	<i>S. hirtum</i>	Colombia: Lulo sin espinas
120052	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Cauca, Popayán, vereda Juntas, Frutos partenocárpicos.
120057	<i>S. hirtum</i>	Colombia: Santander, Rionegro, La Suiza.
120060	<i>S. hirtum</i>	Venezuela: Caracas, Coast hear, Heiser 9904
120061	<i>S. hirtum</i>	Trinidad: Heiser 358
120062	<i>S. hirtum</i>	Venezuela: Maracay
120071 =130005	<i>S. hirtum</i>	Colombia: lulo Santander, municipio Aguas Calientes
120089	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Nariño, Pasto, Villamor,
120101	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Cauca, Aguas claras, Timba
120103	<i>S. quitoense</i>	Colombia: Cauca, Valle de Timbita
Sin Espinas	<i>S. quitoense</i>	Colombia: <i>S. quitoense</i> sin espinas
05T1688028	<i>S. hirtum</i>	Venezuela
04T14203	<i>S. quitoense</i>	Cali, Valle

*Anexo 2. Accesiones y genealogías de tomate de árbol usadas como parentales*

<b>Código accesión</b>	<b>Especie</b>	<b>Origen o genealogía</b>
620019	<i>S. unilobum</i>	Bolivia: Santa Cruz.
620021	<i>S. Betaceum</i>	Colombia: Antioquia, Marinilla, Vereda Cascajo Arriba
6002059	<i>S. Maternum</i>	Bolivia: Santa Cruz zona del departamento de San Juan del Potrero.

*Anexo 3. Composición del buffer de extracción de ADN.*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen 50 mL</b>
Tris HCl	1 M	0,15 M	7,5 mL
EDTA	0,5 M	0,015 M	1,5 mL
NaCl	5M	1M	10 mL
Beta Mercapto etanol	-	2%	1 mL
CTAB	-	1%	0,5 g
PVP 360000	-	1%	0,5 g



**Anexo 4. Marcadores moleculares COSII evaluados para padres híbrido 11H, lulo (*Solanum quitoense*).**

# a	Marcador o Cebador <sup>b</sup>	Cr <sup>c</sup>	Posición Mapa Tomate	Secuencia de los cebadores	Enzima CAPS	Tamaño banda PCR observado	Tamaño de banda digestión enzimática	Tipo UPA <sup>d</sup>
1	C2_At5g18580_3	01	01.0347	F_TGCCACATTGCCTCTGTATGTACAGAAC	TaqI (65°C)	1000	1000	iUPA
	C2_At5g18580_28			R_ATGTCAATTCGGGCTTGAGTAAGTG		1000	850-150	
2	C2_At4g01880_3	01	01.0396	F_ATCTTTGTCTCTTCAGCCTTTTACCAG	AvaII (37°C)	400	400	iUPA
	C2_At4g01880_28			R_TCCCTAGAATTGAGGCTGCTGC		400	140-260	
3	C2_At3g62130_3	01	01.0397	F_TCTCTCATTACGGATTCCGAAATACG	PstI (37°C)	500	500	eUPA
	C2_At3g62130_28			R_TTAGCCAAGGCTTTCCGAAACTC		500	140-360	
4	C2_At4g15530_3	01	01.0397	F_TGTAAGATGGTGGAGCCACAGC	InDel	550-700	InDel	iUPA
	C2_At4g15530_28			R_ATCCACGGGCTACAACAGCTGC		550		
5	C2_At3g62010_3	01	01.0399	F_TACCCATTTATAGCATGGCAAC	BsaHI (37°C)	320	A-NA <sup>e</sup>	iUPA
	C2_At3g62010_28			R_ATGTCATCTTTAACCGAGCTCC		320		
6	C2_At3g63490_3	01	01.0407	F_TCATTTCCGGCTCAATATTGACC	AluI (37°C)	170	50-120	iUPA
	C2_At3g63490_28			R_ACAGTTTGACCTGTTCCCTTGGGC		170	20-150	
7	C2_At3g06050_3	01	01.0465	F_ATACACTATGAACGGTTGGGCAG	Taq I (65°C)	1100	180-200-330-390	iUPA
	C2_At3g06050_28			R_AAACCTCTGTGGAAGCTTCCATC	Eco NI (NA)	1100	210-390-500	
8	C2_At3g23590_3	01	01.0471	F_TCGAAGCTGTCCCTTTGTGGTTG	HinfI (37°C)	600	250-350	iUPA
	C2_At3g23590_28			R_AGGCTTGAACATCTACACCAGTGGC		600	600-470-130	
9	C2_At5g13450_3	01	01.0473	F_AGGTTTGTGAGTTAACCATGGC	Hae III (37°C)	770	770	iUPA
	C2_At5g13450_28			R_TCTGTTCAATGTTACCTTCTTCCC		770	450-320	
9	C2_At5g13450_3	01	01.0473	F_AGGTTTGTGAGTTAACCATGGC	DraI (37°C)	770	120-650-770	iUPA
	C2_At5g13450_28			R_TCTGTTCAATGTTACCTTCTTCCC		770	100-670	
10	C2_At3g52120_3	01	01.0478	F_AAGTGATCCAGCAGTGAAGAAAGTTG	EcoRI (37°C)	650	320-330	iUPA
	C2_At3g52120_28			R_TGATAGAGCCTTTCTCTTCACTAAG		650	650	
11	C2_At4g01940_3	01	01.0478	F_AGAAAAGTTTGAGAAGCCATCAAGG	ApoI (37°C)	280	280	iUPA
	C2_At4g01940_28			R_TGCTGCTTGGACTCCTGATCCAATAG		280	180-100	
12	C2_At3g12300_3	01	01.0920	F_ATGTCAAACGGCTGCAAGATGAAG	InDel	1300	InDel	iUPA
	C2_At3g12300_28			R_TCGAAGAGTTTCAACATAGTTGGTTCC		1400		
13	C2_At1g56345_3	01	01.1156	F_TCGGTGGCAACCACAGATTACCCAG	NsiI (37°C)	760	760	iUPA
	C2_At1g56345_28			R_ATCGAGTCTATTAGCTAAATGAAGCTC		760	280-480	



14	C2_At1g02560_3	01	01.1157	F_TTTATCTTGATGCTGTTGATCCAC R_TGACCCTCTGGAGAATTGACATAC	RsaI (37°C)	740	740	iUPA
	C2_At1g02560_28					740	500-240	
15	C2_At1g10240_3	01	01.1283	F_AGCCGGCTAGCACATTTTGTGG R_TCTGGTATTTGAAAGCAATTCCTG	SspI (37°C)	750	A-NA	iUPA
	C2_At1g10240_28					750		
16	C2_At4g22200_3	01	01.1320	F_CACCAGACGAGTTGTACATCATAGTGCC R_AGTCTTCAAGGAAAGTAGCATTACC	BfaI/MaeI/XspI (37°C)	500	A-NA	N/A
	C2_At4g22200_28					500		
17	C2_At4g14110_3	01	01.1363	F_AGCTCCTCTTTCCGTTATTCAAC R_TGGAAGACATATTCAGTCAAGCGCTG	HincII (37°C)	1100	280-820	iUPA
	C2_At4g14110_28					1100	280-330-490	
17	C2_At4g14110_3	01	01.1363	F_AGCTCCTCTTTCCGTTATTCAAC R_TGGAAGACATATTCAGTCAAGCGCTG	EcoRV (37°C)	1100	1100	iUPA
	C2_At4g14110_28					1100	450-650	
18	C2_At2g15290_3	01	01.1490	F_ACTGCAAGTTACTTCAAGAGATTGGG R_TCTGGTAATAAGGATTAGTTGATGTGG	InDel	1300	InDel	iUPA
	C2_At2g15290_28					1400-1500		
19	C2_At4g34700_3	01	01.160	F_TTCCATGGGCACCTGGTGG R_CAGCCTCTTCCCTGCCATAGTCATA	InDel	350	InDel	iUPA
	C2_At4g34700_28					320-350-390		
20	C2_At4g38810_3	01	01.1625	F_AGGTGATGGACGGTTCAGATATAATG R_AACTTCTTTAAACTCAGTCTTGCTTAC	InDel	1800	InDel	iUPA
	C2_At4g38810_28					1650		
21	C2_At2g35130_3	02	02.0345	F_TGGTCTTTAAGGGGCAGAGGATG R_ATCAACAAGTGCCAGGTAAGTAGATTG	MluI (37°C)	570	A-NA	iUPA
	C2_At2g35130_28					570		
22	C2_At2g34470_3	02	02.0385	F_TTGAGGGAAAAATACAGTCTTGC R_AAGAACTCTCCATCTTCTTCGTG	InDel	520	InDel	iUPA
	C2_At2g34470_28					570-1200		
23	C2_At3g56210_3	02	02.0555	F_ATGTCTTTGATTAAAGAGCAGTAAGG R_GGGTAAAAATGTTAATATTGTTATTATGT	HaeIII (37°C)	2400	270-830-1300	iUPA
	C2_At3g56210_28					2400	270-830-830-470	
23	C2_At3g56210_3	02	02.0555	F_ATGTCTTTGATTAAAGAGCAGTAAGG R_GGGTAAAAATGTTAATATTGTTATTATGT	BglII (37°C)	2400	2400	iUPA
	C2_At3g56210_28					2400	560-1740	
24	C2_At4g18810_3	02	02.0580	F_TTCGATCAAGGCGACAATATCACG R_AGCAATTTCTTCACTGGATATTTTCC	InDel	330	InDel	iUPA
	C2_At4g18810_28					300		
25	C2_At1g11430_3	02	02.0701	F_AGTTCCTAAAGACCCGCTCCTAC R_ACTAAAGGCATACATGTTCTTCTTGC	DraI (37°C)	830	830	iUPA
	C2_At1g11430_28					830	770-60	
26	C2_At2g18030_3	02	02.0831	F_TTGGGCGACCACGCTGAATC R_TTACCACATCAGGACCTTGCC	StyI (37°C)	1400	1400	iUPA
	C2_At2g18030_28					1400	300-1100	
27	C2_At3g01160_3	02	02.0834	F_TCTGAAGAAGCTGAAGCAAGTAGAGC R_TGCCAACTGACGAGCATAAGCTGC	XbaI (37°C)	390	A-SP <sup>f</sup>	iUPA
	C2_At3g01160_28					390		
28	C2_At5g66530_3	02	02.0875	F_TTCAGGAATGGCATTGCAAGTGTG	SE	700	A-SE <sup>g</sup>	iUPA



