



Estación Experimental Santa Catalina

Departamento de Biotecnología

Informe Anual 2017

Mejía – Pichincha – Ecuador
Diciembre / 2017



INFORME 2017

1. **Departamento:** Biotecnología
2. **Director de la Estación Experimental Santa Catalina:** Dr. Luis Ponce
3. **Coordinador Nacional I+D+i:** Dr. Eduardo Morillo
4. **Responsable del Departamento en la Estación Experimental:** Dr. Eduardo Morillo
5. **Equipo técnico multidisciplinario I+D (Personal del departamento):**

Dr. Eduardo Morillo	Investigador Principal 3
Ing. Johanna Buitrón	Técnico Biología Molecular (contrato de servicios ocasionales)
Ing. Santiago Meneses	Técnico Cultivo de Tejidos (contrato de servicios ocasionales)
Ing. Jimmy Sampedro	Técnico Biología Molecular (contrato de servicios ocasionales, desde junio 2017)
Sra. Patricia Medina	Asistente administrativo (a medio tiempo)
Sra. Georgina Vera	Asistente de laboratorio
Tesistas	Denisse Yáñez (UDLA) Fernanda Dueñas (UDLA) Juan Jácome (ESPE) Lisbeth Recto (UDLA)

6. Socios estratégicos para investigación:

CIRAD-Unidad AGAP, Equipo Genómica y Selección (Montpellier, Francia)
UDLA, Ingeniería de Alimentos (Quito)
Ministerio de Electricidad y Energía Renovables (MEER)-IICA (Quito)

7. Publicaciones científicas 2017:

En revistas indexadas con factor de impacto (SCOPUS):

EDUARDO MORILLO, S. RANDERS KNUDSEN and G. SECOND. 2017. Assessment of genetic relationships between cultivated arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) and its wild close relatives in the domestication area using microsatellite markers. *Conservation Genetics*, Vol. 18: 1267-1275. [DOI 10.1007/s10592-017-0978-y](https://doi.org/10.1007/s10592-017-0978-y)

TOAPANTA D., MORILLO E. Y VIERA W. 2017. Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 285-294. http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628

JOHANA BUITRON y EDUARDO MORILLO. 2017. Estandarización de un método de detección molecular del Cucumber mosaic virus (CMV) en banano ecuatoriano. Revista CORPOICA: Ciencia y tecnología agropecuarias (Colombia). Volumen 18(1):113-124. http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:562

Proceedings:

MENESES, L.; MORILLO E. Estado actual de la indexación por medios biotecnológicos de variedades comerciales y nativas de papa en el INIAP. Libro de memorias. 7 Congreso Ecuatoriano de la Papa. Adaptación al cambio climático. Tulcán (Ecuador). 29-30 Jun 2017. ISBN 978-9942-28-795-3. pp 63-65

MORILLO E. y BUITRON J. 2017. Generación de la tecnología de marcadores moleculares microsatélites para el genotipaje de especies nativas de interés. In. Memorias científicas del Congreso Internacional de Agricultura Sustentable. ISBN : 978-9942-759-01-6. Pg. 31. UTC, Ecuador

MORILLO E., ILES D., VINUEZA D, PONCE L. AND BUITRON J. 2017. INIAP advances in biotechnological research applied to avocado: somatic embryogenesis response and screening of genetic variability. In: Proceedings of Avocado Production and Industrial Chain. International Journal of Clinical and Biological Sciences. Volume 2 (Suppl. 1). ISSN 2455-6858

8. Participación en eventos de difusión científica, técnica o de difusión:

- Taller organizado por el IICA en la elaboración del proyecto de Investigación en Biotecnología de Piñón el 5 y 6 de enero 2017 (EMorillo, JBuitron)
- Taller del equipo de investigación de PC en palma realizado en la EETP del 24 al 27 de enero 2017 (EMorillo)
- Capacitación del uso de la base de datos DATA INIAP. 15 de marzo 2017 (Personal Técnico DNB)
- VII Congreso Ecuatoriano de la Papa realizado el 29 al 30 -06-2017 en la ciudad de Tulcán. (S. Meneses, expositor).
- Curso de estadística R, 18 y 19 de julio del 2017 (SMeneses)
- Taller "Manejo de software para análisis de información molecular en papa". 04-07 julio del 2017 (EMorillo, JBuitron)
- Curso Norma NTE INEN ISO/IEC 17025: 2013 Requisitos para el funcionamiento de diferentes tipos de organismos que realizan inspección y criterios de acreditación del SAE. 29-30 noviembre y 1 diciembre 2017 (JBuitron, SMeneses, JSampedro)
- Seminario "Métodos y Desarrollo de Protocolos para la Investigación en Organismos Genéticamente Modificados". 12-13 septiembre (E. Morillo)
- Curso Transformación genética en plantas e introducción a la edición de genes: CRISPR-Cas9". ESPOL, 12-15 diciembre (E. Morillo, J. Buitrón)

9. Actividades

Actividad 1:**1. Título**

Caracterización molecular de materiales criollos y de la colección INIAP de *Jatropha curcas* L., empleando marcadores microsatélites

2. Autores

Johanna Buitrón y Eduardo Morillo

3. Resumen

El piñón *Jatropha curcas* es un cultivo con un excelente potencial agroenergético, siendo una alternativa para la producción de biocombustibles. El INIAP ha trabajado en este cultivo con el propósito de obtener materiales de alto rendimiento y productividad. Desde el año 2010, se han generado trabajos de investigación identificándose materiales promisorios en una colección de germoplasma de materiales representativos de piñón en el país. Este estudio complementa la información molecular disponible caracterizando un set de materiales criollos de alta productividad, mediante un análisis con un número mayor de marcadores al trabajo realizado previamente (INIAP, 2010). De un *screening* de 40 marcadores publicados recientemente, se validó la amplificación de 36 y se observó polimorfismo únicamente en 12 marcadores. La información obtenida se utilizó en un análisis de diversidad cuyos resultados se presentan en este reporte. De manera general los marcadores revelan una modesta diversidad de *J. curcas* a nivel de la información disponible en otras colecciones de germoplasma, revelándose sin embargo en los materiales criollos de alta productividad una variabilidad similar e incluso mayor en dos marcadores a la colección de referencia del INIAP. La heterocigosis esperada y el índice de polimorfismo encontrado para cada marcador SSR analizado evidenciaron valores reducidos, y se identificaron así mismo un alto número de genotipos duplicados entre el material caracterizado.

4. Palabras clave

Jatropha curcas, piñón, diversidad, microsatélites, SSRs

5. Introducción

Jatropha curcas es un arbusto perteneciente a la familia de Euphorbiaceae. Es una planta con muchos atributos, usos múltiples y gran potencial agroenergético. Esta planta se puede usar para prevenir y/o controlar la erosión, para recuperar tierras, cultivadas como cercas vivas, especialmente para contener o excluir animales de granja y ser plantado como cultivo comercial. Es un nativo de América tropical, en la actualidad cultivado en muchas partes de los trópicos y subtrópicos en África y Asia (Openshaw, 2000). Alrededor del mundo se ha comenzado con trabajos de mejoramiento en este cultivo, con el propósito de producir el aceite no comestible de las semillas para generar biocombustibles, sea como aceite puro o transformado en biodiesel para motores de combustión (Saturnino *et al.*, 2005; Sonnenholzner, 2008).

En el caso particular de Ecuador, los combustibles fósiles constituyen la principal fuente de energía; sin embargo, estos vienen enfrentando una significativa alza de precios, dificultad de encontrar nuevas fuentes de extracción y sobre todo problemas de contaminación ambiental. En los últimos años nuestro país ha tomado iniciativas para un cambio en la matriz energética con un objetivo claro superar la dependencia a los combustibles fósiles (Mendoza *et al.*, 2017). La generación de cultivos agro-energéticos es una de las alternativas que se ha planteado para ayudar a satisfacer la demanda en la producción de biocombustibles. El INIAP en la Estación Experimental Portoviejo, ha venido trabajando en el cultivo de *J. curcas* para la extracción de aceites y la generación de un biocombustible que se utiliza en un proyecto piloto de generación de energía eléctrica en las islas Galápagos (MEER, com. pers.). Sin embargo, pese a todo el trabajo que se ha realizado, todavía quedan grandes inconvenientes por solucionar e investigar en este cultivo que apenas ha sido explotado.

Uno de los retos en la investigación de piñon es encontrar o desarrollar variedades que muestren características deseables como precocidad, buena producción de semillas y aceite, además de resistencia a plagas y enfermedades. Con este fin se hace indispensable caracterizar el germoplasma existente e identificar material genético promisorio. En este estudio se generó información de la diversidad genotípica de un set de materiales criollos de alta productividad y la colección de germoplasma del INIAP que se utilizó como referencia.

6. Objetivos

1. Caracterizar molecularmente un set de materiales criollos de alta productividad de piñon con 12 marcadores microsatélites
2. Determinar y cuantificar la diversidad alélica y heterocigosidad y de los materiales criollos de alta productividad respecto a la colección de referencia del INIAP.
3. Determinar la existencia de genotipos duplicados en el material analizado.

7. Materiales y métodos

Toma de muestras: Las muestras vegetales de material criollo de alta productividad fueron colectadas en la provincia de Manabí en colaboración con el equipo técnico del MEER y el IICA. Se tomaron hojas en buen estado fitosanitario y se mantuvieron en bolsas plásticas herméticas con 100 gramos de sílica gel para su secado. Se realizó el refrescamiento de la sílica gel para asegurar el secado apropiado de las muestras foliares colectadas. Se colectaron un total de 31 muestras de plantas de piñon correspondiente a 7 accesiones codificadas como 201 al 207 (ej. 201-1: planta 1 de la accesión 201, etc.).

Extracción, cuantificación y validación de ADN: Para la extracción de ADN se realizó la pulverización del material foliar seco y se empleó el protocolo descrito por Russell *et al.* (2010), con las modificaciones de Souza *et al.* (2012) (Anexo 1). Los ADN obtenidos y purificados se cuantificaron mediante espectrofotometría y validados con el primer JcSSR-26, el coctel PCR y el programa de amplificación empleados se describen en la tabla 1 y 2.

Muestras referenciales de ADN: Se trabajó con muestras del banco de ADN de la colección de *Jatropha curcas* L. del INIAP preservadas desde el 2010 (INIAP, 2010). Los ADN almacenados se purificaron y validaron por PCR. En total se recuperaron 83 ADN para este estudio.

Validación de la amplificación de SSR: Se realizó la validación de la amplificación de 40 SSR descritos en el trabajo de Sinha *et al.*, (2015). Se emplearon siete muestras de ADN previamente validadas más un control negativo, el coctel PCR y programa térmico empleados para este proceso se describen en las tablas 1 y 2, la temperatura de *annealing* utilizada fue de 56°C para todos los *primers*. Los productos PCR fueron cargados en geles de agarosa al 2% teñidos con *Syber safe*. En el Anexo 2 se detalla la lista completa de los marcadores sintetizados para el estudio.

Tabla 1. Coctel de amplificación para la validación de la amplificación de ADN de *Jatropha curcas*

Reactivos	Concentración de reactivos	Volumen para 1 reacción
ADN	5ng/ul	2.000 ul
Colorless GoTaq Flexi Tampón	5x	1.500 ul
MgCl ₂	25mM	0.600 ul
dNTP's	10mM	0.150 ul
Cebador-F	20 µM	0.375 ul
Cebador-R	20 µM	0.375 ul
Agua ultra pura		2.380 ul
Taq DNA Polimerasa	5U/ul	0.125 ul
Volumen Total		7.500 ul

Tabla 2. Programa térmico para la amplificación

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1.	95	5 min	1
2.	94	1 min	30
3.	Tm	45 seg	
4.	72	1 min	
5.	72	7 min	1
6.	10	10 in	1

Validación del polimorfismo de los SSR: Se realizó la verificación del polimorfismo de los SSR validados. Para este propósito se eligió ADN de las diferentes accesiones colectadas y ADN de la colección INIAP para contar con la mayor diversidad. Se realizó una amplificación con la *metodología M13 tailing*, el coctel de amplificación y programa térmico empleado se describen en las tablas 3 y 4. Los productos generados fueron cargados para su visualización y análisis en le LI-COR 4300s.

Tabla 3. Coctel de amplificación para la validación del polimorfismo de los microsatélites. Metodología *M13 Tailing*

PCR- <i>M13 Tailing</i>	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			0,32
TAMPÓN PCR (X)	5	1	1,00
MgCl ₂ (mM)	25	2,5	0,50
dNTP's (mM)	5	0,2	0,20
M13 700/800	1	0,16	0,80
Primer (uM) F -M13	1	0,01	0,05
Primer (uM) R	10	0,16	0,08
Taq casera (U/uL)	5	0,05	0,05
MUESTRA (ng/uL)	5	2	2,00
VOL. TOTAL (uL)			5

Tabla 4. Programa térmico para la amplificación empleando la metodología *M13 Tailing*

Fases	T °C	Tiempo	Ciclos
1	94 °C	2 min	1
2	95 °C	4 min	1
3	95 °C	1 min	25
4	TA °C	2 min	
5	72 °C	2 min	
6	72 °C	10 min	1
7	4 °C	10 min	1

Amplificación y genotipaje: Con los marcadores seleccionados en base al polimorfismo, se realizó la amplificación de la totalidad de las muestras de ADN validadas. Los productos generados se cargaron en geles de poliacrilamida y fueron corridos en el LI-COR 4300s. Las imágenes obtenidas se analizaron en el software SAGA GT. Se generó una matriz de datos para el análisis en base a los pesos en pares de bases de los productos PCR obtenidos.

8. Resultados

Extracción, cuantificación y validación de ADN: Se realizó la extracción de 31 muestras de piñón (colectadas- criollas); la cuantificación e índice de pureza se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación e índice de pureza de los ADN de piñones extraídos

No.	CODIGO LAB	ÍNDICE D EPUREZA	CONCETRACIÓN (ng/μl)
1	201-1	1.934	724.661
2	201-2	2.155	547.622
3	201-3	1.945	573.739
4	201-4	2.057	718.785
5	202-1	1.964	1212.809
6	202-2	2.017	1635.847
7	203-3	1.758	250.109
8	204-1	1.745	364.7
9	204-2	1.814	282.016
10	204-3	1.786	542.251
11	204-4	1.895	439.7
12	205-1	2.086	460.538
13	205-2	2.098	1319.198
14	205-3	1.974	991.598
15	205-4	1.994	962.604
16	205-5	1.956	792.912
17	205-6	1.935	588.934
18	205-7	2.057	1078.892
19	205-8	2.117	549.397
20	205-9	1.958	609.863
21	205-10	1.918	632.301
22	206-1	1.964	850.243
23	206-2	1.965	1057.324
24	206-4	2.137	441.277
25	206-5	1.954	978.348
26	206-3	2.064	326.776
27	207-1	1.943	642.572
28	207-2	1.922	612.29
29	207-3	2.04	2008.717
30	207-4	1.989	612.37
31	207-5	1.984	751.478

La validación de muestras de ADN con el marcador JcSSR-26 se visualiza en la figura 1.

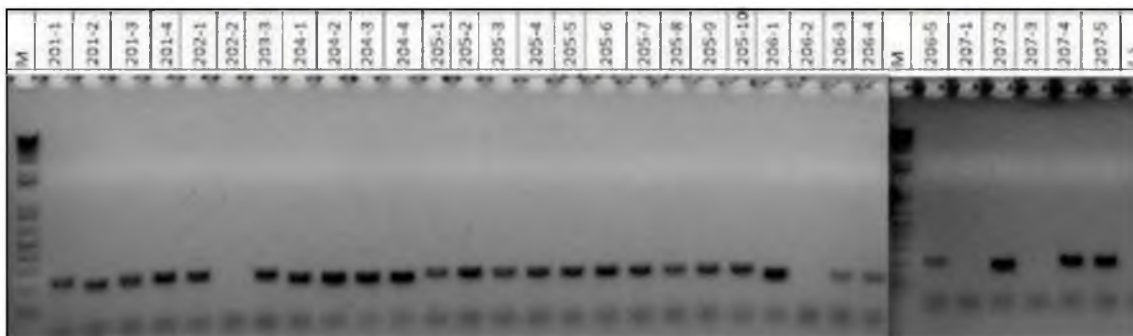


Figura 1. Validación de las muestras de ADN de piñón empleando el marcador JcSSR-26 M: marcador de talla (1KB plus- invitrogen); (-): control negativo.

Validación de la amplificación de SSR: Se realizó la visualización de la amplificación de la validación de los SSR (Figura 2). Los *primers* pJcSSR2741, pJcSSR3442, pJcSSR3836 Y pJcSSR3862 no presentaron amplificación, se realizaron pruebas de amplificación con gradientes de temperaturas de annealing sin obtener resultados. Los 36 *primers* amplificaron a una temperatura de 56°C.

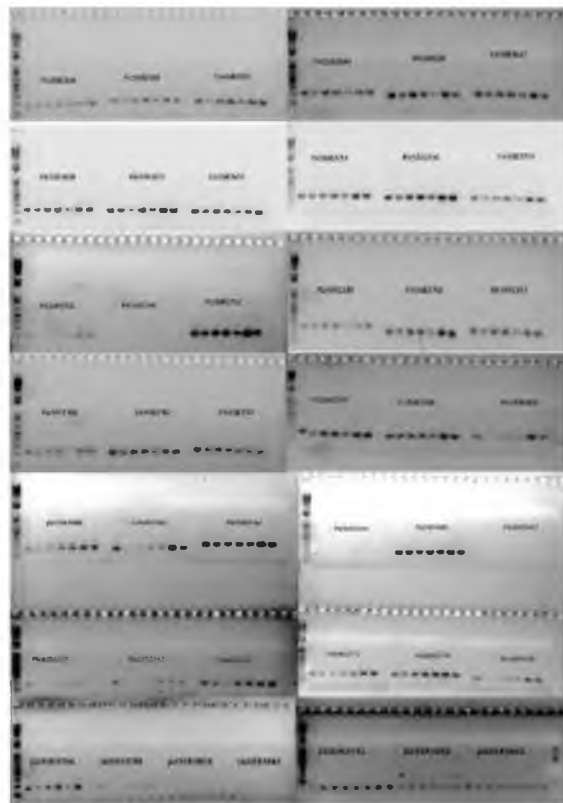


Figura 2. Validación de la amplificación de 40 SSR de piñón.

Validación del polimorfismo de los SSR

La validación del polimorfismo de los SSR dio como resultado 11 *primers* seleccionados de 36 probados (Figura 3).

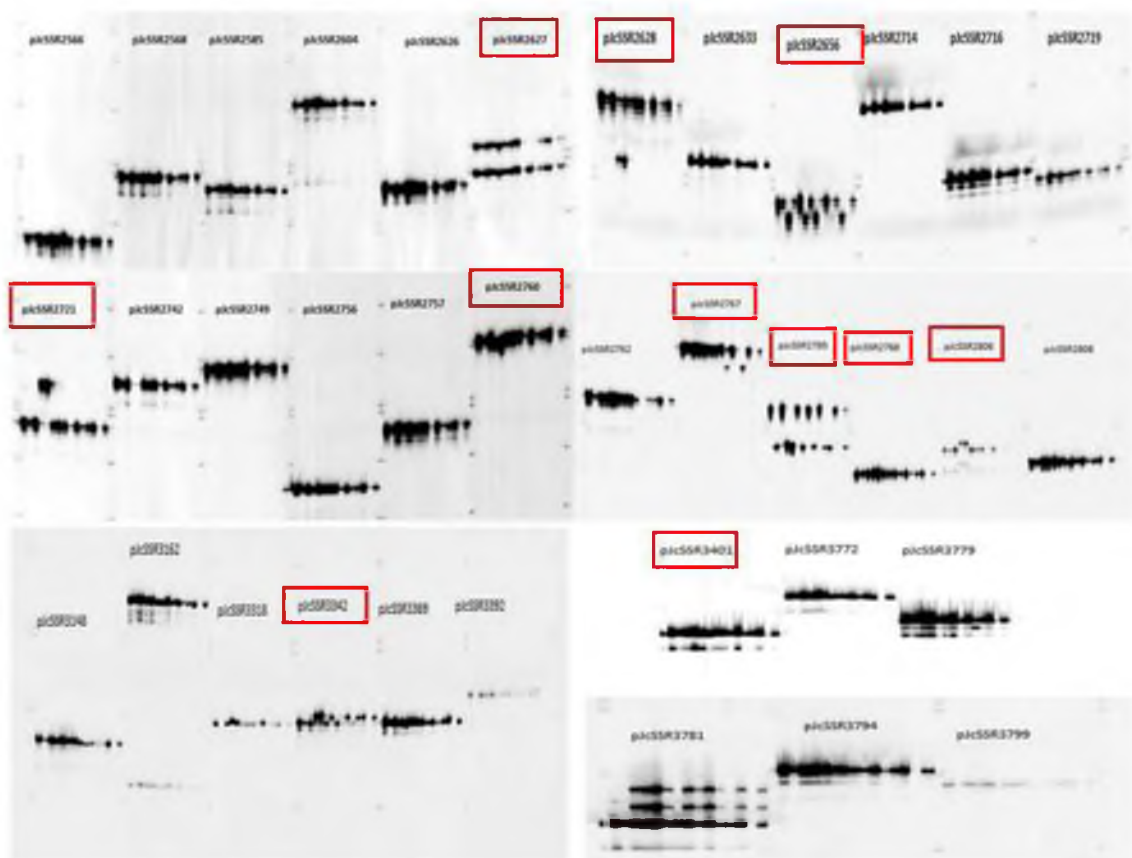


Figura 3. Validación del polimorfismo de 36 marcadores SSR para *Jatropha curcas*; recuadros rojos: SSR seleccionados

Se incluyó en el estudio el primer JcSSR-26, determinado como polimórfico en el trabajo de Zambrano, (2010); dando un total de 12 *primers* seleccionados para el análisis, en la tabla 3 se detallan los *primers* seleccionados por su polimorfismo.

Tabla 3. *Primers* SSR polimórficos seleccionados para el estudio

Primers	Alelos encontrados (pb)
pJcSSR2627	177-189
pJcSSR2628	188-198-210-236
pJcSSR2656	170-176
pJcSSR2721	174-196
pJcSSR2760	211-213-215
pJcSSR2767	216-224
pJcSSR2785	174-194
pJcSSR2788	158-164-178
pJcSSR2806	170-174
pJcSSR3342	156-158
pJcSSR3401	166-170
JcSSR26	179-193-211

Amplificación y genotipaje: Se realizó la amplificación de un total de 114 muestras de piñón (colección INIAP-criollas) con los *primers* SSR 12 seleccionados dando un total de 1368 data points generados. En la figura 4 se visualizan las corridas electroforéticas realizadas en el LICOR 4300s analizadas en el programa SAGA GT.

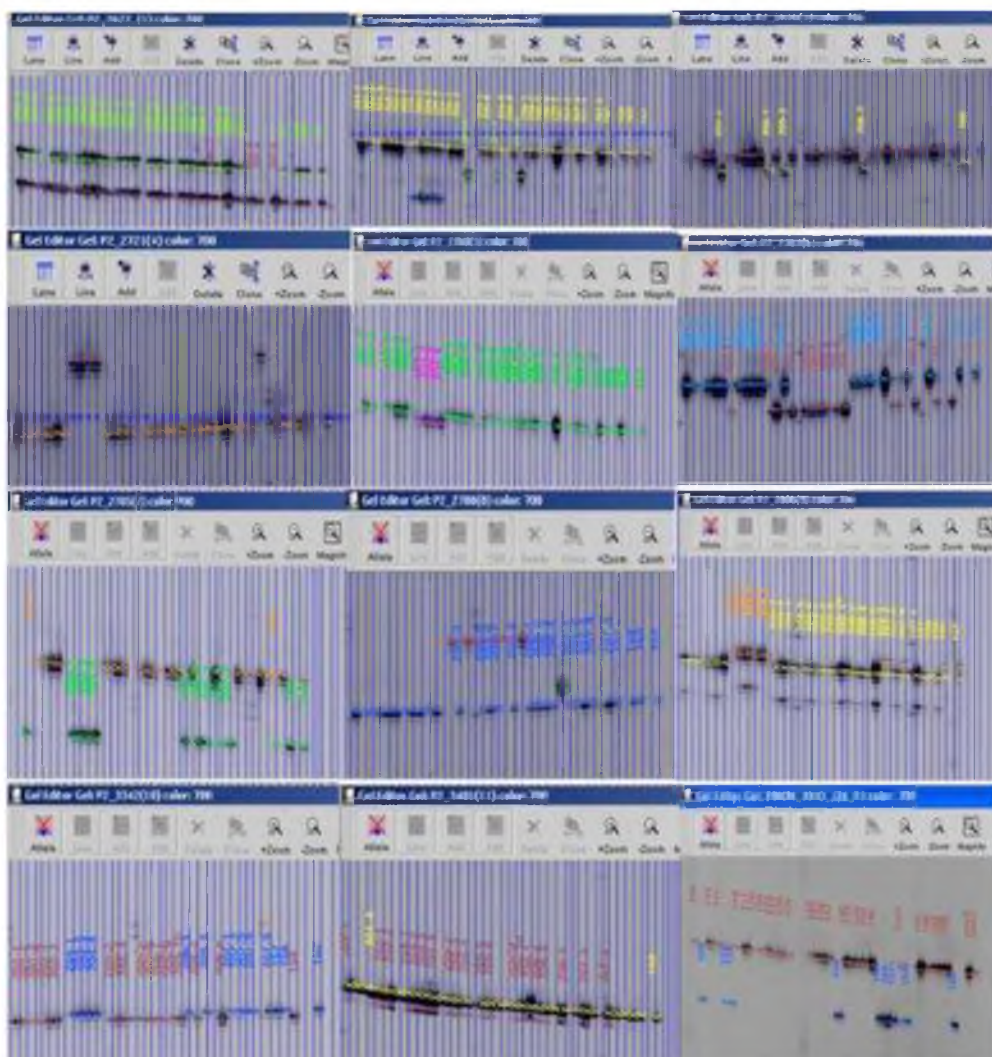


Figura 4. Corridas electroforéticas de los 12 SSR seleccionados para el estudio, análisis en el programa SAGA GT.

En el Anexo 3, se detalla la matriz de datos obtenidas del genotipaje de los 12 *primers* con las 114 muestras estudiadas.

Variables de diversidad genética: Se obtuvo un total de 29 alelos, con un promedio de 2,4 alelos por locus, el marcador con mayor índice de polimorfismo fue el pJcSSR2627 con un valor de 0,37. En la tabla 4 se describen las variables de diversidad para todos los marcadores amplificados.

Tabla 4. Variables de diversidad para los 12 SSR seleccionados

Primers	Mayor frecuencia alelica	No. Genotipos	No. Alelos	No. Observaciones	No. Alelos	Disponibilidad	Heterocigosidad esperada	Heterocigosidad observada	PIC
pJcSSR2627	0,567	3	114	112	2	0,982	0,491	0,848	0,370
pJcSSR2628	0,927	6	114	109	4	0,956	0,139	0,073	0,135
pJcSSR2656	0,743	3	114	113	2	0,991	0,382	0,088	0,309
pJcSSR2721	0,934	3	114	114	2	1,000	0,123	0,009	0,115
pJcSSR2760	0,944	3	114	108	3	0,947	0,106	0,000	0,103
pJcSSR2767	0,616	3	114	112	2	0,982	0,473	0,143	0,361
pJcSSR2785	0,768	3	114	110	2	0,965	0,356	0,100	0,293
pJcSSR2788	0,909	5	114	110	3	0,965	0,169	0,036	0,163
pJcSSR2806	0,778	3	114	108	2	0,947	0,346	0,093	0,286
pJcSSR3342	0,598	3	114	107	2	0,939	0,481	0,075	0,365
pJcSSR3401	0,864	2	114	114	2	1,000	0,235	0,272	0,207
JcSSR26	0,768	4	114	114	3	1,000	0,363	0,105	0,306
Promedio	0,785	3,417	114,000	110,917	2,417	0,973	0,305	0,154	0,251

En la tabla 5, se visualizan las frecuencias para cada alelo encontrado, las frecuencias resaltadas son las mayores.

Tabla 5. Frecuencias alélicas para los alelos encontrados

Marker	Alelo	No. Observaciones	Frecuencia
pJcSSR2627	177	127	0,5670
	189	97	0,4330
pJcSSR2628	188	8	0,0367
	198	7	0,0321
	210	202	0,9266
	236	1	0,0046
	170	58	0,2566
pJcSSR2656	176	168	0,7434
	174	213	0,9342
pJcSSR2721	196	15	0,0658
	211	8	0,0370
pJcSSR2760	213	204	0,9444
	215	4	0,0185
	216	86	0,3839
pJcSSR2767	224	138	0,6161
	174	51	0,2318
pJcSSR2785	194	169	0,7682
	158	200	0,9091
pJcSSR2788	164	10	0,0455
	178	10	0,0455
	170	168	0,7778
pJcSSR2806	174	48	0,2222
	156	128	0,5981
pJcSSR3342	158	86	0,4019
	166	31	0,1360
pJcSSR3401	170	197	0,8640
	179	3	0,0132
JcSSR26	193	50	0,2193
	211	175	0,7675

En la tabla 6, se compara los alelos encontrados entre los materiales criollos y la colección de referencia del INIAP.

Tabla 6. Comparación de alelos

PRIMERS	CRIOLLAS	COLECCIÓN
ALELOS		
pJcSSR2627	177	177
	189	189
pJcSSR2628	188	188
	198	198
	210	210
pJcSSR2656	170	170
	176	176
pJcSSR2721	174	174
	196	196
pJcSSR2760	211	213
	213	215
pJcSSR2767	216	216
	224	224
pJcSSR2785	174	174
	194	194
pJcSSR2788	158	158
	164	164
	178	
pJcSSR2806	170	170
	174	174
pJcSSR3342	156	156
	158	158
pJcSSR3401	166	166
	170	170
JcSSR26	179	193
	193	211
	211	

En la tabla 7, se detalla los materiales que en base al análisis con los 12 marcadores utilizados presentaron identidad genética a nivel de los marcadores analizados.

9. Conclusiones

- Se estableció un set de doce marcadores SSR útiles para la caracterización molecular de *J. curcas*. El marcador pJcSSR2627 presentó el mayor índice de polimorfismo con valor de 0,37.
- Se detectó un total de 29 alelos en las accesiones estudiadas con los 12 SSR analizados, con un promedio de 2,4 alelos por locus. En los materiales criollos se evidenció la presencia de la totalidad de alelos observados en la colección de referencia del INIAP, observándose la presencia adicional de dos alelos adicionales inexistentes en la colección de referencia (alelos 178 y 211 en los marcadores pJcSSR2788 y JcSSR26 respectivamente). Este resultado sugiere una base genética mayor en los materiales criollos a la colección de referencia del INIAP.
- Los valores la heterocigosidad esperada o variabilidad genética revelan una reducida variabilidad en las accesiones analizadas (criollas y colección de referencia)
- Al nivel del estudio de los doce marcadores seleccionados, la presencia de duplicados en las accesiones se constató en 41 materiales en el 100% de los alelos

Tabla 7. Análisis de duplicados

Muestra 1	Muestra 2	Score	No. Alelos	No. Alelos iguales
1	4	100,00%	24	24
10	3	100,00%	24	24
10	8	100,00%	24	24
100	138	100,00%	24	24
120	121	100,00%	24	24
120	143	100,00%	24	24
120	148	100,00%	24	24
120	60	100,00%	24	24
120	159	100,00%	24	24
121	143	100,00%	24	24
121	148	100,00%	24	24
121	60	100,00%	24	24
121	159	100,00%	24	24
128	33	100,00%	24	24
128	53	100,00%	24	24
136	142	100,00%	24	24
136	145	100,00%	24	24
142	145	100,00%	24	24
143	148	100,00%	24	24
143	60	100,00%	24	24
143	159	100,00%	24	24
144	92	100,00%	24	24
148	60	100,00%	24	24
148	159	100,00%	24	24
155	202-1	100,00%	24	24
23	206-4	100,00%	24	24
26	27	100,00%	24	24
26	52	100,00%	24	24
27	52	100,00%	24	24
3	8	100,00%	24	24
33	53	100,00%	24	24
34	6	100,00%	24	24
60	159	100,00%	24	24
202-2	205-3	100,00%	24	24
202-2	206-2	100,00%	24	24
204-1	204-2	100,00%	24	24
204-3	204-4	100,00%	24	24
2051-0	205-4	100,00%	24	24
205-3	206-2	100,00%	24	24
205-6	205-9	100,00%	24	24
207-3	207-5	100,00%	24	24
11	12	100,00%	22	22
120	127	100,00%	22	22
120	147	100,00%	22	22
121	127	100,00%	22	22
121	147	100,00%	22	22
127	143	100,00%	22	22
127	148	100,00%	22	22
127	60	100,00%	22	22
127	159	100,00%	22	22
136	93	100,00%	22	22
142	93	100,00%	22	22
143	147	100,00%	22	22
145	93	100,00%	22	22
146	147	100,00%	22	22
147	148	100,00%	22	22
147	60	100,00%	22	22
147	159	100,00%	22	22
154	38	100,00%	22	22
28	57	100,00%	22	22
32	34	100,00%	22	22
32	6	100,00%	22	22
61	62	100,00%	22	22
76	95	100,00%	22	22
77	79	100,00%	22	22
207-1	207-2	100,00%	22	22
103	28	100,00%	20	20
127	147	100,00%	20	20
127	205-8	100,00%	20	20
155	201-1	100,00%	20	20
201-1	202-1	100,00%	20	20
201-1	202-2	100,00%	20	20
201-1	205-3	100,00%	20	20
201-1	206-2	100,00%	20	20
103	57	100,00%	18	18
103	76	100,00%	18	18

10. Bibliografía

INIAP 2010. Caracterización molecular de la colección nacional de piñon (*Jatropha curcas*) del INIAP mediante marcadores microsatelites. Informe técnico. 29p. Dpto. de Biotecnología, Estación Experimental Santa Catalina. Quito, Ecuador

- Mendoza, H., Mendoza, J., López, J., Mejía, N., Zambrano, F., Mendoza, M., & Ponce, W. (2017). Variabilidad genética de la colección de piñón (*Jatropha curcas* L.) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador, usando marcadores tipo microsatélites. *La Técnica: Revista de las Agrociencias*. e-ISSN 2477-8982, (17), 18-29.
- Morillo, E., Miño G. (2011). Marcadores moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito.
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and bioenergy*, 19(1), 1-15
- Russell A, Samuel R, Rupp B and Barfuss MHJ (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon* 59: 389- 404.
- Saturnino, H.M., Pacheco, D.D., Kakida, J., Tominaga, N., & Goncalves, N.P. (2005). Cultivo de Piñón manso (*Jatropha curcas* L.). Producción de oleaginosas para biodiesel. Belo Horizonte, BR Informe agropecuario, 26(229), 44-74.
- Sinha, P., Islam, M. A., Negi, M. S., & Tripathi, S. B. (2015). Development of novel microsatellite markers in *Jatropha curcas* and evaluation of their cross-species transferability. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(4), 1011-1016
- Sonnenholzner, D. R. (2008). A Review on the Potentials of the *Jatropha curcas* L. for Power Generation and Sustainable Development of Rural Areas. Case Study: Ecuador and the Isabela Island Galapagos. Thesis Diploma. Technische Universitat Munchen. Alemania.
- Souza, H. A., Muller, L. A., Brandao, R. L., & Lovato, M. B. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genet Mol Res*, 11, 756-764.
- Zambrano Gavilanes, F. (2010). Caracterización agronómica y molecular de la colección de piñón (*Jatropha curcas* L.) de la estación experimental Portoviejo del INIAP (Master's thesis, MANABÍ/Universidad Técnica de Manabí/2010).

11. Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN según Russell *et al.* (2010), con las modificaciones de Souza *et al.* (2012)

A partir de tejido seco, conservado en sílica gel, macerar cada muestra (100 mg. aproximadamente) en tubos de 1,7 ml. hasta obtener un polvo fino. Añadir a cada tubo 1,0 ml. de Buffer Sorbitol (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,35 M sorbitol; 5 mM EDTA pH 8,0; 1% PVP 40; 1% 2-mercaptoetanol). Proporcionar a cada tubo agitación por vórtex. Centrifugar los tubos por 10 minutos a 5800 rpm. Descartar el sobrenadante. Disolver el pellet en 1,0 ml. de Buffer Sorbitol y repetir el paso de lavado con Buffer Sorbitol 3 o 4 veces. A los pellets que quedan producto del último lavado, adicionar 1,0 ml. de Buffer Alto en Sales (100 mM Tris pH 8,0; 3 M NaCl; 3% CTAB; 20mM EDTA pH 8,0; precalentado a 60°C; 1% PVP-40; 0.2% 2-mercaptoetanol; 0.2% sarkosyl) e incubar las muestras por 1 hora 60°C. Mezclar las muestras con el buffer antes de ponerlas en baño María.

Añadir 700 µl. de CIA (24:1), mezclar suavemente por 10 minutos y luego centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos. Transferir el sobrenadante a nuevos tubos y añadir 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M) and 2/3 del volumen de isopropanol. Mezclar gentilmente e incubar a -20°C por 1 hora o toda la noche. Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos. Lavar el pellet con 500 µl de etanol 70% y una vez con etanol absoluto y centrifugar por 5 minutos. Secar el pellet ADN y disolver el pellet en 50-100 µl de Buffer TE.

Anexo 2. Lista de 40 marcadores microsatélites sintetizados para el estudio (Sinha et al., 2015)

Primer name	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
pJcSSR2566	GGGAGTGCCAAAATAGTTGT	TATGGAGTAAGCTACTCAGGC
pJcSSR2568	TCTTCACTTGTCTTTCTTTGC	TCTTTCCACAACCCCTTGA
pJcSSR2585	TCTGAAAAGACCACGAACTTG	TGCATGAACAAGGCCAAATAG
pJcSSR2604	TGTTGAAGGAAGATGCGGTAG	TATCTACTGCTGCTCTCTG
pJcSSR2626	CGCAGCCATCTTGAAGTTAG	CAAAATTTCAAGCCATGCTC
pJcSSR2627	TTGGAAAGACTCCTGAGGAG	TTACCACCACTTATTGTTGC
pJcSSR2628	CGTTTGTGTGTCGCTAGA	CTCTCCCTATTAGTCTGAC
pJcSSR2633	GAGTTGCCAAGGCGAAAAAG	AGAGAAAAACGCTCACCAAGTG
pJcSSR2656	TGCAGGCACATAGGCACACAG	CATTGCTCGATCTTGAATCTG
pJcSSR2714	TTGAGAGAGGAGTTGAGATC	TTCCGACCTTACAGTTACAC
pJcSSR2716	TCATCTCTGCTGGACGAAG	CTTCGAGTTGAATCCTCTC
pJcSSR2719	CAACACCTCGAGAAATAGAAG	GCACATTCCAAAAGAGAAAACG
pJcSSR2721	GACTCAACAGCGGCTTATTG	CTGCAGAAACAAGAACATGGT
pJcSSR2741	CATCAGGAATTGTTGATGGTC	GGAAATTTCTATGGGACTGAG
pJcSSR2742	TTGAAACAGACCAAGGTGTG	ATCGTATGAAGCAGCACACTC
pJcSSR2749	TGCGATTACCTGGTTTAGGGA	TCGGAAGCCTTGAGGATTAG
pJcSSR2756	TGAGGGATGGGTCTGTATACA	CCACTCCATATAATCGGATGC
pJcSSR2757	GATGACTGATAGATTGACAG	AATTATACCCGCTGAGGAAC
pJcSSR2760	TGTGTGTTGATTGTCGGATTG	TCGACCACGCATCCAAATTAC
pJcSSR2762	TCCTCCACACCCATTTCTTC	CGGTAAGGGTGATGGATATAG
pJcSSR2767	GAATATAAGCAAAGGGCATGA	TGCTCCGCTTCTTCTTTTTTC
pJcSSR2785	GAGGTAGCTGAAAAAACAGC	GTTGAGAAGAATGGTGGCTGC
pJcSSR2788	GTCCAGCTCAATTGCAAAAGT	AAACAGACCAAAAGGTGTGTACG
pJcSSR2806	CATATCCCAGAGATAAAGGC	GATTGTAATCGGACCAGACG
pJcSSR2808	TAAAACCCGTGTAAAGAACG	GCTCAAGTTCAGGGGGTTTAC
pJiSSR3148	TTTCCTTATCCCAAGCCACT	GTTATCATCATCCGAGGTCCA
pJiSSR3162	CGGACCTTCTTATGGCAAGTC	TGCCTCTCCATTGGATACAG
pJiSSR3318	GGCATATTTTGTGCCATA	CACAACCATGAGGGCTTAG
pJiSSR3342	GCCTCCTTCTAACGGGTTT	TTGAAGAATGGGACGTGGAT
pJiSSR3369	AAGCAATTTGAGGAAGCAC	TTCTCCAAGTTTTCTACTCG
pJiSSR3392	TGCTTTTCTTCTCTGCCTAT	TCTGTGTTGATTAGCTTACCT
pJiSSR3401	AGACCCCATCCTTGTCCATA	CGTCCAACCTTTTTATAGCC
pJiSSR3442	TCGTGTGTGTGTGTAAGT	CCGACTACACAAGTCCCAAGA
pJcSSR3772	GGGACTCATTCAAATGGTAA	AAGCATTACAGGAGTAGA
pJcSSR3779	GGTTGTTAGTATTGAGCGGT	AAGGAGGTGAGATGTGACAG
pJcSSR3781	AAGAGTCAGCGACAAGAGAG	TATGGAGCTTGACTAAGACGA
pJcSSR3794	GCTTGAATCTTTGAGAAGG	ATAGAAGAGAAGGCGGTAAC
pJcSSR3799	AAAAGTGAGGGACAATAGAGG	CCTTGCAATTTGCCTATCT
pJcSSR3836	GCTTCTGATCTTATTACCC	ACCATCCAATCCAATCATAG
pJcSSR3862	AAGATCACACTCACATTGTAC	GCACATTGTGACACTAAATGG

Actividad2:**1. Título**

Desarrollo de la tecnología de marcadores moleculares microsatélites para el genotipaje de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas de la sección Lasiocarpa

2. Autores

Eduardo Morillo, Johanna Buitrón, Denisse Yáñez y J. Sampedro

3. Resumen

Las tecnologías de última generación de secuenciación (*NGS-Next Generation Sequencing*) posibilitan una rápida alternativa para el desarrollo de nuevos marcadores moleculares; entre ellos los microsatélites (SSRs); los cuales constituyen una herramienta eficaz para la identificación de genotipos, estudios de diversidad, mapeo genético y otras aplicaciones. El presente estudio buscó identificar un set de marcadores SSRs útiles para el genotipaje de cultivares de *S. quitoense*, además de determinar su aplicabilidad en especies relacionadas de la sección Lasiocarpa. Con el propósito de desarrollar esta tecnología, se evaluó un set de 100 primers SSR identificados por datos NGS en un cultivar de naranjilla (Morillo 2014), para esto se realizó un screening de polimorfismo de los primers que amplificaron efectivamente en diferentes cultivares de *S. quitoense* y seis especies de la sección Lasiocarpa. Empleando la metodología *M13 Tailing*, se seleccionaron 40 marcadores que diferencian a las especies de la sección Lasiocarpa, de los cuales 15 resultaron informativos en *S. quitoense*.

4. Palabras clave: naranjilla, *S. quitoense*, Lasiocarpos, marcadores microsatélites

5. Introducción

El cultivo de naranjilla en el Ecuador es uno de los rubros de más alto desarrollo económico en las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza y Sucumbíos. La naranjilla representa aproximadamente el 93% de la producción nacional dentro de la Amazonía ecuatoriana (Silva *et al.*, 2016). Durante el año 2010, el cultivo y producción de esta fruta fue de aproximadamente 20.005 toneladas, evidenciándose una disminución del rendimiento cercano al 4% con respecto a los años pasados (INEC, 2010). Las grandes pérdidas en el rendimiento y en el número de hectáreas se deben principalmente a la susceptibilidad que este cultivo presenta a nemátodos, gusanos que atacan el fruto y a varios artrópodos (Andrade, 2005). La naranjilla al ser un rubro de alto aporte nutricional y un recurso económico primordial, ha sido objeto de investigaciones con la finalidad de solucionar problemas de susceptibilidad a diferentes enfermedades y plagas (Pazmiño-Gonzales, 2008). Los problemas de mayor relevancia generados por estas plagas son: la marchitez vascular y la perforación del fruto, debilitando la economía de las poblaciones que se sustentan en la siembra y cosecha de este frutal (Sowell y Shively, 2012).

Una de las alternativas para superar los inconvenientes con plagas, es el mejoramiento tradicional generando resistencia mediante cruzamientos entre especies e injertos con especies relacionadas genéticamente (Schouten, Krens, y Jacobsen, 2006). Sin embargo, no se han obtenido resultados favorables y el proceso de mejora puede tardar incluso décadas (Schultz, 1964). En este contexto, los marcadores moleculares se perfilan como una alternativa eficaz ya que brindan información relevante del genoma de una especie vegetal de forma rápida y concisa (Schlötterer, 2004). Actualmente las tecnologías de secuenciación de última generación (NGS del inglés, *Next Generation Sequencing*) son una alternativa para el desarrollo de nuevos marcadores moleculares (Buermans y den Dunnen, 2014). Los avances en NGS han proporcionado un nuevo escenario para la detección de microsatélites, ya que cuentan con una infinita cantidad de secuencias disponibles en bases de datos de acceso público. Estas tecnologías han permitido la realización de diversos estudios, incluida la búsqueda y prospección de nuevos marcadores moleculares SSR (Behjati y Tarpey, 2013). Actualmente, la plataforma Illumina es la NGS más utilizadas para el desarrollo de marcadores SSR (Patel y Jain, 2012).

Los marcadores moleculares del tipo microsatélite (SSR del inglés, *Simple Sequence Repeat*) consisten en la repetición consecutiva de segmentos cortos de DNA con motivos de entre 1 a 6 pares de bases (pb) (Gupta *et al.*, 1996). Los microsatélites se definen dependiendo del tipo de unidad repetida (di, tri, tetra hasta exa nucleótidos) y del locus específico que ocupan en el genoma (Jiao *et al.*, 2012). Entre los diversos cultivos vegetales, existen diferencias entre la frecuencia y aparición de estas unidades repetidas o también llamadas motivos. Los motivos más frecuentes que están presentes en los genomas de plantas son: (AC)_n y (GA)_n, también existe la presencia de trinucleótidos y tetranucleótidos siendo los más habituales (AAG)_n y (AAT)_n (Shehata, *et al.*, 2009).

Las características principales de estos marcadores moleculares son: la presencia de un alto grado de polimorfismo, heredabilidad mendeliana simple, fácil diferenciación entre individuos homocigotos y heterocigotos gracias a su codominancia, simple medición y posterior análisis (Aranguren-Mendez *et al.*, 2005). Los microsatélites son empleados en estudios de mapeo genético, de estructura poblacional y de procesos evolutivos. Durante los últimos 20 años estos marcadores moleculares han sido utilizados para el genotipaje de diferentes especies vegetales, debido a su reproducibilidad experimental y su transferibilidad entre especies vegetales relacionadas (Miah *et al.*, 2013). Los SSR son aplicables en especies silvestres para: realizar estudios de diversidad medidos sobre la base de la distancia genética, estimar el flujo de genes, frecuencia de cruzamiento y en estudios evolutivos infiriendo relaciones genéticas intraespecíficas (Varshney, Graner, y Sorrells, 2005).

En el caso particular de *S. quitoense*, el INIAP desarrolló librerías genómicas con la tecnología Shortgun en ILLUMINA MISEQ (Morillo, 2014). Del análisis bioinformático se obtuvo un banco de secuencias con presencia de motifs SSR (32073 contigs de los cuales 14918 serían potencialmente explotables). El fin del presente trabajo consiste en validar la amplificación de un set de marcadores microsatélites obtenidos de esta base de datos, para su posterior utilización en la caracterización de polimorfismo en naranjilla y en otras especies de la sección *Lasiocarpa*, y otras aplicaciones potenciales de interés.

6. Objetivos

1. Validar la amplificación del set de marcadores identificados por NGS
2. Establecer un set de SSR polimórficos para el genotipaje de variedades de *S. quitoense* y otras especies de la sección *Lasiocarpa*
3. Determinar combinaciones multiplex para el genotipaje de marcadores SSRs en *S. quitoense*

7. Materiales y métodos

7.1. Validación de la amplificación de un set de primers SSRs identificados por NGS

Extracción, cuantificación y validación de DNA de *S. quitoense*: Se seleccionaron seis cultivares de *S. quitoense* del banco de germoplasma INIAP-DENAREF y de colecciones activas existentes (J. Ochoa-DNPV). La extracción de DNA se realizó a partir de semillas o plantas de invernadero. Para el primer caso se utilizó el protocolo de extracción de DNA descrito por Kang *et al.*, (1998). En primera instancia, se procedió a fragmentar las semillas y se colocó cada una en tubos eppendorf de 1,5 mL, se añadió a cada tubo 400 µL de solución amortiguadora dodecilsulfato sódica (SDS) que contenía: Tris-HCl 200 mM (pH 8.0), EDTA 25 mM (pH 8.0), NaCl 200 mM, 0,5 % de SDS y 50 µg de Proteinasa K. Las soluciones se incubaron durante una hora a 37°C, posteriormente las semillas se trituraron nuevamente y se añadieron 400 µL de tampón CTAB (Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM (pH 8.0), NaCl 1.4 M, 1 % de PVP y 2% de CTAB). Posteriormente se adicionó cloroformo/alcohol-isoamílico en proporción (24:1) y 5% de fenol, se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 revoluciones por minuto (rpms). Se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf de 1,5 mL, a cada nuevo tubo se añadió 500 µL de isopropanol y se incubó durante 1 hora a -20 °C. Culminado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 12.000 rpms durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del pellet empleado etanol al 70 % y un lavado del

pellet utilizando etanol al 100 %. Posteriormente se secó el pellet obtenido durante 20 min a 40 °C utilizando el equipo Centrivap DNA Concentrator (LABCONCO, EE.UU) y se resuspendió en 50 µL de solución amortiguadora TE, luego se agregó 1 µL de RNAasa y se incubó a 37 °C durante 30 min hasta que el pellet se diluyera completamente. Para la extracción de ADN a partir de plántulas se empleó el protocolo descrito por Ferreira y Gratapaglia (1998).

Para la cuantificación de las muestras de DNA, se empleó la técnica de espectrofotometría utilizando el equipo EPOCH™ (Biotek®, EE.UU) para microplacas. Mediante el programa GENE5 se realizaron las lecturas de la placa que contenía 0.2 µL de muestra en cada pocillo y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 260-280nm (BioTeK Instruments, 2011). Cada muestra fue diluida hasta obtener una concentración de DNA de 5 ng/µL. Una vez diluidas las muestras, se procedió a validar el DNA mediante la amplificación de productos por PCR, utilizando el primer ISSR 844A. Se utilizó el siguiente Mix (Tabla 1.) y las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 2.) descritas por Morillo y Miño, (2011). p.126. Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2 % teñidos con Sybr Safe.

Tabla 1. Mix para la validación de DNA de *Solanum quitoense* utilizando el marcador ISSR 844A.

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

*CI: Concentración inicial de los reactivos

*CF: Concentración final de los reactivos

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la validación de DNA de *Solanum quitoense* utilizando el marcador ISSR 844A.

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

Amplificación de los marcadores moleculares microsatélites identificados por NGS: Se realizó la verificación de la amplificación de los 100 primers SSR, utilizándose 7 muestras de ADN de distintas variedades de *S. quitoense*. Se utilizó el mix de la Tabla 3 y las condiciones de amplificación de la Tabla (Morillo y Miño, 2011). Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2 % teñidos con Sybr Safe.

Tabla 3. Mix para la validación de 100 primers microsatélites utilizando ADN de *S. quitoense*

REACTIVOS:	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.18
Buffer PCR (X)	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.60
dNTP's (mM)	5	0.25	0.38
Primer (uM) F	10	0.50	0.38
Primer (uM) R	10	0.50	0.38
Taqpolimerasa (U/uL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/uL)	5	1.33	2.00
Volumen Total (uL)			7.50

*CI: Concentración inicial de los reactivos

*CF: Concentración final de los reactivos

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la validación de primers microsatélites

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

Se realizó una gradiente de temperatura y una gradiente de MgCl₂ para los marcadores que no evidenciaron un buen producto de amplificación de acuerdo al producto esperado in silico. Las reacciones se realizaron a: 43, 48, 55 y 60°C de temperatura de *annealing* y se realizaron a: 1, 2 y 3 mM de MgCl₂.

7.2. Determinación del polimorfismo de un set de marcadores SSRs en variedades de *S. quitoense* y otras especies de la sección *Lasiocarpa*

Material vegetal: Se utilizaron diez replicas para los seis cultivares y especies de naranjilla y especies de la sección *Lasiocarpa* seleccionados para este estudio. En la tabla 5 se describen los materiales empleados para este trabajo.

Tabla 5. Muestras biológicas utilizadas en este estudio

Nº	Especie/Nombre comun	Código /Identificación	ECU	Fuente
Especies de la sección <i>Lasiocarpa</i>				
1	<i>S. candidum</i>	CAN	ECU 9947	J. Ochoa-DNPV
2	<i>S. hirtum</i>	HIR	ECU 6242	DENAREF
3	<i>S. pectinatum</i>	PEC	ECU 7875	J. Ochoa-DNPV
4	<i>S. pseudolulo</i>	PSEU	-	J. Ochoa-DNPV
5	<i>S. sessiliflorum</i>	SES	ECU 5552	J. Ochoa-DNPV

6	<i>S. stramonifolium</i>	STR	-	J. Ochoa-DNPV
Cultivares de naranjilla				
7	Espinosa	Sq1	ECU-3567	DENAREF
8	Naranjilla agria	Sq2	ECU-3817	DENAREF
9	Naranjilla bolona	Sq5	ECU-6235	DENAREF
10	Morada	Sq8	-	J. Ochoa-DNPV
11	Baeza	Sq9	-	J. Ochoa-DNPV
12	Baeza roja	Sq14	-	J. Ochoa-DNPV

Validación del ADN: Una vez obtenidas las concentraciones estimadas de ADN se realizó una dilución a 5 ng/uL de ADN para su posterior validación mediante PCR, empleando el marcador mSq 048 según protocolo descrito en Morillo y Miño (2011). Los resultados de la amplificación fueron visualizados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe DNA utilizando el buffer TAE 1X.

Validación del polimorfismo de los marcadores SSR seleccionados: se seleccionaron ADNs validados de los diferentes cultivares de *S. quitoense* y muestras de las diferentes especies de la sección lasiocarpa. Se realizó una amplificación con la metodología *M13 tailing*, el coctel de amplificación y programa térmico empleado se describen en las tablas 6 y 7. Los productos generados fueron cargados en geles de poliacrilamida en le LI-COR 4300s.

Tabla 6. Mix de amplificación, para la verificación del polimorfismo de los *primers* seleccionados, metodología *M13 Tailing*

Componentes	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
Agua ultra pura			0.32
Buffer PCR (X)	5	1.00	1
MgCl ₂ (mM)	25	2,5	0.50
dNTP's (mM)	5	0.2	0.20
M13 700/800	1	0.16	0.80
Primer (uM) F -M13	1	0.01	0.05
Primer (uM) R	10	0.16	0.08
Taq polimerasa (U/uL)	5	0.05	0.05
Muestra (ng/uL)	5	2	2
Volumen Total (uL)	5		

Fuente: (Morillo y Miño, 2011)

Tabla 7. Programa térmico de amplificación, metodología *M13 Tailing*

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

7.3. Determinación de las combinaciones multiplex para el genotipaje de marcadores SSRs en *S. quitoense*

Se realizaron pruebas de amplificación para determinar combinaciones múltiplex de los marcadores SSR seleccionados, para este propósito se verificó los primers que presentaron la misma temperatura de *annealing* y diferente tamaño de amplificación.

Amplificación, Electroforesis y Genotipado en el LI-COR 4300S: Se realizó la amplificación con los marcadores polimórficos en las combinaciones múltiplex y monoplex establecidas con todas las muestras de ADN de las especies de la sección lasiocarpa y de las variedades de *S. quitoense* (cada una con sus diez repeticiones); además, de las tres repeticiones de los cultivares de *S. quitoense*. La corrida electroforética se realizó en gel de poliacrilamida en el analizador de ADN LI-COR 4300s. La edición y análisis de los geles obtenidos se realizó en el programa SAGA GT.

8. Resultados

8.1. Validación de la amplificación de un set de primers SSRs identificados por NGS: en todas las muestras se obtuvieron concentraciones superiores a los 20 ng/μL (Tabla 8).

Tabla 8. Cuantificación de ADN en absorbancia a 260 y 280 nm de los cultivares de naranjilla

Código N°	Pureza (260/280)	DNA (ng/μL)
Sq1.1	1,421	170,34
Sq1.2	0,773	46,465
Sq1.3	1,046	64,56
Sq1.4	1,01	68,824
Sq1.5	0,905	47,756
Sq1.6	0,83	48,503
Sq1.7	0,824	53,07
Sq1.8	0,782	48,539
Sq1.9	0,796	41,19
Sq1.10	0,832	87,261
Sq2.1	1,148	42,962
Sq2.2	1,125	67,111
Sq2.3	1,298	41,283
Sq2.4	0,95	47,1
Sq2.5	1,358	49,606
Sq2.6	1,091	55,034
Sq2.7	0,735	28,526
Sq2.8	1,002	69,38
Sq2.9	0,964	57,467
Sq2.10	1,568	99,682
Sq5.1	0,776	54,102
Sq5.2	0,891	47,001
Sq5.3	1,163	64,529
Sq5.4	0,838	59,998
Sq5.5	0,992	68,906
Sq5.6	0,811	38,103
Sq5.7	1,019	57,862
Sq5.8	0,581	29,976
Sq5.9	0,925	61,679
Sq5.10	0,761	51,692
Sq8.1	1,306	54,902
Sq8.2	1,311	39,898
Sq8.3	1,103	33,209
Sq8.4	1,165	25,965
Sq8.5	0,803	22,284
Sq8.6	1,2	36,978
Sq8.7	0,536	22,603
Sq8.8	1,098	19,764
Sq8.9	0,994	38,432
Sq8.10	0,875	17,766
Sq9.1	1,026	34,972
Sq9.2	1,247	35,069
Sq9.3	1,006	36,787
Sq9.4	1,065	42,008
Sq9.5	1,072	31,011
Sq9.6	1,137	45,761
Sq9.7	1,195	47,218
Sq9.8	0,774	15,766
Sq9.9	0,728	20,024
Sq9.10	0,671	18,577
Sq14.1	1,249	100,865
Sq14.2	0,623	17,896
Sq14.3	0,752	20,45
Sq14.4	0,644	18,32
Sq14.5	0,639	15,806
Sq14.6	0,706	18,161
Sq14.7	0,797	29,722
Sq14.8	0,638	16,755
Sq14.9	0,793	24,499
Sq14.10	0,862	24,277
N3	2,065	274,609

Como se puede observar en la Tabla 8, las concentraciones de DNA obtenidas empleando el protocolo de extracción para semillas secas son bajas. Las bajas concentraciones de DNA pueden deberse al tamaño, estructura y anatomía del embrión, puesto que las solanáceas

tienen una semilla pequeña con altas cantidades de almidón, lo que dificulta la recuperación del DNA (Hasan *et al.*, 2012). Sin embargo, al comparar los valores obtenidos en la extracción de DNA en semilla de naranjilla con valores de extracción obtenidos en semillas de arroz (Rogers *et al.*, 1988), empleando el mismo protocolo, los valores son suficientes para proceder con la validación del ADN, conforme al resultado obtenido con el marcador ISSR 488A (Figura 1).

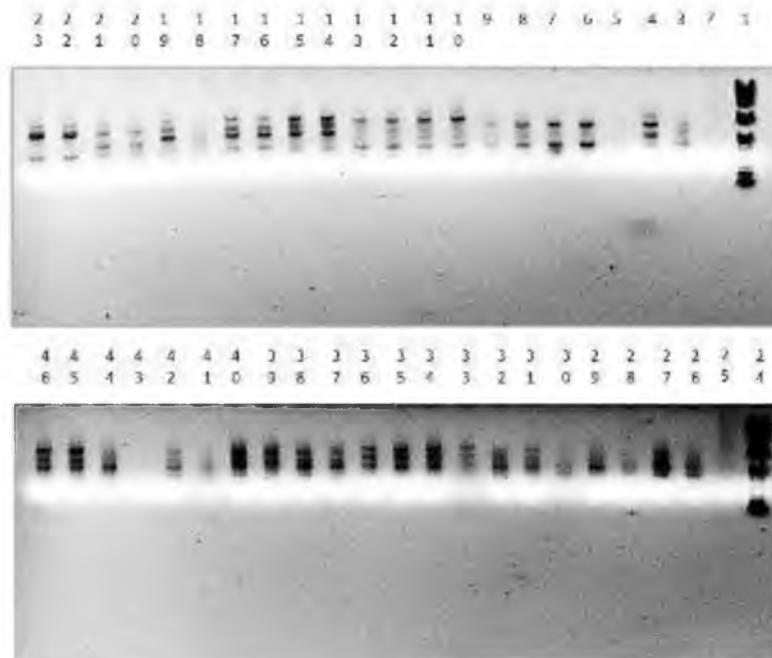


Figura 1. Resultados de la amplificación por PCR empleando el marcador ISSR 844A para la validación de DNA de naranjilla. Carril 1: marcador de peso molecular, del carril 2 al carril 8: muestras Sq1.1 a Sq1.7, del carril 9 al carril 15: muestras Sq2.1 a Sq2.7, del carril 16 al carril 22: muestras Sq5.1 a Sq5.7, del carril 23 al carril 30: muestras Sq8.1 a Sq8.7, del carril 31 al carril 37: muestras Sq9.1 a Sq9.7, del carril 38 al carril 44: muestras Sq14.1 a Sq14.7, carril 45: muestra N3 y carril 46: control positivo.

Como se puede evidenciar en la Fig. 1, exceptuando los carriles 2, 5, 25 y 43, todas las muestras presentaron amplificación. Del total de muestras amplificadas, se seleccionaron para la posterior validación de los marcadores moleculares SSR los siguientes DNAs: Sq1.2, Sq2.2, Sq5.2, Sq8.2, Sq9.2, Sq14.2, N3. Se realizó la verificación de la amplificación de los 100 primers sintetizados con las siete muestras de DNA de *S. quitoense* seleccionadas (Figura 2).

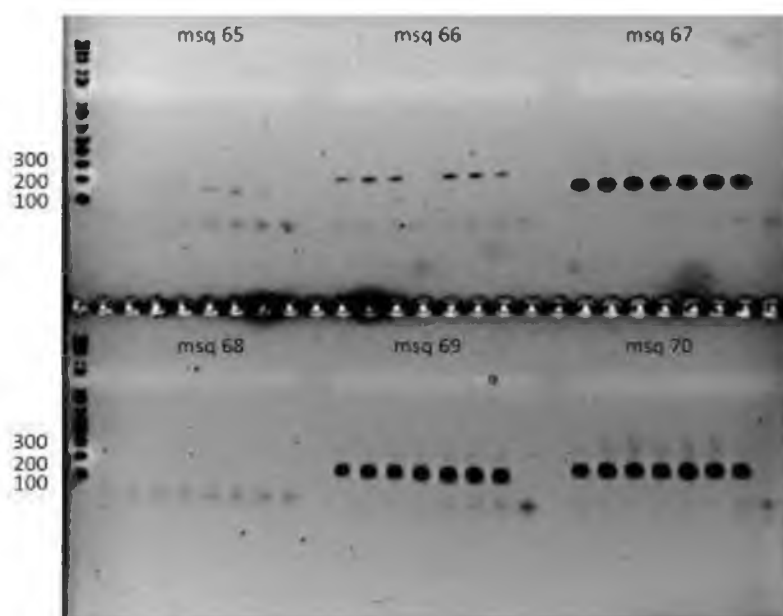


Figura 2. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa utilizando los SSR: msq65, msq66, msq67, msq68, msq69, msq70. Carriles 1-8: (1-7) DNA *Solanum quitoense*, (8) control (-), (M) marcador de talla molecular, se repite el mismo procedimiento para cada primer SSR

De los 100 primers SSRs probados, 96 mostraron una exitosa amplificación. En el caso de los marcadores: msq 11, msq 15, msq 26, msq 27, msq 31, msq 37, msq 50, msq 60, msq 58, msq 60, msq 64, msq 84, msq 86, msq 89 y msq 99, se realizó la optimización de la PCR modificando la gradiente de temperatura. Por otro lado, para los marcadores: msq 52, msq 67, msq 69, msq 75, y msq 96, se realizó la optimización de la PCR modificando la concentración de cloruro. Las condiciones de amplificación, temperatura y concentración de cloruro para los 100 microsatélites se describen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de amplificación para cada microsatélite de naranjilla

Primer SSR	Condiciones PCR		Primer SSR	Condiciones PCR	
	Tm (°C)	MgCl2 (mM)		Tm (°C)	MgCl2 (mM)
msq 1	55	2	msq 51	55	2
msq 2	55	2	msq 52	55	1,5
msq 3	55	2	msq 53	55	2
msq 4	55	2	msq 54	55	2
msq 5	55	2	msq 55	55	2
msq 6	55	2	msq 56	55	2
msq 7	55	2	msq 57	55	2
msq 8	55	2	msq 58	50	2
msq 9	55	2	msq 59	55	2
msq 10	55	2	msq 60	43	2
msq 11	48	2	msq 61	55	2
msq 12	55	2	msq 62	55	2
msq 13	55	2	msq 63	55	2
msq 14	55	2	msq 64	50	2
msq 15	48	2	msq 65	-	-
msq 16	55	2	msq 66	55	2
msq 17	55	2	msq 67	55	1,5
msq 18	55	2	msq 68	55	2
msq 19	55	2	msq 69	55	1,5
msq 20	55	2	msq 70	55	2
msq 21	55	2	msq 71	55	2
msq 22	55	2	msq 72	55	2
msq 23	55	2	msq 73	55	2
msq 24	55	2	msq 74	55	2
msq 25	55	2	msq 75	55	3
msq 26	48	2	msq 76	55	2
msq 27	48	2	msq 77	55	2
msq 28	55	2	msq 78	-	-
msq 29	55	2	msq 79	55	2
msq 30	55	2	msq 80	55	2
msq 31	48	2	msq 81	55	2
msq 32	55	2	msq 82	55	2
msq 33	55	2	msq 83	55	2
msq 34	55	2	msq 84	43	2
msq 35	55	2	msq 85	55	2
msq 36	55	2	msq 86	60	2
msq 37	48	2	msq 87	55	2
msq 38	55	2	msq 88	55	2
msq 39	55	2	msq 89	60	2
msq 40	55	2	msq 90	-	-
msq 41	55	2	msq 91	55	2
msq 42	55	2	msq 92	55	2

msq 43	55	2
msq 44	55	2
msq 45	-	-
msq 46	55	2
msq 47	55	2
msq 48	55	2
msq 49	55	2
msq 50	48	2

msq 93	55	2
msq 94	55	2
msq 95	55	2
msq 96	55	3
msq 97	55	2
msq 98	55	2
msq 99	43	2
msq 100	55	2

8.2. Determinación del polimorfismo de un set de marcadores SSRs en variedades de *S. quitoense* y otras especies de la sección *Lasiocarpa*

Se realizó la extracción de ADN a partir de semilla de las especies *S. candidum*, *S. hirtum*, *S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium*. Para las especies *S. pectinatum*, *S. pseudolulo* la extracción se realizó a partir de plántulas. En la tabla 10 se detallan las concentraciones obtenidas.

