

ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

**DEPARTAMENTO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA**

INFORME ANUAL 2025



Mejía – Pichincha – Ecuador

Enero / 2026

CONTENIDO

INFORMACIÓN GENERAL

5. Proyectos	
6. Socios externos estratégicos para la ejecución de la I&D+i durante el 2024:	5
7. Publicaciones del 2025:	
8. Participación en eventos de difusión científica y técnica:	6
9. Hitos/Actividades establecidas en el POA 2025	8

9.1 ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 1

ACTIVIDAD P1A1: Validación de marcadores SSRs para el genotipaje de chocho y jícama	10
ACTIVIDAD P1A2: Caracterización molecular de ishpingo	14
ACTIVIDAD P1A3: Barcoding de ADN en material referencial (vainillas amazónicas)	20

9.2 ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 2

ACTIVIDAD P2 A1: Ensayos de regeneración y transfección de protoplastos en papa	23
---	----

9.3 ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 3

ACTIVIDAD P3A1: Propagación de vitro plantas para producción y ensayos experimentales	31
ACTIVIDAD P3A2: Optimización de un protocolo de micropropagación acelerada de jicama	40
ACTIVAD P3A3: Producción de vitro plantas irradiadas de banano	51

ACTIVIDADES PROYECTOS FIASA

PF1: Caracterización molecular de palma oleífera	57
PF2: Caracterización molecular de cacao blanco	59
PF3: Caracterización molecular de chirimoyas	63
PF4: Caracterización molecular de guarango	68

9.4 OTRAS ACTIVIDADES EJECUTADAS

ACTIVIDAD A: Análisis de transcriptoma de genotipos resistentes y susceptibles de genotipos de naranjilla infectados con <i>F. oxysporum</i> y <i>Meloidogyne</i>	72
ACTIVIDAD B: Análisis transcriptómico de genes de calidad de fruta en tomate de árbol	81
ACTIVIDAD C: Genotipado de materiales de café	99

INFORME ANUAL 2025

1. **Departamento/Programa:** Biotecnología
2. **Director de la Estación Experimental:** Rivadeneira Ruales Jorge Esteban
3. **Coordinador Nacional I+D+:** Luis Eduardo Morillo Velasteguí
4. **Responsable del Departamento en la Estación Experimental:** Luis Eduardo Morillo Velasteguí
5. **Proyectos:**

INTERNACIONALES:

Proyecto 1

Título del proyecto:	Fortalecimiento de la investigación para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla y tomate de árbol en el Ecuador
Presupuesto total:	322.500 USD
Recurso estimado que INIAP ofrece en contraparte:	172.860 USD
Recurso estimado que recibe el INIAP:	322.500 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025:	No se recibieron recursos adicionales en el 2025
Institución financiadora:	AECID
Coordinador del proyecto:	Jorge Merino (INIAP-EESC)
Número de memorando:	INIAP-EESC_DIR-2020-0422-MEM INIAP-EESC_DIR-2020-0511-MEM
Duración:	24 meses (prorrogado)
Fecha de inicio:	Octubre 2020
Fecha de finalización:	Junio 2025

Proyecto 2

Título del proyecto:	Edición génica para mejoramiento en especies vegetales y animales
Presupuesto total:	200.000 USD
Recurso estimado que INIAP ofrece en contraparte:	25.000 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025	1.500 USD
Institución financiadora:	FONTAGRO
Responsable proyecto en el INIAP:	Eduardo Morillo
Número de memorando:	INIAP-EESC_DIR-2020-1091-MEM INIAP-EESC_DIR-2020-1635-MEM
Duración:	42 meses (total proyecto)
Fecha de inicio:	Marzo 2022
Fecha de finalización:	Marzo 2026 (prorrogado)