	C2_At5g66530_28			R_ACCATTGAATACAGCATCTGGTCGAAC		700		
29	C2_At3g28050_3	02	02.0975	F_ACGCTTGCCTCCGCCATCAG	InDel	320-550-1000-1200	InDel	iUPA
	C2_At3g28050_28			R_TCAGTTGTGAGGAAAAGGCCACC		320-580-900		
30	C2_At4g37280_3	02	02.1350	F_AAGAAGCAACTGGTTGATGATTGGG	InDel	900	InDel	iUPA
	C2_At4g37280_28			R_TCCTTTTTGGATCGGTATTCAAGGTA		800		
31	C2_At3g27200_3	02	02.1392	F_ACACGTTGTTGGTGGAAGCCAAGG	Alu I (37°C)	820	220-240-350	iUPA
	C2_At3g27200_28			R_TCCCTGGTCACAATGACCTGCTGTTTC		820	120-120-170-180-220	
32	C2_At5g62390_3	03	03.0756	F_GCTAAGGGCTCTCTCAACAACCTTC	BglII (37°C)	1100	1100	iUPA
	C2_At5g62390_28			R_TTGGGGGTCGATAACATCAAGC		1100	800-300	
32	C2_At5g62390_3	03	03.0756	F_GCTAAGGGCTCTCTCAACAACCTTC	HaeIII (37°C)	1100	1100	iUPA
	C2_At5g62390_28			R_TTGGGGGTCGATAACATCAAGC		1100	100-450-550	
33	C2_At2g43770_3	03	03.0760	F_AATGGAGTGTCTGTTGTGCTTCC	MspI (37°C)	450	300-150	eUPA
	C2_At2g43770_28			R_TGGCGCATATCCCAAAGTTTAGC		450	450	
34	C2_At5g38880_3	03	03.0760	F_TGTAATGCTAAACACTGCCTTGACG	HaeIII (37°C)	840	840	iUPA
	C2_At5g38880_28			R_ATGCTGGTGTTCACCATTTCATC		840	390-450-840	
35	C2_At3g17810_3	03	03.0763	F_TGGAGCCCGATCTAAGTGTAACCTG	ApoI (37°C)	1600	A-NA	iUPA
	C2_At3g17810_28			R_TGATAGAAGCAATTAGTATCCTATCTGG		1600		
36	C2_At3g10020_3	03	03.0767	F_TGGCTTCTCAGTTACAGATTC AAGG	InDel	1600	InDel	eUPA
	C2_At3g10020_28			R_AGGACATCGAATTGACTGAAGTACCA		850		
37	C2_At3g10220_3	03	03.0769	F_TGGCTTCTCAGTTACAGATTC AAGG	InDel	1700	InDel	iUPA
	C2_At3g10220_28			R_AACCTCCGGAGGTCCTGACG		1000		
38	C2_At5g60160_3	03	03.0833	F_ACACAATGCTAATCAACGTTATGC	HaeIII (37°C)	390	290-100	iUPA
	C2_At5g60160_28			R_TGACCACTGTGGTGCTCCACATCAG		390	190-100-100	
39	C2_At5g63460_3	03	03.0833	F_TTCTCGCGGCCCTTTCTCCTC	Alu/MspI (37°C)	1150	A-NA	iUPA
	C2_At5g63460_28			R_TC GTGATCGCAAACATATACTCGC		1150		
40	C2_At1g05350_3	03	03.0845	F_TGAACGAACCTAAAGCGTGAAGG	TaqI (37°C)	480	350-130	iUPA
	C2_At1g05350_28			R_TCCGAACCTCAACAAGTACTTCAATGTG		480	480	
41	C2_At5g62440_3	03	03.1205	F_AGTTTCGTTTCTCCGTGGAGATG	InDel	1150	InDel	iUPA
	C2_At5g62440_28			R_AGTTTCGTTTCTCCGTGGAGATG		1100		
42	C2_At3g21300_3	03	03.1590	F_TCAGGCCGGAATATTGAAACTGG	AvaII (37°C)	1200	350-850	eUPA
	C2_At3g21300_28			R_TCTGTGATAACAATGTCAGGCTTGGG		1200	1200	
43	C2_At3g17040_3	04	04.0220	F_TGGGGTTGGATGGAGTGGAAG	InDel	300	InDel	iUPA
	C2_At3g17040_28			R_AGTAGAGGTTACGAATTCCTCTGC		400		



44	C2_At2g20390_3	04	04.0280	F_AGCCCATGTGTAGAGGTCCTTGG	EcoRV (37°C)	1200	A-SP	iUPA
	C2_At2g20390_28			R_ACTTAAATCCGAAAAGTTTGCTGC		1200		
45	C2_At3g62940_3	04	04.0560	F_ACTGTGATAAGTAATCATGTTTACCG	ApoI (37°C)	860	560-300	iUPA
	C2_At3g62940_28			R_TCTGCTCTCTGGCTGCCTCTTGTGTG		860	860	
46	C2_At4g39660_3	04	04.0587	F_ACAGGGAGCCACTACTGGGGTTT	InDel	500	InDel	iUPA
	C2_At4g39660_28			R_ACATAACCAACAAATAAGGTGCACG		480		
47	C2_At1g35720_3	04	04.0622	F_ATTCTGGCTCATAGGAATGCAGCAC	EcoRI (37°C)	1650	A-SP	iUPA
	C2_At1g35720_28			R_ATAAGAGGAACCAAAAAGCTTACGG		1650		
48	C2_At1g71810_3	04	04.0715	F_TCATGCAGATCCACATCCTGGAAAC	SE	1100	A-SE	iUPA
	C2_At1g71810_28			R_AGTGACAAAATCCTTGGCCAATGC		1100		
49	C2_At4g09040_3	04	04.0823	F_ACAATGGGCTCACATGAGGAAGC	AluI (37°C)	330	170-160	iUPA
	C2_At4g09040_28			R_TATCATTGAATATGACTTCAGCAGAAAC		330	330	
50	C2_At3g16150_3	04	04.0975	F_AAGCAACTCCTTACTCGTTGCC	Tsp509I (37°C)	330	A-NA	iUPA
	C2_At3g16150_28			R_CTAGCTTCAGCATACCAACATTGTC		330		
51	C2_At1g46480_3	04	04.1015	F_TAAGAGTTTCATTAGGCCTGAAAG	NruI (37°C)	450	380-70	iUPA
	C2_At1g46480_28			R_TATCTGTTCTTGTGTGGATTCC		450	450	
52	C2_At5g25900_3	04	04.1085	F_CTTTTGTGTTTCAGTTACCGCAAT	MspI (37°C)	1300	850-450	iUPA
	C2_At5g25900_28			R_TGTTAGCTTTCTAGTTGAGATGGATG		1300	1300	
53	C2_At5g42950_3	04	04.1190	F_CTCTTCTGGAACACATTATCGTCCCAA	EcoRV (37°C)	490	90-400-490	iUPA
	C2_At5g42950_28			R_ACATTTTTGGCACTTGACCAGTGAC		490	90-400	
54	C2_At1g47830_3	04	04.1295	F_TTGTGAATAGAGATCCCAAATTCACC	XbaI (37°C)	1500	A-SP	iUPA
	C2_At1g47830_28			R_ATAACAATTTCACTACTATCCATAACG		1500		
55	C2_At1g42990_3	04	04.1356	F_ATGACCCCGTCGATAAGAAGCG	TaqI (65°C)	860	390-470	iUPA
	C2_At1g42990_28			R_ACCTCACAGCTGCATCTCTATTCTC		860	860	
56	C2_At1g23890_3	05	05.0075	F_ACCCTTACTCCATCATCCCTGTATCT	Cfo I (37°C)	1200	1100-100	iUPA
	C2_At1g23890_28			R_TGACTTGCTAATCTTTCTAATTGCAT		1200	1200	
57	C2_At4g24830_3	05	05.0510	F_TGATGTTGCCAGAGAGGTTGGAGC	InDel	1700	InDel	iUPA
	C2_At4g24830_28			R_TCAGAGCAAAGAATGTCAGCTCAA		2300		
58	C2_At1g26520_3	05	05.0560	F_ACTGTGAAGCATAGTTTGGTTCAAGC	StyI (37°C)	1650	A-NA	iUPA
	C2_At1g26520_28			R_TTTGTGTTATAGGCAAGTTGTCAGAT		1650		
59	C2_At1g14000_3	05	05.0595	F_AGCGTTACATGGCTGGATCGATG	BclI (37°C)	1600	A-NA	iUPA
	C2_At1g14000_28			R_ATACGTCTTTAAACAATTCAATCATGC		1600		
60	C2_At5g55800_3	05	05.0900	F_ATGCTTGTCTGAGGAAGTTCTCTGAG	SE	350	A-SE	iUPA