Tabla 10. Cuantificación de ADN de las especies de la sección *lasiocarpa*

Código N°	Pureza (260/280)	DNA (ng/μL)
CAN 1	1,009	23,48
CAN 10	1,006	18,29
CAN 2	1,17	18,07
CAN 3	1,021	26,87
CAN 4	0,85	25,6
CAN 5	0,973	39,96
CAN 6	0,85	27,95
CAN 7	1,18	18,65
CAN 8	0,914	26,88
CAN 9	1,152	21,46
HIR1	0,886	29,772
HIR10	0,987	24,66
HIR2	0,982	17,948
HIR3	1,497	28,07
HIR4	0,909	34,204
HIR5	1,199	23,737
HIR6	1,547	16,229
HIR7	1,069	35,536
HIR8	1,827	22,083
HIR9	0,843	42,001
PEC 1	0,782	34,38
PEC 10	0,885	32,826
PEC 2	0,873	24,16
PEC 3	0,846	33,717
PEC 4	1,06	19,64
PEC 5	1,124	23,791
PEC 6	0,725	21,25
PEC 7	1,265	10,39
PEC 8	0,868	35,9
PEC 9	1,595	34,02

Código N°	Pureza (260/280)	DNA (ng/μL)
PSE 1	2,06	698,47
PSE 10	2,065	1031,03
PSE 2	0,87	12,58
PSE 3	2,06	643,66
PSE 4	2,05	999,17
PSE 5	2,073	1232,51
PSE 6	2,056	1026,51
PSE 7	2,07	936,28
PSE 8	2,036	644,78
PSE 9	2,048	735,32
SES1	0,826	39,679
SES10	0,768	50,894
SES2	0,941	46,292
SES3	0,97	35,699
SES4	0,849	87,692
SES5	0,776	45,096
SES6	0,796	66,065
SES7	0,663	52,522
SES8	0,764	65,198
SES9	0,873	49,442
STR1	0,777	69,351
STR10	1,247	34,464
STR2	0,771	36,168
STR3	0,865	65,213
STR4	1,17	27,76
STR5	0,739	14,225
STR6	1,327	40,004
STR7	1,49	32,961
STR8	1,44	19,78
STR9	1,097	33,275

Todas las muestras fueron validadas con el marcador mSq 048 mostrando la eficiencia de los protocolos de extracción empleados (figura 3).

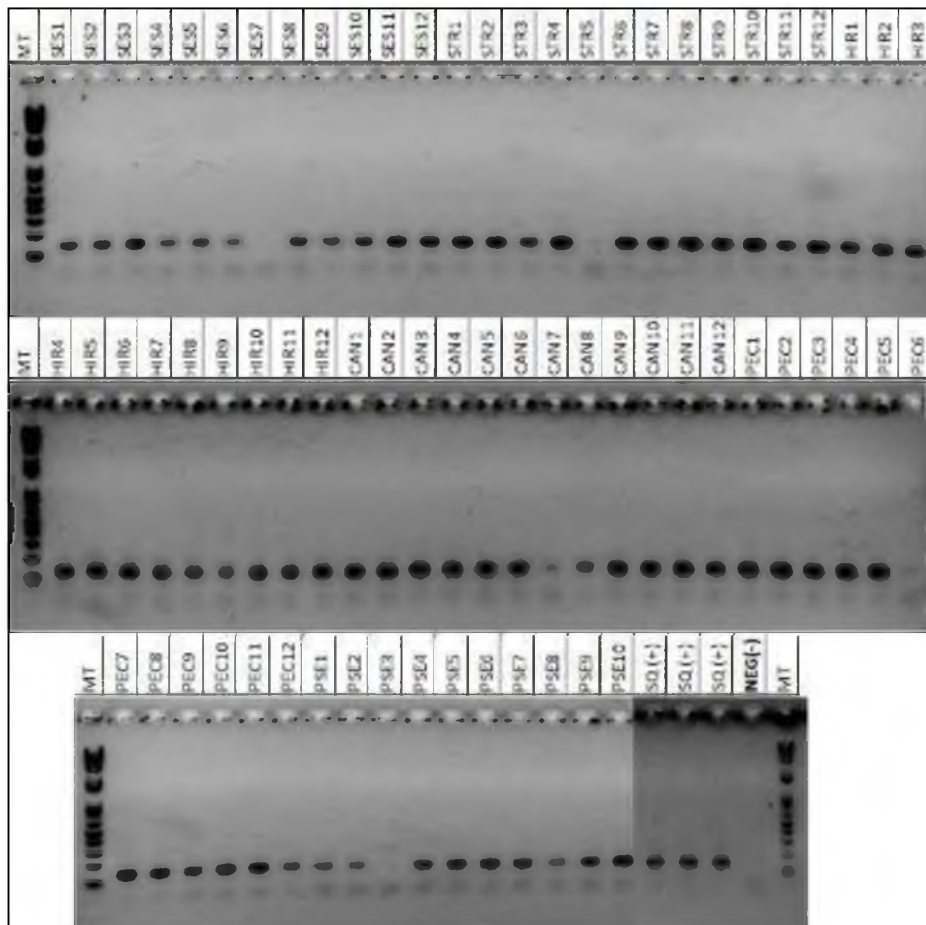


Figura 3. Validación del ADN de las especies de la sección lasiocarpa con el *primer* mSq 48

El polimorfismo de los *primers* que amplificaron se verificó empleando el ADN de los diferentes cultivares de *S. quitoense* y las mencionadas especies de la sección Lasiocarpa. En la figura 4 se observa parte de validación del polimorfismo de los marcadores.

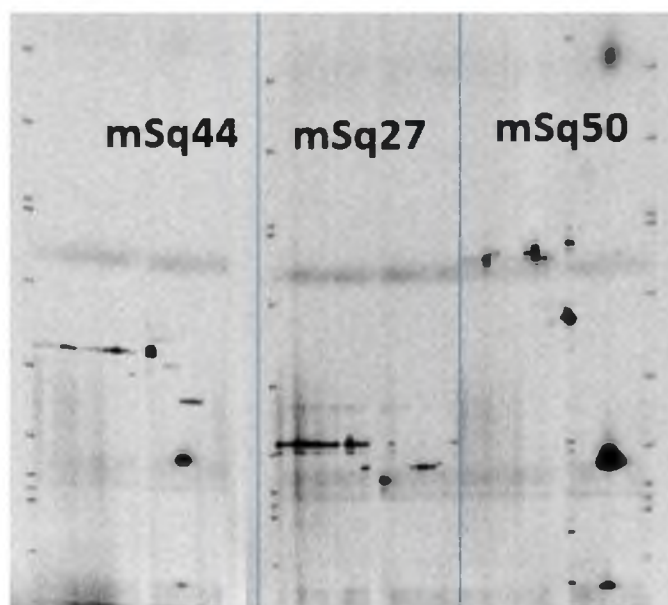


Figura 4. Visualización del polimorfismo para los *primers* mSq44, mSq27 y mSq50

Se seleccionaron 45 *primers* para la amplificación de los cultivares de *S. quitoense* (seis cultivares con diez repeticiones) y de las especies de la sección lasiocarpa (seis especies con

diez repeticiones). En la tabla 11 se listan los marcadores que mostraron polimorfismo en *S. quitoense* o diferenciar a las especies de *Lasiocarpas*.

Tabla 11. *Primers* seleccionados por presentar polimorfismo en *S. quitoense* y/o diferenciar a especies de la sección *lasiocarpa*

No.	Primer	Alelo secuenciado
		(Morillo, 2014)
1	mSq003	221 pb
2	mSq004	164 pb
3	mSq006	170pb
4	mSq007	147 pb
5	mSq008	167 pb
6	mSq012	194 pb
7	mSq013	145 pb
8	mSq016	256 pb
9	mSq017	117 pb
10	mSq018	143 pb
11	mSq020	210 pb
12	mSq021	136 pb
13	mSq023	134 pb
14	mSq024	152 pb
15	mSq026	132 pb
16	mSq027	104 pb
17	mSq028	168 pb
18	mSq029	145 pb
19	mSq031	190 pb
20	mSq033	143 pb
21	mSq035	233 pb
22	mSq036	118 pb
23	mSq037	246 pb
24	mSq040	221 pb
25	mSq043	137 pb
26	mSq044	134 pb
27	mSq046	246 pb
28	mSq047	133 pb
29	mSq049	107 pb
30	mSq050	172 pb
31	mSq051	247 pb
32	mSq056	122pb
33	mSq057	168 pb

34	mSq058	162 pb
35	mSq059	195 pb
36	mSq063	157 pb
37	mSq066	162 pb
38	mSq068	188pb
39	mSq091	147 pb
40	mSq093	135 pb

8.3. Determinación de las combinaciones multiplex para el genotipaje de marcadores SSRs en *S. quitoense*

En la tabla 12 se detallan las combinaciones dúplex, tríplex y la amplificación monoplex de los 40 SSR seleccionados.

Tabla 12. Combinaciones de los 40 SSR seleccionados

Combinación	Primer	Alelo secuenciado
DUPLEX 1	mSq004	164 pb
	mSq040	221 pb
DUPLEX 2	mSq046	246 pb
	mSq047	133 pb
DUPLEX 3	MSq020	210 pb
	mSq024	152 pb
DUPLEX 4	mSq051	247 pb
	mSq057	168 pb
DUPLEX 5	mSq056	122pb
	mSq068	188pb
TRIPLEX 1	mSq007	147 pb
	mSq035	233 pb
	mSq049	107 pb
TRIPLEX 2	mSq003	221 pb
	mSq017	117 pb
	mSq029	145 pb
TRIPLEX 3	mSq008	167 pb
	mSq016	256 pb
	mSq036	118 pb
TRIPLEX 4	mSq026	132 pb
	mSq031	190 pb
	mSq037	246 pb
MONOPLEX 1	mSq006	170pb
MONOPLEX 2	MSq012	194 pb

MONOPLEX 3	mSq013	145 pb
MONOPLEX 4	mSq019	158 pb
MONOPLEX 5	mSq021	136 pb
MONOPLEX 6	mSq023	134 pb
MONOPLEX 7	mSq027	104 pb
MONOPLEX 8	mSq028	168 pb
MONOPLEX 9	mSq033	143 pb
MONOPLEX 10	mSq043	137 pb
MONOPLEX 11	mSq044	134 pb
MONOPLEX 12	mSq050	172 pb
MONOPLEX 13	mSq058	162 pb
MONOPLEX 14	mSq059	195 pb
MONOPLEX 15	mSq063	157 pb
MONOPLEX 16	mSq066	162 pb
MONOPLEX 17	mSq091	147 pb
MONOPLEX 18	mSq093	135 pb

En la figura 5 se visualiza un ejemplo de las combinaciones de los SSR realizadas para la amplificación de las muestras de los cultivares de *S. quitoense* y especies de la sección *Lasiocarpa*.

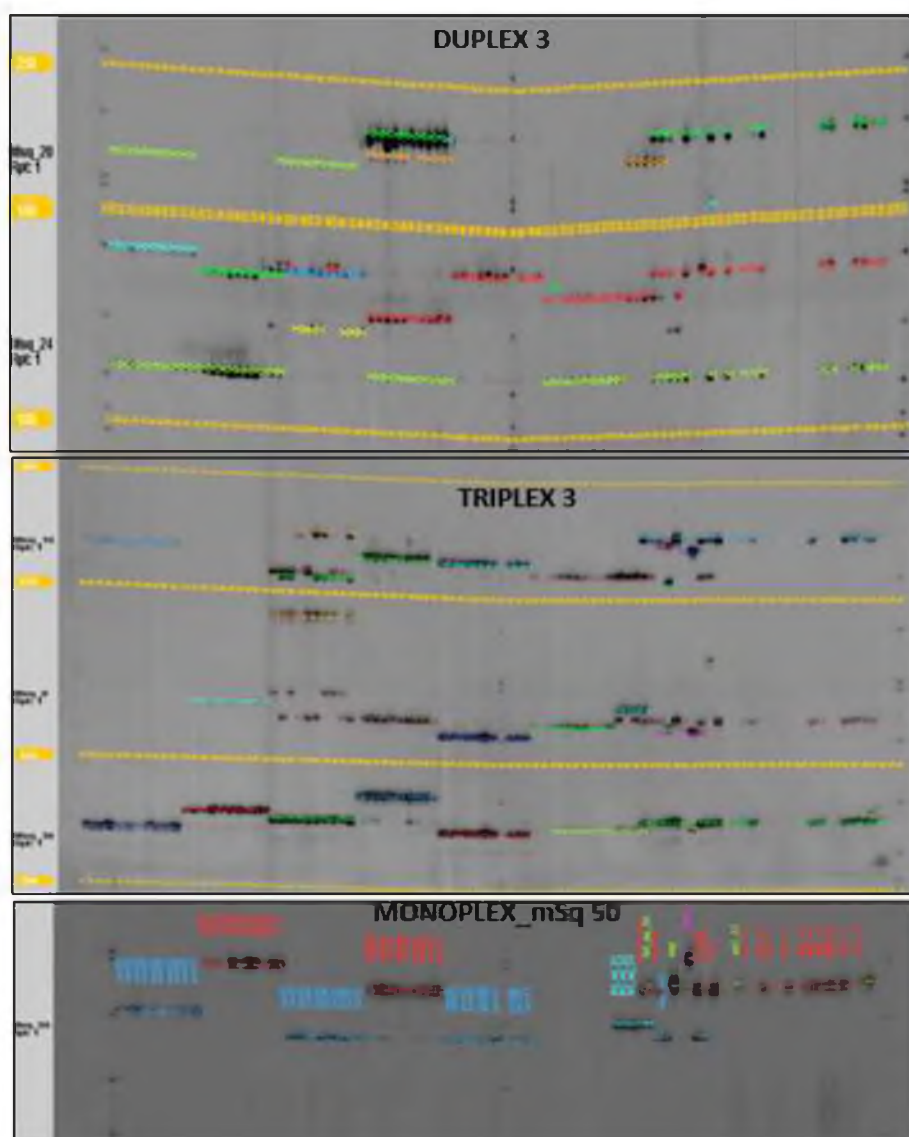


Figura 5. Ejemplo de las combinaciones de los SSR para la amplificación

Amplificación, Electroforesis y Genotipado en el LI-COR 4300S: Se realizó la amplificación todas las muestras de la sección lasiocarpa y de los cultivares de *S. quitoense* con los *primers* seleccionados conforma a las combinaciones determinadas. En la tabla 13 se resumen los alelos encontrados para cada unq de los *primers* amplificados.

Tabla 13. Alelos identificados en las variedades de *S. quitoense* y especies de la sección lasiocarpa

PRIMER	ALELOS (pb)						
mSq6	140	158	170	173	182	191	239
mSq12	161	164	165	194	200	203	
mSq13	126	133	142	145	148	154	
	229	235	247				
mSq18	122	128	134	137	140	143	
mSq21	97	106	133	136	154	163	
mSq23	107	110	116	134	140	176	
mSq27	86	95	98	101	104		

mSq28	150 153 156 162 165 168 174
mSq33	143 134 122
mSq43	129 133 132 137
mSq44	114 118 126 130 134
mSq50	150 158 160 172 174 168
mSq4	125 146 161 164 170
mSq40	209 218 220 221 230 245 266
mSq46	231 241 246
mSq47	133
mSq20	180 195 201 210
mSq24	104 125 131 143 149 152 155 158
mSq49	89 91 107
mSq35	230 233 239 242 248 251 260
mSq7	147 150
mSq3	221 224 236 239
mSq17	117
mSq29	145
mSq8	158 162 164 167 173 176 194 215
mSq16	235 238 244 247 250 253 256
mSq36	112 115 118 121 124 130
mSq26	105 108 111 132
mSq31	172 178 190
mSq37	216 225 234 237 246 249
mSq59	179 183 189 191 193 195
mSq51	233 235 237 247
mSq57	162 168 170 172 176 178 186 190
mSq56	104 110 112 116 122 130
mSq68	176 186 188
mSq58	140 144 150 154 156 160 162 176
mSq63	135 137 143 147 157 155
mSq66	148 150 152 154 156 162 168 172 174
mSq91	121 123 135 137 147 165
mSq93	119 121 129 133 135 137 141 143

Se determinó un set de marcadores informativos en *S. quitoense*, estos se detallan en la tabla 14.

Tabla 14. *Primers* polimórficos en *S. quitoense*

PRIMER	ALELOS (pb)
mSq6	140 158 170 173 182 191 239
mSq12	161 164 165 194 200 203
mSq18	122 128 134 137 140 143
mSq_50	150 158 160 172 174 168

mSq_40	209	218	220	221	230	245	266
mSq_49	89	91	107				
mSq_16	235	238	244	247	250	253	256
mSq_36	109	112	115	118	121	124	130
mSq_59	179	183	189	191	193	195	
mSq_56	104	110	112	116	122	130	
mSq_68	172	176	186	188			
mSq_58	110	140	144	150	154	156	160 162 176
mSq_63	135	137	143	147	157	155	
mSq_66	142	150	152	154	156	162	168 172 174 178
mSq_91	121	121	135	137	147	165	

En la tabla 15 se puede verificar la transferibilidad de los 40 *primers* seleccionados en las distintas especies de la sección lasiocarpa

Tabla 15. Transferibilidad a especies de la sección lasiocarpa (*leve amplificación, + parcialmente amplificado)

SOLANUM	mSq 6	mSq 12	mSq 13	mSq 19	mSq 21	mSq 23	mSq 27	mSq 28	mSq 33	mSq 43	mSq 44	mSq 50	mSq 4	mSq 40	mSq 46	mSq 47	mSq 20	mSq 24	mSq 35	mSq 49
QUITOENSE	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
SESSILIFLORUM	SI	SI	SI*	SI	NO	NO	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI*	SI	NO	NO
STRAMONIFOLIUM	SI	SI	SI*	SI*	NO	NO	SI	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
HIRTUM	SI	SI	SI	SI*	SI*	SI*	SI*	SI*	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI*	NO	SI*	SI	SI	SI
CANDIDUM	SI	SI	SI*	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI	NO
PECTINATUM	NO	SI	SI	SI	SI*	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
PSEUDOLULO	NO	SI	SI	NO	SI*	NO	SI	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI	SI*	NO	NO	SI	SI*

SOLANUM	mSq 7	mSq 17	mSq 29	mSq 3	mSq 16	mSq 36	mSq 8	mSq 26	mSq 31	mSq 37	mSq 59	mSq 51	mSq 57	mSq 56	mSq 68	mSq 58	mSq 63	mSq 66	mSq 91	mSq 93
QUITOENSE	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
SESSILIFLORUM	NO	NO	NO	NO	SI*	SI	NO	SI*	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI*	NO	NO	SI*	NO	NO
STRAMONIFOLIUM	NO	NO	NO	NO	NO	SI	SI*	SI	NO	SI	SI*	NO	SI	SI	NO	SI*	SI*	SI	NO	SI
HIRTUM	NO	NO	SI*	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI*	SI	SI	SI	NO	SI	SI*	SI	SI	SI
CANDIDUM	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI*	SI	SI	SI*	SI	NO	SI	NO	SI	SI
PECTINATUM	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI	NO	NO
PSEUDOLULO	NO	NO	NO	NO	SI	SI*	SI	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI*	NO	SI*	NO	SI*	NO	SI

9. Conclusiones

- Se validó la amplificación de 96 primers SSR en muestras de *S. quitoense*, además, se verificó la utilidad de 40 *primers* para el análisis de *S. quitoense* y otras especies de la sección Lasiocarpa.
- Se establecieron cinco combinaciones dúplex, cuatro tríplex y 18 mónoplex para la amplificación de los 40 *primers* seleccionados.
- Se encontró un set de 15 *primers* polimórficos para los cultivares de *S. quitoense*, con un máximo de tres alelos por *primers*
- Se verificó la transferibilidad completa para las especies de la sección lasiocarpas de los marcadores mSq 12,13, 27, 44, 4, 24, 36 y 66.

10. Bibliografía

- Andrade, R. (2005). Limitantes y potencialidades agro-socioeconómicas de las familias productoras de naranjilla en las provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago y Sucumbíos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Ingeniero Economista. Pontificia Universidad Católica.
- Aranguren Mendez, J. A., Roman, R., Isea, W., Villasmil, Y., y Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión (Vol. 13).
- Behjati, S. y Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition, 98(6), 236–238. doi:10.1136/archdischild-2013-304340
- BioTeck Instrumets. (2011). Manual de operaciones Espectrofotómetro para Microplacas Epoch

- Buermans, H. P. J. y den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *From Genome to Function*, 1842(10), 1932–1941. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015
- Gupta, P., Balyan, H., Sharma, P. C., & Ramesh, B. (1996). Microsatellites in plants: A new class of molecular markers (Vol. 70).
- Hasan, S., Prakash, J., Vashishtha, A., Sharma, A., Srivastava, K., Sagar, F. y Mishra, S. (2012). Optimization of DNA extraction from seeds and leaf tissues of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum indicum*) for polymerase chain reaction. *Bioinformation*, 8(5), 225–228. http://doi.org/10.6026/97320630008225
- Jiao, Y., Jia, H., Li, X., Chai, M., Jia, H., Chen, Z. y Gao, Z. (2012). Development of simple sequence repeat (SSR) markers from a genome survey of Chinese bayberry (*Myrica rubra*). *BMC Genomics*, 13(1), 201. doi:10.1186/1471-2164-13-201
- Kang, H.W., Cho, Y.G. y Yoon, U.H. (1998). A Rapid DNA Extraction Method for RFLP and PCR Analysis from a Single Dry Seed. *Plant Molecular Biology*, 16, 90. doi:10.1023/A:1007418606098
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Islam, K. N. y Latif, M. A. (2013). A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 22499–22528. doi:10.3390/ijms141122499
- Morillo, B. y Miño, G. (2011). “Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP”. Manual No. 91. Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Ss.nt3. Catalina.
- Morillo, E. (2014). Reporte técnico “Desarrollo de librerías genómicas para análisis moleculares en *S. quitoense* y *S. betaceum*”. INIAP, EESC. No publicado.
- Patel, R. K. y Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLOS ONE*, 7(2), e30619. doi:10.1371/journal.pone.0030619
- Rafiei, V., Banihashemi, Z., Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M. y Milgroom, M. G. (2017). Comparison of genotyping by sequencing and microsatellite markers for unravelling population structure in the clonal fungus *verticillium dahliae*. *Plant Pathology*, 3, 253–264. doi:10.1111/ppa.12713.
- Rogers SO, Bendich AJ (1988). Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) *Plant Molecular Biology Manual*, pp A6:l-10. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5, 63.
- Schouten, H. J., Krens, F. A. y Jacobsen, E. (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports*, 7(8), 750. doi:10.1038/sj.embor.7400769
- Schultz, T. W. (1964). *Transforming traditional agriculture*. New Haven: Yale Univ. Pr.
- Shehata, A. I., Al-Ghethar, H. A. y Al-Homaidan, A. A. (2009). Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16(2), 57–62. doi:10.1016/j.sjbs.2009.10.001
- Sowell, A. y Shively, G. (2012). Economic and environmental impacts of grafted naranjilla. *Forests, Trees and Livelihoods*, 21(1), 30–43. doi:10.1080/14728028.2012.669133
- Varshney, R. K., Graner, A. y Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48–55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L. y Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027

Actividad3:**1. Título**

Análisis de diversidad genética en variedades de frejol cultivadas en las zonas de Cotacachi y Saraguro

2. Autores

Juan Jácome, Johana Buitron y Eduardo Morillo

3. Resumen

En el presente trabajo se evaluó la diversidad de genotipos presentes en la mezcla en comunidades seleccionadas de Cotacachi y Saraguro en el 2015 con nueve marcadores SSRs, y se realizó además una comparación con los parámetros de diversidad obtenidos a partir de datos del 2009. El valor promedio de PIC observado fue de 0.611 Cotacachi 2015, 0.605 Saraguro 2015, 0.752 Cotacachi 2009 y 0.770 Saraguro 2009. La heterocigosidad esperada fue 0.061 Cotacachi 2015, 0.105 Saraguro 2015, 0.112 Cotacachi 2009 y 0.08 Saraguro 2009. El modelo basado en STRUCUTURE dio como resultado 3 subpoblaciones en el 2015 que corresponde a 2 grupos en Cotacachi y 1 grupo en Saraguro. También se encontró una mayor diferenciación entre las poblaciones de 2009 y 2015 que entre las poblaciones de las comunidades de Cotacachi y Saraguro. Además, se verificó los alelos de los de 11 diferenciales mesoamericanos permitieron confirmar la presencia de alelos mesoamericanos. El porcentaje de accesiones con alelos mesoamericanos en más de 2 loci fue del 2,56% en 2015 y del 8,88% en 2009. Una posible introgresión en cultivares tradicionales de Cotacachi y Saraguro está sujeta a confirmación. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes en programas de conservación de germoplasma de frejol en el país, y proporcionan evidencias interesantes sobre el origen y diversificación de esta leguminosa en áreas tradicionales.

4. Introducción

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es la leguminosa de mayor consumo en el mundo y una gran fuente de proteínas, fibra, carbohidratos, minerales y vitaminas esenciales (Gujaria-Verma *et al.*, 2016, Müller *et al.*, 2015). El fréjol es genéticamente un grupo muy diverso y juega un papel importante en la economía moderna. China es el mayor productor de fréjol del mundo seguido por Indonesia y Turquía (Madakbaş *et al.*, 2016), (MAGAP, 2014). En Ecuador, para el año 2014 la producción fue de 17,860 toneladas de fréjol tierno y 12,607 toneladas de fréjol seco, se estimó 26600 ha cosechadas y un rendimiento del 0,4718 t/ha en el 2014 (FAOSTAT, 2014) (MAGAP, 2014).

Es una planta diploide autógena con 473 Mb de tamaño genómico (Mahajan *et al.*, 2016). Está organizado en dos grupos genéticos distintos, el Meso y el Andino, (Benchimol *et al.*, 2007, McClean *et al.*, 2012). Su domesticación ocurrió por separado, primero el acervo Andino hace 4000 años y luego el Meso hace 2000 años (Mahajan *et al.*, 2016).

El estudio de diversidad es el primer paso para un programa de mejoramiento, por esto, durante la última década, los principales productores de fréjol como China y Turquía realizaron estudios de caracterización genética usando marcadores moleculares (SSRs y SCARs), así como Estados Unidos y la India (Zhang, Blair, & Wang, 2008, McClean *et al.*, 2012, Mahajan *et al.*, 2016, Madakbaş *et al.*, 2016).

En Ecuador se cultiva principalmente dos tipos de fréjol; el fréjol arbustivo, en monocultivo en los valles meso-térmicos y estribaciones de la sierra, y los tipos volubles asociados con maíz. El cultivo de fréjol voluble en mezclas de genotipos ha sido una práctica en la sierra del Ecuador, pero debido al interés comercial del fréjol de tipo canario. Esta práctica se está perdiendo; sin embargo, el cultivo de estas mezclas llamadas mixturados o chacras todavía es una práctica importante en zonas como Cotacachi y Saraguro. Las variedades mezclas casi enteramente se destinan al autoconsumo, siendo muy rara su comercialización, regularmente se comercializa los tipos canarios que forman parte de la mezcla. Las variedades mezcla se

siembran, cosechan y consumen como mezclas de genotipos (Peralta *et al.*, 2012, Voysest, 2000).

Los agricultores en Cotacachi cultivan dos tipos de fréjol asociados con maíz, los llamados allpa, que presentan hábito de crecimiento II (arbustivo) y III (postrados), y los llamado chacras, de hábito de crecimiento IV (volubles). Los dos se cultivan en mezclas, los chacras se siembran junto con el maíz en el mismo sitio, y los allpa entre sitios cerca del maíz. En Saraguro solo se cultivan los chacras y se siembran como en Cotacachi junto con el maíz. Este sistema de cultivo de las variedades mezcla de fréjol es muy antiguo y aparentemente es la razón de la sustentabilidad de estos agro ecosistemas (Voysest, 2000, Murillo, Pinzón, & Peralta, 1998).

La diversidad fenotípica y probablemente genotípica del fréjol podría ser la razón de la sustentabilidad del cultivo de fréjol en Cotacachi y Saraguro. Adicionalmente, la composición de la variedad mezcla parece ser muy dinámica, y debe estar relacionada con la adaptación de la variedad mezcla a las presiones de selección bióticas y abióticas en este proceso. Por otro lado, la introgresión genética puede ser un fenómeno importante, que ayude a explicar la diversificación y elasticidad de la variedad mezcla en los agroecosistemas de Cotacachi y Saraguro (Carrillo Paz y Miño, 2014). Los primeros estudios de diversidad se reportaron utilizando marcadores morfológicos tales como rendimiento y peso de la semilla (Singh, 1995); y otros descriptores morfológicos como el color y brillo de la semilla o su hábito de crecimiento (Tofiño, *et al.*, 2006).

Los marcadores bioquímicos como la faseolina de proteínas o coenzimas y marcadores de ADN como RFLPs, polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), y microsatélites también han sido reportados (SSR) (Blair *et al.*, 2003). Varios sistemas de marcadores confiables incluyendo marcadores SSRs y SNPs se han desarrollado y utilizado para evaluar la estructura genética y la diversidad en el fréjol común de diferentes localizaciones geográficas (Madakbaş *et al.*, 2016).

En esta línea, en Ecuador se ha realizado varios estudios de diversidad en fréjol; un primer estudio de la variabilidad genética de cultivares de fréjol de Cotacachi y Saraguro realizado por Torres (2010) pone en evidencia materiales de posible origen mesoamericano. En este estudio sin embargo no se exploró la variabilidad genética entre variedades que poseen hábito de crecimiento de tipo II (arbustivo) y IV (volubles) individualmente, así como la variabilidad del tipo Canario por su interés comercial. En el mismo trabajo se encontró evidencia de que un grupo de accesiones de Cotacachi pertenecen al acervo mesoamericano, y resulta de interés comparar genéticamente estos materiales con accesiones diferenciales provenientes del mencionado acervo.

En este estudio se plantea analizar la diversidad genética de los dos tipos de variedades mezcla; chacra y allpa en Cotacachi, y chacra en Saraguro; y, explorar la potencial importancia de la introgresión como fenómeno genético en la diversificación de las variedades mezcla.

5. Palabras clave

Fréjol, SSRs, introgresión, *Phaseolus vulgaris*, Saraguro, Cotacachi

6. Objetivos

1. Caracterizar el polimorfismo de 9 marcadores microsatélites en fenotipos obtenidos a partir de mixturas de fréjol en comunidades seleccionadas de Cotacachi y Saraguro en el ciclo de cultivo 2015 incluyendo un set de referenciales mesoamericanos.
2. Comparar los parámetros de la diversidad 2015 con parámetros disponibles del año 2009 en las mismas comunidades.
3. Definir si en las variedades mezcla se produce los fenómenos de introgresión y recombinación genética, como parte de la diversificación de la diversidad de fréjol en Cotacachi y Saraguro.

7. Materiales y métodos

Extracción, cuantificación y validación del ADN: Un total de 171 semillas de fréjol previamente clasificadas, evaluadas y codificadas (anexo1). Dos plantas de cada fenotipo se cultivaron en bandejas de germinación con turba y se rotularon adecuadamente. De estas se colectaron dos primordios foliares u hojas jóvenes de cada fenotipo para la posterior extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó con el protocolo de Colombo *et al.*, (1998) a partir de primordios foliares u hojas jóvenes; y el protocolo de Kang *et al.*, (1998) para semilla, que se modificó para embriones de fréjol obtenido de semilla seca. El ADN se cuantificó en el espectrofotómetro EPOCH™ de Biotek®, con el kit *Taken 3* y el software GEN 5. El ADN se normalizó a una concentración final de 100 ng/μl en 100 μl de agua ultra-pura para su validación por PCR utilizando el cebador BM 139 reportado por Gaitán-Solís *et al.*, (2002) (mix en tabla 1).

Tabla 1. Coctel de amplificación empleado para la validación del ADN

Reactivos	Concentración de reactivos	Volumen para 1 reacción
ADN	5ng/ul	2 ul
Colorless GoTaq Flexi Tampón	5x	1.5 ul
MgCl ₂	25mM	0.6 ul
dNTP's	10mM	0.15 ul
Cebador-F	20 μM	0.375 ul
Cebador-R	20 μM	0.375 ul
Agua ultra pura	-	2.38 ul
Taq DNA Polimerasa	5U/ul	0.125 ul
Volumen Total	-	7.5 ul

La amplificación se realizó empleando el programa de amplificación que se detalla en la Tabla 2. Los productos de amplificación se migraron en geles de agarosa al 2% con tampón TAE 1X y un marcador de talla de 1 Kb.

Tabla 2. Programa de amplificación utilizado en la validación del ADN

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1.	95	5 min	1
2.	94	1 min	30
3.	Tm	45 seg	
4.	72	1 min	
5.	72	7 min	1
6.	10	11 in	1

Amplificación con marcadores microsatélites empleando la metodología *M13 tailing*: Se emplearon diez marcadores microsatélites sintetizados con un fragmento M-13 en el primer F, y la metodología *M13 tailing* descrita por Morillo y Miño (2011) para el uso del analizador genético LI-COR 4300S. Los marcadores se organizaron en siete combinaciones; tres reacciones dúplex con los marcadores BM139-BM154, BM181-BM183 y BM160-BM143 y cuatro reacciones monoplex con los marcadores BM164, BM211, BM156. Los marcadores y sus características se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Combinaciones y temperatura de alineación individual (Tm) y en combinación (TmC) de los marcadores utilizados en la amplificación

Combinación	SSR	Tm (°C)	TmC (°C)
-------------	-----	---------	----------

1	MB139	50	50
	MB154	50	
2	MB181	50	51
	MB183	52	
3	MB160	52	53,5
	MB143	55	
4	MB164	52	52
5	MB211	52	52
6	MB156	52	52

Las muestras de ADN se amplificaron empleando el coctel de amplificación que se muestra en la Tabla 4 y Tabla 5 para las reacciones monoplex y dúplex respectivamente.

Tabla 4. Coctel de amplificación en monoplex empleando la metodología M13 *tailing*.

MONOPLEX PCR	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			0,32
TAMPÓN PCR (X)	5	1	1,00
MgCl ² (mM)	25	2,5	0,50
dNTP's (mM)	5	0,2	0,20
M13 700/800	1	0,16	0,80
Primer (uM) F -M13	1	0,01	0,05
Primer (uM) R	10	0,16	0,08
Taq casera (U/uL)	5	0,05	0,05
MUESTRA (ng/uL)	5	2	2,00
VOL. TOTAL (uL)			5

Tabla 5. Coctel de amplificación en dúplex empleando la metodología M13 *tailing*

DUPLEX PCR	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			0,19
TAMPÓN PCR (X)	5	1	1,00
MgCl ² (mM)	25	2,5	0,50
dNTP's (mM)	5	0,2	0,20
M13 700/800	1	0,16	0,80
Primer (uM) F -M13	1	0,01	0,05
Primer (uM) R	10	0,16	0,08
Primer (uM) F-M13	1	0,01	0,05
Primer (uM) R	10	0,16	0,08
Taq casera (U/uL)	5	0,05	0,05
MUESTRA (ng/uL)	5	2	2,00
VOL. TOTAL (uL)			5

Las reacciones monoplex y dúplex se amplificaron con el programa indicado en la Tabla 6. También se amplificaron 12 accesiones de Cotacachi y Saraguro respectivamente utilizados como referencia. De estas se conocía los alelos presentados según el trabajo de Torres (2012).