Proyecto 3

Título del proyecto:	<i>Strengthening national capabilities for the development of banana resistant to their main diseases</i>
Código del proyecto:	ECU5034-2105955
Presupuesto total:	200.000 USD
Recurso estimado que INIAP ofrece en contraparte:	10.000 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025	2.000 USD
Institución financiadora:	IAEA
Responsable proyecto en el INIAP:	Danilo Vera (INIAP-EETP)
Fecha de inicio:	Enero 2021
Fecha de finalización:	Diciembre 2025 (prorrogado)

NACIONALES:**Proyecto 4**

Título del proyecto:	Proyecto de investigación sobre enfermedades letales en la palma aceitera en Ecuador
Código del proyecto:	FIASA – EESD-2022-015
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025:	6.700 USD
Institución financiadora:	FIASA
Responsable del proyecto:	Dígener Ortega (INIAP-EESD)
Número de memorando:	INIAP-EESD_DIR-2021-0891-MEM
Duración:	48 meses
Fecha de inicio:	Abril 2022
Fecha de finalización:	Abril 2026

Proyecto 5

Título del proyecto:	Rescate y selección de especies cultivadas de cacao de almendra blanca en fincas de productores de la provincia Zamora Chinchipe, centro de origen, con fines de conservación y mejoramiento genéticos
Código del proyecto:	FIASA-EELS-2024-025
Presupuesto total:	49.7316 USD
Recursos que recibió el Dpto. en el 2025:	3.200 USD
Institución financiadora:	FIASA
Responsable del proyecto:	James Quiroz (INIAP-EELS)
Número de memorando:	INIAP-EELS_DIR-2024-0658-MEM INIAP-EELS_DIR-2024-0750-MEM
Duración:	36 meses
Fecha de inicio:	Abril 2024
Fecha de finalización:	Diciembre 2026

Proyecto 6

Título del proyecto:	Conservación y Manejo del Banco de Germoplasma del INIAP
Código del proyecto:	FIASA- EESD-2024-022
Presupuesto 2025	190.658 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025:	No se recibieron recursos adicionales en el 2025
Institución financiadora:	FIASA
Responsable del proyecto:	Cesar Tapia (INIAP-DENAREF)
Número de memorando:	Acta aprobación (11 octubre 2023)
Duración:	36 meses
Fecha de inicio:	Enero 2024
Fecha de finalización:	Diciembre 2026

Proyecto 7

Título del proyecto:	Fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético mediante herramientas Biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola.
Código del proyecto:	FIASA-EELS-2022-008
Presupuesto 2024	49.313,21 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025:	2.000 USD
Institución financiadora:	FIASA
Responsable del proyecto:	Elisa Quiala (INIAP-EELS)
Número de memorando	INIAP-EELS _DIR-2021-0908-MEM
Duración:	48 meses
Fecha de inicio:	Abril 2022
Fecha de finalización:	Marzo 2026

Proyecto 8

Título del proyecto:	Identificación y conservación de poblaciones de chirimoya nativa y desarrollo de tecnologías de producción sustentable en la provincia de Loja.
Código del proyecto:	FIASA-CA-2023-011
Presupuesto 2024:	484.753 USD
Recurso estimado que recibió el Dpto. en el 2025:	No se recibieron recursos adicionales en el 2025
Institución financiadora:	FIASA
Responsable del proyecto:	Myriam Capa (UNL)
Número de memorando	INIAP-INIAP-2023-0017-OF
Duración:	48 meses
Fecha de inicio:	Marzo 2023
Fecha de finalización:	Marzo 2026

Proyecto 9

Título del proyecto:	Desarrollo de agrotecnologías como estrategia ante la amenaza de enfermedades que afecten la producción de Musáceas en el Ecuador.
Código del proyecto:	133900000.0000.387228
Recurso estimado que recibió el Dpto. 2025:	1.500 USD
Institución financiadora:	Secretaria Nacional de Planificación, COE SEMPLADES, PLANIFICA ECUADOR.
Responsable o director del proyecto en el INIAP:	Pedro Terrero (INIAP-EETP)
Número de memorando	Acta de reunión de comité técnico N°030 CT-EETP-2022
Duración:	48 meses
Fecha de inicio:	Enero 2022
Fecha de finalización:	Diciembre 2025