	C2_At5g55800_28			R_AGTTTCGTGTCCACAATACTAGAACCATC		340		
61	C2_At5g49510_3	05	05.1010	F_AAGCCAGTTTAGAGGTTCTGTGG	TspRI. Hpy188I	1300	A-NA	iUPA
	C2_At5g49510_28			R_TTCTTTGGGAGTGGTAGCTGTGCG	NheI (37°C)	1300		
62	C2_At2g01720_3	05	05.1190	F_ACAAATTGGTACATGCTGGTGCTC	TaqI (65°C)	500	400-100	iUPA
	C2_At2g01720_28			R_TGGCCTGTTAGACTGATATTCAAC		500	500	
62	C2_At2g01720_3	05	05.1190	F_ACAAATTGGTACATGCTGGTGCTC	AvaII (37°C)	500	380-120	iUPA
	C2_At2g01720_28			R_TGGCCTGTTAGACTGATATTCAAC		500	500	
63	C2_At3g46780_3	06	06.0040	F_ATGGCTCAACTCTTACTTCAAATTC	InDel	2250	InDel	eUPA
	C2_At3g46780_28			R_TCTGCATCTTGAATGATGATGCAAC		1700-2000		
64	C2_At2g39690_3	06	06.0053	F_TCTGCATCTTGAATGATGATGCAAC	BstBI (65°C)	1500	A-NA	iUPA
	C2_At2g39690_28			R_AATTCTGAAGCATAAGGTTGAACCTC		1500		
65	C2_At5g61510_3	06	06.0062	F_AGTTTCTACTGCGCCGTGCTTC	Tsp509I	1600	A-NA	iUPA
	C2_At5g61510_28			R_AGCATGAACAAGTACTGTGTGCCACG		1600		
66	C2_At3g56130_3	06	06.0170	F_CTATCTTGTGTATGCCTTGTGAGCAG	TaqI (65°C)	1200 (450-650)	A-SP	iUPA
	C2_At3g56130_28			R_AGAGGATTTTCAAGACTTCTCCAGCC		1200 (450-650)		
67	C2_At3g56230_3	06	06.0185	F_ATGCTCCTTATACCAGCACATAGAG	BsaHI (37°C)	670	A-NA	eUPA
	C2_At3g56230_28			R_TGAGGATTCTTGAGTGCAAATGCATC		670		
68	C2_A3g56040_3	06	06.0190	F_TCGTATTGGATATAATGCGTAATGC	BglII (37°C)	710	710	iUPA
	C2_A3g56040_28			R_AACTCAGCAACCTTATTAGCAACTC		710	560-150	
69	C2_At3g11210_3	06	06.0245	F_CTCTACAAAATTGAGAACATCTGCGAA	SE	990	A-SE	iUPA
	C2_At3g11210_28			R_AATTCTGTTGCCATTGATTCCAGTG		1000		
70	C2_At5g41480_3	06	06.0260	F_TATTCGTGCTGGTCTGGAGAGTGC	DraI (37°C)	380	380	iUPA
	C2_At5g41480_28			R_ATGATCCTTGTCATTCGCCATAGC		380	220-160	
71	C2_At1g44760_3	06	06.0395	F_TTCTTCATCTGCTGCTCATCTTGC	AseI (37°C)	800	A-NA	iUPA
	C2_At1g44760_28			R_AGAGGGTTTTTCTGACCCAAGAC		800		
72	C2_At4g24690_3	06	06.0625	F_TTGCCCTCAGGGGAGAAGTTTGG	BstNI. EcoO109I (37°C)	300	A-NA	iUPA
	C2_At4g24690_28			R_TCAACTAATTCATGGCAGGTTTG		300		
73	C2_At4g34215_3	06	06.0690	F_TACTCTGGGCAAAGCAACATGGC	CfoI (37°C)	470	470	eUPA
	C2_At4g34215_28			R_ATGGCAGATGCAAATCAGCACG		470	400-70	
73	C2_At4g34215_3	06	06.0690	F_TACTCTGGGCAAAGCAACATGGC	HhaI (37°C)	470	470	eUPA
	C2_At4g34215_28			R_ATGGCAGATGCAAATCAGCACG		470	400-70	
74	C2_A5g22620_3	06	06.0740	F_TCAAGAAGCTGCTGACTGCCTTGG	TaqI (65°C)	650	100-550-650	iUPA
	C2_A5g22620_28			R_TCCCTGAGGGTCCATCAGGAAAATC		650	650	



74	C2_A5g22620_3	06	06.0740	F_TCAAGAAGCTGCTGACTGCCTTGG	DraI (37°C)	650	250-400	iUPA
	C2_A5g22620_28			R_TCCCTGAGGGTCCATCAGGAAAATC		650	200-450	
75	C2_At4g28530_3	06	06.0980	F_TGGAAATTGATCTTCACACTTGTGAGC	MspI (37°C)	640	500-140	iUPA
	C2_At4g28530_28			R_TCAAGTCGAAATTCATGCATGATCC		640	640	
76	C2_At1g20050_3	06	06.1010*	F_ATGATCTAAAATTGCCTGGTTTTG	HaeIII (37°C)	1400	1300	iUPA
	C2_At1g20050_28			R_AATAGCCCTCAAGGACCATGTGG		1400	500-600	
76	C2_At1g20050_3	06	06.1010*	F_ATGATCTAAAATTGCCTGGTTTTG	StyI (37°C)	1200	1200	iUPA
	C2_At1g20050_28			R_AATAGCCCTCAAGGACCATGTGG		1200	350-850	
77	C2_At4g30580_3	07	07.0020	F_TACTCTGGGCAAAGCAACATGGC	XbaI (37°C)	390	90-300-390	iUPA
	C2_At4g30580_28			R_ATGGCAGATGCAAAATCAGCACG		390	390	
77	C2_At4g30580_3	07	07.0020	F_TCAGCCGGTGTCTTATCCAC	BglII (37°C)	390	300-90	iUPA
	C2_At4g30580_28			R_TGATGAACTGAAGTTTCTCCAAGAG		390	390	
78	C2_At1g14850_3	07	07.0035	F_AGCTGCTTGAAGGGTGCAGTAG	MspI (37°C)	650	440-210	iUPA
	C2_At1g14850_28			R_ATTCTCAAGTTCACGAAAACCTCG		650	650	
79	C2_At5g20180_3	07	07.0060	F_TGCTATGTACATCTAATCCCAAGCAC	BanI, KpnI	1500	A-NA	iUPA
	C2_At5g20180_28			R_AGCTATCCCCCTTTCCACCAAG	(37°C)	1500		
80	C2_At4g29490_3	07	07.0223	F_AAGAGCAAACCTCGACATTGCACC	BstNI (60°C)	500	A-NA	iUPA
	C2_At4g29490_28			R_ACAAGTAGGCGAAATAGCTCTCCTG	ScrFI (37°C)	500		
81	C2_At2g20860_3	07	07.0433	F_ATTGAAGCCACATATACTCATAGAAGC	BclI (50°C)	930	A-NA	iUPA
	C2_At2g20860_28			R_TCCAGATTTTGCAACTTCTCTACAC		930		
81	C2_At2g20860_3	07	07.0433	F_ATTGAAGCCACATATACTCATAGAAGC	RsaI (37°C)	930	A-SP	iUPA
	C2_At2g20860_28			R_TCCAGATTTTGCAACTTCTCTACAC		930		
82	C2_At2g42750_3	07	07.0443	F_AAGAAGGCATACTATAGTTGCATGAA	HinfI (37°C)	690	110-200-300-400	iUPA
	C2_At2g42750_28			R_ACTCTAGCTCTTCCAAAGTCTTCTC		690	90-250-300-510	
83	C2_At1g78620_3	07	07.0570	F_TTCCTCTGGGTTTCTTCTGTGTC	BanI (37°C)	1200	A-NA	iUPA
	C2_At1g78620_28			R_ACGCTTCCAGTCTCTCTCTCC		1200		
84	C2_At1g50575_3	07	07.0855	F_AGCAATGCTATGAATTAATACACAGGC	InDel	520	InDel	iUPA
	C2_At1g50575_28			R_TGCTGTAGAGCACCTTGTGTGGC		490		
85	C2_At4g17380_3	08	08.0020	F_CTTCAACTTGCAAATGTTCTCTAATA	HaeIII (37°C)	600	480-120	iUPA
	C2_At4g17380_28			R_AATTGCCAATAGATGCTCACAACAG		600	600	
86	C2_At3g52860_3	08	08.0020	F_TGTTTGCCAGCACGAGAATCC	Xho I (37°C)	1750	1100-650	iUPA
	C2_At3g52860_28			R_ATCAGTTTTGTTTCCAATCTTCTTC		1750	1750	
86	C2_At3g52860_3	08	08.0020	F_TGTTTGCCAGCACGAGAATCC	Taq I (65°C)	1750	100-300-500-850	iUPA