Tabla 6. Programa de amplificación utilizado empleando la metodología M13 *tailing*

Fases	T °C	Tiempo	Ciclos
1	94 °C	2 min	1
2	95 °C	4 min	1
3	95 °C	1 min	25
4	TA °C	2 min	
5	72 °C	2 min	
6	72 °C	10 min	1
7	4 °C	10 min	1

Para la preparación del gel se empleó 20 ml de Gel *Matrix* KB Plus al 6.5%, 150 µl Persulfato de Amonio al 10% y 15 µl de tetrametiletildiamina (TEMED). En cada pocillo se cargó 1µL de muestra denaturada, y se dejó correr durante una hora y media. El registro de datos se realizó mediante la asignación de un tamaño específico en pares de bases a cada locus realizado por el software Saga GT Microsatellite®, y con los datos generados se elaborará una matriz de datos genotípicos.

Análisis de datos: La matriz genotípica obtenida se separaron tres secciones principales con la finalidad de cumplir con los objetivos.

Caracterización de la diversidad genética de Cotacachi y Saraguro (2015): Se obtuvo los parámetros de diversidad en el ciclo de cultivo 2015 con el software PowerMaker V3.25 (Lui *et al.*, 2005) y el complemento de Microsoft Excel GenAIEx v6.5 (Peakall y Mouse, 2012). Los parámetros calculados fueron los siguientes: Número de observaciones, Frecuencias alélicas, Heterocigosidad observada, Heterocigosidad esperada, Índice de contenido polimórfico. El análisis de estructura poblacional se realizó con el software STRUCTURE con un periodo de 5000 y simulaciones de la cadena de Markov 50000. Para elegir el mejor número de agrupaciones se utilizó el método de Evanno *et al.* (2005). También se hizo un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) que consiste en conocer la distribución espacial de los genotipos sobre los ejes en dos dimensiones. De la misma manera se realizó dendrogramas utilizando el coeficiente de similitud aproximado *Simple Matching* (SM) y el algoritmo de agrupación UPGMA con el programa NTSYSpc V2.2 (Rohlf, 2002). Finalmente, para determinar el nivel de estructura genética y la diferenciación poblacional se realizó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y los estadísticos F con ayuda del complemento de Microsoft Excel GenAIEx v6.5 (Peakall y Mouse, 2012). La estadística F o índices de fijación Sewall Wright proponen medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones relacionados por medio de 3 parámetros: FIT, FIS, FST (Estévez, 2009).

Comparación de los parámetros de diversidad en los ciclos de cultivo 2009 y 2015 para los cantones de Cotacachi y Saraguro: se recalculó los parámetros de diversidad en el ciclo de cultivo 2009 para 9 locus con el software PowerMaker V3.25 (Lui y Muse, 2005) y el complemento de Microsoft Excel GenAIEx v6.5 (Peakall y Mouse, 2012). Los datos obtenidos se contrastaron con los del 2015. La diferencia entre poblaciones del 2009 y 2015 se estimó con una AMOVA y los estadísticos F en el complemento de Microsoft Excel GenAIEx v6.5 (Peakall y Mouse, 2012).

Introgresión y recombinación genética: Con los alelos presentados por las 11 accesiones mesoamericanas se buscó la presencia de estos alelos en accesiones andinas. Después se obtuvo un porcentaje que representa el total de accesiones andinas que presentan alelos mesoamericanos en al menos uno y dos o más marcadores del total de 9 loci analizados. Finalmente, se escogió de 10 a 12 accesiones de 6 fenotipos diferentes de fréjol. Los fenotipos tienen denominaciones que les otorgan los agricultores en las comunidades de los cantones de Cotacachi y Saraguro, las mismas que son: "Bola puka", "Toa", "Cargabello", "Zuko", "Canario" de Cotacachi y "Canario" de Saraguro. <con ayuda de Excel Microsatellite Toolkit se calculó el porcentaje de cuantos alelos coinciden entre todas las accesiones de los seis fenotipos diferentes.

8. Resultados

Extracción cuantificación y validación del ADN: Se obtuvieron concentraciones superiores a 150ng/ul tanto para los ADNs a partir de tejido foliar como para las semillas; el índice de pureza obtenido osciló entre 1,6 y 2,2 para los dos métodos de extracción. El ADN obtenido se cargó en geles de agarosa para verificar su integridad (figura 1).

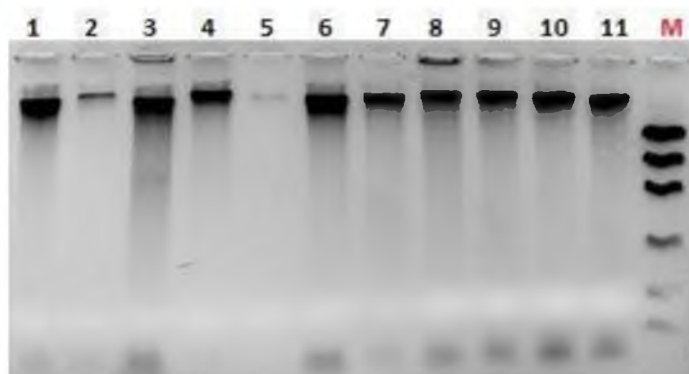


Figura 1. Muestras de ADN genómico total de *Phaseolus vulgaris* L. en gel de agarosa al 2% (Carril 1 al 11: muestras de ADN, carril 12: marcador de peso molecular *Low Mass Ladder*)

El último paso fue la validación de las 171 muestras con una PCR monoplex con el marcador BM139. En la Figura 2 se muestra el resultado de la validación de algunas de las muestras.

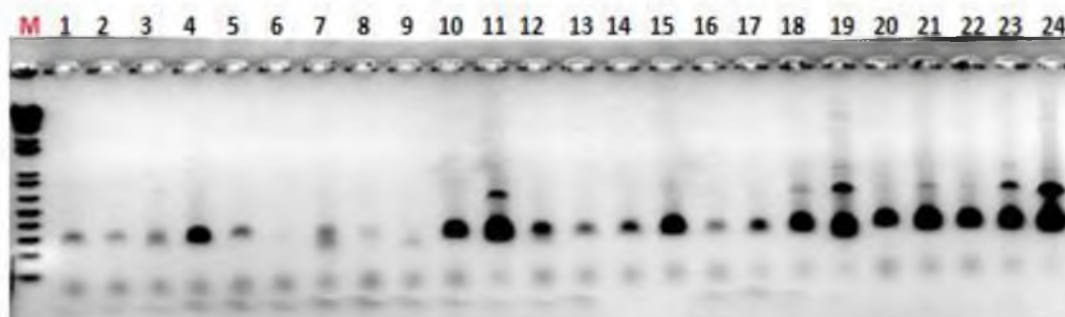
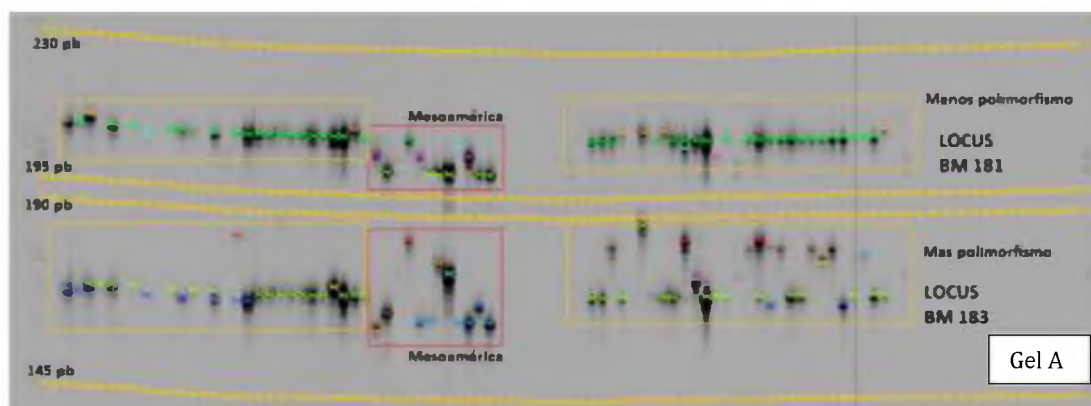


Figura 2. Validación de ADN extraído a partir de primordio foliar de *Phaseolus vulgaris* L.

Amplificación empleando la metodología M13 tailing y genotipaje en el LI-COR 4300S:

Para la amplificación se realizaron seis combinaciones (3 dúplex y 3 monoplex). Los productos de PCR se cargaron en gel de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300S junto con marcadores de talla de durante una hora en electroforesis. El analizador genético LI-COR 4300S generó imágenes que fueron analizadas con el programa SAGA-GT en donde se observó polimorfismos para los locus SSR utilizados. En la Figura 3 se muestra algunas de las imágenes generadas y analizadas en el software SAGA GT.



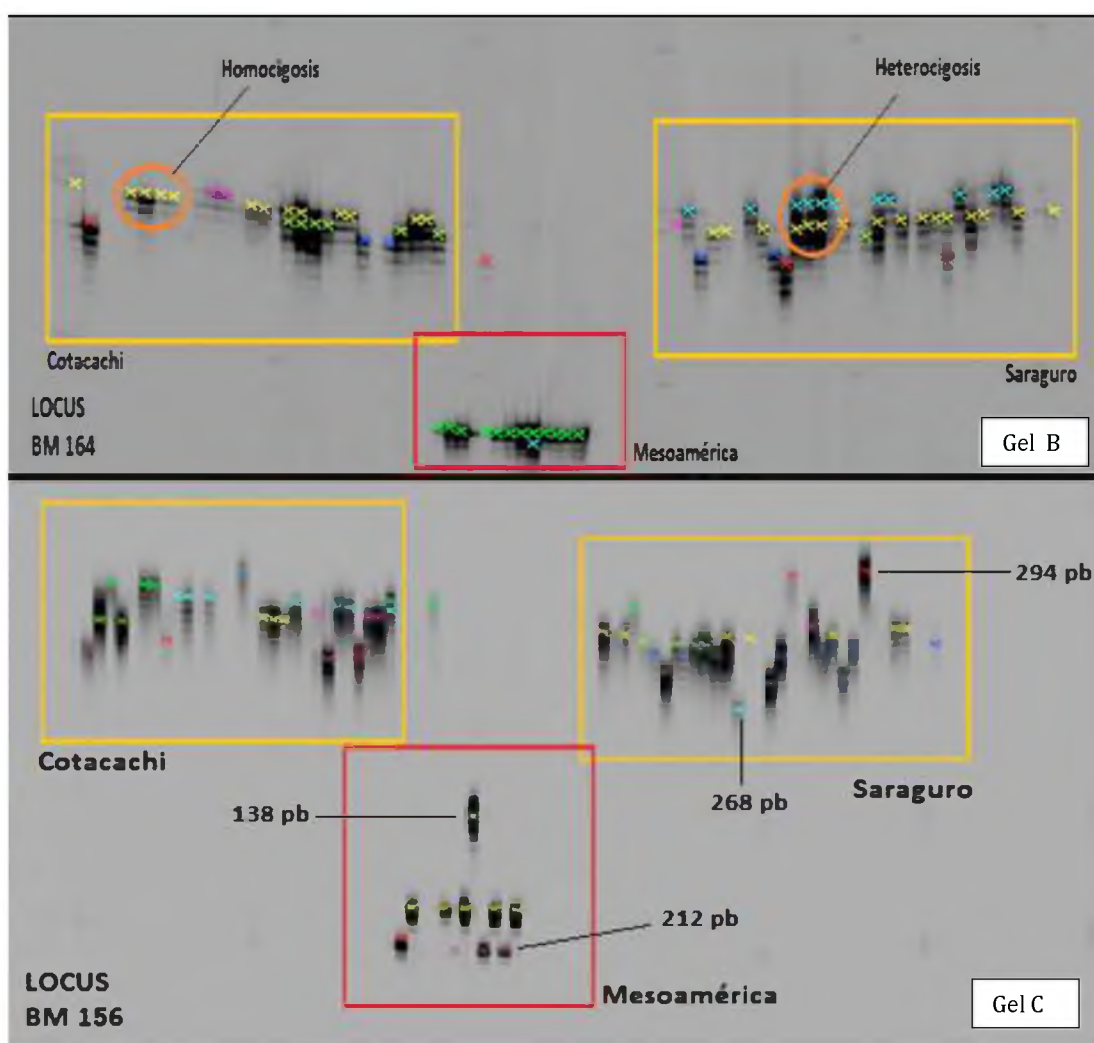


Figura 3. Productos de amplificación Gel de poliacrilamida al 6,5%. Gel A: dúplex BM181-BM183. Gel B: monoplex BM164. Gel C: monoplex BM156

Análisis de datos: De las 171 accesiones se descartaron cuatro debido a que presentaron datos ambiguos en más del 10% de los loci analizados. La matriz alélica total contiene los datos de 167 accesiones que fue separada para el análisis de diversidad de Cotacachi y Saraguro (114 accesiones), diferenciales mesoamericanos (11 accesiones) y análisis de recombinación (58 accesiones). También se utilizó la matriz alélica de Torres (2012) para comparar los parámetros de diversidad entre los ciclos de cultivo 2009 y 2015.

Caracterización de la diversidad genética Cotacachi y Saraguro en el ciclo de cultivo 2015

Diversidad genética: Para el análisis de diversidad del ciclo de cultivo 2015 se utilizaron datos de 114 accesiones (70 de Cotacachi y 44 de Saraguro) de frejol de las comunidades de Cotacachi y Saraguro. En conjunto, las 114 muestras de Cotacachi y Saraguro presentaron 105 alelos que en promedio es de 11,8 alelos/locus. De los nueve marcadores se observó que los marcadores BM181 y BM211 presentaron el menor número de alelos con solo seis, mientras que el marcador BM160 presenta el mayor número de alelos con 21. En la Tabla 7 se muestran los parámetros de diversidad para las accesiones conjuntas de Cotacachi y Saraguro. Se observa un Índice de Contenido Polimórfico (PIC) de 0,635 y una heterocigosidad observada (H_o) 0,078 para los 9 marcadores. También se observa que el marcador menos polimórfico es el BM181 con un PIC de 0,269 y la heterocigosidad observada de 0,027. Mientras que, al contrario, el marcador BM160 es el más polimórfico con un índice PIC de 0,921 y con una heterocigosidad observada de 0,147.

Tabla 7. Parámetros globales de diversidad de 112 accesiones de frejol de Cotacachi y Saraguro en el ciclo 2015

SSR	Mayor Frecuencia Alélica	Número de Alelos	Heterocigosidad Esperada (He)	Heterocigosidad Observada (Ho)	PIC
BM139	0.411	15	0.767	0.098	0.744
BM143	0.220	17	0.882	0.065	0.871
BM154	0.688	8	0.493	0.071	0.460
BM156	0.205	17	0.868	0.045	0.854
BM160	0.138	21	0.926	0.147	0.921
BM164	0.342	8	0.769	0.153	0.735
BM181	0.851	6	0.269	0.027	0.259
BM183	0.696	9	0.499	0.036	0.483
BM211	0.734	6	0.429	0.056	0.393
Media	0.476	11.889	0.656	0.078	0.635

En la Tabla 8 se comparan las variables de diversidad entre Saraguro y Cotacachi

Tabla 8. Parámetros de diversidad 68 accesiones de Cotacachi (Cot., columna izquierda) y 44 de Saraguro (Sar., columna derecha) de frejol

SSR	Muestras		Número de Alelos		Heterocigosidad Esperada (He)		Heterocigosidad Observada (Ho)		PIC	
	Cot	Sar	Cot	Sar	Cot	Sar	Cot	Sar	Cot	Sar
BM139	70	44	14	9	0.781	0.704	0.088	0.114	0.754	0.679
BM143	70	44	12	15	0.851	0.905	0.031	0.119	0.835	0.898
BM154	70	44	6	6	0.559	0.354	0.088	0.045	0.513	0.336
BM156	70	44	14	11	0.834	0.806	0.043	0.047	0.818	0.784
BM160	70	44	17	17	0.887	0.918	0.074	0.268	0.877	0.912
BM164	70	44	7	5	0.734	0.638	0.132	0.186	0.697	0.587
BM181	70	44	5	4	0.190	0.380	0.000	0.071	0.185	0.353
BM183	70	44	7	9	0.422	0.602	0.029	0.048	0.404	0.580
BM211	70	44	6	2	0.436	0.397	0.063	0.045	0.415	0.318
Media	70	44	9.778	8.667	0.633	0.634	0.061	0.105	0.611	0.605

Análisis de agrupamiento de accesiones andinas y mesoamericanas: Se generó un dendrograma (figura 4) en el que se empleó el coeficiente de similitud SM (*Simple Matching*) y el algoritmo de agrupación UPGMA. Concordando con el análisis de coordenadas PCoA, se observa la formación de dos grupos principales (coeficiente de similitud 0,88) separando las accesiones de Cotacachi y Saraguro de las acciones de Mesoamérica (figura 5). La accesión mesoamericana 96JM fue agrupada con las accesiones de Cotacachi y Saraguro, sin embargo, junto con las accesiones 150JS, 151JS y 83JS son las más alejadas de las demás muestras provenientes de Cotacachi y Saraguro. Las accesiones diferenciales de Mesoamérica se alejan de las accesiones de Cotacachi y Saraguro en los dos métodos de agrupación utilizados.

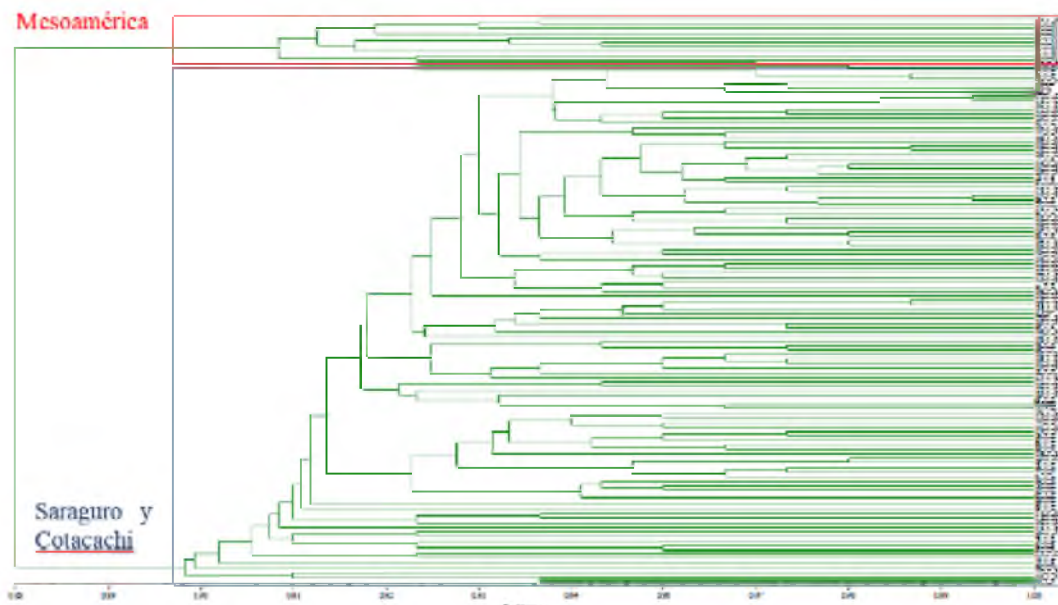


Figura 4. Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud SM y el algoritmo UPGMA para el análisis de agrupamiento de 125 accesiones de *Phaseolus vulgaris* (114 de Saraguro y Cotacachi y 11 Mesoamérica)

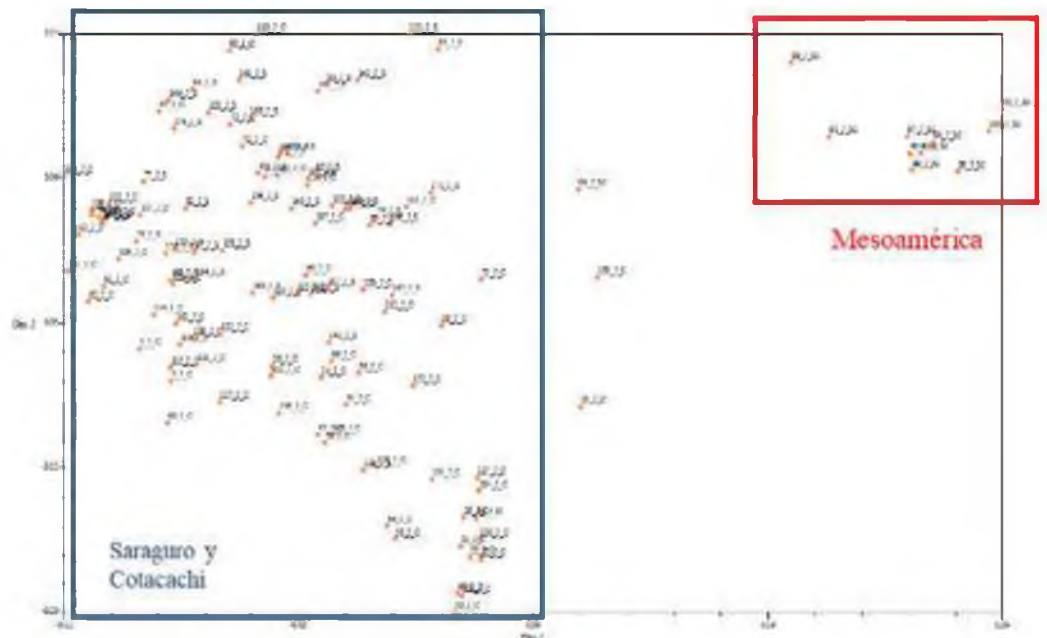


Figura 5. Análisis de componentes principales (PCoA) de 114 accesiones de frejol de los cantones Cotacachi y Saraguro (accesiones Andinas) y 11 accesiones provenientes de México (accesiones Mesoamérica)

Dentro de las poblaciones de Cotacachi y Saraguro se observó la formación de tres grupos, el grupo de color rojo, con 55 accesiones en su mayoría pertenecen a las comunidades de Saraguro, sin embargo, existe algunas accesiones de Cotacachi también en este grupo (71JC, 67JC, 124JC, 56JC, 72JC, 73JC, 75JC, 110JC, 4JC, 108JC, 113JC, 121JC, 65JC). Los grupos verde y azul, con 23 y 36 accesiones respectivamente, pertenecen a las comunidades de Cotacachi, y dos accesiones a Saraguro (139JS y 169JS). Se notó también que en Saraguro la población es más homogénea que en Cotacachi (Figura 6).

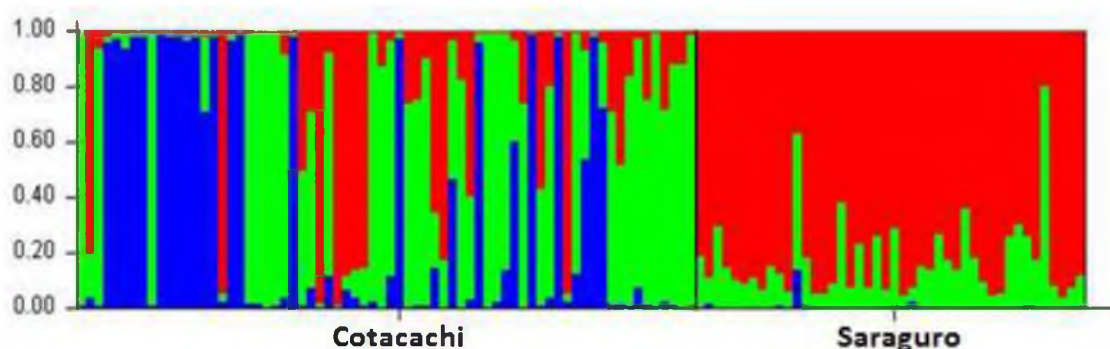


Figura 6. Estructura de las accesiones de Cotacachi y Saraguro. Eje horizontal: accesiones; Eje vertical: probabilidad de pertenecer a cada uno de los grupos

Análisis de agrupamiento de Cotacachi: En la Figura 7 observa la formación de cuatro grupos. El grupo verde con 21 accesiones, el grupo azul con 22, el grupo amarillo con 19 y el grupo rojo con 8 accesiones. Se observa que las accesiones del grupo verde tienen en su mayoría un hábito de crecimiento arbustivo (fréjol allpa), y también hay algunas accesiones del grupo azul. Las accesiones del grupo amarillo y rojo son mayoritariamente de hábito de crecimiento voluble (fréjol chacra).

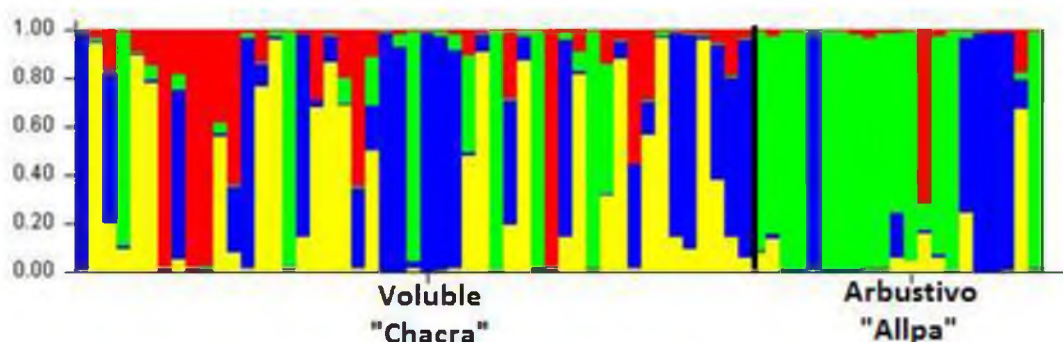


Figura 7. Estructura de las accesiones de Cotacachi Eje horizontal: accesiones; Eje vertical: probabilidad de pertenecer a cada uno de los grupos

Análisis de agrupamiento de Saraguro: En la figura 8 se observa la formación de tres grupos: El grupo azul con 18 accesiones, el grupo rojo con 15 y el grupo verde con 11. No se tiene ninguna clasificación previa para Saraguro y los fenotipos en cada grupo son muy diversos.

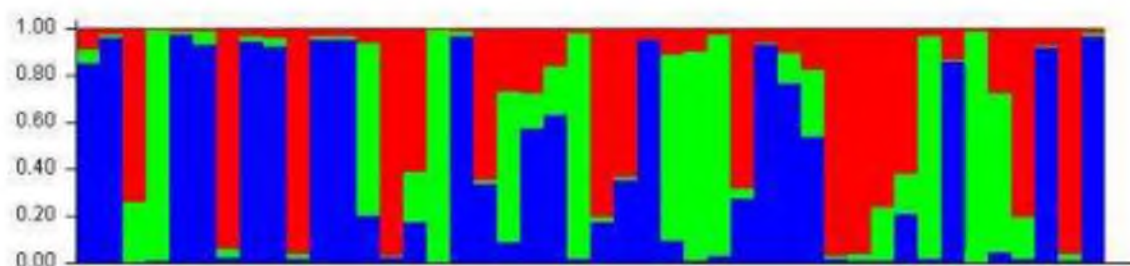


Figura 8. Estructura de las accesiones de Saraguro Eje horizontal: accesiones; Eje vertical: probabilidad de pertenecer a cada uno de los grupos

Diferenciación de población Andina y Mesoamericana: Se calcularon los índices de diferenciación de poblaciones (estadísticos F) para las subpoblaciones de Andinos y Mesoamericanos. Al analizar los parámetros, un valor alto de $F_{it}=0.927$ sugiere una clara desviación del equilibrio de H-W y que se hace evidente en la deficiencia de heterocigosis en cada una de las subpoblaciones ($F_{is}=0.895$). Finalmente, el estadístico $F_{st}=0.299$ podría indicar una clara diferenciación entre las subpoblaciones de Mesoamérica y Andinos. Se realizó

el Análisis Molecular de Varianza (Tabla 9), para explorar las diferencias entre las accesiones andinas con mesoamericanas como poblaciones. Se aprecia que el 69% de la variabilidad se encuentra dentro de cada población con respecto a la población total analizada de frejol, mientras que el 30% se explica por la diferencia entre poblaciones. Finalmente, la AMOVA y el estadístico Fst indican una diferencia significativa entre la población mesoamericana y andina.

Tabla 9. Análisis Molecular de Varianza entre los tipos andinos y mesoamericanos de frejol

Origen de Variación	gl	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	Componente de Varianza	% de variación genética
Entre Poblaciones	1	116.279	116.279	5.218	31%
Dentro de las poblaciones	123	1425.217	11.587	11.587	69%
Total	124	1541.496		16.805	100%

Comparación de los parámetros de diversidad en los ciclos de cultivo 2009 y 2015 para los cantones de Cotacachi y Saraguro

En la Tabla 10 se presentan los parámetros de diversidad Cotacachi en los ciclos 2009 y 2015 respectivamente.

Tabla 10. Parámetros de diversidad de los ciclos de cultivo 2009 (Torres 2012) y 2015 de frejol en el cantón de Cotacachi con 9 marcadores SSRs

COTACACHI										
SSR	Muestras		Número de Alelos		Heterocigosidad Esperada (He)		Heterocigosidad Observada (Ho)		PIC	
	2009	2015	2009	2015	2009	2015	2009	2015	2009	2015
BM139	146	70	15	14	0.878	0.781	0.000	0.088	0.866	0.754
BM143	146	70	20	12	0.879	0.851	0.343	0.031	0.868	0.835
BM154	146	70	6	6	0.535	0.559	0.021	0.088	0.472	0.513
BM156	146	70	24	14	0.888	0.834	0.378	0.043	0.878	0.818
BM160	146	70	20	17	0.926	0.887	0.048	0.074	0.921	0.877
BM164	146	70	11	7	0.808	0.734	0.105	0.132	0.784	0.697
BM181	146	70	9	5	0.755	0.190	0.000	0.000	0.717	0.185
BM183	146	70	12	7	0.781	0.422	0.000	0.029	0.751	0.404
BM211	146	70	7	6	0.566	0.436	0.116	0.063	0.511	0.415
Media	146	70	13.77	9.778	0.779	0.633	0.112	0.061	0.752	0.611

Los parámetros de diversidad de Saraguro en los ciclos 2009 y 2015 se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros de diversidad de los ciclos de cultivo 2009 y 2015 de frejol en el cantón de Saraguro

SARAGURO										
SSR	Muestras		Número de Alelos		Heterocigosidad Esperada (He)		Heterocigosidad Observada (Ho)		PIC	
	2009	2015	2009	2015	2009	2015	2009	2015	2009	2015
BM139	113	44	16	9	0.835	0.704	0.000	0.114	0.822	0.679
BM143	113	44	23	15	0.923	0.905	0.065	0.119	0.918	0.898
BM154	113	44	9	6	0.597	0.354	0.027	0.045	0.544	0.336
BM156	113	44	14	11	0.880	0.806	0.031	0.047	0.869	0.784

BM160	113	44	19	17	0.847	0.918	0.156	0.268	0.837	0.912
BM164	113	44	13	5	0.824	0.638	0.000	0.186	0.804	0.587
BM181	113	44	9	4	0.828	0.380	0.056	0.071	0.806	0.353
BM183	113	44	10	9	0.846	0.602	0.314	0.048	0.828	0.580
BM211	113	44	7	2	0.543	0.397	0.071	0.045	0.504	0.318
Media	113	44	13.33	8.667	0.791	0.634	0.080	0.105	0.770	0.605

Niveles de comparación de poblaciones: En la muestra en la Tabla 12 donde se contrastó los estadísticos F y la AMOVA en todos los niveles de análisis, se observó una mayor diferencia entre las poblaciones del 2009 y 2015 (Cotacachi 11% Fst=0,107 y Saraguro 10% Fst=0,095) que regionalmente en los mismos años entre Cotacachi y Saraguro en los diferentes años.

Tabla 12. AMOVA y Estadística F con 9 marcadores SSR para fréjol en diferentes poblaciones comparadas entre sí

Poblaciones a comparar	AMOVA (% de variación)		Estadística F		
	Entre Poblaciones	Dentro de las poblaciones	Fst	Fis	Fit
Mesoamericano vs Andino	31%	69%	0.299	0.895	0.927
2015: Saraguro vs Cotacachi	6%	94%	0.054	0.887	0.893
2009: Saraguro vs Cotacachi	5%	95%	0.045	0.885	0.891
Cotacachi: 2009 vs 2015	11%	89%	0.107	0.881	0.894
Saraguro: 2009 vs 2015	10%	90%	0.095	0.892	0.903

Análisis de introgresión y recombinación genética: En la Tabla 13 se muestra el porcentaje de accesiones que presentan alelos mesoamericanos. Para esto se utilizó la matriz alélica con 156 genotipos del ciclo de cultivo 2015 y la matriz generada por Torres (2012) con 259 genotipos del ciclo de cultivo 2009. El porcentaje de genotipos que presentaron alelos mesoamericanos en un marcador fue mayor en Saraguro 29,55% y menor en Cotacachi 16,96% en el 2015. Al contrario, en 2009 fue mayor Cotacachi que obtuvo 42,47% mientras que Saraguro 36,28%. En total en los dos ciclos de cultivo el porcentaje fue de 20,51% para el 2015 y 39,77% en el 2009.