6. Socios externos estratégicos para la ejecución de la I&D+i durante el 2025:

Institución	SIGLAS	Contacto o punto focal/Proyecto asociado
INTA-Balcarce (Argentina)	INTA	Sergio Feingold (Proyecto FONTAGRO)
Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria	AGROSAVIA	Luz Estella Barrero, Gina Garzón (Proyecto FONTAGRO)
Instituto Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (España)	IHSM	Noe Fernández (Proyecto AECID)
Corporación Técnica Alemana	GIZ	Pedro Ramírez (Programa BIOVALOR 2)
Universidad Nacional de Loja	UNL	Myrian Capa (Proyecto FIASA Chirimoya)
Universidad de las Américas	UDLA	Wilson Vásquez (Proyecto Mortiño)
Universidad Técnica de Cotopaxi	UTC	Emerson Jácome (Proyecto Mortiño)
Escuela Politécnica Nacional	EPN	Edison Vera (Proyecto ECU5034)
Empresa privada	-	Rodrigo Páez (Proyecto Jicama)

7. Publicaciones del 2025:

7.1 Publicaciones técnicas

INIAP 2025. Plegable 520. Servicios del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología. Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador.

INIAP 2025. Plegable 521. Servicios del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología. Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador.

7.2 Artículos científicos en revistas indexadas (SCOPUS):

MORILLO, E., BUITRON, J., YANEZ, D., MOURNET, P., VÁSQUEZ-CASTILLO, W., & VITERI, P. (2025). Genetic Assessment in the Andean Tropical Fruits *Solanum quitoense* Lam. and *S. betaceum* Cav.: Efforts Towards a Molecular Breeding Approach. *Plants*, 14(6), 874.

7.3 Otras publicaciones científicas

Meneses S. y Morillo E. *Avances en el Aislamiento, Cultivo y Regeneración de Protoplastos de Papa var. INIAP- Gabriela con Fines de Aplicar Edición génica*. In: Sigcha F., Castillo C., Panchi N., Andrade-Piedra J.L., Cuesta X. (2025). Libro de Memorias del XXX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa y XI Congreso Ecuatoriano de la Papa. INIAP. Pgs 81-82

Morillo E. y Buitrón J. *Análisis de Homología de ARNs guía para el gen de la Invertasa Vacuolar en Cuatro Variedades Ecuatorianas de Papa*. In: Sigcha F., Castillo C., Panchi N., Andrade-Piedra J.L., Cuesta X. (2025). Libro de Memorias del XXX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa y XI Congreso Ecuatoriano de la Papa. INIAP. Pgs. 83-84.

Morillo E., Buitrón J., Zulay Banderas Z., Murillo A., Vega L. y Villacrés L. *Estudio de la expresión de genes asociados a la síntesis de saponinas en genotipos dulces y amargos de quinua del INIAP*. In: Memorias del IX Congreso Mundial de la Quinua y VI Simposio Internacional de Granos Andinos 2025. Cañar, Ecuador (En elaboración).

8. Participación en eventos de difusión científica y técnica

Participación 1

Proyecto	FONTAGRO: “Edición génica para mejoramiento en especies vegetales y animales”
Nombres del autor:	Meneses Santiago
Tipo de participación:	Visita técnica
Nombre del evento científico:	Extracción y cultivo de protoplastos de papa
Institución o instituciones organizadoras:	AGROSAVIA
Fechas del evento	17 al 19 febrero 2025
Ciudad sede del evento:	Mosquera-Colombia

Participación 2

Proyecto	ECU5034
Nombres del autor:	Morillo Eduardo y Buitrón Johanna
Tipo de participación:	Visita técnica
Nombre del evento científico:	<i>Fellowship on Molecular Markers for the identification of Banana Mutants</i>
Institución o instituciones organizadoras:	EMBRAPA, IAEA
Fechas del evento:	3 al 14 febrero 2025
Ciudad sede del evento:	Bahía-Brasil