	C2_At3g52860_28			R_ATCAGTTTTTGTTCCTTCTCTTC		1750	100-250-600-800	
87	C2_At2g25950_3	08	08.0230	F_TGGTGGTGCTGATGGAACAAGTCC	DdeI (37°C)	350	350	iUPA
	C2_At2g25950_28			R_TCGCTTGCATAGATTGAGCATCTG		350	250-100	
88	C2_At5g25940_3	08	08.0233	F_AGCAGCCGCAAGTTGCTTGTGTTG	BsaBI (60°C)	2100	A-NA	iUPA
	C2_At5g25940_28			R_ATTTGCCTTTGCCAAGGAATTG	ApoI (50°C)	2100		
89	C2_At2g26830_3	08	08.0301	F_TCAAATCTAGATGGTTCTCACTTCTCTG	HhaI (37°C)	1700	1700	iUPA
	C2_At2g26830_28			R_AAGTGCCTGCATCAATAAATGACTG	CfoI (37°C)	1700	1300-400	
90	C2_At2g27090_3	09	09	F_TCCGAAGTGATTATGATGCTAAGCG	HincII (37°C)	1550	650-850	eUPA
	C2_At2g27090_28			R_AGACAGAACAGGTGGTATAAATAGGTGG		1550	1550	
91	C2_At3g09920_3	09	09.0170	F_AAGCAATCATAAAGGGTCACAGGAG	TaqI (65°C)	1500	650-850	iUPA
	C2_At3g09920_28			R_AGACCATTGGGCAATAATCTTTCC		1500	1500	
91	C2_At3g09920_3	09	09.0170	F_AAGCAATCATAAAGGGTCACAGGAG	BglII (37°C)	1500	650-850	iUPA
	C2_At3g09920_28			R_AGACCATTGGGCAATAATCTTTCC		1500	200-650-650	
92	C2_At3g09925_3	09	09.0250	F_ATTGAAGCTCAGATGGAATGGATG	HinfI (37°C)	1300	A-SP	eUPA
	C2_At3g09925_28			R_ACATGGGAGTTGTGTAGTAGAAAGGG		1300		
93	C2_At4g10360_3	09	09.0505	F_TTGATGACCTGAAGAACTTGAATGG	HaeIII (37°C)	1200	200-350-650	iUPA
	C2_At4g10360_28			R_AGTAATAGAAAATCATTGCCAAGTCTG		1200	350-850	
94	C2_At3g23400_3	09	09.0845	F_TGGGCTAAACAGAGGTTCTTGTCTGC	BglII (37°C)	890	A-SP	iUPA
	C2_At3g23400_28			R_TATAAGTTCAAATTTGTGGGCTAAAG		900		
95	C2_At3g54360_3	10	10.0560	F_AGCTTTCCCTGGTTCAACAAGCC	Tsp509I (65°C)	320	A-NA	iUPA
	C2_At3g54360_28			R_AACTGCTCCGAGCTGTGAGCAC		320		
96	C2_At3g58470_3	10	10.0610	F_ATTGCTTGTCCCACACTTTATGC	InDel	1400	InDel	iUPA
	C2_At3g58470_28			R_TACTGTTCAAACCGTTTGTCACTC		1300		
97	C2_At5g09880_3	11	11	F_AGGGTCAAGCATATCCATGTGGAC	TaqI (65°C)	530	100-430	iUPA
	C2_At5g09880_28			R_TCTCTTGTGCATGGCTTGTGAGC		520	100-200-230	
98	C2_At5g16710_3	11	11.0314	F_TGATGAGCTGACAGCTTCAATGAT	InDel	1200	InDel	iUPA
	C2_At5g16710_28			R_AGTGAATCTGGAATAGACCAATTCTTAT		1100		
99	C2_At4g08230_3	11	11.0410	F_ATTTCTTTTGGTCCATCATCAACTTC	XmnI (37°C)	600	A-NA	iUPA
	C2_At4g08230_28			R_AGCAAGAACCACAGGCAGGAAGAG		600		
100	C2_At3g54470_3	11	11.0720	F_TCCTGACTTTGGTTCTAAGCTTAGATCG	RsaI (37°C)	800	A-SP	iUPA
	C2_At3g54470_28			R_TCAAATATTAAGAAGTTGTGCTTGTCTGC		800		
101	C2_At5g20890_3	11	11.0760	F_AAATTATCGAGGAGATCATGATTGG	SspI (37°C)	2200	A-NA	iUPA
	C2_At5g20890_28			R_AGCTGAGCAATCAGCTCAGCACTGTC		2200		



102	C2_At4g32930_3	11	11.0880	F_TCCTCTTCTTCTATTGGCAAGGGC	AseI (37°C)	1300	A-NA	iUPA
	C2_At4g32930_28			R_TGGACACTCCCCCTTTTCATCATAC		1300		
103	C2_At5g25760_3	11	11.0895	F_TCCTTATGATGGTGGAGTTTCCAG	DraI (37°C)	1200	550-650	iUPA
	C2_At5g25760_28			R_AAAGCAATTATAGCTCGACAAACAG		1200	1200	
104	C2_At2g06530_3	12	12.0327	F_AAGGTGTCTCCCTCAGAATTCAG	RsaI (37°C)	620	260-240-120	iUPA
	C2_At2g06530_28			R_ATCTGTCCCATTCCTTTGTAAC		620	520-100	
105	C2_At1g05620_3	12	12.0573	F_ATTTTGATCGAGACGAGTTGGC	NsiI (37°C)	1200	1200-1100-100	iUPA
	C2_At1g05620_28			R_AGCAGTTGGATCATGAAGGTAACAC		1200	1200	

<sup>a</sup> Los marcadores filas sombreadas fueron polimórficos en los híbridos 1H-11H (26) y los sombreados solo en la columna # (34) fueron también polimórficos comprobados para F1 de 11H (total de 60 marcadores. algunos marcadores presentan cortes con diferentes enzimas). <sup>b</sup> El tamaño de banda PCR y digestión enzimática en laboratorio corresponde al de parentales del híbrido testigo 11H: *Solanum quitoense* 04T142-3 y *S. hirtum*. 05T1688-28 <sup>c</sup> Cr: Cromosoma Tomate. <sup>d</sup> iUPA: Amplificación de intrones. eUPA: amplificación de exones según Wu *et al.*, 2006. <sup>e</sup> A-NA: amplificado en laboratorio. digestión no analizada en laboratorio por ausencia de enzima. pero predicho *in silico* como polimórfico para la enzima mencionada. <sup>f</sup> A-SP: amplificado y digerido en laboratorio pero sin polimorfismo. <sup>g</sup> A-SE: amplificado. pero sin enzima predicha *in silico*.



**Anexo 5. Marcadores moleculares COSII evaluados para tomate de árbol (*Solanum betaceum*).**

# a	Marcador o Cebador <sup>b</sup>	Cr <sup>c</sup>	Posición Mapa Tomate	Secuencia de los cebadores	CAPS Enzima	Tamaño de banda PCR Observado	Tamaño Banda digestión enzimática	Tipo UPA <sup>d</sup>
1	C2_At5g18580_Sb	01	01.0347	F_TGCCACATTGCCTCTGTATGTACAGAAC	MspI	1000	A-SP <sup>e</sup>	iUPA
	C2_At5g18580_Su			R_ATGTCAATTCGGGCTTGAGTAAGTG		1000		
2	C2_At3g62130_Sb	01	01.0397	F_TCTCTCATTACGGATTCCGAAATACG	Hsp92II	500	320 - 130	eUPA
	C2_At3g62130_Su			R_TTAGCCAAGGCTTCCGAAACTC		500	500	
3	C2_At3g63490_Sb	01	01.0407	F_TCATTCCGGCTCAATATTGACC	AluI	170	A-SP	iUPA
	C2_At3g63490_Su			R_ACAGTTTGACCTGTTCCCTTGGGC		170		
4	C2_At5g13450_Sb	01	01.0473	F_AGGTTTGCTGAGTTAACCATGGC	Dra I	770	310-310-150	iUPA
	C2_At5g13450_Su			R_TCTGTTCATGTTCACCTTCTTCCC		770	750	
5	C2_At3g52120_Sb	01	01.0478	F_AAGTGATCCAGCAGTGAAGAAAGTTG	EcoRI	600	A-SP	iUPA
	C2_At3g52120_Su			R_TGATAGAGCCTTTCTCTTCACTAAG		600		
6	C2_At4g01940_Sb	01	01.0478	F_AGAAAAGTTTGAGAAGCCATCAAGG	ApoI	280	A-SP	iUPA
	C2_At4g01940_Su			R_TGCTGCTTTGACTCCTGATCCAATAG		280		
7	C2_At1g56345_Sb	01	01.1156	F_TCGGTGGCAACCACAGATTACCCAG	NsiI		No amplificó	iUPA
	C2_At1g56345_Su			R_ATCGAGTCTATTAGCTAAATGAAGCTC				
8	C2_At1g56345_Sb	01	01.1156	F_TCGGTGGCAACCACAGATTACCCAG	XbaI	690	490 - 200	iUPA
	C2_At1g56345_Su			R_ATCGAGTCTATTAGCTAAATGAAGCTC		690	290-200-200	
9	C2_At4g14110_Sb	01	01.1363	F_AGCTCCTTCTTTCCGCTTATTCAAC	InDel	1200	InDel	iUPA
	C2_At4g14110_Su			R_TGGAAGACATATTCAGTCAAGCGCTG		1300		
10	C2_At2g15290_Sb	01	01.1490	F_ACTGCAAGTTACTTCAAGAGATTGGG		1400	A-SP	iUPA
	C2_At2g15290_Su			R_TCTGGTAATAAGGATTAGTTGATGTGG		1400		
11	C2_At4g34700_Sb	01	01.160	F_TTCCATGGGCACCTGGTGG	InDel	350	No amplificó	iUPA
	C2_At4g34700_Su			R_CAGCCTCTTCTTGCCATAGTCATA		350-390		
12	C2_At2g34470_Sb	02	02.0385	F_TTGAGGGAAAAATACAGTCTTGC		620	A-SP	iUPA
	C2_At2g34470_Su			R_AAGAACTCTCCATCTTCTTTCGTG		620		
13	C2_At1g11430_Sb	02	02.0701	F_AGTTCCCTAAAGACCTGCTCCTAC	Hsp92II (37°C)	1100	550-500	iUPA
	C2_At1g11430_Su			R_ACTAAAGGCATACATGTTCTTCTTTC		1100	430-100-480	