Tabla 13. Accesiones con uno, dos o más alelos mesoamericanos en muestras andinas (Cotacachi y Saraguro) en los ciclos de cultivo 2009 y 2015

Nivel	Accesiones con alelos mesoamericanos observados en un SSR			Accesiones con alelos mesoamericanos observados en dos o más SSR		
	Accesiones observadas	Total	%	Accesiones observadas	Total	%
Cotacachi 2015	19	112	16.96	4	112	3.57
Cotacachi 2009	62	146	42.47	12	146	8.22
Saraguro 2015	13	44	29.55	4	44	9.09
Saraguro 2009	41	113	36.28	11	113	9.73
Andino 2015	32	156	20.51	4	156	2.56
Andino 2009	103	259	39.77	23	259	8.88

Análisis de recombinación dentro de fenotipos: Para explicar la alta variabilidad de fréjol se escogieron accesiones de seis fenotipos, estos fenotipos tiene denominaciones que les otorgan los agricultores en las comunidades de los cantones de Cotacachi y Saraguro: 12 accesiones de "Bola puka", 12 de "Toa", 12 de "Cargabello", 10 de "Zuko", 12 de "Canario" de Cotacachi y

12 de "Canario" de Saraguro. También, las accesiones mejoradas liberadas por el INIAP se adoptaron y son parte de la mezcla de los agricultores por lo que forman parte de este análisis: 1_J_C (Mejorado Pronaleg Bola Puka), 2_J_C (Mejorado Bombolin Bola Puka), 13_J_C (INIAP 412 Toa) y 25_J_C (INIAP 404 Cargabello). Se observó que en el fenotipo "Bola puka" solo una accesión presenta 100% de coincidencia y las accesiones 1JC y 2JC que son mejoradas por INIAP tuvieron 50% o menos de alelos idénticos a otras accesiones del mismo fenotipo. De igual manera en el fenotipo "Toa" solo las accesiones 16JC y 17JC tuvieron 100% de coincidencia y la semilla mejorada 13JC tiene menos del 60% con todas las otras accesiones. En el fenotipo "Zuco" las accesiones 40JC-42JC y 37JC-38JC coincidían en todos sus alelos. Finalmente "Cargabello" y "Canario" de Cotacachi y Saraguro son los fenotipos que menos alelos coinciden de una accesión a otra, es decir, hay mayor variabilidad en estos fenotipos.

9. Conclusiones

- Los valores de heterocigosis observada se explican principalmente por la naturaleza autogama del fréjol. Mientras que la Heterocigosis esperada indica el potencial de diversidad que se encuentra en comunidades de Cotacachi y Saraguro y está directamente relacionado con el manejo tradicional del cultivo en estos cantones.
- Los marcadores utilizados en este estudio tienen un alto poder de discriminación y son útiles como herramientas para análisis de la diversidad en fréjol. Los marcadores más informativos para las accesiones de Cotacachi y Saraguro en los dos ciclos de cultivo fueron BM160 y BM156.
- La presencia de accesiones de Cotacachi y Saraguro agrupadas entre sí, y su baja diferenciación sugiere que tienen un mismo origen o acervo en común que se separaron por el cambio de las prácticas agrícolas en este cultivo.
- Los 9 marcadores microsatélites empleados permitieron distinguir los dos acervos genéticos (mesoamericano y Andino) en la población analizada, debido a su alto poder discriminante y alto nivel de información (principalmente los marcadores BM139, BM164, BM156 y BM211).
- La presencia de alelos mesoamericanos podría explicarse por la conservación de alelos ancestrales provenientes de mesoamerica, o por un proceso de introgresión de estos alelos entre el acervo mesoamericano hacia el Andino durante la domesticación.
- Los altos niveles de riqueza alélica obtenidos en la caracterización genética de fréjol con 9 marcadores microsatélites en el ciclo 2015, ratifican la importancia del manejo tradicional en las zonas de Cotacachi y Saraguro que favorece una alta diversidad en esta leguminosa
- Se encontró una mayor diferenciación entre las poblaciones del 2009 y 2015 que entre las poblaciones de las comunidades de Cotacachi y Saraguro, debido a la dinámica producida por el manejo del cultivo en formas de mezcla.
- La presencia de alelos mesoamericanos así como también procesos de recombinación genética serían procesos que favorecen la diversificación de Fréjol en comunidades tradicionales como las de Cotacachi y Saraguro.

10. Bibliografía

- Benchimol, L. L., Campos, T., Morais Carbonell, S. A., Colombo, C. A., Chioratto, A. F., Formighieri, E. F., Pereira de Souza, A. (2007). Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. *Genet Resour Crop Evol*, 54(8), pp 1747–1762. doi:10.1007/s10722-006-9184-3
- Blair, M. W., Díaz, J. M., Duque, M. C., & Hidalgo, R. (2007). Evidencia molecular de diferenciación genética e introgresión entre razas de fréjol común del acervo andino. *Acta Agrónomica*, 56(4), pp 165-170. Retrieved from <http://www.uacm.kirj.redalyc.org/articulo.oa?id=169913316002>
- Blair, M. W., Pedraza, F., Buendia, H. F., Gaitán-Solís, E., Beebe, S. E., Gepts, P., & Tohme, J. (2003). Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 107(8), pp 1362–1374. doi:10.1007/s00122-003-1398-6

- Carrillo Paz y Miño, F. U. (2014). Evaluación de la resistencia a enfermedades y potencial agronómico de poblaciones de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Cotacachi y Saraguro. cotacachi, Imbabura. Quito, Ecuador: Universidad Central Del Ecuador.
- FAOSTAT. (2014). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Retrieved 02 06, 2017, from [http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCGujaria-Verma, N., Ramsay, L., Sharpe, A., Sanderson, L.-A., Debouck, D., Tar'an, B., & Bett, K. E. \(2016\). Gene-based SNP discovery in tepary bean \(*Phaseolus acutifolius*\) and common bean \(*P. vulgaris*\) for diversity analysis and comparative mapping. BMC Genomics, 17, 239. doi:10.1186/s12864-016-2499-3](http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCGujaria-Verma, N., Ramsay, L., Sharpe, A., Sanderson, L.-A., Debouck, D., Tar'an, B., & Bett, K. E. (2016). Gene-based SNP discovery in tepary bean (<i>Phaseolus acutifolius</i>) and common bean (<i>P. vulgaris</i>) for diversity analysis and comparative mapping. BMC Genomics, 17, 239. doi:10.1186/s12864-016-2499-3)
- Liu, K. y Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21, 2128-2129.
- Madakbaş, S. Y., Sarıkamış, G., Başak, H., Karadavut, U., Özmen, C. Y., Daşçı, M. G., & Çayan, S. (2016, Agosto). Genetic Characterization of Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Accessions from Turkey with SCAR and SSR Markers. *Biochemical Genetics*, 54, pp 495–505. doi:10.1007/s10528-016-9737-x
- MAGAP. (2014). BOLETÍN SITUACIONAL FRÉJOL TIERNO Y SECO. Recuperado el 12 de diciembre de 2016, de <http://www.agricultura.gob.ec/http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2014/hboletin-situacional-frejol-2014-actualizado.pdf>
- Mahajan, R., Zargar, S. M., Singh, R., Salgotra, R. K., Sufia, F., & Sonah, H. (2016). Population Structure Analysis and Selection of Core Set among Common Bean Genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Appl Biochem Biotechnol*. doi:10.1007/s12010-016-2307-1
- McClellan, P. E., Terpstra, J., McConnell, M., White, C., Lee, R., & Mamidi, S. (2012). Population structure and genetic differentiation among the USDA common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core collection. *Genet Resour Crop Evol*, 59(4), pp 499–515. doi:10.1007/s10722-011-9699-0
- Müller, B. S., Pappas, G. J., Valdisser, P. A., Coelho, G. R., Menezes, I. P., Abreu, A. G., Vianello, R. P. (2015). An Operational SNP Panel Integrated to SSR Marker for the Assessment of Genetic Diversity and Population Structure of the Common Bean. *Plant Mol Biol Rep*, 33(6), pp 1697–1711. doi:10.1007/s11105-015-0866-x
- Murillo, Á., Pinzón, J., & Peralta, E. (1998). Catalogo del Banco de Germoplasma de Fréjol, Arveja, Haba y Lenteja. Quito, Ecuador: INIAP - Estación Experimental Santa Catalina.
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, Á., & Pinzón, J. (2012). LINEA DEL TIEMPO, Mejoramiento genético del fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador. Pichincha, Ecuador: Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA), INIAP.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rohlf, J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.
- Tufiño, A. P., Gutierrez, J. A., Ocampo, C., & García, V. H. (2006). Estudio de la variabilidad genética en habichuela *Phaseolus vulgaris* L., mediante descriptores morfológicos y bioquímicos. *Acta Agronómica*, 53(1), pp. 25-36.
- Torres, C. C. (2010). Estudio de la variabilidad genética de cultivares locales de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) colectado en dos agroecosistemas andinos (Cotacachi y Saraguro), y su relación con la resistencia genética a roya. ESPE - INIAP.
- Voysest, O. (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de America Latina. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

11. Anexos

Anexo 1. Lista de accesiones de fréjol de Saraguro, Cotacachi, Mesoamericanos y fenotipos seleccionados.

Cuadro 1. Genotipos componentes de variedades mezcla de fréjol de Cotacachi obtenidos de comunidades en el ciclo de cultivo 2015	
IDENTIFICACIÓN LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD
1_J_C	Chakra
2_J_C	Chakra
3_J_C	Chakra
4_J_C	Chakra
5_J_C	Chakra
13_J_C	Chakra
14_J_C	Chakra
25_J_C	Allpa
26_J_C	Allpa
36_J_C	Allpa
37_J_C	Allpa
38_J_C	Allpa
47_J_C	Allpa
49_J_C	Allpa
50_J_C	Allpa
52_J_C	Allpa
54_J_C	Allpa
55_J_C	Allpa
56_J_C	Allpa
57_J_C	Allpa
58_J_C	Allpa
59_J_C	Allpa
60_J_C	Allpa
61_J_C	Allpa
62_J_C	Allpa
63_J_C	Allpa
64_J_C	Allpa
65_J_C	Canario
66_J_C	Canario
67_J_C	Canario
69_J_C	Canario
71_J_C	Canario
72_J_C	Canario
73_J_C	Canario
75_J_C	Canario

101_J_C	Chakra
102_J_C	Chakra
103_J_C	Chakra
104_J_C	Chakra
105_J_C	Chakra
106_J_C	Chakra
107_J_C	Chakra
108_J_C	Chakra
109_J_C	Chakra
110_J_C	Chakra
111_J_C	Chakra
112_J_C	Chakra
113_J_C	Chakra
114_J_C	Chakra
115_J_C	Chakra
116_J_C	Chakra
117_J_C	Chakra
118_J_C	Chakra
119_J_C	Chakra
120_J_C	Chakra
121_J_C	Chakra
122_J_C	Chakra
123_J_C	Chakra
124_J_C	Chakra
125_J_C	Chakra
126_J_C	Chakra
127_J_C	Chakra
128_J_C	Chakra
129_J_C	Chakra
130_J_C	Chakra
131_J_C	Chakra
132_J_C	Chakra
133_J_C	Chakra
134_J_C	Chakra
135_J_C	Chakra
136_J_C	Chakra
137_J_C	Chakra
138_J_C	Chakra

Cuadro 2. Genotipos componentes de variedades mezcla de fréjol de Saraguro obtenidos de comunidades en el ciclo de cultivo 2015	
IDENTIFICACIÓN LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD
77_J_S	Canario
78_J_S	Canario
79_J_S	Canario
80_J_S	Canario
81_J_S	Canario
82_J_S	Canario
83_J_S	Canario
84_J_S	Canario
85_J_S	Canario
86_J_S	Canario
87_J_S	Canario
88_J_S	Canario
139_J_S	Chakra
140_J_S	Chakra
141_J_S	Chakra
142_J_S	Chakra
143_J_S	Chakra
144_J_S	Chakra
145_J_S	Chakra
146_J_S	Chakra
147_J_S	Chakra
148_J_S	Chakra
149_J_S	Chakra
150_J_S	Chakra
151_J_S	Chakra
152_J_S	Chakra
153_J_S	Chakra
154_J_S	Chakra
155_J_S	Chakra
156_J_S	Chakra
157_J_S	Chakra
158_J_S	Chakra
159_J_S	Chakra
160_J_S	Chakra
161_J_S	Chakra
162_J_S	Chakra
163_J_S	Chakra
164_J_S	Chakra
165_J_S	Chakra

166_J_S	Chakra
167_J_S	Chakra
168_J_S	Chakra
169_J_S	Chakra
170_J_S	Chakra
171_J_S	Chakra
172_J_S	Chakra
173_J_S	Chakra
174_J_S	Chakra
175_J_S	Chakra
176_J_S	Chakra

Cuadro 3. Genotipos diferenciales mesoamericanos	
IDENTIFICACIÓN LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD
89_J_M	Mesoamericano
90_J_M	Mesoamericano
91_J_M	Mesoamericano
92_J_M	Mesoamericano
93_J_M	Mesoamericano
94_J_M	Mesoamericano
95_J_M	Mesoamericano
96_J_M	Mesoamericano
97_J_M	Mesoamericano
98_J_M	Mesoamericano
99_J_M	Mesoamericano
100_J_M	Mesoamericano

Cuadro 4, Fenotipos seleccionados de la mezcla utilizados para el estudio del potencial de introgresión en variedades mezcla de fréjol		
IDENTIFICACIÓN LABORATORIO	TIPO DE VARIEDAD	IDENTIDAD AGRICULTOR
1_J_C	Chakra	Bola Puka
2_J_C	Chakra	Bola Puka
4_J_C	Chakra	Bola Puka 1
3_J_C	Chakra	Bola Puka 2
5_J_C	Chakra	Bola Puka 3
6_J_C	Chakra	Bola Puka 4
7_J_C	Chakra	Bola Puka 5

8_J_C	Chakra	Bola Puka 6
9_J_C	Chakra	Bola Puka 7
10_J_C	Chakra	Bola Puka 8
11_J_C	Chakra	Bola Puka 9
12_J_C	Chakra	Bola Puka 10
13_J_C	Chakra	Toa
14_J_C	Chakra	Toa
15_J_C	Chakra	Toa 1
16_J_C	Chakra	Toa 2
17_J_C	Chakra	Toa 3
18_J_C	Chakra	Toa 4
19_J_C	Chakra	Toa 5
20_J_C	Chakra	Toa 6
21_J_C	Chakra	Toa 7
22_J_C	Chakra	Toa 8
23_J_C	Chakra	Toa 9
24_J_C	Chakra	Toa 10
25_J_C	Allpa	Cargabello
26_J_C	Allpa	Cargabello 1
27_J_C	Allpa	Cargabello 2
28_J_C	Allpa	Cargabello 3
29_J_C	Allpa	Cargabello 4
30_J_C	Allpa	Cargabello 5
31_J_C	Allpa	Cargabello 6
32_J_C	Allpa	Cargabello 7
33_J_C	Allpa	Cargabello 8
34_J_C	Allpa	Cargabello 9
35_J_C	Allpa	Cargabello 10
36_J_C	Allpa	Cargabello morado
37_J_C	Allpa	Zuko 1
38_J_C	Allpa	Zuko 2
39_J_C	Allpa	Zuko 3
40_J_C	Allpa	Zuko 4
41_J_C	Allpa	Zuko 5
42_J_C	Allpa	Zuko 6
43_J_C	Allpa	Zuko 7
44_J_C	Allpa	Zuko 8
45_J_C	Allpa	Zuko 9
46_J_C	Allpa	Zuko 10
65_J_C	Canario	Canario Cuadrado 1

66_J_C	Canario	Canario Cuadrado 2
67_J_S	Canario	Canario b
68_J_S	Canario	Canario Cuadrado 3
69_J_S	Canario	NaN
70_J_S	Canario	Canario pálido
71_J_S	Canario	Canario pequeño 1
72_J_S	Canario	NaN
73_J_S	Canario	Crema 1
74_J_S	Canario	Crema 2
75_J_S	Canario	Canario pequeño 2
76_J_S	Canario	Crema 3

Actividad 4:

1. Título

Validación de marcadores moleculares asociados con resistencia a tizón tardío y nematodo del quiste en una población segregante de papa

2. Autor

Jimmy Sampedro

3. Resumen

La papa es uno de los principales rubros agrícolas en el Ecuador, convirtiéndose en un producto primordial especialmente de la región interandina, ya que se cultiva en 12 provincias del país. Entre los principales factores que afectan el cultivo de este rubro se encuentran: diversas condiciones ambientales, plagas y enfermedades. Los principales microorganismos que afectan al tubérculo de la papa son *Phytophthora infestans* y *Globodera sp.*, causando pérdidas económicas anuales. La tecnología de selección asistida por marcadores moleculares se postula como una solución viable para la obtención de poblaciones segregantes que presentan resistencia a estos fitopatógenos. El objetivo de este estudio es realizar la validación de la presencia o ausencia de marcadores moleculares asociados con la resistencia a tizón tardío y nematodo del quiste. Para este fin se extrajo el ADN de una población de 106 individuos segregantes de papa, y se aplicó la tecnología de PCR y electroforesis para la identificación y discriminación de marcadores. Se determinó que el 97% de los individuos presenta el marcador GP179, el 45% presentan el marcador 76-2SF2/76-2SR y el 37% evidencian la presencia del marcador TG689. En conclusión, la identificación de los genes que confieren resistencia a *P. infestans* y *Globodera* empleando la tecnología de selección asistida por marcadores moleculares, es una alternativa tecnológica para aumentar la eficiencia de la selección de los programas de mejoramiento genético en este rubro.

4. Palabras clave

Población segregante de papa, resistencia, tizón tardío, nematodo del quiste, MAS

5. Introducción

La papa es uno de los principales rubros agrícolas en el Ecuador, ocupando el séptimo lugar de producción a nivel nacional después de la caña de azúcar, del banano, de la palma, del maíz, del arroz y del plátano. En el Ecuador, la papa es un producto primordial especialmente de la región interandina, ya que se cultiva en 12 provincias del país (Pumisacho y Sherwood, 2002). Este cultivo es altamente demandado debido al gran aporte nutricional del producto y por su presencia en la dieta cotidiana de los ecuatorianos (ESPAC, 2014). La papa es la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país, con un consumo anual per cápita que fluctúa según las ciudades: 122 kg en Quito y 80 kg en Cuenca (Guerrero, 2016). La papa se ve afectada anualmente por plagas y enfermedades que afectan el crecimiento de la planta, la calidad y la producción del tubérculo (Loebenstein y Gaba, 2012).

La papa es susceptible a diversas enfermedades, muchas de las cuales infectan las raíces y los tubérculos, mientras que otras atacan específicamente las hojas (Huitema *et al.*, 2003). Las enfermedades que afectan a la papa generalmente son: la caspa negra, la sarna común, la costra pulverulenta y la podredumbre blanda. Las enfermedades de la hoja incluyen al tizón tardío, al tizón temprano y al rollo de la hoja de papa (Alvarado *et al.*, 2012). El tizón tardío es la enfermedad de la papa más común y ocasiona defoliación severa y disminución en el rendimiento, causando pérdidas millonarias cada año (Kamoun *et al.* 2001). Las infecciones producidas por *Phytophthora infestans*, microorganismo acarreador del tizón, generalmente comienzan en grietas producidas en los tubérculos (Goss *et al.*, 2014). Además del tizón tardío, el nematodo del quiste (*Globodera sp.*) causa severas pérdidas de rendimiento en la papa (Skantar *et al.*, 2007). Las plantas infectadas con nematodos del quiste generalmente

presentan concentraciones reducidas de nitrógeno, fósforo y potasio en el follaje (Jones *et al.*, 2003).

El mejoramiento genético de la papa en el país se orienta principalmente al desarrollo de nuevas variedades con altos rendimientos y una alta calidad comercial y culinaria. El mejoramiento tradicional consiste básicamente en varios cruzamientos de germoplasma local e introducido de varios orígenes y la identificación de clones promisorios superiores (Condori *et al.*, 2014). Aun cuando las enfermedades que afectan a la papa pueden ser controladas empleando semillas certificadas, rotando el cultivo, con buenas prácticas agronómicas y el empleo de tratamientos químicos, el desarrollo de variedades resistentes representa una opción importante de manejo del tizón tardío y del nematodo del quiste (Watanabe, 2015).

Debido a la continua aparición de nuevas razas de *Phytophthora infestans* y el difícil control de *Globodera*, que han superado la resistencia de las variedades en uso en el país, es necesaria la generación permanente de nuevas variedades. Los marcadores moleculares son poderosas herramientas que permiten de manera clara la determinación de las características genéticas de las plantas y la capacidad de seleccionar individuos basándose en el genotipo, en lugar de por el fenotipo (Álvarez-Gil, 2011). De esta manera la identificación molecular de resistencia empleando marcadores moleculares, se ha convertido en una opción de amplio uso y de fácil detección. La selección asistida por marcadores es una herramienta de alta potencia para la identificación de caracteres deseables (Barone, 2004). Por lo cual, si se determina si un marcador se encuentra ligado a la resistencia contra un patógeno específico, se puede predecir si el carácter se encuentra presente o no en un cultivo. Por este motivo, el propósito de este proyecto consiste en la validación de marcadores moleculares asociados con la resistencia a las principales enfermedades (tizón tardío y nematodo del quiste) en germoplasma del Programa de mejoramiento genético del INIAP, para su posterior uso en la selección de germoplasma con resistencia a estos limitantes bióticos.

6. Objetivos

1. Aplicar la tecnología de PCR y electroforesis para la identificación de marcadores ligados a loci de resistencia de tizón tardío y nematodo del quiste.
2. Establecer la asociación existente entre los marcadores moleculares y la resistencia al desarrollo de enfermedades producidas por tizón tardío y nemátodo del quiste.

7. Materiales y Métodos

7.1. Extracción, cuantificación y validación de ADN de *Solanum tuberosum*: Se realizó la extracción de DNA de 98 tubérculos de papa que pertenecían a una población segregante de papa, provenientes de un cruzamiento entre progenitores *S. phureja* con diferentes niveles de resistencia a tizón tardío y al nematodo del quiste. También se realizó la extracción de 4 tubérculos de papa pertenecientes a: un progenitor masculino, un progenitor femenino, un testigo resistente y un testigo susceptible. Para la extracción de DNA de los tubérculos de papa, se utilizó el protocolo de extracción de DNA descrito por el Institute for Health and Consumer Protection, 2010. En primera instancia, se procedió a macerar un fragmento de tubérculo de cada muestra en tubo ependorf de 1,5 mL, cada tubo contenía 300 µL solución amortiguadora bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB del inglés, *Hexadecyltrimethylammonium bromide*) que contenía: NaCl 5 M, 2 % de CTAB, Tris-HCl 0,1 M (pH 8.0) y EDTA 0,05 M (pH 8.0). Posterior, a cada tubo se colocó 700 µL de solución amortiguadora CTAB y 4 µL de Proteínasa K y las muestras se incubaron por 2 horas en el baño maría a 65 °C. Transcurridas las 2 horas, las muestras se centrifugaron por 10 min a 3000 gravedades y se transfirió 500 µL del sobrenadante a tubos ependorf de 2 mL que contenían 600 µL de cloroformo, se agitó el tubo y se centrifugó nuevamente por 10 min a 16000 gravedades. Posterior, se transfirió 500 µL del sobrenadante a tubos ependorf de 1,5 mL que contenían 500 µL de isopropanol, se agitó el tubo y se incubaron las muestras por 30 min a -20°C. Culminada la incubación, se centrifugaron las muestras por 10 min a 16000 gravedades, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del pellet empleado etanol al 70 % y un lavado del pellet utilizando etanol al 100 %. Posterior, se procedió a secar el pellet durante 20 min a 40 °C utilizando el equipo Centrivap DNA Concentrator (LABCONCO,

EE.UU) y se resuspendió en 100 μL de solución amortiguadora TE, luego se agregó 2 μL de RNAasa y se incubó a 37 °C durante 30 min hasta que el pellet se diluyera completamente. Para la cuantificación de las muestras de DNA de *Solanum tuberosum*, se empleó la técnica de espectrofotometría utilizando el equipo EPOCH™ (Biotek®, EE.UU) para microplacas. Mediante el programa GENE5 se realizaron las lecturas de la placa que contenía 0.2 μL de muestra en cada pocilio y se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 260-280nm (BioTeK Instruments, 2011). Cada muestra fue diluida hasta obtener una concentración de DNA de 5 ng/ μL . Una vez diluidas las muestras, se procedió a validar el DNA mediante la amplificación de productos por PCR, utilizando el marcador molecular STG0033. Se utilizó el siguiente Mix (Tabla 1.) y las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 2.) descritas por Morillo y Miño, 2011. p.126. Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2 % teñidos con Sybr Safe.

Tabla 1. Mix para la validación de DNA de papautilizando el marcador STG0033

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

*CI y CF: Concentración inicial y final

Tabla 2. Programa de amplificación para la validación de DNA

	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	5 min	1 ciclo
2	94	45 seg	30 ciclos
3	61	1 min	
4	72	2 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	10 min	1 ciclo

7.2. identificación de la resistencia a *Phytophthora infestans* (tizón tardío) y *Globorera sp.* (Nemátodo del quiste): Para la detección molecular de la resistencia a tizón tardío, se utilizaron los marcadores moleculares: GP179 empleando la metodología modificada de (Meksem *et al.*, 1995) (Tablas 3 y 4.) y 76-2SF2/76-2SR (Tablas 5 y 6.) empleando la metodología modificada de (Ballvora *et al.*, 2002). Por otro lado, para la detección molecular de la resistencia al nematodo del quiste, se utilizó el marcador molecular TG689 empleando la metodología modificada de (Gebhard *et al.*, 2006) (Tablas 7 y 8.).

Tabla 3. Mix marcador molecular GP179.

REACTIVOS:	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.89
Buffer PCR (X)	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	1,5	0.45
dNTP's (mM)	5	0.1	0.16
Primer (μM) F	10	0.25	0.20
Primer (μM) R	10	0.25	0.20
Taqpolimerasa (U/μL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/μL)	5	1.33	2
Volumen Total (μL)			7.50

Tabla 4. Condiciones de amplificación para el marcador GP179

	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	93	2 min	1 ciclo
2	93	45 seg	40 ciclos
3	55	45seg	
4	72	1.20 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	10 min	1 ciclo

Tabla 5. Mix marcador molecular 76-2SF2/76-2SR

REACTIVOS:	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.18
Buffer PCR (X)	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.60
dNTP's (mM)	5	0.25	0.38
Primer (μM) F	10	0.5	0.38
Primer (μM) R	10	0.5	0.38
Taqpolimerasa (U/μL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/μL)	5	1.33	2
Volumen Total (μL)			7.50

Tabla 6. Condiciones de amplificación para el marcador 76-2SF2/76-2SR

	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	93	2 min	1 ciclo
2	93	45 seg	40

3	55	45 seg	ciclos
4	72	1.30 min	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	10 min	1 ciclo

Tabla 7. Mix marcador molecular TG698

REACTIVOS:	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
Agua UP	-	-	2.18
Buffer PCR (X)	5	1	1.50
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.60
dNTP's (mM)	5	0.25	0.38
Primer (μM) F	10	0.25	0.19
Primer (μM) R	10	0.25	0.19
Taqpolimerasa (U/μL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/μL)	5	1.33	2
Volumen Total (μL)			7.50

Tabla 8. Condiciones de amplificación para el marcador TG698

	T (°C)	Tiempo	Ciclos
1	95	5 min	1 ciclo
2	95	45 seg	30 ciclos
3	55	45 seg	
4	72	45 seg	
5	72	7 min	1 ciclo
6	10	10 min	1 ciclo

Los productos de amplificación de las PCR's descritas, se visualizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2 % teñidos con Sybr Safe.

8. Resultados y Discusión

8.1. Validación de los DNA's extraídos de tubérculo de papa: Se empleó el protocolo de extracción de DNA descrito por el Institute for Health and Consumer Protection para tubérculos de papa, del cual se obtuvieron concentraciones por sobre los 200 ng/μL de las 102 muestras (Tabla 9.) y no se evidenció la amplificación de DNA de las muestras 16, 63, 108 y 109 (Anexo 1.).

Tabla 9. Cuantificación de DNA en absorbancia a 260 y 280 nm de los tubérculos de papa.

Nº Individuo	Pureza (260/280)	DNA (ng/μL)	Nº Individuo	Pureza (260/280)	DNA (ng/μL)
14	1,598	341,044	13	1,596	205,45
8	1,619	246,382	2	1,737	227,363
1	1,706	265,806	4A	1,801	406,061
43	1,706	288,103	17	1,645	278,403

28	1,583	240,862	24	1,827	185,555
5	1,844	524,833	26	1,836	324,624
33	1,81	249,497	25	1,827	135,191
18	1,725	253,174	11	1,712	326,349
3	1,847	408,004	10	1,635	369,556
30	1,768	341,709	4B	1,659	317,41
29	1,596	270,593	19	1,732	154,911
27	1,537	414,478	31	1,439	318,062
42	1,498	409,631	36	1,718	274,766
47	1,733	676,043	41	1,386	303,664
38	1,522	314,875	23	1,57	307,245
34	1,689	185,91	63	1,448	323,312
48	1,634	536,389	43	1,563	311,18
32	1,455	750	21	1,78	673,204
59	1,538	400,998	58	1,774	430,436
39	1,422	284,107	22	1,487	330,231
20	1,57	307,968	44B	1,605	343,701
48	1,611	285,789	40	1,591	447,082
37	1,744	1133,936	61	1,506	449,502
44A	1,708	781,94	50	1,582	342,084
69	1,789	468,072	83	1,675	525,753
73	1,49	542,94	77	1,914	144,158
68	1,583	567,75	64	1,733	831,102
80	1,838	548,614	70	1,596	535,614
71B	1,822	466,419	51	1,669	487,987
81	1,629	519,518	55	1,773	461,291
57	1,778	632,028	78	1,644	405,178
75	1,767	525,201	82	1,903	278,29
67	1,883	476,916	54	1,713	337,659
71A	1,612	207,396	53	1,761	450,436
74	1,28	149,091	66	1,557	457,047
92	1,661	257,607	108	1,427	425,611
96B	1,464	1193,586	112	1,61	340,726
111	1,439	392,19	88	1,604	1265,787
96A	1,841	231,743	89	1,616	199,681
93B	1,818	303,397	109	1,606	241,484
93A	1,662	267,275	107	1,692	673,035
104	1,776	213,636	99	1,794	250,466
105	1,548	635,946	95B	1,847	201,057
90	1,757	378,377	100	1,466	341,896
98	1,632	70,225	103	1,766	456,352
87	1,636	307,107	110	1,313	790,595
95A	1,803	280,289	97	1,927	205,392
79	1,626	282,542	52	1,655	625,408
Victoria	1,922	1224,77	85	1,807	298,778
94	1,921	359,594	84	1,937	507,543
Superchola	1,966	929,064	98	1,672	305,432
Capiro	1,893	26,027	43	1,822	109,811
Libertad	1,856	349,522	12	1,987	138,371

Como se puede observar en la Tabla 9, las concentraciones de DNA obtenidas presentan concentraciones altas, superando los 200 ng/ μ L. Sin embargo, debido a que la muestra se oxida con mucha facilidad al triturarla por la influencia de los polifenoles (Vitti *et al.*, 2011), los índices de pureza son bajos, aunque esta particularidad no afecta los resultados de amplificación (Anexo 1.).

Debido a que las muestras 16, 63, 108 y 109 no amplificaron, se realizó una nueva extracción, cuantificación y validación. En dicho caso solo amplificaron las muestras 63 y 108. La ausencia

de banda por la degradación de DNA en las muestras 16 y 109 puede deberse al extenso tiempo en el cual se encontraban almacenados los tubérculos (Deagle, *et al.*, 2006). También, el valor superior a 400 ng/ μ Len la cuantificación de ambas muestras, puede deberse a la coloración café producida por la oxidación del tubérculo (Kruger, 1995).

8.2. identificación de la resistencia a tizón tardío y al nematodo del quiste: Con la finalidad de optimizar las condiciones de amplificaciones de PCR para los marcadores de resistencia, se procedió a realizar ensayos utilizando 5 muestras de las 104 presentes. Las condiciones que principalmente variaron fueron: la concentración de magnesio, de primer y de dNTP's. El marcador molecular GP179 amplifica un fragmento que pertenece al gen R1, mismo que confiere resistencia al tizón tardío (Juyó, *et al.*, 2011). El tamaño del fragmento que se observa en el Anexo 2, es de 550 pb, tal como se evidencia en la investigación de Meksem *et al.* (1995). Sin embargo, el testigo susceptible perteneciente al carril VIC presenta bandaje, lo cual dificulta el análisis de la presencia o ausencia de la resistencia. Aproximadamente el 97% de las muestras amplificaron (Tabla 10.) y evidencian la resistencia al tizón. En las actuales circunstancias se requiere confirmar la validación en el testigo susceptible para confirmar el potencial de este marcador para la selección de resistencia (Botez *et al.*, 2009).

Por otro lado, el marcador 76-2SF2/76-2SR amplifica un fragmento de la secuenciación del gen R1, obteniéndose un gran fragmento de aproximadamente 1,4 kb, tal como se evidencia en el trabajo realizado por (Zoteyeva, 2014), donde se observa un fragmento de tamaño de aproximadamente 1355 pb. La amplificación presenta bandaje en el testigo resistente (carril LIB) y ausencia de amplificación en el testigo susceptible (carril VIC), lo cual facilita el análisis de la presencia o no de la resistencia (Anexo 3.). El 45% de las muestras evidencian amplificación de la resistencia (Tabla 10.), lo cual es imprescindible ya que una vez las especies sean liberadas en campo, solo el 20% de las mismas son capaces de adaptarse y sobrevivir a las condiciones ambientales presentes (Anjum, 2015).

El marcador TG698 asociado a el gen H1, es un patrón que representa correlaciones idóneas en cuanto a genotipos resistentes a *Globodera rostochiensis* (Milczarek *et al.*, 2012), así mismo, en evaluaciones de la descendencia (Caromelet *et al.*, 2003), se observa que este rasgo se encuentra presente en una población de papa que presenta tolerancia a este fitopatógeno. El tamaño esperado del fragmento es de aproximadamente de 141 pb (Anexo 4.), tal como lo reporta (Bryan *et al.*, 2002), en su trabajo de investigación. Sin embargo, el testigo resistente perteneciente al carril LIB no presenta amplificación, lo cual dificulta el análisis de la presencia o ausencia de la resistencia. El 37% de las muestras evidencian amplificación de la resistencia (Tabla 10).