14	C2_At3g27200_Sb	02	02.1392	F_ACACGTTGTTGGTGGGAAGCCAAGG	HindIII	800	A-SP	iUPA
	C2_At3g27200_Su			R_TCCCTGGTCACAATGACCTGCTGTTC		800		
15	C2_At2g43770_Sb	03	03.0760	F_AATGGAGTTGTCTGTTGTGCTTCC	MspI	450	A-SP	eUPA
	C2_At2g43770_Su			R_TGGCGCATATCCCAAAGTTTAGC		450		
16	C2_At3g10020_Sb	03	03.0767	F_TGGCTTCTCAGTTACAGATTCAAGG	SE	850	A-SP	eUPA
	C2_At3g10020_Su			R_AGGACATCGAATTGACTGAAGTACCA		850		
17	C2_At3g10220_Sb	03	03.0769	F_TGGCTTCTCAGTTACAGATTCAAGG	SE	1000	A-SE	iUPA
	C2_At3g10220_Su			R_AACCTCCGGAGGTCCTGACG		1000		
18	C2_At5g60160_Sb	03	03.0833	F_ACACAATGCTAATCAACGTTATGC	HaeIII	370	A-SP	iUPA
	C2_At5g60160_Su			R_TGACCACTGTGGTCTCCACATCAG		370		
19	C2_At1g05350_Sb	03	03.0845	F_TGAACGAACCTAAAGCGTGAAGG	TaqI	480	A-SP	iUPA
	C2_At1g05350_Su			R_TCCGAACTTCAACAAGTACTTCAATGTG		480		
20	C2_At3g62940_Sb	04	04.0560	F_ACCTGTGATAAGTAATCATGTTTACCG	ApoI	860	A-SP	iUPA
	C2_At3g62940_Su			R_TCTGCTCTCTGGCTGCCTCTTGTG		860		
21	C2_At4g39660_Sb	04	04.0587	F_ACAGGGAGCCACTACTGGGGTTT	SE	500	A-SP A-SE <sup>f</sup>	iUPA
	C2_At4g39660_Su			R_ACATAACCAACAAATAAGGTGCACG		500		
22	C2_At1g71810_Sb	04	04.0715	F_TCATGCAGATCCACATCCTGGAAAC	SE	1100	A-SP A-SE	iUPA
	C2_At1g71810_Su			R_AGTGACAAAATCCTTGGCCAATGC		1100		
23	C2_At4g09040_Sb	04	04.0823	F_ACAATGGGCTCACATGAGGAAGC	AluI/HindIII	330	A-SP	iUPA
	C2_At4g09040_Su			R_TATCATTGAATATGACTTCAGCAGAAAC		330		
24	C2_At1g46480_Sb	04	04.1015	F_TAAGAGTTTCATTAGGCCTGAAAG	NruI	450	A-SP	iUPA
	C2_At1g46480_Su			R_TATCTGTCTTGTGTTGGATTCC		450		
25	C2_At1g42990_Sb	04	04.1356	F_ATGACCCCGTCGATAAGAAGCG	NsiI	850	620-230 850	iUPA
	C2_At1g42990_Su			R_ACCTCACAGCTGCATCTCTATTCTC		850		
26	C2_At1g23890_Sb	05	05.0075	F_ACCCTTACTCCATCATCCCTGTATCT	CfoI	1200	1100-100 1200	iUPA
	C2_At1g23890_Su			R_TGACTTGCTAATCTTTCTAATTGCAT		1200		
27	C2_At2g01720_Sb	05	05.1190	F_ACAAATTGGTACATGCTGGTGCTC	TaqI	500	A-SP	iUPA
	C2_At2g01720_Su			R_TGGCCTGTTAGACTGATATTCAAC		500		
27	C2_At2g01720_Sb	05	05.1190	F_ACAAATTGGTACATGCTGGTGCTC	AvaII	500	A-SP	iUPA
	C2_At2g01720_Su			R_TGGCCTGTTAGACTGATATTCAAC		500		
28	C2_At3g46780_Sb	06	06.0040	F_ATGGCTCCAACCTTACTTCAAATTC			No amplificó	eUPA
	C2_At3g46780_Su			R_TCTGCATCTTGAAATGATGATGCAAC				
29	C2_At2g39690_Sb	06	06.0053	F_TCTGCATCTTGAAATGATGATGCAAC		1000	No amplificó	



	C2_At2g39690_Su			R_AATTCTGAAGCATAAGGTTGAACCTC		1100		
30	C2_At1g44760_Sb	06	06.0395	F_TTCTTCATCTGCTGCTCATCTTGC	<b>InDel</b>	750-850	<b>InDel</b>	iUPA
	C2_At1g44760_Su			R_AGAGGGTTTTTCTGACCCAAGAC		800		
31	C2_At4g34215_Sb	06	06.0690	F_TACTCTGGGCAAAGCAACATGGC	CfoI	470	A-SP	iUPA
	C2_At4g34215_Su			R_ATGGCAGATGCAAATCAGCACG		470		
32	C2_At4g28530_Sb	06	06.0980	F_TGGAAATTGATCTTCACACTTGTGAGC	MspI	640	A-SP	iUPA
	C2_At4g28530_Su			R_TCAAGTCGAAATTCATGCATGATCC		640		
33	C2_At4g30580_Sb	07	07.0020	F_TACTCTGGGCAAAGCAACATGGC	BgI II		No amplificó	iUPA
	C2_At4g30580_Su			R_ATGGCAGATGCAAATCAGCACG				
34	C2_At1g14850_Sb	07	07.0035	F_AGCTGCTTGAAGGTCAGTAG	MspI	650	No amplificó	iUPA
	C2_At1g14850_Su			R_ATTCTCAAGTTCAGAAAACCTCG		650		
36	C2_At4g17380_Sb	08	08.0020	F_CTTCAACTTGCAAATGTTCTTAATA	HaeIII	600	A-SP	iUPA
	C2_At4g17380_Su			R_AATTGCCAATAGATGCTCACAACAG		600		
37	C2_At3g52860_Sb	08	08.0020	F_TGTTTGCCAGCAGAGAATCC	TaqI (65°C)		No amplificó	iUPA
	C2_At3g52860_Su			R_ATCAGTTTTTGTTCACACTCTCTTC				
38	C2_At2g25950_Sb	08	08.0230	F_TGGTGGTGTGATGGAACAAGTCC	DdeI	350	A-SP	iUPA
	C2_At2g25950_Su			R_TCGCTTGCATAGATTGAGCATCTG		350		
39	C2_At3g54360_Sb	10	10.0560	F_AGCTTTCCTGGTTCAACAAGCC	Hsp92II		No amplificó	iUPA
	C2_At3g54360_Su			R_AACTGCTCCGAGCTGTGAGCAC				
40	C2_At5g09880_Sb	11	11	F_AGGGTCAAGCATATCCATGTGGAC	TaqI		No amplificó	iUPA
	C2_At5g09880_Su			R_TCTTGTGTCATGGCTTGTGAGC				
41	C2_At3g54470_Sb	11	11.0720	F_TCCTGACTTTGTTCTAAGCTTAGATCG	Hsp92II	800	100-150-550	iUPA
	C2_At3g54470_Su			R_TCAAATATTAAGAAGTTGTGCTTGTCTGC		800	50-100-100-550	
42	C2_At5g20890_Sb	11	11.0760	F_AACTTATCGAGGAGATCATGATTGG	SsPI		No amplificó	iUPA
	C2_At5g20890_Su			R_AGCTGAGCAATCAGCTCAGCACTGTC				
43	C2_At4g32930_Sb	11	11.0880	F_TCCTCTTCTATTGGCAAGGGC			No amplificó	iUPA
	C2_At4g32930_Su			R_TGGACACTCCCCCTTTCATCATAAC				
44	C2_At2g06530_Sb	12	12.0327	F_AAGGTGTCTCCCTCAGAATTCAG	RsaI	620	A-SP	iUPA
	C2_At2g06530_Su			R_ATCTGTCCATTGCCTTTGTAAC		620		
45	C2_At3g13235_Sb	10	10	F_ATTCTGTGCTGTCAAATGCTTTTCG	Hsp92II	750	750	iUPA
	C2_At3g13235_Su			R_AGCATATCAAGTCCAAAGAGAAATTC		750	520-230	
46	C2_At3g27310_Sb	02	02.1380	F_AGCCCGAAGACTTCTATGAGTTCAC	DdeI	420	420	iUPA
	C2_At3g27310_Su			R_TCTGCTCACGAATTTCTTCGTC		420	370-50	