A continuación, se observa un cuadro resumido de la presencia o ausencia de los 3 marcadores moleculares testeados (Tabla 10):

Tabla 10. Resumen de la presencia de los marcadores asociados a la resistencia de tizón tardío y nemátodo del quiste

indiv.	Presencia de la resistencia			indiv.	Presencia de la resistencia		
	GP179	76-2SF2/76-2SR	TG698		GP179	76-2SF2/76-2SR	TG698
14	✓	x	x	13	✓	x	x
8	✓	✓	x	2	✓	x	✓
1	✓	x	✓	4A	✓	x	x
43	✓	x	x	17	✓	✓	x
28	✓	✓	✓	24	✓	x	✓
5	✓	✓	x	26	✓	✓	x
33	✓	x	✓	25	✓	✓	x
18	✓	✓	✓	11	✓	x	✓
3	✓	x	✓	10	✓	x	✓

30	✓	✓	✓	4B	✓	x	x
29	✓	✓	x	19	✓	✓	✓
27	✓	✓	✓	31	✓	x	x
42	✓	x	x	36	✓	✓	x
47	✓	x	✓	41	✓	✓	x
38	✓	✓	x	23	✓	✓	✓
34	✓	x	x	63	x	x	x
48	✓	x	✓	43	✓	x	x
32	✓	✓	x	21	✓	✓	x
59	✓	x	x	58	x	x	✓
39	✓	x	x	22	✓	✓	x
20	✓	✓	x	44B	✓	✓	x
48	✓	✓	x	40	✓	✓	✓
37	✓	✓	x	61	✓	✓	x
44A	✓	✓	x	50	✓	x	✓
69	✓	x	✓	83	✓	✓	✓
73	✓	✓	✓	77	✓	✓	✓
68	✓	✓	✓	64	✓	✓	x
80	✓	x	x	70	✓	✓	✓
71B	✓	x	✓	51	✓	x	x
81	✓	x	x	55	✓	✓	✓
57	✓	✓	✓	78	✓	x	✓
75	✓	✓	x	82	✓	x	x
67	✓	x	x	54	✓	x	✓
71A	✓	✓	✓	53	✓	✓	x
74	✓	✓	✓	66	✓	x	x
92	✓	✓	x	108	x	x	x
96B	✓	✓	x	112	✓	✓	✓
111	✓	x	x	88	✓	x	x
96A	✓	x	✓	89	✓	x	x
93B	✓	✓	x	109	✓	x	x
93A	✓	✓	x	107	✓	x	x
104	✓	x	x	99	✓	✓	x
105	✓	x	x	95B	x	x	x
90	✓	✓	x	100	✓	✓	x
98	✓	x	x	103	✓	✓	✓
87	✓	✓	x	110	✓	✓	x
95A	✓	✓	x	97	✓	x	✓
79	✓	✓	x	52	✓	✓	✓
Victoria	✓	x	x	85	✓	✓	x
94	✓	x	x	84	✓	x	✓
Superchola	✓	✓	✓	98	✓	x	x
Capiro	✓	x	x	43	✓	x	x
Libertad	✓	✓	x	12	✓	✓	x

9. Conclusiones

- La identificación de los genes que confieren resistencia a *P. infestans* y *Globodera* mediante tecnología de selección asistida por marcadores moleculares, aumentaría la eficiencia del programa de mejoramiento genético de papa en INIAP. Este estudio está aun en fase final de ejecución.
- La presencia de genes de resistencia en la población segregante de papa permite la inclusión de otros marcadores moleculares relacionados con el gen R1 y el gen H1, que también confieren resistencia a estos fitopatógenos. En el estado actual de avance no es posible concluir cuál es el marcador más efectivo aun.

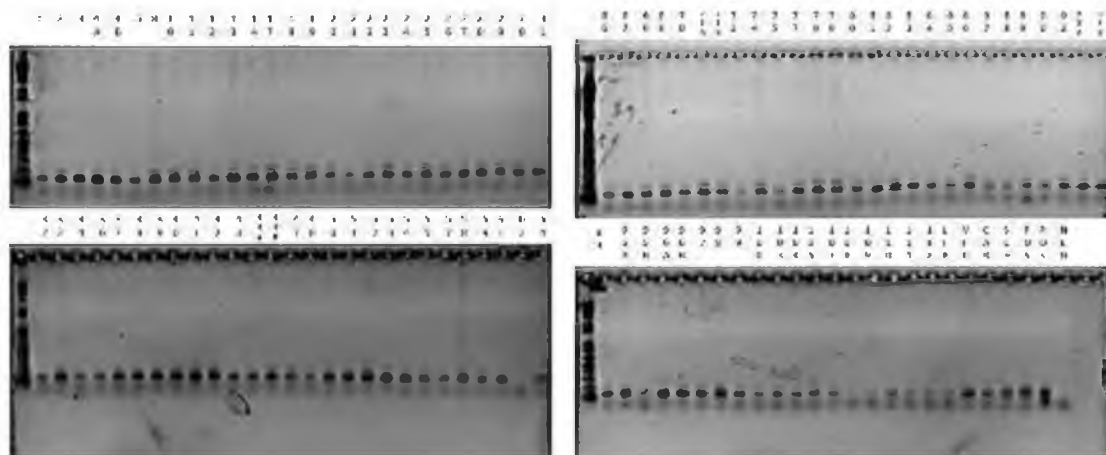
10. Bibliografía

- Alvarado, V. Y., Odokonyero, D., Duncan, O., Mirkov, T. E. y Scholthof, H. B. (2012). Molecular and Physiological Properties Associated with Zebra Complex Disease in Potatoes and Its Relation with Candidatus *Liberibacter* Contents in Psyllid Vectors. *PLoS ONE*, 7(5), e37345. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037345>
- Álvarez-Gil, M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(2), 154-171. Recuperado en 04 de diciembre de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362011000200006&lng=es&tng=es
- Anjum, N. A. (2015). Plant acclimation to environmental stress: a critical appraisal. *Frontiers in Plant Science*, 6, 445. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00445>.
- Ballvora, A., Shormack, S., Baker, B. J., Ganai, M., Bonas, U. y Lahaye, T. (2001). Chromosome location of the tomato *Bs4* locus. *Mol. Gen. Genet*, 266: 639-645.
- Botez, C., Pamfil, D., Taoutaou, A., Balazs, E. y Raica, P. (2009). Preliminary Results Concerning Marker Assisted Selection for Potato Resistance to *Phytophthora infestans*.
- Barone, A. (2004). Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Am. J. Potato Res.* 81, 111–117.
- Bryan, G., McLean, K., Bradshaw, J. De Jon, W., Phillips, M., Castelli, L. y Waugh, R. (2002). Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet*, 105: 68. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0873-9>
- Caromel B., Mugniéry, D., Lefebvre, V., Andrzejewski, S., Elliséche, D., Kerlan, M.C., Rousselle, P. y Rousselle-Bourgeois, F. (2003). Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *Solanum spigazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1517–1523.
- Collard, B.C.Y. y Mackill, D.J. (2008). Marker assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 557–572.
- Condori, B., Hijmans, R. J., Ledent, J. F. y Quiroz, R. (2014). Managing Potato Biodiversity to Cope with Frost Risk in the High Andes: A Modeling Perspective. *PLoS ONE*, 9(1), e81510. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0081510>
- Deagle, B. E., Eveson, J. P. y Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3, 11. <http://doi.org/10.1186/1742-9994-3-11>
- ESPAC. (2014). Encuesta De Superficie Y Producción Agropecuaria Continua. Estadísticas Agropecuarias y Ambientales. Estadísticas Agropecuarias – ESAG. Quito, Ecuador.
- Gebhardt, C., Bellin, D., Henselewski, H., Lehmann, W., Schwarzfischer, J. y Valkonen, J.P.T. (2006). Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112: 1458–1464.
- Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E. L., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A. y Grünwald, N. J. (2014). The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24), 8791–8796. <http://doi.org/10.1073/pnas.1401884111>
- Guerrero, A. (2016). Rendimientos de papa en el Ecuador primer ciclo 2016 (diciembre-junio). Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información. Coordinación General del Sistema de Información Nacional. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Quito, Ecuador.
- Huitema, E., Vleeshouwers, V. G. A. A., Francis, D. M. y Kamoun, S. (2003). Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 4: 487–500. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00195.x.
- Institute for Health and Consumer Protection. (2010). Report from the validation of a "CTAB/Microspin" Method for DNA extraction from Freeze-dried potato tubers. *Via Ferme*, 1: 21020.
- Jones, J. T., Furlanetto, C., Bakker, E., Banks, B., Blok, V., Chen, Q., Phillips, M. y Prior, A. (2003). Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Molecular Plant Pathology*, 4: 43–50. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00140.x

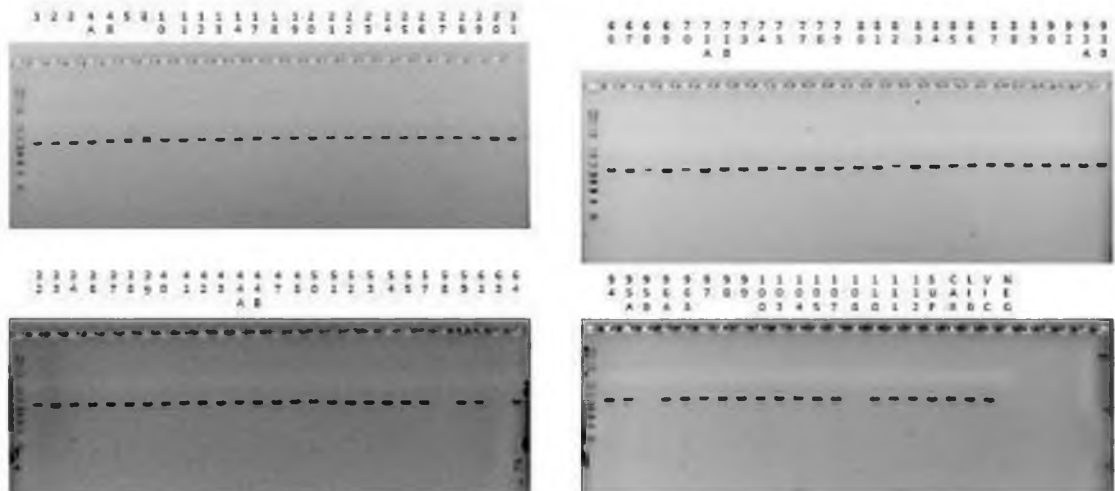
- Juyó, D., Gerena, H. y Mosquera, T. (2011). Evaluación de marcadores moleculares asociados con resistencia a goma (*Phytophthora infestans* L.) en papas diploides y tetraploides. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18 (2): 51-62.
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 295–300.
- Kruger, N.J. (1995). Errors and artifacts in coupled spectrophotometric assays of enzyme activity. *Phytochemistry* 38, 1065–1071.
- Loebenstein, G. y Gaba, V. (2012). Chapter 6 - Viruses of Potato. In *Advances in Virus Research*. Academic Press), pp. 209–246.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F. y Gebhardt, C. (1995). A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Molecular and General Genetics* 249: 74–81.
- Milczarek, D., Flis, B. y Przetakiewicz, A. (2011). Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.* 88: 245–255.
- Pumisacho, M. y Sherwood, S. (2002). El cultivo de papa en el Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). INIAP-CIP. Quito, Ecuador.
- Skantar, A. M., Handoo, Z. A., Carta, L. K. y Chitwood, D. J. (2007). Morphological and Molecular Identification of *Globodera pallida* Associated with Potato in Idaho. *Journal of Nematology*, 39(2), 133–144.
- Vitti, M., Dario, C., Sasaki, F., Fumi, M., Kluge, R. y Moretti, C. (2011). Activity of enzymes associated with the enzymatic browning of minimally processed potatoes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 983-990. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132011000500016>
- Watanabe, K. (2015). Potato genetics, genomics, and applications. *Breeding Science*, 65(1), 53–68. <http://doi.org/10.1270/jsbbs.65.53>
- Zoteyeva, N., Mepaka, I., Vilcāne, D., Nilsson, U., Skrabule, L. y Rostoks, N. (2014). Assessment of Genes R1 and R3 Conferring Resistance to Late Blight and of Gene R Ysto Conferring Resistance to Potato Virus Y in Two Wild Species Accessions and their Hybrid Progenies/ Izturības Pret Lakstu Puvīgāņu R1 Un R3 Un Izturības Pret Kartupeļu Vīrusu Y Ģēnā Rysto Novērtējums Divu Savvaļas Sugu Līnijās Un To Hibrīdos. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 68(3-4): 133-141.

11. Anexos

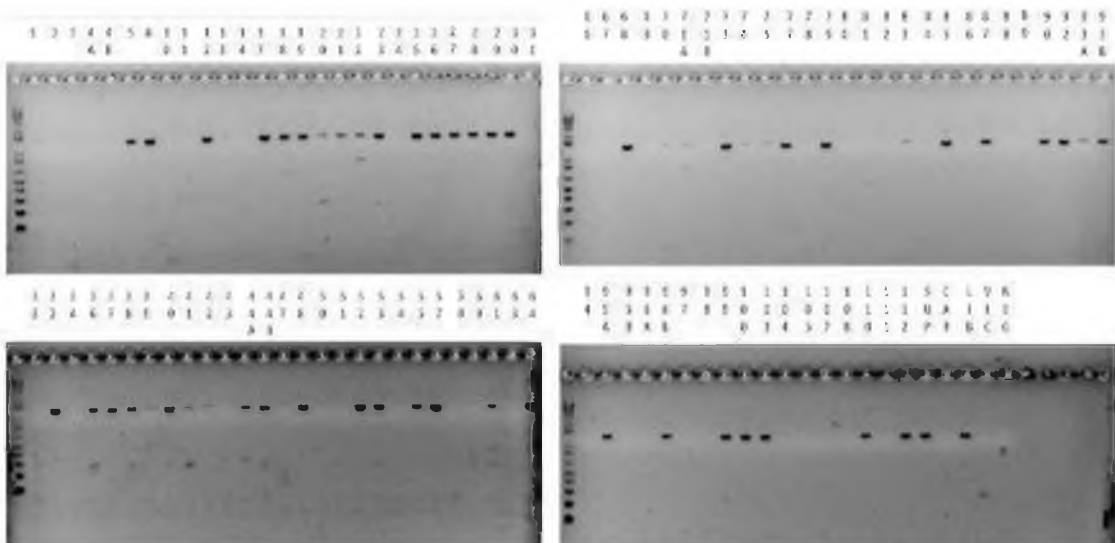
Anexo 1. Resultados de la amplificación por PCR empleando el marcador STG0033 para la validación de DNA de tubérculo de papa



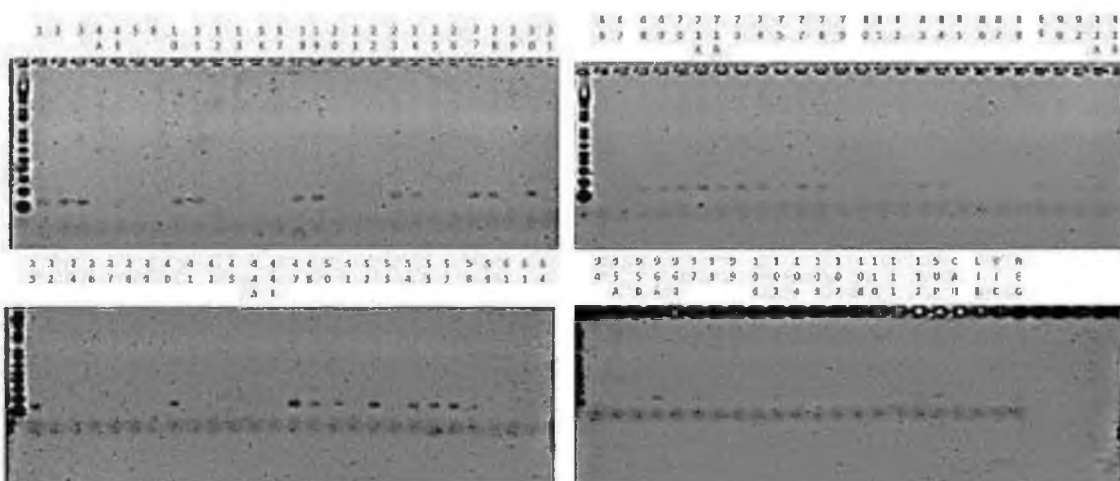
Anexo 2. Resultados de la amplificación por PCR empleando el marcador GP179



Anexo 3. Resultados de la amplificación por PCR empleando el marcador 76-2SF2/76-2SR.



Anexo 4. Resultados de la amplificación por PCR empleando el marcador TG698.



Actividad 5:**1. Título:**

Adaptación de *vitro* plantas de naranjilla (*S. quitoense*) a condiciones de invernadero

2. Autor:

Santiago Meneses y Georgina Vera

3. Resumen

La propagación *in vitro* plantas es una técnica exitosa para la reproducción clonal, sin embargo, la fase de adaptación a condiciones *ex vitro* puede llegar a ser crítica, ya que puede existir una pérdida significativa de este material. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta de las *vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a la adaptación a condiciones de invernadero. Se analizó el efecto de la fertilización con Nitrofosca® (10% N - 4% P₂O₅ - 7% K₂O) 5 ml/litro en los genotipos G4P8, G8P17 y *Solanum quitoense*. En todos los tratamientos el 100% de las plantas sobrevivieron, evidenciando el mejor resultado G4P8 sin fertilización.

4. Palabras clave

Adaptación, naranjilla, *in vitro*, genotipos, fertilización

5. Introducción

La naranjilla (*Solanum quitoense*) es una especie que presenta un elevado potencial para la producción con fines de exportación, debido al valor nutritivo de sus frutos; sin embargo, al ser una especie en estado de domesticación, la investigación es escasa y uno de los primeros retos es la generación de tecnologías que garanticen el rendimiento y calidad de sus frutos. La producción de *S. quitoense* presenta múltiples problemas de tipo sanitario, que reducen la capacidad productiva; así como, la vida útil del cultivo. Adicionalmente, el carácter alógamo y la amplia variabilidad de la especie dificulta la implementación de métodos tradicionales de fitomejoramiento (Criollo, 2013); por lo tanto, es necesario el empleo de herramientas biotecnológicas que permitan la propagación de especies élites que se encuentren libres de patógenos (Cano, 2013). La fase de aclimatación de *vitro* plantas propagadas a las condiciones de invernadero es muy crítica y el éxito o fracaso de todo el proceso depende de la misma, debido a que las *vitro* plantas experimentarán cambios fisiológicos y morfológicos que les permitirán adecuarse a las condiciones naturales (Díaz *et al.* 2004). Para lo cual se evaluó la respuesta de las *vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a la adaptación a condiciones de invernadero.

6. Objetivo

Evaluar la respuesta de las *vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a la adaptación a condiciones de invernadero.

7. Materiales y Métodos**7.1. Materiales.****Materiales de Laboratorio**

Tubos de ensayo con tapa
Gradillas
Probetas
Pipetas
Piseta
Bisturí

Equipos de laboratorio

Cámara de flujo laminar
Cuarto de crecimiento
Destilador de agua
Autoclaves
Estufa
pH metro

Pinzas	Refrigerador
Agitador magnético	Agitadores magnéticos
Lámpara de alcohol	Balanza de precisión
Fósforos	Microondas
Guantes y mascarillas	
Mandil	
Cinta rolopack	
Papel aluminio	
Vasos plásticos	

Reactivos

Medio Murashige y Skoog (M&S)
 Sucrosa
 TDZ
 Pantotenato de Calcio
 Carbón Activado
 Agua destilada
 Ácido clorhídrico
 Hidróxido de sodio
 Agar
 Tierra negra
 Humus
 Pomina
 Nitrofosca® (10% N - 4% P₂O₅ - 7% K₂O)

7.2. Métodos

Se realizó la fase de adaptación a condiciones de invernadero de las plantas resultantes del mejor tratamiento de la micropropagación que se muestra en la tabla 1, para lo cual se esterilizó la tierra negra enriquecida con humus más pomina, (Anexo 1), y se mezcló en una relación 3:1 respectivamente, posteriormente se llenó en vasos plásticos de 10 onzas y se humedeció. Se retiraron las *vitro* plantas de los tubos de ensayo, se lavaron las raíces con agua tibia para eliminar el agar, teniendo cuidado de no dañar las raicillas. Se colocaron las *vitro* plantas en los vasos realizando un orificio en el sustrato con la ayuda de un tubo de ensayo, se cubrió las raíces, se fertilizó con Nitrofosca® (10% N - 4% P₂O₅ - 7% K₂O) 5 ml/litro, (Anexo 2), y se tapó a las plantas con otro vaso plástico, para crear un microambiente idóneo. Se realizó monitoreos a los 5 y 15 días, observando el porcentaje de supervivencia de las plantas.

Tabla 1 Medio de cultivo para la multiplicación de Naranjilla. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Murashige y Skoog con vitaminas (MS)	4.4 g/litro
Sucrosa	30 g/litro
Thidiazuron(TDZ)	1mg/litro
Pantotenato de calcio	2 mg/litro
Carbón activado	0.5 g/l
Agar	7 g/l
pH	5.7

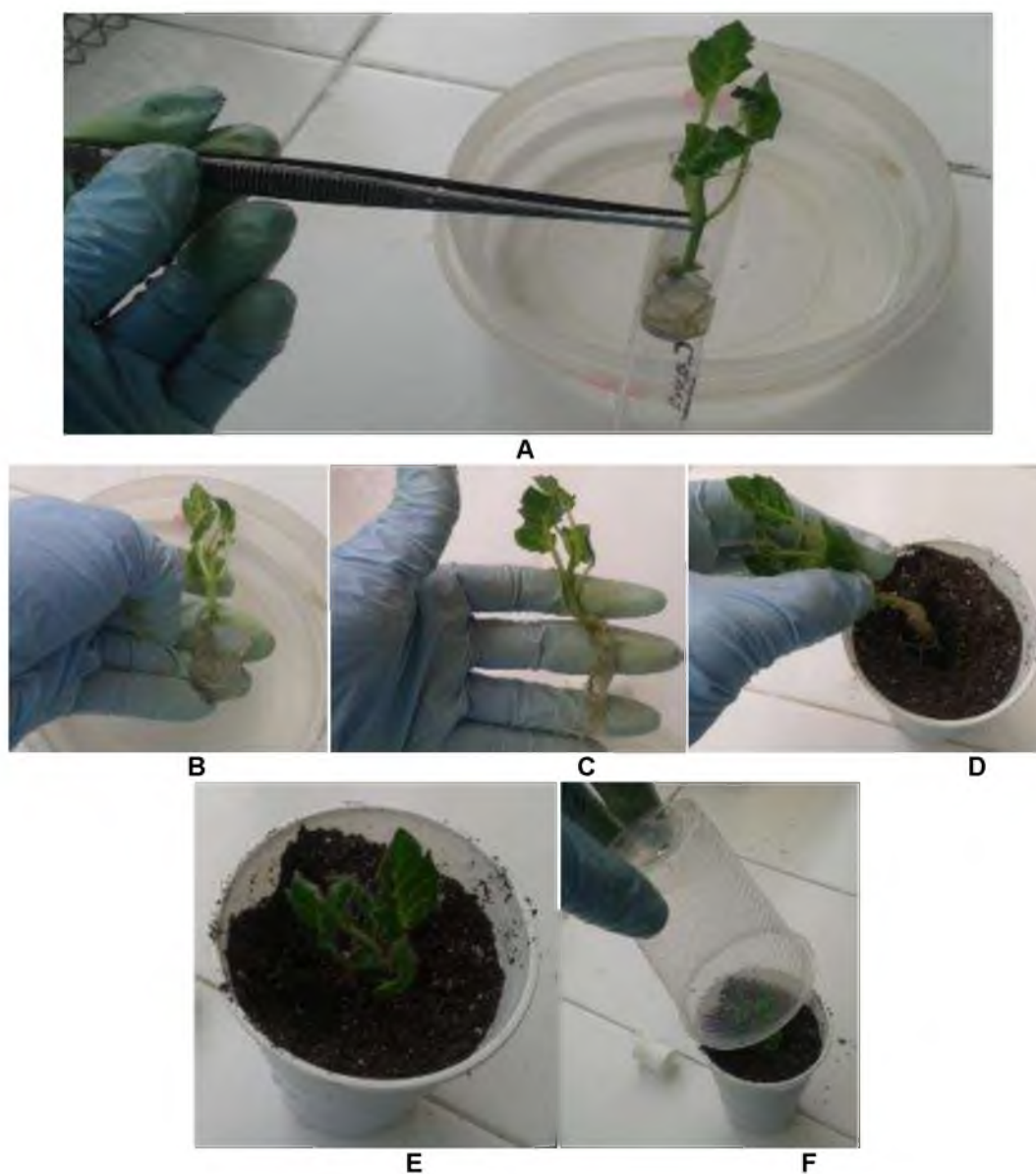


Figura 1. Metodología de adaptación de *in vitro* plantas de naranjilla a condiciones de invernadero. **A)** Planta *in vitro* de naranjilla retirada del tubo del ensayo. **B)** Lavado de raíces para retirar el agar. **C)** Raíces de limpias. **D, E)** Plantado en sustrato. **F)** Vaso plástico para crear microambiente. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

Factores de estudio:

Fertilización (F)

f1 = con fertilización (Nitrofosca® 10 - 4 - 7)

f2 = sin fertilización

Genotipos (G)

g1 = G4P8

g2 = G8P17

g3 = *Solanum quitoense*

Tratamientos

En la tabla 2 se muestran los tratamientos resultantes de la interacción de los factores de estudio para la adaptación *in vitro* de naranjilla.

Tabla 2 Tratamientos para la adaptación de *in vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a condiciones de invernadero. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

Orden	Símbolo	Código	Tratamiento
1	t1	f1g1	Con fertilización + G4P8
2	t2	f1g2	Con fertilización + G8P17
3	t3	f1g3	Con fertilización + <i>Solanum quitoense</i>
4	t4	f2g1	Sin fertilización + G4P8
5	t5	f2g2	Sin fertilización + G8P17
6	t6	f2g3	Sin fertilización + <i>Solanum quitoense</i>

Variables:

Porcentaje de sobrevivencia de plantas: Se registró el número de plantas vivas y muertas a los 15 días, realizando una relación porcentual.

Longitud de planta: Se registró la ganancia de longitud de las plantas midiéndolas al inicio de la adaptación y transcurridos 30 días posteriores. La longitud de las plantas se registró en milímetros a los 30 días, utilizando una regla graduada en milímetros. Se midió desde el inicio del tallo de la planta hasta el meristemo apical.

Unidad Experimental:

La unidad experimental estuvo conformada por una *in vitro* planta de naranjilla plantada en un vaso plástico que contenía un sustrato y tapada con un vaso plástico.

Diseño experimental y análisis funcional:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x3 con 10 observaciones por cada tratamiento. Se realizó la prueba de Tukey 5% para fertilización, genotipos y la interacción que presentaron diferencias estadísticas significativas.

Esquema análisis de varianza:

El esquema del análisis de varianza para la adaptación de *in vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a condiciones de invernadero se presenta en la tabla 3.

Tabla 3 ADEVA para la adaptación de *in vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*) a condiciones de invernadero. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

F de V	GL
TOTAL	59
TRATAMIENTOS	5
Fertilización (F)	1
Genotipo (G)	2
F x G	2
ERROR EXPERIMENTAL	54
CV	
PROMEDIO	

8. Resultados y Discusión:

En el ADEVA para la variable longitud de brote, Tabla 4, se observa diferencias significativas para Fertilización y Genotipos. Además, se observa diferencias significativas para la interacción

FxG. El promedio general fue de 3.45 mm y el coeficiente de variación fue de 48.07 % que para este tipo de investigación se considera bueno.

Tabla 4 ADEVA para la variable Longitud de planta evaluada en la adaptación de *vitro* plantas de Naranjilla (*Solanum quitoense*). INIAP. Cutuglahua, Pichincha. 2017.

F de V	GL	CUADRADOS MEDIOS
TOTAL	59	-
TRATAMIENTOS	5	40.07
Fertilización (F)	1	109.35*
Genotipo (G)	2	25.55*
F x G	2	19.95*
ERROR EXPERIMENTAL	54	2.75
CV		48.07 %
PROMEDIO		3.45 mm

Para la variable porcentaje de sobrevivencia, Tabla 5, se observa que transcurridos 15 días la sobrevivencia de plantas en todos los tratamientos es del 100%, figura 2 y 3. Este resultado indica que la estrategia establecida generó las condiciones microambientales idóneas, para lo cual, Díaz *et al.*, (2004) mencionan que la aplicación de la técnica de adaptación al pasar de condiciones *in vitro* a *ex vitro* es importante para que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y con sustratos sépticos, así mismo, Echenique *et al.*, (2010) dicen que durante la etapa de adaptación se deberá contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de las plantas.

Para el factor Fertilización, Tabla 5, se observa que f2 (sin fertilización) alcanza el mejor resultado para la ganancia de la longitud de planta con 4.80 mm, figura 4 y 5. Este resultado puede deberse a que el sustrato (Tierra negra con humus + pomina) contenía los suficientes nutrientes para el desarrollo de las plantas y que la adición de fertilizante constituyó en una cantidad excesiva de nutrimentos, consecuencia de ello, el crecimiento de la planta se desaceleró. Según Rojas (2015) dice que las propiedades más relevantes de la tierra negra son: la retención de humedad, textura franco arcilloso, reserva de bases intercambiables, capacidad de suministro de nitrógeno, azufre y otros elementos nutritivos a las plantas, aireación, estabilidad estructural y depende marcadamente de aportaciones de materia orgánica. Además, Moreta (2014) menciona que el humus de lombriz es un abono orgánico natural que mejora la porosidad y la retención de humedad, aumenta la colonia bacteriana, posee un alto contenido de macro y oligoelementos ofreciendo una alimentación equilibrada para las plantas. En su composición están presentes todos los nutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, manganeso, hierro, cobre, cinc, carbono en cantidad suficiente para garantizar el perfecto desarrollo de las plantas (Bioagrotecsa 2011). Según Revelo *et al.*, en el 2010 mencionan que la materia orgánica del suelo influye en las características físicas del mismo mejorando su estructura y porosidad, obteniéndose un balance apropiado entre la fase sólida, líquida y gaseosa, para el buen desarrollo del cultivo. También mejora las características químicas del suelo poniendo a disposición de las plantas los macro y micro nutrientes. A su vez, Moreno *et al.*, (2011) indican que la adición en exceso de abonos o fertilizantes sintéticos pueden ocasionarse daños en los cultivos.

Para el factor de estudio Genotipo, Tabla 5, se observa que g1 (G4P8) obtiene la mejor respuesta para la ganancia de la longitud de planta con 4.75 mm. Estos resultados revelan la variación que existe entre el material genético; al respecto, Pérez *et al.* (1999) afirman que no todos los cultivares responden igual al crecimiento, ni todos los genotipos dentro de una mismo cultivar se comportan igual.

Tabla 5 Promedios y pruebas de significación para las variables en estudio a los 40 días en la multiplicación *in vitro* de naranjilla (*S. quitoense*)

FACTORES	CÓDIGO	SOBREVIVENCIA DE PLANTAS 15 días (%)	LONGITUD DE PLANTAS 30 días (mm)
Fertilización (F)	f1 (con fertilización)	100	2.10 b
	f2 (sin fertilización)	100	4.80 a
Genotipos (G)	g1 (G4P8)	100	4.75 a
	g2 (G8P17)	100	2.90 b
	g3 (<i>Solanum quitoense</i>)	100	2.70 b
F x G	f1g1	100	2.30 bc
	f1g2	100	2.40 bc
	f1g3	100	1.60 c
	f2g1	100	7.20 a
	f2g2	100	3.40 bc
	f2g3	100	3.80 b

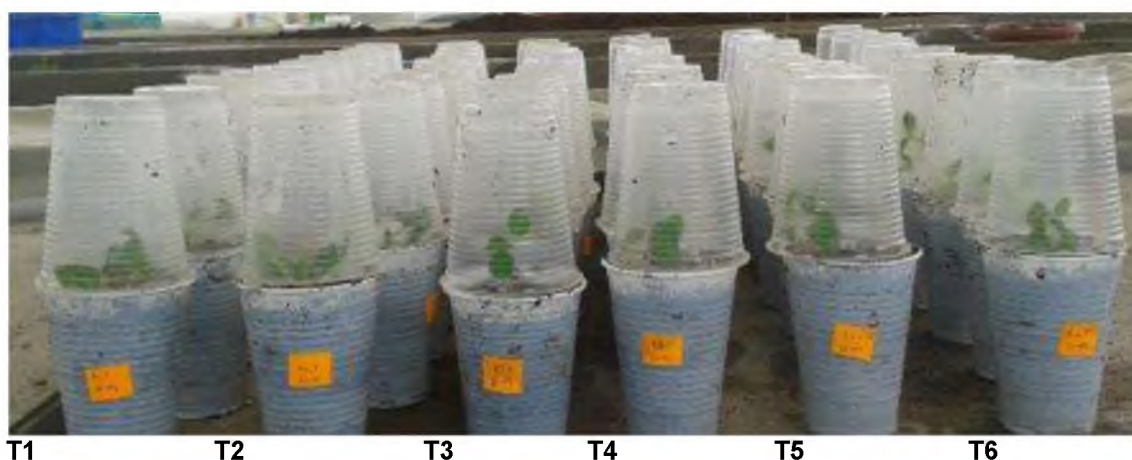


Figura 2. Ensayo día 1: **T1)** Con fertilización + G4P8. **T2)** Con fertilización + G8P17. **T3)** Con fertilización + *Solanum quitoense* **T4)** Sin fertilización + G4P8. **T5)** Sin fertilización + G8P17. **T6)** Sin fertilización + *Solanum quitoense*. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

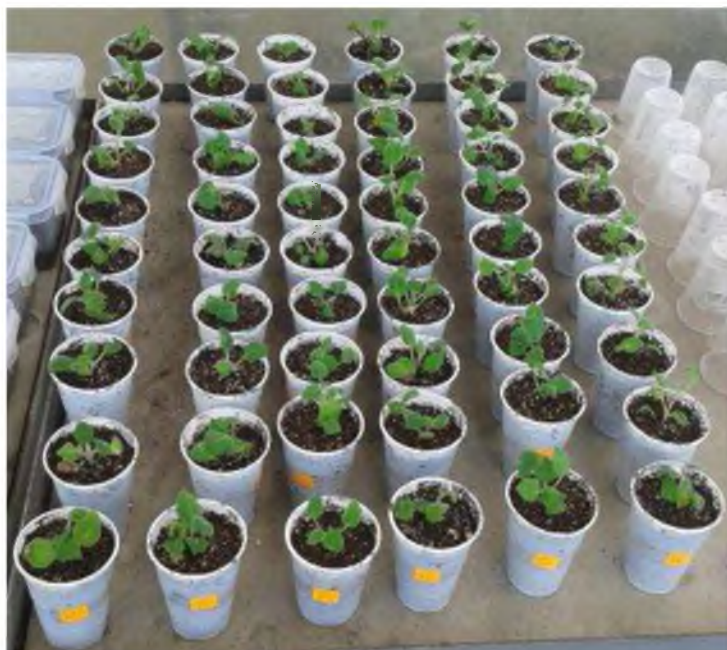


Figura 3. Ensayo día 15: Supervivencia de plantas. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.