47	C2_At5g64730_Sb	11	11.0005	F_TGAAGTCCGCGATGTCCATGTCAC	ApoI (50°C)	1550	1550	iUPA
	C2_At5g64730_Su			R_ACATGAACAAAGTTTTGAATTGTCC			1500-50	
48	C2_At3g44600_Sb	11	11.0680	F_TCCTTTATACCGACTTGAAGCTATTG	Rsa I	470	80-90-300	iUPA
	C2_At3g44600_Su			R_AGATTCTATGTTTCTTGAAAGCACAGC			40-50-80-300	
49	C2_At3g04870_Sb	01	01.1015	F_ACGCGTGCTAGCATCCAGAGG	HincII	420	310-110	iUPA
	C2_At3g04870_Su			R_TGACATGGCAAGCCCCTAACATAC			420	
50	C2_At3g55360_Sb	05	05.1077	F_TTTAGTGGTTACACGTAGCGGC	Taq I (37°C)	850	260-590	iUPA
	C2_At3g55360_Su			R_TGCCTCTGCAGATCAGCAAC			850	
51	C2_At3g08030_Sb	01	01.0477	F_AGGCTTCAATTTCTCAGACAATTCC	BamHI	900	690-210	iUPA
	C2_At3g08030_Su			R_TTCAAAACCAGCATTTTAACCAAG			210-280-410	
52	C2_At4g00090_Sb	01	01.0575	F_AGATATTGGCCACCACTCATGGTTC	InDel	550-1650	InDel	iUPA
	C2_At4g00090_Su			R_AGGCGACCATGCCATGTCCG		2000-3000		
53	C2_At3g15430_Sb	07	07.0680	F_TCGTTTGAGGTCAACTTTAATGGAGG			No amplificó	eUPA
	C2_At3g15430_Su			R_AGTGTGTTTCAGGCCCATGACCAAG				
54	C2_At5g58200_Sb	07	07.0004	F_TATTGATGGGGTGACCATGGTG	MspI		No amplificó	iUPA
	C2_At5g58200_Su			R_TCCAGGTTTCTGCTATCTTCTCCACTC				
55	C2_At2g33990_Sb	10	10.0275	F_ATAACGCAGCCATAAGGATTCAGAC	BclI		No amplificó	iUPA
	C2_At2g33990_Su			R_TAAGTTATGAAGCTTTGCCTCTAGC				
56	C2_At2g18710_Sb	07	07.0001	F_TAAAAGCACAGCGGCATTCATC	TaqI		No amplificó	iUPA
	C2_At2g18710_Su			R_AGAACCAAGAACTGATATCCGGC				
57	C2_At5g46630_Sb	08	08	F_TGGCGCTTTGATGAAGATGC	XspI	870	A-SP	iUPA
	C2_At5g46630_S			R_AGATTTTGAGGTAACCAAAGTCC		870		
58	C2_At2g24270_Sb	07	07.0003	F_TGGAAATGAAAGGACCAAATACTG			No amplificó	iUPA
	C2_At2g24270_Su			R_AGGAGCAATCTTGAGACGGC				
59	C2_At1g55880_Sb	07	07.0860	F_AGAAGGCTGAAGAACCCGTTTGATAC	Mse I	550	A-SP	iUPA
	C2_At1g55880_Su			R_AGGAACTCCAGACCAGTTGCTGAAGG		550		
60	C2_At5g64350_Sb	01	01.1372	F_AGATCGGCCAAGGCAAAGTTATC			No amplificó	iUPA
	C2_At5g64350_Su			R_TGCATGCCAGTACTCCTTCATCC				
61	C2_At1g14310_Sb	01	01.0305	F_CGATACCTACTTTGAAGAAGTATTC		250	A-SP	iUPA
	C2_At1g14310_Su			R_TCAGTATTGTGTCATAGGCTCCAGC		250		
62	C2_At4g21580_Sb	02	02.0680	F_TCGCTGGAAAATTGGTGATCAG	Psi I		No amplificó	iUPA
	C2_At4g21580_Su			R_ATGAAAATGGTCGACCAAACAGTG				
63	C2_At3g28720_Sb	02	02.0980	F_ATCCATCCCCTGCTTTCACCAAG	DraIII	900	A-SP	eUPA



	C2_At3g28720_Su			R_ACCATATCCTTAAAGGCCACAGACTG		900	A-SE	
64	C2_At4g34090_Sb	02	02.1340	F_TGTTACGATGGCCAACCTGCCCC		400	A-SP	iUPA
	C2_At4g34090_Su			R_TCTTCCACCAAACCTGTGAATG		400		
65	C2_At3g61140_Sb	01	01.0625	F_AGCCGACGAGATCTACGCCAACG	TspRI	660	A-NA <sup>g</sup>	eUPA
	C2_At3g61140_Su			R_AACATAATTCTTAAATGCCTCTCCAAG				
66	C2_At5g10920_Sb	04	04.0883	F_TATCATGGGTAGTAAAGCTCATGC		300	A-SP	iUPA
	C2_At5g10920_Su			R_TTGCTCTCTATCTCTTCAAGACC		300		
67	C2_At2g37240_Sb	09	09.0010	F_GCAGTGCTATCATAATGTGCATATCTT	Mae II	500	A-SP	iUPA amplificó
	C2_At2g37240_Su			R_ACAAGTGCAGCTCTGCTGCATCC				

<sup>a</sup> Los marcadores filas sombreadas fueron polimórficos en los híbridos de tomate de árbol del presente estudio. <sup>b</sup> Sb: *Solanum betaceum*. Su: *Solanum unilobum*. <sup>c</sup> Cr: Cromosoma de tomate. <sup>c</sup> iUPA: Amplificación de intrones. eUPA: amplificación de exones según Wu *et al.*, 2006. <sup>d</sup> A-SP: amplificado y digerido en laboratorio pero sin polimorfismo. <sup>e</sup> A-SE: amplificado, pero sin enzima predicha *in silico*. <sup>g</sup> A-NA: amplificado en laboratorio, digestión no analizada en laboratorio por ausencia de enzima, pero predicho *in silico* como polimórfico para la enzima mencionada

#### Anexo 6. Proporciones de compuestos para amplificación por PCR.

Reactivos	[ ] Stock (inicial)	[ ] por tubo o pozo	Volumen (µL) por pozo
Buffer (Invitrogen)	10x (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl)	1x	1.5
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen)	50mM	2,0mM	0,6
dNTPs (Invitrogen)	10mM	0,2 mM	0,3
Primer F	10mM	0,2 mM	0,3
Primer R	10mM	0,2 mM	0,3
Taq (Invitrogen)	-	-	0,075 (0,375 u)
DNA	15 ng/ µL	5 ng/µL	5
ddH <sub>2</sub> O	-	-	6,925
<b>VOLUMEN FINAL</b>			15 µL

**Anexo 7. Estimación de la concentración y calidad del ADN de lulo, a través de la lectura de absorbancia con Espectro UV (260/280 nm).**

Accesiones	Concentración (ng/μL)*	Calidad (260/280 nm)	Accesiones	Concentración (ng/μL)	Calidad (260/280 nm)
Sq 120101 x Sh120057_1	315,5	1.803	6H_89x71_3	927	1.844
Sq 120101 x Sh120057_2	183	1.767	6H_89x71_4	885	1.816
Sq 120101 x Sh120057_3	239,5	1.752	6H_89x71_5	562,5	1.715
Sq 120101 x Sh120057_4	197	1.713	Sq 120052 x Sh 120062_1	333	1.708
Sq 120101 x Sh120057_5	189,5	1.690	Sq 120052 x Sh 120062_2	857,5	1.819
1H_101x57_1	287,5	1.710	Sq 120052 x Sh 120062_3	375	1.742
1H_101x57_2	187	1.679	Sq 120052 x Sh 120062_4	1195	1.856
1H_101x57_3	111	1.663	Sq 120052 x Sh 120062_5	318,5	1.689
1H_101x57_4	171	1.715	7H_52x62_1	887	1.868
1H_101x57_5	69	1.690	7H_52x62_2	1010,5	1.893
Sq 120044 x Sh 120061_1	366	1.704	7H_52x62_3	1253,5	1.889
Sq 120044 x Sh 120061_2	432	1.695	7H_52x62_4	1282	1.866
Sq 120044 x Sh 120061_3	326	1.689	7H_52x62_5	1205	1.878
Sq 120044 x Sh 120061_4	353	1.700	Sq 120038 x Sh 120051_1	1230,5	1.866
Sq 120044 x Sh 120061_5	218,5	1.710	Sq 120038 x Sh 120051_2	767,5	1.850
2H_44x61_1	366,5	1.652	Sq 120038 x Sh 120051_3	928,5	1.776
2H_44x61_2	160,5	1.735	Sq 120038 x Sh 120051_4	955,5	1.879
2H_44x61_3	616	1.690	Sq 120038 x Sh 120051_5	912,5	1.747
2H_44x61_4	333,5	1.665	8H_38x51_1	762,5	1.836
2H_44x61_5	676	1.722	8H_38x51_2	537	1.878
Sq 120101 x Sh 120071_1	258	1.821	8H_38x51_3	720	1.898
Sq 120101 x Sh 120071_2	446	1.719	8H_38x51_4	1483,5	1.891
Sq 120101 x Sh 120071_3	292,5	1.693	8H_38x51_5	668	1.857
Sq 120101 x Sh 120071_4	493	1.675	Sq 120039 x Sh 120060_1	425,5	1.785
Sq 120101 x Sh 120071_5	813,5	1.705	Sq 120039 x Sh 120060_2	643	1.857
3H_101x71_1	357,5	1.651	Sq 120039 x Sh 120060_3	623,5	1.815
3H_101x71_2	354,5	1.651	Sq 120039 x Sh 120060_4	825	1.890
3H_101x71_3	181	1.700	Sq 120039 x Sh 120060_5	640	1.867
3H_101x71_4	297	1.625	9H_39x60_1	576,5	1.834
3H_101x71_5	466,5	1.708	9H_39x60_2	740	1.864
Sq 120103 x Sh 120071_1	434	1.678	9H_39x60_3	575	1.824
Sq 120103 x Sh 120071_2	103,5	1.675	9H_39x60_4	463,5	1.845
Sq 120103 x Sh 120071_3	182,5	1.725	9H_39x60_5	594,5	1.749
Sq 120103 x Sh 120071_4	147,5	1.755	Sh 120071 = Sh 130005_1	777	1.715
Sq 120103 x Sh 120071_5	80	1.625	Sh 120071 = Sh 130005_2	338,5	1.847
4H_103x71_1	299	1.650	Sh 120071 = Sh 130005_3	323,5	1.827
4H_103x71_2	671,5	1.642	Sh 120071 = Sh 130005_4	342	1.638
4H_103x71_3	153	1.611	10H_13005_1	745,5	1.774
4H_103x71_4	218,5	1.655	10H_13005_2	818,5	1.763
4H_103x71_5	352	1.698	10H_13005_3	517,5	1.767