Figura 4. Ensayo día 30: **T1)** Con fertilización + G4P8. **T2)** Con fertilización + G8P17. **T3)** Con fertilización + *Solanum quitoense* **T4)** Sin fertilización + G4P8. **T5)** Sin fertilización + G8P17. **T6)** Sin fertilización + *Solanum quitoense*. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

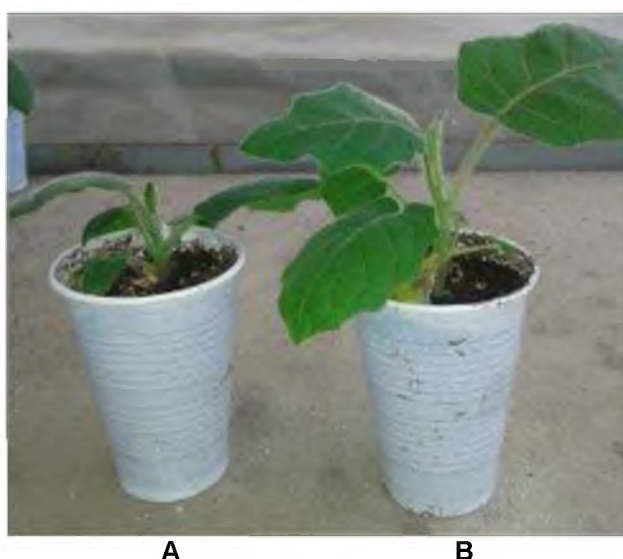


Figura 5. Ensayo día 30: **A)** Con fertilización **B)** Sin fertilización. INIAP, Cutuglagua, Pichincha. 2017.

9. Conclusión

Las *in vitro* plantas de naranjilla se pueden adaptar a las condiciones de invernadero con la utilización de un sustrato de tierra negra con humus más pomina en una relación 3:1 respectivamente, sin la necesidad de la adición de fertilizante de iniciación, tomando en cuenta las condiciones ambientales (luz, temperatura y humedad relativa) necesarias para su desarrollo.

10. Bibliografía

- Cano M. (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés. Tesis de doctorado. Instituto Iberoamericano de la biodiversidad. Universidad de Alicante. 191 p.
- Criollo H. (2013). Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a través de la embriogénesis somática. Tesis de doctorado. Facultad de agronomía. Universidad Nacional de Colombia. 129 p.
- Bioagrotecsa. (2011). Humus de lombriz. Lombricultura en Ecuador. Consultado: 1 de junio del 2017 Disponible en: <http://www.bioagrotecsa.com.ec/lombricultura/humus-de-lombriz.html>
- Díaz, L., Medina, L., Latife, J., Digonzelli, P. y Sosa S. (2004). Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. INTA. Argentina p. 115-128
- Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina) p. 22-24
- Gómez, F., Trejo, L. y Ladewig, P. (2014). Índices de crecimiento de plántulas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en sustratos orgánicos. Revista Mexicana de ciencias agrícolas. 9: 1787-1793.
- Moreta, R. (2014). Evaluación de tres sustratos y cuatro dosis de humus para la producción de primula (*Primula acaulis*), bajo invernadero. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 70 p.
- Moreno, R., García, T., Storch, J., Yanes, E., Muñoz, M. y Pérez E. (2011). Fertilización y corrección edáfica de suelos agrícolas con productos orgánicos. Revista Tecnología y Desarrollo. 9 v.34 p.
- Pérez, N., De Feria, M., Jiménez, E., Capote, A., Chávez, M. y Quiala, E. (1999). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*L.) en Sistemas de Inmersión Temporal y estudio de su comportamiento en campo. Biotecnología Vegetal. 3: 149 – 154
- Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Valverde, F., León, J. y Gallegos, P. (2010). Manual del cultivo ecológico de la naranjilla. Manual técnico No. 77. INIAP. Ecuador. 120 p.

Rojas, V. 2015. Evaluación de cuatro sustratos en la producción de semilla prebásica de papa (*Solanum tuberosum*) en dos variedades. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 79 p.

11. Anexos

Anexo 1. Propiedades químicas y físicas de los sustratos

VARIABLE	POMINA	TIERRA NEGRA	HUMUS
Capacidad de intercambio catiónico	-	-	>40 cmol/kg
Nitrógeno (%)	-	-	1,0 - 1,5
Fosforo (%)	-	-	2,4 - 3,1
Potasio (%)	-	-	2,6 - 3,2
Calcio (%)	-	-	7,0 - 8,0
Magnesio (%)	-	-	1,5 - 2,0
Azufre (%)	-	-	0,1 - 0,5
Cenizas (%)	-	-	-
Silicio (SiO ₂) (%)	-	-	-
Hierro (ppm)	-	-	-
Manganeso (ppm)	-	-	-
Cobre (ppm)	170 - 280	-	-
Zinc (ppm)	190 - 250	-	-
Boro (ppm)	-	-	-
Tamaño de grano (mm)	-	-	-
Densidad aparente (Kg.m ⁻³)	-	-	0,40 - 0,90
Porosidad total (% volumen)	-	-	-
Capacidad de aire (% volumen)	-	-	-
Agua fácilmente disponible (% volumen)	-	-	-
Agua de reserva (% volumen)	-	-	-
Agua difícilmente disponible (% volumen)	-	-	-
Capilaridad	-	-	-

Fuente: (Calderón & Cevallos, 2010-Modificado: Rojas, 2015)

Anexo 2. Propiedades químicas y físicas del fertilizante

VARIABLE	NITROFOSCA® Foliar
Nitrógeno (%)	10
Fósforo (%)	4
Potasio (%)	7
Magnesio (%)	0.2
Azufre (%)	0.8
Manganeso (ppm)	17
Hierro (ppm)	140
Cobre (ppm)	25
Zinc (ppm)	5
Boro (ppm)	22
Molibdeno (ppm)	3
Solución acuosa homogenizada. Contiene trazas de fitohormonas.	

Fuente: (Etiqueta del producto NITROFOSCA® Foliar, 2017)

Actividad 6:

1. Título:

Optimización del establecimiento *in vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) a partir de tres tipos de explantes

2. Autores

Santiago Meneses, Fernanda Dueñas, Lisbeth Recto y Eduardo Morillo

3. Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es un frutal andino de creciente demanda por su agradable sabor, propiedades antioxidantes y valor nutritivo, pero que no posee de un sistema de propagación masivo eficiente para responder a la creciente demanda. Este trabajo tuvo como objetivo optimizar y establecer material vegetal *in vitro* de mortiño a partir de diferentes tipos de explantes. Para la germinación *in vitro* de semillas de mortiño se estudió el efecto de los medios de cultivo WPM y MS, fotoperiodos de 16 y 24 horas luz y temperatura de 18°C y 28°C. En tanto que, para el establecimiento de brotes se analizó el efecto de la desinfección previa, la utilización de alcohol 70% y tiempos de exposición al hipoclorito de sodio al 2% de 10, 20 y 30 minutos y se probó la exposición de hipoclorito de sodio por 15 minutos con la adición de 200 mg/litro de ácido cítrico y 200 mg/litro de ácido ascórbico a los procesos de desinfección previa y 1 g de carbón activado al medio de cultivo. La inducción de callos a partir de tejido foliar utilizó medios de cultivo WPM y MS, concentraciones de 3 mg/l, 2 mg/l y 1.5 mg/l de TDZ, 6 mg/l y 4 mg/l de 2iP, 6 mg/l y 4 mg/l de Zeatina. El porcentaje de semillas germinadas que mejor resultado obtuvo después de 80 días fue del 61% que se obtuvo al someterlas a MS + 24 horas luz + 18°C. El establecimiento de brotes, con desinfección previa, alcohol 70% e hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos obtuvo los mejores promedios alcanzando 10% de contaminación, 35% de oxidación y 2.05 mm de longitud de brote a los 35 días. No se obtuvo resultados para la inducción de callos utilizando hojas procedentes de plantas de campo, sin embargo, existió callogénesis utilizando hojas procedentes de *in vitro* plantas.

3. Palabras clave

mortiño, establecimiento, *in vitro*, semillas, brotes

5. Introducción

El mortiño es una planta leñosa endémica de los páramos del Ecuador, perteneciente a la familia Ericaceae del género *Vaccinium* (Muñoz, 2004). Se caracteriza por ser ramificada y puede alcanzar a medir 2,5 m de altura, sus hojas son generalmente muy pequeñas llegando a medir alrededor de 1 cm, sus flores miden menos de 1 cm, su fruto es una baya esférica que tiene un tamaño aproximado de 5 a 8 mm de diámetro y su color es azul o azul oscuro (Coba *et al.*, 2012). El género *Vaccinium* tiene alrededor de 4500 especies alrededor del mundo y alrededor de 900 en América Tropical (Smith *et al.*, 2004; Asturizaga *et al.*, 2006). En Ecuador se encuentra con mayor frecuencia a *Vaccinium floribundum* y se la conoce como mortiño, uva de los Andes, manzanilla del cerro o uva de monte. Esta especie crece de forma silvestre entre los 1600 y 3850 msnm (Coba *et al.*, 2012; Gutiérrez y Camacho, 2011), en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Cañar, Azuay y Loja. Las épocas de producción van desde septiembre hasta noviembre y generalmente la recolección es realizada por las comunidades aledañas a estos sectores (Noboa, 2010).

Los frutos del mortiño tienen contenidos importantes de azúcares, vitaminas del complejo B y C, antioxidantes y minerales como potasio, fósforo y calcio (Morales, 2011). Por sus propiedades físicas químicas presenta la ventaja al ser refrigerado, dado de que no se alteran sus características organolépticas y nutricionales, sin variar el peso y volumen de la baya. Por estas razones el mortiño tiene un gran potencial para la industria alimentaria con la posibilidad de generar productos como: jugos, mermeladas, jaleas, frutos deshidratados, coladas,

ingredientes para pastelería y vino (Coba *et al.*, 2012). La reproducción de *Vaccinium floribundum* Kunth presenta varias dificultades que no permiten la existencia de cultivos tecnificados de mortiño en Ecuador debido a la baja viabilidad de las semillas y a que la reproducción asexual es deficiente. Estudios previos confirman la dificultad para reproducirlos por métodos sexuales y asexuales debido a que es una especie silvestre que aún no se ha podido domesticar y generar una tecnología eficiente para establecer cultivos comerciales que satisfagan la demanda interna (González, 2002); (Muñoz, 2004; Noboa, 2010; Trujillo *et al.*, 2010, Gutiérrez, 2011 y Coba *et al.*, 2012). El uso de métodos biotecnológicos de cultivo de tejidos es una alternativa que permita mejorar las técnicas de propagación.

6. Objetivos

Objetivo General

Optimizar y establecer material vegetal *in vitro* de mortiño a partir de diferentes tipos de explantes.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de mortiño.
2. Validar y optimizar un protocolo para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de brotes vegetativos de plantas de mortiño.
3. Evaluar la respuesta a la inducción de callos en mortiño a partir de explantes foliares.

7. Materiales y métodos

7.1. Materiales

Materiales de Laboratorio

Frascos de vidrio 200 ml, 100 ml
 Tubos de ensayo con tapa
 Gradillas
 Erlenmeyers 500ml, 1000 ml
 Cajas Petri
 Probetas
 Pipetas
 Bisturís
 Pinzas
 Agitador magnético
 Lámpara de alcohol
 Fósforos
 Guantes y mascarillas
 Mandil
 Papel servilleta
 Cinta rolopack
 Papel aluminio

Equipos de laboratorio

Cámara de flujo laminar
 Cámara de termoterapia
 Estéreo microscopio
 Cuarto de crecimiento
 Destilador de agua
 Autoclaves
 Estufa
 Agitadores orbitales
 pH metro
 Refrigerador
 Agitadores magnéticos
 Balanza de precisión
 Microondas

Reactivos:

Medio Murashige y Skoog (M&S)
 WoodyPlant Medium (WPM)
 Sucrosa
 Sacarosa
 Zeatina

2ip
 TDZ
 Agua destilada
 Ácido clorhídrico
 Hidróxido de sodio
 Agar
 Alcohol
 Hipoclorito de Sodio
 Tween 20

7.2. Métodos

7.2.1. Ubicación del sitio experimental:

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP ubicado en:

- Provincia:	Pichincha
- Cantón:	Mejía
- Parroquia:	Cutuglagua.
- Altitud:	3058 m.s.n.m.
- Latitud:	00° 22' 08" S
- Longitud:	78° 33' 24" O
- Temperatura promedio anual	11.3 °C
- Precipitación promedio anual	1140.6 mm
- Humedad relativa	84.3%

Las características del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales:

- Temperatura promedio	20 °C ± 2
- Humedad relativa	50%
- Fotoperíodo	16 horas luz
- Intensidad luminosa	10000 lux

7.2.2. Toma de explantes:

La toma de material vegetal (frutos y plantas) se realizó en las faldas del volcán Atacazo ubicado en:

- Provincia	Pichincha
- Cantón	Mejía
- Parroquia	Cutuglagua
- Altitud	3636 m.s.n.m.
- Latitud	00° 22' 18" S
- Longitud	78° 35' 50" O

De los frutos se extrajeron las semillas, presionándolas sobre un tamiz y separándolas de su pulpa con abundante agua, las mismas fueron secadas a la sombra por dos días y almacenadas en frascos de vidrio a temperatura ambiente. Las plantas se establecieron en los jardines del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, para lo cual se plantaron en orificios de 80 x 80 x 80 centímetros de largo, ancho y profundidad respectivamente, colocando la planta con pan de tierra y adicionando humus. Cabe indicar que se solicitó la regularización ante el MAE para la presente investigación.

7.2.3. Establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño: De las semillas almacenadas se realizó una selección con la ayuda de un estéreo microscopio para homogenizar el material,

escogiendo semillas que no estén huecas ni deformadas. Posteriormente se realizó la desinfección de acuerdo con el protocolo propuesto por Trujillo *et al.*, (2010) que consiste en la desinfección con alcohol al 70 % por tres minutos, enjuague con agua destilada estéril por una ocasión, desinfección con hipoclorito de sodio al 2.5% más Tween 20 por 10 minutos y el enjuague con agua destilada estéril por cinco ocasiones. Luego en una cámara de flujo laminar, las semillas desinfectadas se colocaron en cajas Petri con los medios de cultivo en estudio, anexo 1 y se las colocó en los cuartos de crecimiento bajo las condiciones de fotoperiodo y temperatura.

Factores en estudio:

Medios de cultivo (2)

m1 = Medio Murashige y Skoog (M&S) (Torres *et al.*, 2010)

m2 = Woody Plant Medium (WPM) (Torres *et al.*, 2010)

Fotoperiodos (2)

f1 = 16 horas luz (Castro, 2012)

f2 = 24 horas luz (Castro, 2012)

Temperatura (2)

t1 = 18°C (Castro, 2012)

t2 = 28°C (Castro, 2012)

Tratamientos:

Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de los tres factores en estudio para el establecimiento de semillas de mortiño en condiciones *in vitro* que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos para el establecimiento de semillas de mortiño en condiciones *in vitro*. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

Tratamiento	Código	Descripción
t1	m1f1t1	Murashige and Skoog + 16 horas luz + 18°C
t2	m1f1t2	Murashige and Skoog + 16 horas luz + 28°C
t3	m1f2t1	Murashige and Skoog + 24 horas luz + 18°C
t4	m1f2t2	Murashige and Skoog + 24 horas luz + 28°C
t5	m2f1t1	Woody Plant Medium + 16 horas luz + 18°C
t6	m2f1t2	Woody Plant Medium + 16 horas luz + 28°C
t7	m2f2t1	Woody Plant Medium + 24 horas luz + 18°C
t8	m2f2t2	Woody Plant Medium + 24 horas luz + 28°C

Variables:

Porcentaje de germinación (%): Se determinó el porcentaje de germinación de las semillas realizando la relación porcentual del número de semillas germinadas versus las no germinadas.

Se evaluó cada 20 días hasta el final de la germinación.

Inicio de la germinación (días): Se determinó el inicio de la germinación de las semillas revisando periódicamente cuando comenzó el desarrollo del embrión de las primeras semillas.

Final de la germinación (días): Se determinó el final de la germinación de las semillas revisando periódicamente cuando terminó el desarrollo del embrión de las últimas semillas.

Unidad Experimental:

La unidad experimental estuvo conformada por 20 semillas en una caja Petri con 20 ml de medio de cultivo en estudio.

Diseño experimental y análisis funcional:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2x2 con 5 observaciones por cada tratamiento. Se realizó la prueba de LSD 5% para medios de cultivo, fotoperiodo, temperatura y las interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas.

Esquema análisis de varianza:

El esquema del análisis de varianza para el establecimiento de semillas de mortiño en condiciones *in vitro* se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. ADEVA para el establecimiento de semillas de mortiño en condiciones *in vitro*. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.

F de V	GL
TOTAL	39
TRATAMIENTOS	7
Medios de cultivo (M)	1
Fotoperiodo (F)	1
MxF	1
Temperatura (T)	1
MxT	1
FxT	1
MxFxT	1
ERROR EXPERIMENTAL	32
CV	
PROMEDIO	

7.2.4 Establecimiento *in vitro* de brotes.

A las plantas colectadas y establecidas en los jardines del DNB, se les realizó los controles fitosanitarios cada 15 días con un fungicida-bactericida de contacto y de amplio espectro (KOSIDE® ingrediente activo hidróxido de cobre) a una dosis de 20 g/litro. Posteriormente las ramas con brotes fueron llevados al laboratorio para someterse a los tratamientos de

desinfección en estudio, anexo 2. Luego en una cámara de flujo laminar se secaron las ramas con brotes y se cortaron en explantes de 18 mm y con 2 brotes aproximadamente y se colocaron en un medio basal WPM. Los explantes se mantuvieron a 18 °C, una humedad relativa del 40 % con un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

Primer ensayo.

Factores de estudio:

Desinfección previa (2)

p1 = Con desinfección previa

p2= Sin desinfección previa

Alcohol (2)

a1 = Con alcohol 70% por 1 minuto

a2 = Sin alcohol

Tiempo de exposición de hipoclorito de sodio al 2% (3)

e1 = Hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos

e2 = Hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos

e3 = Hipoclorito de sodio al 2% por 30 minutos

Tratamientos:

Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de los tres factores en estudio para el establecimiento de brotes de mortíño en condiciones *in vitro* que se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos (T) para el establecimiento *in vitro* de brotes. INIAP. Cutuglagua, Pichincha. 2017.

T	Código	Descripción
t1	p1a1e1	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO ₂ 2% por 10 minutos
t2	p1a1e2	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos
t3	p1a1e3	Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO ₂ 2% por 30 minutos
t4	p1a2e1	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 10 minutos
t5	p1a2e2	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 20 minutos
t6	p1a2e3	Con desinfección previa sin alcohol + NaClO ₂ 2% por 30 minutos
t7	p2a1e1	Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 10 minutos
t8	p2a1e2	Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 20 minutos
t9	p2a1e3	Sin desinfección previa + alcohol 70% por un minuto + NaClO 2% por 30 minutos
t10	p2a2e1	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 10 minutos
t11	p2a2e2	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 20 minutos
t12	p2a2e3	Sin desinfección previa sin alcohol + NaClO 2% por 30 minutos

Variables:

Porcentaje de contaminación: Se registró el porcentaje de contaminación mediante la confirmación de la presencia de hongos y bacterias; se evaluó a los 8 días.

Porcentaje de oxidación: Se registró el porcentaje de oxidación mediante la observación de la presencia de síntomas de fenolización de los expantes; se evaluó a los 20 días.

Brotos viables (número de brotes viables): El número de brotes viables se visualizó a los 30 días, esta evaluación se realizó observando la viabilidad del explante.

Unidad Experimental:

La unidad experimental estuvo conformada por un tubo de ensayo con 5 ml de medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) con un explante de 18 mm con dos brotes aproximadamente.

Diseño Experimental y Análisis Funcional:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2x3 con 10 observaciones por cada tratamiento. Se realizó la prueba de LSD 5% para desinfección previa, alcohol, tiempo de exposición de hipoclorito de sodio y las interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas.

Esquema análisis de varianza:

El esquema del análisis de varianza para el establecimiento de brotes de mortiño a condiciones *in vitro* se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. ADEVA para el ensayo del establecimiento *in vitro* de brotes. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

F de V	GL
TOTAL	119
TRATAMIENTO	11
Desinfección previa (P)	1
Alcohol (A)	1
PxA	1
Tiempo de exposición de hipoclorito de sodio (H)	2
PxH	2
AxH	2
PxAxH	2
Error Experimental	108
CV	
PROMEDIO	

Segundo ensayo

Factores de estudio:

Desinfección previa (2)

d1 = Desinfección previa sin antioxidantes

d2= Desinfección previa con antioxidantes

Tipo de explante (2)

e1 = joven
e2 = maduro

Tratamientos:

Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de los dos factores en estudio para el segundo ensayo del establecimiento de brotes de mortiño en condiciones *in vitro* que se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Tratamientos (T) para el segundo ensayo del establecimiento *in vitro* de brotes. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

T	Código	Descripción
t1	d1e1	Desinfección previa sin antioxidantes + explante joven
t2	d1e2	Desinfección previa sin antioxidantes + explante maduro
t3	d2e1	Desinfección previa con antioxidantes + explante joven
t4	d2e2	Desinfección previa con antioxidantes + explante maduro

Variables:

Porcentaje de contaminación: Se registró el porcentaje de contaminación mediante la confirmación de la presencia de hongos y bacterias; se evaluó a los 35 días.

Porcentaje de oxidación: Se registró el porcentaje de oxidación mediante la observación de la presencia de síntomas de fenolización de los explantes; se evaluó a los 35 días.

Longitud de brote: se registró la longitud de brote a los 35 días midiendo su distancia desde la base del brote hasta su parte apical. La longitud se registró en milímetros con ayuda de una regla graduada.

Unidad Experimental:

La unidad experimental estuvo conformada por cinco tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo Woody Plant Medium más 1 g/litro de carbón activado, anexo 4, con un explante por tubo de 20 mm con dos brotes aproximadamente.

Diseño Experimental y Análisis Funcional:

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x2 con 5 observaciones por cada tratamiento. Se realizó la prueba de LSD 5% para desinfección previa, tipo de explante y las interacciones que presentaron diferencias estadísticas significativas.

Esquema análisis de varianza:

El esquema del análisis de varianza para el segundo ensayo del establecimiento de brotes de mortiño a condiciones *in vitro* se presenta en la tabla 6.

Tabla 6. ADEVA para el segundo ensayo del establecimiento *in vitro* de brotes. INIAP. Cutuglagua Pichincha. 2017.

F de V	GL
TOTAL	19
TRATAMIENTO	3
Desinfección previa (P)	1
Tipo de Explante (E)	1
PxE	1
Error Experimental	16
CV	
PROMEDIO	

7.2.5 Inducción de callos a partir de tejido foliar: Las hojas colectadas se llevaron al laboratorio para ser lavadas y desinfectadas, (Anexo 5). Luego en una cámara de flujo laminar se cortaron los bordes hasta dejar un cuadrado pequeño de aproximadamente 9 mm² que se colocó en cajas Petri que contuvieron los diferentes medios de cultivo con las hormonas en estudio, (Anexo 6). Después se evaluó la formación y tipo de callo.

Factores de estudio:

Medio de cultivo (2)

m1 = Medio Murashige y Skoog (M&S)

m2 = Woody Plant Medium (WPM)

Hormonas (3)

h1 = Thidiazuron(TDZ).

h2 = N⁶2 isopentenil- adenine (2iP)

h3 = Zeatina

Dosis (2)

d1 = Alta (TDZ= 3ppm, 2iP= 6ppm, Zeatina= 6ppm)

d2 =Baja (TDZ= 1,5ppm, 2iP= 4ppm, Zeatina= 4ppm)

Variables:

Formación de callo: Se determinó la formación de callos en el tejido foliar mediante observación cada 10 días.

Tipo de callo: Se determinó el tipo de callo, clasificándolos por las estructuras morfogénicas que se presentaron, siendo estas: callo embriogénico, callo organogénico, callo mixto (embriogénico y organogénico) y no morfogénicos o sin formación de callo.

Tratamientos:

Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de los tres factores en estudio para la inducción de callos a partir de tejido foliar, que se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos (T) para la inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua.Pichincha. 2017

T	Código	Descripción
t1	m1h1d1	MS + TDZ + Dosis Alta (3 mg/litro)
t2	m1h2d1	MS + 2iP + Dosis Alta (6 mg/litro)
t3	m1h3d1	MS + Zeatina + Dosis Alta (6 mg/litro)
t4	m1h1d2	MS + TDZ + Dosis Baja (1,5 mg/litro)
t5	m1h2d2	MS + 2iP + Dosis Baja (4 mg/litro)
t6	m1h3d2	MS + Zeatina + Dosis Baja (4 mg/litro)
t7	m2h1d1	WPM + TDZ + Dosis Alta (3 mg/litro)
t8	m2h2d1	WPM + 2iP + Dosis Alta (6 mg/litro)
t9	m2h3d1	WPM + Zeatina + Dosis Alta (6 mg/litro)
t10	m2h1d2	WPM + TDZ + Dosis Baja (1,5 mg/litro)
t11	m2h2d2	WPM + 2iP + Dosis Baja (4 mg/litro)
t12	m2h3d2	WPM + Zeatina + Dosis Baja (4 mg/litro)

Unidad Experimental: La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri con cinco explantes, en 20 ml de medio de cultivo en estudio.

Diseño experimental y análisis funcional: Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial 2x4x2 con 10 observaciones por cada tratamiento.

Esquema análisis de varianza: El esquema del análisis de varianza para la inducción de callos a partir de tejido foliar se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. ADEVA para el ensayo de la inducción de callos a partir de tejido foliar. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

F de V	GL
TOTAL	159
TRATAMIENTO	15
Medios de cultivo(M)	1
Hormonas (H)	3
MxH	3
Dosis (D)	1
MxD	1
HxD	3
MxHxD	3
Error Experimental	144
PROMEDIO	
CV	

8. Resultados y Discusión.

8.1. Establecimiento *in vitro* de semillas de mortiño.

En el ADEVA, para el porcentaje de germinación a los 80 días, tabla 9, se observa diferencias significativas para fotoperiodo y temperatura. Además, se observa diferencias significativas para las interacciones MxF, MxT, FxT y MxFxT. El promedio general fue 14,63 % de germinación y el coeficiente de variación fue de 85.30%, esto posiblemente se debe a que existe una alta heterogeneidad en las semillas utilizadas, debido a que su procedencia fue de frutos en distintos estados de madurez, de distintas plantas y alta variabilidad genética, para lo cual Pérez (1998) menciona que un factor determinante es la variabilidad genética y la procedencia del material inicial.

Tabla 9. ADEVA para el establecimiento de semillas *in vitro* de mortiño a los 80 días. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

F de V	GL	CM
TOTAL	39	
TRATAMIENTOS	7	3305,38
Medio de cultivo (M)	1	105,63 ns
Fotoperiodo (F)	1	7155,63*
M x F	1	30,63*
Temperatura (T)	1	8555,63*
M x T	1	105,63*
F x T	1	7155,63*
M x F x T	1	30,63*
Error Experimental	32	155,63
CV	85.30 %	
PROMEDIO	14,63 % de germinación	

Para medios de cultivo, tabla 10, no detecta significación estadística. El mejor promedio obtiene m1 (Murashige and Skoog) con 16,25% de germinación, seguido por m2 (Woody Plant Medium) con 13% de germinación. Sin embargo, se observa que las plántulas sometidas al m2 (Woody Plant Medium) son más vigorosas como se muestra en la figura 1.

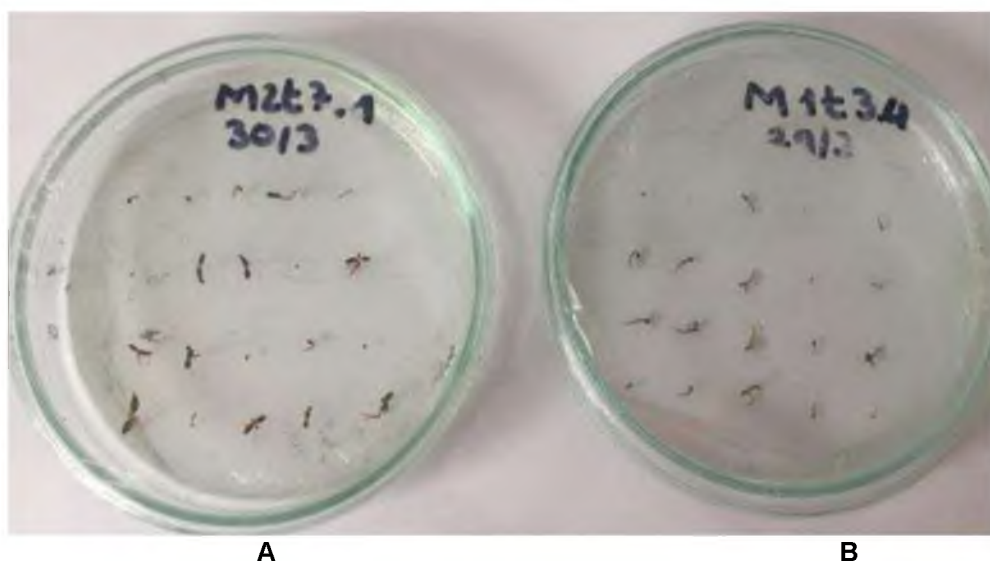


Figura 1. Semillas de Mortiño (*Vaccinium floribundum*) germinadas. **A)** m2 Woody Plant Medium. **B)** m1 Murashige and Skoog. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

LSD al 5% para Fotoperiodo, tabla 10, detecta dos rangos de significación estadística. Encabeza el primer rango f2 (24 horas luz) con un promedio 28% de germinación, en tanto que, en el segundo rango se ubica f1 (16 horas luz) con un promedio 1.25% de germinación. Estos resultados probablemente se deben a que la luz es un factor que afecta en la germinación de las semillas, para lo cual, Finch y Leubner en el 2006 muestran que, en la mayoría de las semillas, la germinación es más rápida en condiciones de luz debido a la presencia de fitocromo en el eje embrionario de la semilla. Este pigmento se presenta en dos formas en la semilla, Pr (P660) que está inactivo y Prf(P730) que induce la germinación. Así mismo, Medina y Lobo en el 2004, atribuyen que la germinación está regulada por la luz. Además, Castro *et al.*, (2012) menciona que la germinación de semillas de *Vaccinium meridionale* comenzó en luz continua.

LSD al 5% para Temperatura, tabla 10, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubica t1 (18°C) con un promedio de 29,25% de germinación, en tanto que, en el segundo rango se ubica t2 (28°C) con un promedio de 0% de germinación. Estos resultados se pueden atribuir a que las condiciones ambientales tienen un efecto directo en la germinación de las semillas, para lo cual, McGinley (1993) y Dalling (2002) indican que las condiciones ambientales pueden afectar a la germinación de las semillas. Por otro lado, Castro *et al.*, (2012) obtiene los mayores porcentajes de germinación de semillas en temperaturas 18 °C.

LSD al 5% para la interacción medio de cultivo, fotoperiodo y temperatura, tabla 10, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubican t3 (Murashige and Skoog + 24 horas luz + 18°C) y t7 (Woody Plant Medium + 24 horas luz + 18°C) con un promedio de 61% y 51% de germinación respectivamente, es decir que, los tres factores en esta variable interaccionan. Estos resultados son similares a los obtenidos por Castrillon *et al.*, (2008) obteniendo un 63% de semillas germinadas de *Vaccinium meridionale*.

Tabla 10. Promedios y pruebas de significación para el porcentaje de germinación de semillas de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

FACTORES	CÓDIGO	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%) 80 días
MEDIO DE CULTIVO (M)	m1 (Murashige and Skoog)	16,25
	m2 (Woody Plant Medium)	13,00
FOTOPERIODO (F)	f1 (16 horas luz)	1,25 b
	f2 (24 horas luz)	28,00 a
TEMPERATURA (T)	t1 (18°C)	29,25 a
	t2 (28°C)	0,00 b
M x F	m1f1	2,00 b
	m1f2	30,50 a
	m2f1	0,50 b
	m2f2	25,5 a
M x T	m1t1	32,50 a
	m1t2	0,00 b
	m2t1	26,00 a
	m2t2	0,00 b
F x T	f1t1	2,50 b

	f1t2	0,00 b
	f2t1	56,00 a
	f2t2	0,00 b
M x F x T	m1f1t1	4,00 b
	m1f1t2	0,00 b
	m1f2t1	61,00 a
	m1f2t2	0,00 b
	m2f1t1	1,00 b
	m2f1t2	0,00 b
	m2f2t1	51,00 a
	m2f2t2	0,00 b

Para el inicio y fin de la germinación, figura 2, se muestra que el crecimiento de la semilla comienza efectivamente a los 20 días terminando a los 80 días. Resultados similares obtiene Castro *et al.*, (2012) iniciando la germinación al día 14 y terminando al día 94 bajo condiciones similares.