Sq 120052 x Sh 120057_1	699	1.731	10H_13005_4	399	1.709
Sq 120052 x Sh 120057_2	552	1.742	10H_13005_5	690,5	1.775
Sq 120052 x Sh 120057_3	458,5	1.728	Sq 04T-142_03_1	1323,5	1.765
Sq 120052 x Sh 120057_4	349,5	1.695	Sh 05T-1688_28_1	1170,5	1.805
Sq 120052 x Sh 120057_5	383	1.721	11H_28x03_1	2187	1.760
5H_52x57_1	514	1.745	11H_28x03_2	2737,5	1.711
5H_52x57_2	770,5	1.756	11H_28x03_3	2401	1.659
5H_52x57_3	742	1.740	11H_28x03_4	3233,5	1.692
5H_52x57_4	826	1.805	11H_28x03_5	1865,5	1.774
5H_52x57_5	700	1.751	11H_28x03_6	1433	1.721
Sq 120089 x Sh 120071_1	807	1.750	11H_28x03_7	1741	1.854
Sq 120089 x Sh 120071_2	510,5	1.764	11H_28x03_8	1610	1.723
Sq 120089 x Sh 120071_3	878	1.775	11H_28x03_9	1211,5	1.836
Sq 120089 x Sh 120071_4	581	1.761	11H_28x03_10	2620	1.573
Sq 120089 x Sh 120071_5	950	1.828	11H_28x03_11	3376	1.882
6H_89x71_1	236,5	1.779	11H_28x03_12	2223,5	1.771
6H_89x71_2	389	1.769	11H_28x03_13	2015	1.712

\* Para cada individuo se almacenaron 2 alícuotas de ADN concentrado. volumen 100 µl. se presenta la concentración y calidad de una de las alícuotas. la segunda presentó concentración y calidad similares.

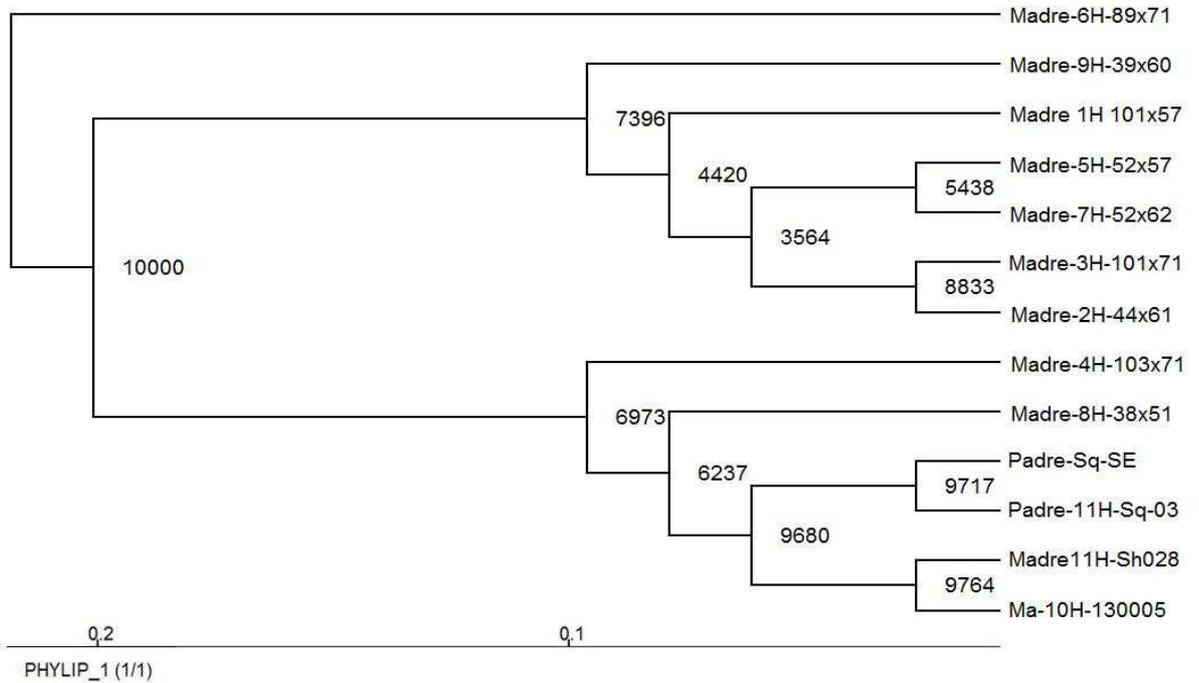
**Anexo 8. Estimación de la concentración y calidad del ADN de tomate de árbol, a través de la lectura de absorbancia con Espectro UV (260/280 nm).**

Accesiones	Alicuota* 1		Alicuota 2	
	Concentración	Calidad	Concentración	Calidad
	(ng/μL)	(260/280 nm)	(ng/μL)	(260/280 nm)
Su 620019_1	760	1.806	767	1.702
Su 620019_2	770	1.800	1400	1.760
Su 620019_3	1390	1.768	1670	1.789
Su 620019_4	920	1.720	1000	1.717
Su 620019_5	1065	1.707	728	1.750
Sm 6002059_1	910	1.670	510	1.650
Sm 6002059_2	880	1.660	240	1.790
Sm 6002059_3	930	1.640	520	1.700
Sm 6002059_4	726	1.631	625	1.710
Sm 6002059_5	717	1.650	679	1.750
Su019 x Sm059_1	330	1.710	450	1.700
Su019 x Sm059_2	950	1.736	860	1.710
Su019 x Sm059_3	657	1.700	600	1.720
Su019 x Sm059_4	820	1.760	690	1.753
Su019 x Sm059_5	610	1.700	720	1.780
Sb 620021_1	850	1.831	750	1.844
Sb 620021_2	854	1.680	920	1.550
Sb 620021_3	528	1.650	605	1.700
Sb 620021_4	530	1.800	679	1.816
Sb 620021_5	829	1.875	664	1.864
Su019 x Sb021_1	2460	1.758	621	1.730
Su019 x Sb021_2	550	1.777	1200	1.815
Su019 x Sb021_3	1014	1.818	1300	1.780
Su019 x Sb021_4	708	1.808	398	1.700
Su019 x Sb021_5	680	1.810	870	1.712

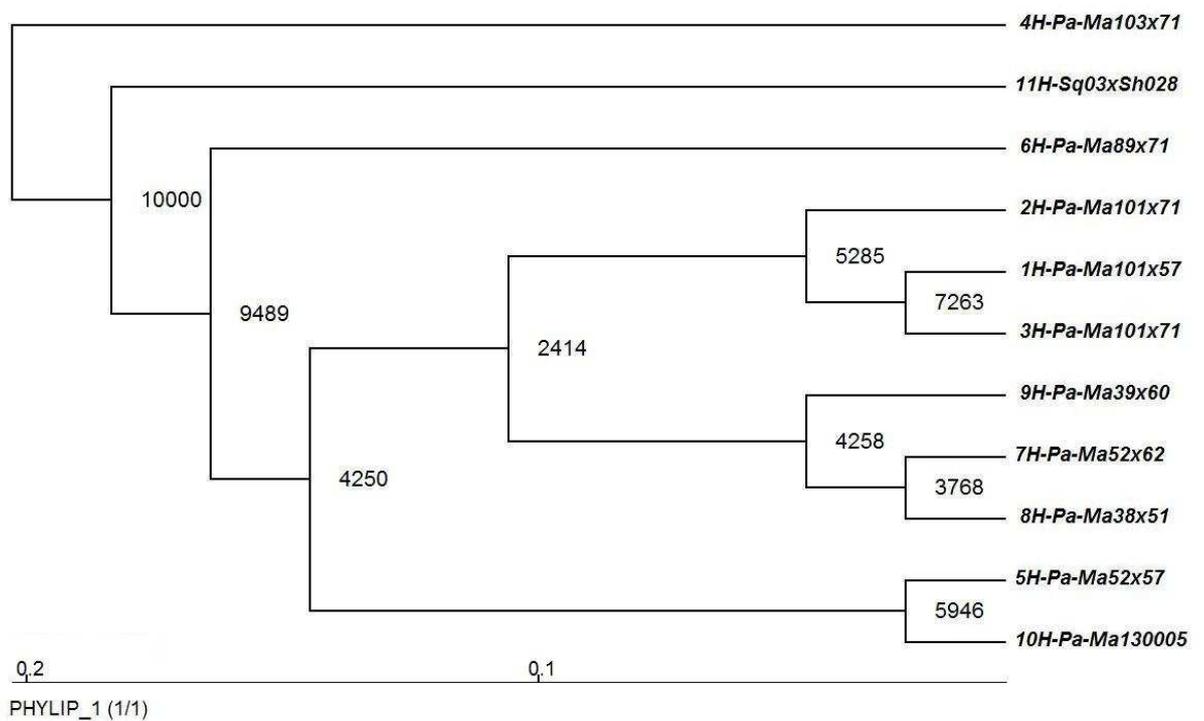
\*Cada alícuota corresponde a un volumen de 100 μl. concentración y calidad similares.



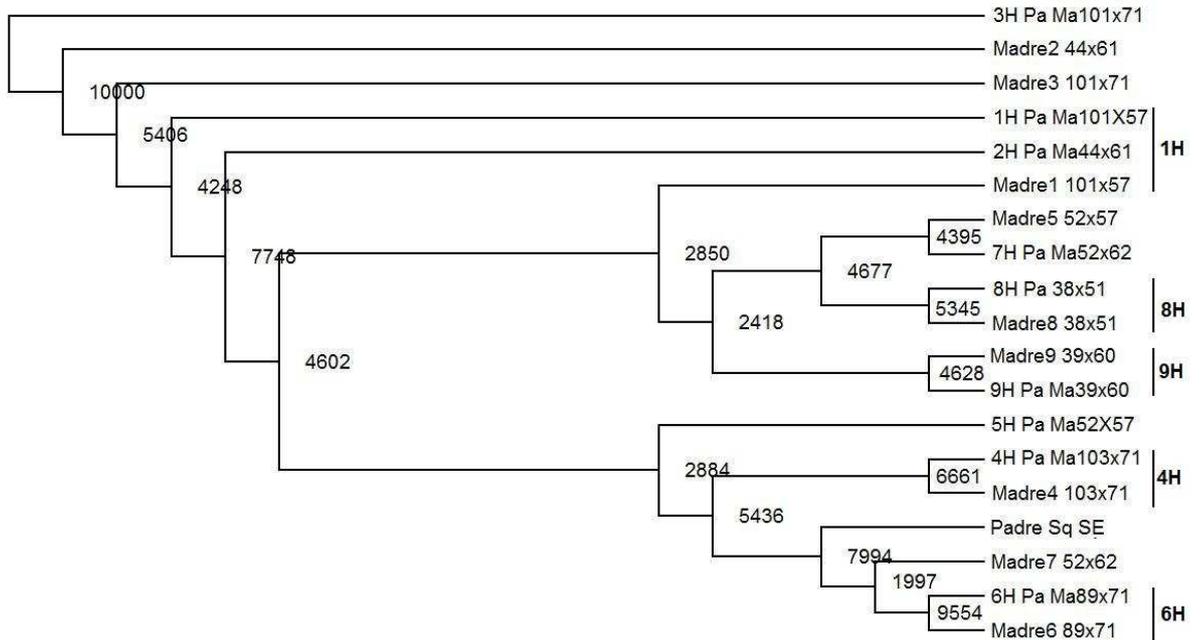
**Anexo 9.** Árboles consenso de poblaciones de padres, madres e híbridos de lulo generados por PHYLIP 3.5, utilizando UPGMA, mostrando valores de “bootstrap” sobre 10000 repeticiones.



a) Árbol de poblaciones de padres y madres de híbridos 1H a 11H, con bootstrap de 35 a 100%.

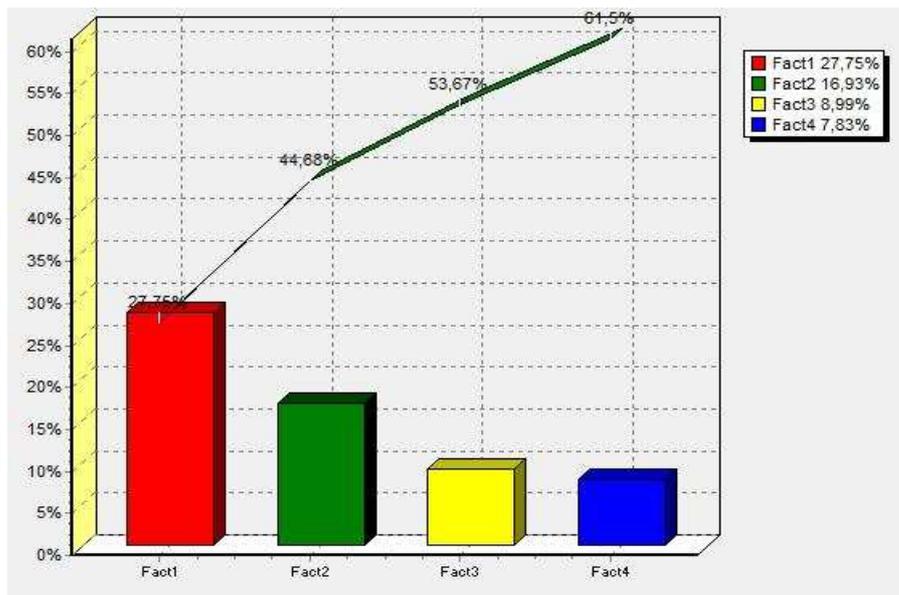


b) Árbol de poblaciones de híbridos 1H a 11H con bootstrap de 24 a 100%.



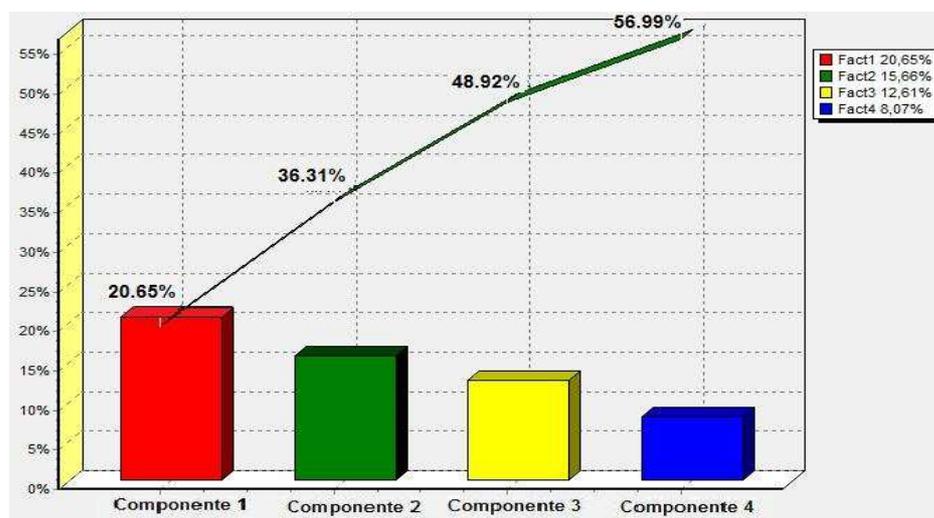
c) Árbol de poblaciones parentales e híbridos 1H a 9H con bootstrap de 19 a 100 %; Híbridos señalados a la derecha se agrupan a alta similitud con sus correspondientes accesiones maternas excepto para 1H.

Anexo10. a) Valores acumulados de los cuatro componentes principales de los parentales de los híbridos 1H a 11H generado por GENETIX 4.03 versión 5.





b) Valores acumulados de los cuatro componentes principales de los híbridos 1H a 11H generado por GENETIX 4.03 versión 5.



Anexo 11. Índices de fijación y heterocigosidad por locus y por accesión híbridos 1H a 9H, y de padres e híbridos 10H y testigo 11H.

Species	Promedio y rango de índices <sup>1</sup>						
		$H_o$ <sup>2</sup>	$H_e$ <sup>3</sup>	Alelos /locus	$F_{IS}$ <sup>4</sup>	$F_{IT}$ <sup>5</sup>	$F_{ST}$ <sup>6</sup>
Híbridos lulo 1H a 9H	Accesiones	0,50 (0,2 a 0,49)	0,34 (0,23 a 0,42)	1,88	-0,19 (-0,3 a -0,16)	-0,13 (-0,19 a -0,04)	0,09 (0,06 a 0,11)
	Locus	0,48 (0,2 a 0,49)	0,36 (0,23 a 0,42)		-0,23 (-0,3 a -0,16)	-0,12 (-0,19 a -0,04)	0,09 (0,06 a 0,11)
Híbridos lulo 10H y 11H	Accesiones	0,332 (0,09 a 0,44)	0,1715 (0,02 a 0,47)	1,3653	-0,94 (-0,98 a -0,89)	-0,09885 (-0,15 a -0,03)	0,4346 (0,40 a 0,46)
	Locus	0,31 (0,08 a 0,43)	0,153 (0,02 a 0,48)		-0,923 (-0,97 a -0,86)	-0,0925 (-0,16 a -0,02)	0,415 (0,38 a 0,47)

<sup>1</sup>Se indica entre paréntesis. <sup>2</sup>Heterocigosidad observada. <sup>3</sup>Heterocigosidad esperada.

<sup>4</sup>Coefficiente de consanguinidad. <sup>5</sup>Medida de la diferenciación genética en poblaciones. <sup>6</sup>Diferencia de frecuencias de los alelos entre las poblaciones



**Anexo 12. Árbol consenso de poblaciones de padre, madres e híbridos de tomate de árbol generados por PHYLIP 3.5, utilizando UPGMA, mostrando valores de “bootstrap” sobre 10000 repeticiones.**