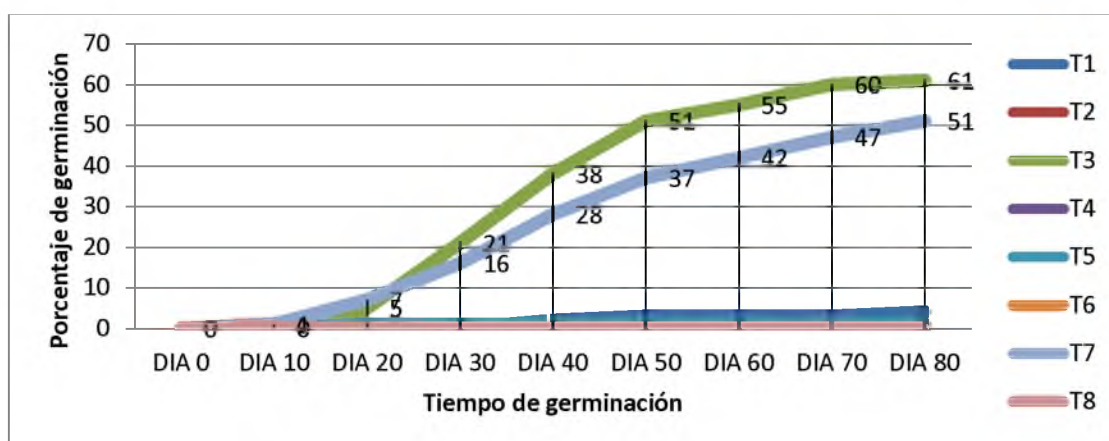


Figura 2. Inicio y fin de la germinación de las semillas de mortiño (*Vaccinium floribundum*). INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

8.2 Establecimiento *in vitro* de brotes

En el ADEVA, para el porcentaje de contaminación a los 8 días, tabla 11, se observa diferencias significativas para la desinfección previa y tiempo de exposición a NaOCl 2 %. Además, se observa diferencias significativas para las interacciones PxA, PxH, AxH y PxAxH. El promedio general fue 71,00 % de contaminación y el coeficiente de variación fue de 56.18% que para este tipo de estudio es bueno.

Tabla 11. ADEVA para el establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

F de V	GL	CUADRADOS MEDIOS	
		PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN (%) 8 días	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN (%) 20 días
TOTAL	119		
TRATAMIENTO	11	0,70	0,39
Desinfección previa (P)	1	2,41 *	1,41 *

Alcohol (A)	1	0,41 ns	0,41 ns
Tiempo de exposición de hipoclorito de sodio (E)	2	1,46 *	0,81 *
PxA	1	0,67 *	0,07 *
PxE	2	0,36 *	0,26 *
AxE	2	0,11 *	0,06 *
PxAxE	2	0,17 *	0,08 *
Error Experimental	108	0,16	0,14
CV		56,18	47,85
PROMEDIO		71,00 % de contaminación	79,00 % de oxidación

LSD al 5 % para desinfección previa, tabla 12, detecta dos rangos de significación estadística. Encabeza el primer rango p1 (Con desinfección previa) con un promedio de 57% de contaminación, en tanto que, en el segundo rango p2 (Sin desinfección previa) con un promedio de 85% de contaminación. Estos resultados posiblemente se deben a que los controles fitosanitarios previos aumentan la eficiencia de la desinfección contra de los microorganismos, para lo cual, Ramos (2012) menciona que es importante la eliminación de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) que se encuentran en la superficie del explante al momento de la siembra.

LSD al 5 % para tiempo de exposición a hipoclorito de sodio al 2%, tabla 12, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubica e3 (NaOCl 2% por 30 minutos) con un promedio de 50 % de contaminación, en tanto que, en el segundo rango se ubica e1 (NaOCl 2% por 10 minutos) y e2 (NaOCl 2% por 20 minutos) con 88% y 75% de contaminación respectivamente. Estos resultados se pueden atribuir a que a mayor exposición de los explantes al NaOCl aumenta la probabilidad que se eliminen los microorganismos presentes, para lo cual, Borges (2009) indica que a medida que se aumenta la concentración de NaOCl y el tiempo de exposición, se disminuye el porcentaje de contaminación.

LSD al 5% para la interacción Desinfección previa, alcohol 70% y tiempo de exposición a NaOCl 2%, tabla 12, detecta cinco rangos de significación estadística, en el primer rango se ubica p1a1e2 (Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos) con un promedio de 30% de contaminación es decir que los tres factores en esta variable interaccionan.

Tabla 12 Promedios y pruebas de significación para el porcentaje de contaminación y oxidación del ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

FACTORES	CÓDIGO	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN (%) 8 días	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN (%) 20 días
DESINFECCIÓN PREVIA (P)	p1 (Con desinfección previa)	57,00 a	68,00 a
	p2 (Sin desinfección previa)	85,00 b	90,00 b
ALCOHOL 70% (A)	a1 (Alcohol 70% por 1 minuto)	65,00	73,00
	a2 (sin alcohol)	77,00	85,00
TIEMPO DE EXPOSICIÓN A NaOCl 2% (E)	e1 (NaOCl 2% por 10 minutos)	88,00 b	95,00 b
	e2 (NaOCl 2% por 20 minutos)	75,00 b	75,00 a
	e3 (NaOCl 2% por 30 minutos)	50,00 a	68,00 a
P x A x E	p1a1e1	60,00 abc	80,00 bc

	p1a1e2	30,00 a	40,00 a
	p1a1e3	40,00 ab	60,00 ab
	p1a2e1	100,00 d	100,00 c
	p1a2e2	70,00 bcd	70,00 abc
	p1a2e3	40,00 ab	60,00 ab
	p2a1e1	100,00 d	100,00 c
	p2a1e2	100,00 d	90,00 bc
	p2a1e3	60,00 abc	70,00 abc
	p2a2e1	90,00 cd	100,00 c
	p2a2e2	100,00 d	100,00 c
	p2a2e3	60,00 abc	80,00 bc

En el ADEVA, para el porcentaje de oxidación a los 20 días, tabla 11, se observa diferencias significativas para la desinfección previa y tiempo de exposición a NaOCl 2%. Además, se observa diferencias significativas para las interacciones PxA, PxH, AxH y PxAxH. El promedio general fue 79,00 % de oxidación y el coeficiente de variación fue de 47,85 % que para este tipo de estudio es bueno.

LSD al 5 % para desinfección previa, tabla 12, detecta dos rangos de significación estadística. Encabeza el primer rango p1 (Con desinfección previa) con un promedio de 68% de oxidación, en tanto que, en el segundo rango p2 (Sin desinfección previa) con un promedio de 90% de oxidación.

LSD al 5 % para tiempo de exposición a hipoclorito de sodio al 2%, tabla 12, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubica e2 (NaOCl 2% por 20 minutos) y e3 (NaOCl 2% por 30 minutos) 75% y 68% de oxidación respectivamente, en tanto que, en el segundo rango se ubica e1 (NaOCl 2% por 10 minutos) con 88% de oxidación 95%. Estos resultados pueden atribuirse a que los explantes expuestos a desinfectantes como el NaOCl comienzan a oxidarse porque existe un efecto abrasivo que produce síntomas de necrosis en el tejido vegetal. Para lo cual, Azofeifa (2009), menciona que los procesos de oxidación fenólica son producidos por varios factores entre ellos el efecto del tiempo y la concentración del desinfectante y el tipo de explante.

LSD al 5% para la interacción Desinfección previa, alcohol 70% y tiempo de exposición a NaOCl 2%, tabla 12, detecta cinco rangos de significación estadística, en el primer rango se ubica p1a1e2 (Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos) con un promedio de 40% de oxidación, es decir que, los tres factores en esta variable interaccionan.

A pesar que se determinó un tratamiento que obtuvo el mejor tratamiento en este ensayo p1a1e2 (Con desinfección previa + alcohol 70% por 1 minuto + NaClO 2% por 20 minutos) la viabilidad de los brotes no obtuvo resultados positivos, dado que estos no brotaron y pasados los 30 días empezaron a morir, por lo tanto, no se estableció el material vegetal clonal de mortifio y considerando que los porcentajes de contaminación y oxidación son altos, se propuso otro ensayo considerando como información base este ensayo. Para lo cual, se consideró el uso de algunas estrategias para evitar la oxidación y promover la brotación efectiva de los explantes siendo estas: la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico y ácido cítrico en concentraciones de 200 mg/100ml en el proceso de desinfección previa para evitar la oxidación, anexo 3, la adición de carbón activado 1g/litro al medio de cultivo para ayudar con la adsorción de fenoles producidos por los explantes, refrescamiento de los explantes en nuevo medio de cultivo cada 10 días retirando los tejidos necrosados, el uso de explantes jóvenes vs maduros y colocando los explantes en un cuarto de crecimiento a 18°C, humedad relativa de 40% y sin fotoperiodo para estimular la brotación estableciendo un segundo ensayo.

En el ADEVA, para el porcentaje de contaminación a los 35 días, tabla 13, se observa diferencias significativas para la desinfección previa y tipo de explante. Además, se observa

diferencias significativas para la interacción PxE. El promedio general fue 35,00 % de contaminación y el coeficiente de variación fue de 59,76% que para este tipo de estudio es bueno y se debe a la heterogeneidad del tipo de explante.

Tabla 13. ADEVA para el segundo ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortifio. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

F de V	GL	CUADRADOS MEDIOS	
		PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN % 35 días	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN % 35 días
TOTAL	19		
TRATAMIENTO	3	9083,33	5697,92
Desinfección previa (P)	1	3125,00 *	781,25
Tipo de Explante (E)	1	18000,00 *	13781,25 *
PxE	1	6125,00 *	2531,25 *
Error Experimental	16	437,00	484,38
CV		59,76%	39,13%
PROMEDIO		35% de contaminación	56,25% de oxidación

LSD al 5% para desinfección previa, tabla 14, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubicó 2 (desinfección previa con antioxidantes) con un promedio de 22,5% de contaminación, en tanto que, en el segundo rango se ubicó d1 (desinfección previa sin antioxidantes). Este resultado pudo deberse a que el proceso de desinfección es efectivo para la eliminación de microorganismos y se valida la información con el primer ensayo.

LSD al 5% para tipo de explante tabla 14, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubicó e1 (explante joven) con un promedio del 5% de contaminación, en tanto que, en el segundo rango se ubicó e2 (explante maduro) con un promedio del 65% de contaminación. Este resultado posiblemente se debe a que la cantidad de microorganismos en los tejidos juveniles es menor a un tejido maduro.

LSD al 5 % para la interacción desinfección previa y tipo de explante, tabla 14, figura 3, detecta cuatro rangos de significación estadística. En el primer rango se ubicó d1e1 (desinfección previa sin antioxidante + explante joven) con 0% de contaminación, es decir que, los dos factores en esta variable interaccionan.

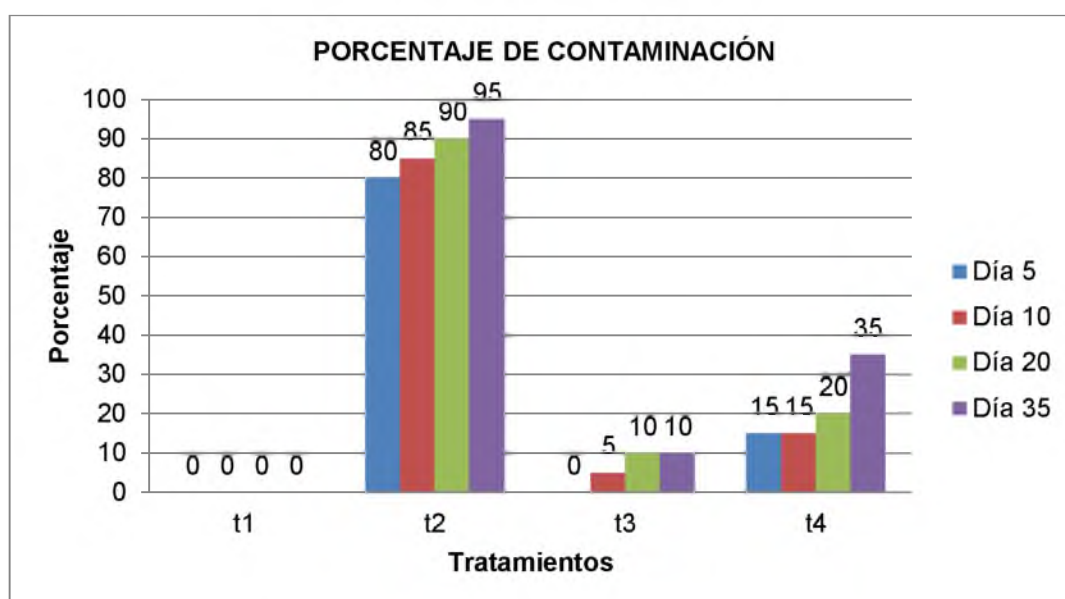


Figura 3. Porcentaje de contaminación para el segundo ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

En el ADEVA, para el porcentaje de oxidación a los 35 días, tabla 13, se observa diferencias significativas para tipo de explante. Además, se observa diferencias significativas para la interacción PxE. El promedio general fue 56,25% de oxidación y el coeficiente de variación fue de 39,13% que para este tipo de estudio es bueno.

El promedio para desinfección previa, tabla 14, muestra que el menor porcentaje de oxidación a d2 (desinfección previa con antioxidantes) con un promedio de 50,00% de oxidación, Este resultado pudo deberse a que la adición de antioxidantes tuvo un efecto positivo en el mantenimiento del explante al momento de la desinfección. Para lo cual Azofeifa (2009) dice que la adición de antioxidantes como el ácido cítrico, el ácido ascórbico y el carbón activado añadidos al medio de cultivo o a los procesos de desinfección disminuyen la fenolización.

LSD al 5% para tipo de explante tabla 14, detecta dos rangos de significación estadística. En el primer rango se ubicó e1 (explante joven) con un promedio del 30% de oxidación, en tanto que, en el segundo rango se ubicó e2 (explante maduro) con un promedio del 82,5% de oxidación. Este resultado seguramente se debe a que los tejidos juveniles son menos propensos a la fenolización. Pérez (1998) menciona que la edad del explante es un factor importante para el establecimiento a condiciones *in vitro*.

LSD al 5 % para la interacción desinfección previa y tipo de explante, tabla 14, figura 4, detecta tres rangos de significación estadística. En el primer rango se ubicó d1e1 (desinfección previa sin antioxidante + explante joven) y d2e1 (desinfección previa con antioxidante + explante joven) con 25% y 35% de oxidación, es decir que los dos factores en esta variable interaccionan.

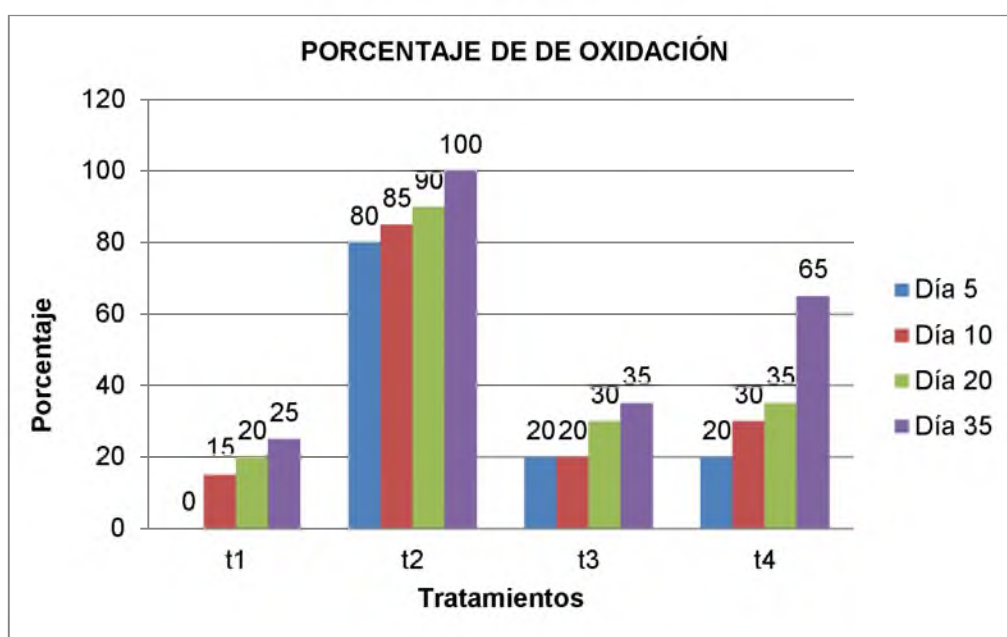


Figura 4. Porcentaje de oxidación para el segundo ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

Para la interacción desinfección previa y tipo de explante, tabla 14, figura 5, muestran que el mejor promedio alcanza d2e1 (desinfección previa con antioxidante + explante joven) 2,05 mm de longitud de brote, es decir, que la desinfección previa utilizando antioxidantes junto al uso de tejido joven ayudaron a que se desarrollen los brotes, interactuando estos factores. Adicionalmente la estrategia de subcultivar cada 10 días retirando en tejido necrosado favoreció a que los nutrientes del medio de cultivo sean aprovechados de mejor forma por los explantes para el desarrollo de los brotes como se observa el incremento de longitud de brote al día 55, figura 5, alcanzando 3,30 mm para el mejor tratamiento.

Tabla 14. Promedios y pruebas de significación para el porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación y longitud de brote del segundo ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

FACTORES	CÓDIGO	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN (%) 35 días	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN (%) 35 días	LONGITUD DE BROTE (mm) 35 días
DESINFECCIÓN (D)	d1 (Sin antioxidantes)	47,5 b	62,5	0,00
	d2 (Con antioxidantes)	22,5 a	50,0	1,13
EXPLANTE (E)	e1 (joven)	5,0 a	30,0 a	1,03
	e2 (maduro)	65,0 b	82,5 b	0,10
DxE	d1e1	0,0 a	25 a	0,00
	d1e2	95,0 c	100,0 c	0,00
	d2e1	10,0 ab	35,0 a	2,05
	d2e2	35 b	65,0 b	0,20

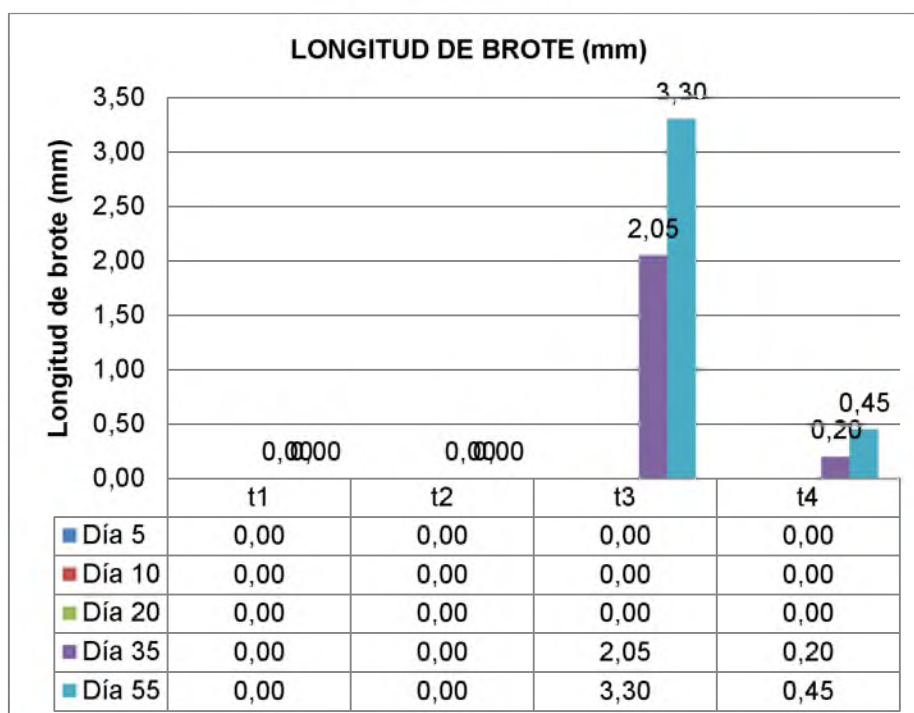


Figura 5. Longitud de brote para el segundo ensayo del establecimiento de brotes *in vitro* de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

8.3 Inducción de callos a partir de tejido foliar

Para este ensayo, no se reportaron resultados satisfactorios, teniendo inconvenientes serios de oxidación, figura 6, posiblemente porque el tipo de explante utilizado no fue el correcto, dado que el tejido foliar procede de plantas de campo, para lo cual, Azofeifa (2009) menciona que, el establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*. Además, la respuesta negativa al desarrollo de callos pudo deberse a un efecto inhibitorio producido por la fenolización acelerada de los explantes, para lo cual, Azofeifa (2009) dice que luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estrés biótico y abiótico). Así mismo, No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir.

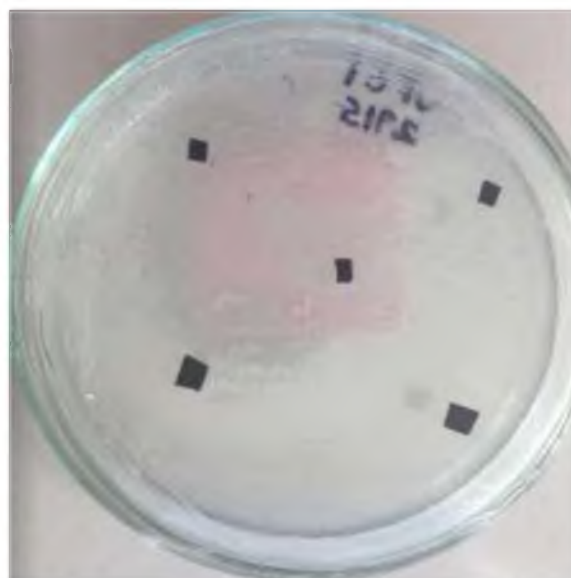


Figura 6. Tejido foliar con síntomas de oxidación en el ensayo de inducción de callos. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

Con esta respuesta se validó la metodología propuesta por Torres *et al.*, (2016) la cual probó un ensayo de organogénesis a partir de hojas de plantas *in vitro* en un medio de cultivo conformado por $\frac{1}{2}$ Murashige y Skoog más TDZ 2 mg/litro más NAA 0,5 mg/litro, también, se probó en el mismo medio de cultivo, tejido foliar juvenil y maduro de plantas de campo con 10 observaciones por tratamiento. En la tabla 15, figura 7, se observa que el tratamiento que obtiene el mejor promedio es t1 (Hoja *in vitro* planta de semilla) alcanzando 59,99% de formación de callo, en tanto que, t2 y t3 obtienen 3,33% y 0,00% de formación de callo respectivamente. Así mismo, el tipo de callo observado es de tipo organogénico como se muestra en la figura 8.

Tabla 15. Promedios y pruebas de significación para el porcentaje de formación de callo y tipo de callo en el ensayo inducción de callos a partir de tejido foliar de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

FACTOR	CÓDIGO	FORMACIÓN DE CALLO %	TIPO DE CALLO
Tejido foliar	t1 (Hoja <i>in vitro</i> planta de semilla)	59,99	Organogénico
	t2 (Hoja tierna campo)	3,33	Formación de callo
	t3 (Hoja madura campo)	0,00	Sin formación de callo

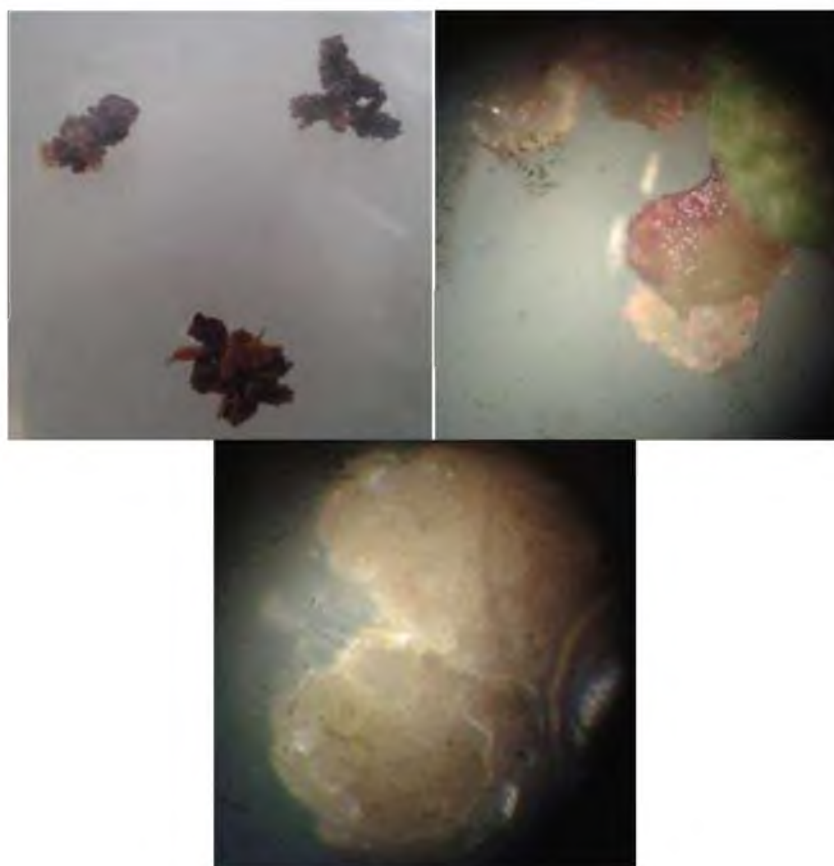


Figura 7. Tejido foliar con formación de callo en el ensayo de inducción de callos. INIAP. Cutuglagua. Pichincha 2017



Figura 8. Callo organogénico con brotes en el ensayo de inducción de callos. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017

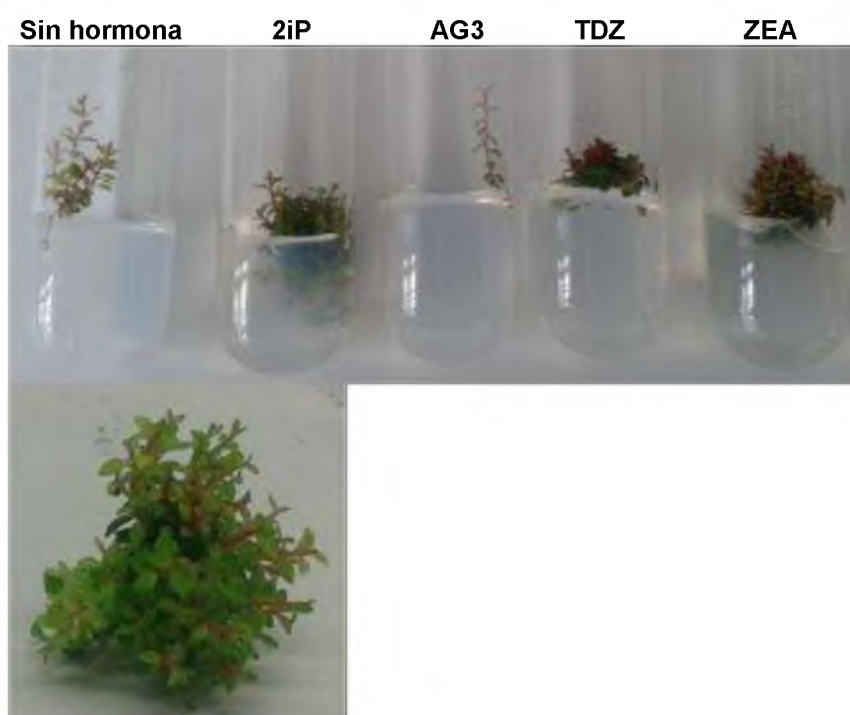
8.3 Ensayo preliminar de multiplicación clonal *in vitro* de mortiño

Las *in vitro* plantas obtenidas de la germinación de las semillas de mortiño fueron sometidas a la influencia de diversos reguladores de crecimiento (2iP, AG3, TDZ, ZEA) a una dosis de 2 mg/litro. En la tabla 16, figura 9, se observa que el mejor promedio lo obtiene r4 (ZEA 2 mg/litro) con 11,4 brotes por explante. Este resultado posiblemente se debe a que la Zeatina es

la citoquinina que induce la proliferación de brotes. Para lo cual Gajdosova *et al.*, 2006 menciona que la Zeatina fue el mejor agente que induce la formación de brotes.

Tabla 16. Promedios para el ensayo preliminar de multiplicación de mortiño. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

FACTOR	CÓDIGO	COEFICIENTES DE MULTIPLICACIÓN (brotes/explante)
Regulador de Crecimiento (R)	r0 (sin hormona)	2,1
	r1 (2iP)	3,1
	r2 (AG3)	1
	r3 (TDZ)	3,8
	r4 (ZEA)	11,4



A B
Figura 9. Multiplicación clonal de *in vitro* plantas de mortiño. A) tratamientos con los diversos reguladores de crecimiento. B) Brotes del tratamiento con Zeatina 2mg/litro. INIAP. Cutuglagua. Pichincha. 2017.

9. Conclusiones

- Es posible el establecimiento *in vitro* del material vegetal de mortiño a partir de los tres tipos de explantes.
- Los factores influyentes para la germinación de semillas de mortiño son el fotoperiodo (24 horas) y la temperatura (18°C).
- Las semillas de mortiño bajo las condiciones ambientales adecuadas germinan a partir de los 20 días hasta los 80 días.
- El establecimiento de *in vitro* de brotes es posible considerando el uso de antioxidantes (ácido ascórbico 200 mg/litro y ácido cítrico 200 mg/litro) en los procesos de desinfección previa, la adición carbón activado (1g/litro) en medio de cultivo, el uso de brotes juveniles y los sub cultivos frecuentes (cada 10 días).

- Se generó callo organogénico a partir de tejido foliar de plantas *in vitro* procedente de semilla y se obtuvo brotes adventicios de los mismos.
- La Zeatina se perfila como una citoquinina que induzca la formación de brotes a partir de yemas de mortiño.

10. Bibliografía

- Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Asturizaga, A. S., Ollgaard B. y Balslev H. (2006). Frutos comestibles. Moraes M., Ollgaard B., Kvist L. P.,
- Borchsenius F. y Balslev H. (Ed.), *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andes. La Paz. 329-346
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I. y Meneses, S. (2009). Desinfección de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Volumen 11, Número 2, p. 127-135
- Castrillón, J., Carvajal, E., Ligarreto, G. y MAGNITSKIY, S. (2008). El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swarf.) en diferentes sustratos. *Agronomía Colombiana* XXV (f). p. 9
- Castro, C., Olarte, Y., Rache, L. y Pacheco J. (2012). Establecimiento de un protocolo para germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana* 30(2), 196-203
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes M. F., Yugsi, E. y Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*. Vol. 16(2), 5-13.
- Dalling, J. (2002). Ecología de semillas. pp. In: Guariguata, M. and G. Kattan (eds.). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Editorial Tecnológica de Costa Rica, Puerto Rico.
- Finch, W. y Leubner, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171, 501-523.
- Gajdošová, A., Ostroľucká, M., Libiaková, G., Ondrušková, E., y Šimala D. (2006). Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. vol. 14 (Suppl. 104 1): 103-119
- Gutiérrez, V. y Camacho, D. (2011). Evaluación de las estrategias de propagación de la especie *Vaccinium floribundum* (familia Ericaceae) presente en el paramo Cruz Verde. Tesis de pregrado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA. Facultad de Ingeniería Agronómica. Bogotá.
- McGinley, M.A. (1993). Variation in reproductive characteristics of *Poa pratensis* across a sucesional chrono sequence. *Tex. J.Sci.* 45, 105-108.
- Medina, C. y LOBO, M. (2004). Colecta, conservación y caracterización de diversas poblaciones de *Vaccinium meridionale*, presentes en los bosques altoandinos de la jurisdicción de Corantioquia para promover su utilización sostenible. Informe final técnico del proyecto. Corpoica, Rionegro. 32 p.
- Muñoz, V. V. (2004). Determinación de métodos para la producción de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) con fines de propagación y producción comercial. Tesis de pregrado. Universidad San Francisco de Quito. Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición. Departamento Agroempresas. Quito.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. ed., Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 400p
- Ramos, J. (2012). *Avances de lamicropropagación in vitro de plantas leñosas*. Universidad Nacional abierta y a distancia UNAD. Bogotá. 71 p.
- Smith, N., Mori S. A., Henderson A., Stevenson D. W. y Heald S. V. (2004). *Flowering plants of the neotropics*. Princeton University Press.
- Trujillo D. (2010). *Cultivo in vitro de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Tesis de pregrado. Universidad San Francisco de Quito. Colegio de ciencias Biológicas y Ambientales. Quito.

11. Anexos

Anexo 1. Medios de cultivo para la germinación de semillas de mortiño

Reactivo	Concentración
WPM	1 X
Sacarosa	20 g/litro
Agar	5,8 g/litro
pH	5,2

Reactivo	Concentración
MS	1 X
Sacarosa	20 g/litro
Agar	5,8 g/litro
pH	5,2

Anexo 2. Desinfección previa para los brotes de mortiño

1. Lavado de los explantes con agua corriente más jabón neutro.
2. Sumergir los explantes en una solución de yodo povidona 1% por 30 minutos
3. Sumergir los explantes en una solución de fungicidas (Carbendazim 1ml más sulfato de cobre pentahidratado 1ml más ácido ascórbico 100 mg más ácido cítrico 100 mg en 100 ml de agua destilada) por 60 minutos.
4. Enjagüe por tres ocasiones en agua destilada esterilizada.

Anexo 3. Desinfección previa para los brotes de mortiño con la adición de antioxidantes

1. Lavado de los explantes con agua corriente más jabón neutro.
2. Sumergir los explantes en una solución de yodo povidona 1% por 30 minutos
3. Sumergir los explantes en una solución de fungicidas (Carbendazim 0,5 ml más sulfato de cobre pentahidratado 0,5 ml más ácido ascórbico 200 mg más ácido cítrico 200 mg en 100 ml de agua destilada) por 30 minutos.
4. Enjagüe por tres ocasiones en agua destilada esterilizada.

Anexo 4. Medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de brotes de mortiño

Reactivo	Concentración
WPM	1 X
Sacarosa	30 g/litro
Agar	8 g/litro
Carbón Activado	1 g/litro
pH	5,2

Anexo 5. Desinfección de tejido foliar de mortiño

1. Lavado de los explantes con agua más jabón neutro.
2. Sumergir los explantes en una solución de yodo povidona 1% por 30 minutos
3. Sumergir los explantes en una solución de fungicidas (Carbendazim 1ml más sulfato de cobre pentahidratado 1ml) por 60 minutos.
4. Enjuague por tres ocasiones con agua destilada estéril.
5. Sumergir los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 0,1% por 60 minutos.
6. Sumergir los explantes en una solución de Alcohol al 70% por 1 minuto.
7. Enjuague por una ocasión con agua destilada estéril.
8. Sumergir los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 10% más cuatro gotas de tween 20 por 10 minutos.
9. Enjuague por cinco ocasiones con agua destilada estéril.

Anexo 6. Medio de cultivo base para la inducción de callos a partir de tejido foliar de mortiño

Reactivo	Concentración
WPM	1 X
Sacarosa	30 g/litro
Agar	7 g/litro
pH	5,7

Reactivo	Concentración
MS	1 X
Sacarosa	30 g/litro
Agar	7 g/litro
pH	5,7