Participación 3

Proyecto	Investigación para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla y tomate de árbol en Ecuador”
Nombres del autor:	Morillo Eduardo y Buitrón Johanna
Tipo de participación:	Capacitación-virtual
Nombre del evento científico:	Análisis del transcriptoma por la tecnología RNA-SEQ

Institución o instituciones organizadoras:	INIAP-EESC/IHSM
Fechas del evento:	16 al 17 julio 2025
Ciudad sede del evento:	EESC

Participación 4

Título del trabajo:	Uso de Biorreactores
Nombres del autor:	Meneses Santiago
Tipo de participación:	Visita técnica
Nombre del evento científico:	Manejo de biorreactores como herramienta para el escalamiento de la producción de productos biológicos
Institución o instituciones organizadoras:	Laboratorio de bioprocesos de la Universidad Politécnica Nacional
Fechas del evento:	16 septiembre 2025
Ciudad sede del evento:	Quito

Participación 5

Título del trabajo:	Bio-economía
Nombres del autor:	Meneses Santiago y Buitrón Johanna
Tipo de participación:	Curso virtual
Nombre del evento científico:	Plan nacional de bio-economía para el sector agropecuario forestal acuícola y pesquero del Ecuador
Institución o instituciones organizadoras:	MAG IICA
Fechas del evento:	11 al 27 noviembre 2025
Ciudad sede del evento:	Quito

Participación 6

Título del trabajo:	Avances en el Aislamiento, Cultivo y Regeneración de Protoplastos de Papa var. INIAP- Gabriela con Fines de Aplicar Edición génica
Nombres del autor	Meneses Santiago y Morillo Eduardo
Tipo de participación	Poster
Nombre del evento científico:	XXX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa
Institución o instituciones organizadoras:	INIAP-ALAP
Fechas del evento	28 al 31 julio 2025
Ciudad sede del evento:	Quito

Participación 7

Título del trabajo:	Análisis de Homología de ARNs guía para el gen de la Invertasa Vacuolar en Cuatro Variedades Ecuatorianas de Papa
Nombres del autor:	Morillo Eduardo y Buitrón Johanna
Tipo de participación:	Poster
Nombre del evento científico:	XXX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa
Institución o instituciones	INIAP-ALAP

organizadoras:	
Fechas del evento:	28 al 31 julio 2025
Ciudad sede del evento:	Quito

Participación 8

Título del trabajo:	Estudio de la expresión de genes asociados a la síntesis de saponinas en genotipos dulces y amargos de quinua del INIAP
Nombres del autor:	Morillo Eduardo
Tipo de participación:	Ponencia
Nombre del evento científico:	IX Congreso Mundial de la Quinua
Institución o instituciones organizadoras:	Asociación “Mushuk Yuyay”
Fechas del evento:	18 al 21 noviembre 2025
Ciudad sede del evento:	Cañar

9. Hitos/Actividades establecidas en el POA 2025:

1. ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 1

Actividades planificadas en el hito 1	
Actividades	Indicador de Resultado
P1A1: Validación de marcadores microsatelites para el genotipaje de chocho y jícama	Se han validado marcadores moleculares útiles para el genotipado de cultivos andinos
P1A2: Caracterización molecular de ishpingo	Se ha evaluado marcadores útiles para el genotipado del ishpingo
P1A3: Barcoding de ADN en material referencial (vainillas amazónicas)	Se han obtenido secuencias de ADN para el barcoding de material referencial

ACTIVIDAD P1A1. Validación de marcadores micro satélites para el genotipaje de chocho y jícama

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna Rodríguez Rinel (tesista UDLA)
Colaboradores	Diego Rodríguez (PRONALEG) Marcelo Tacan (DENAREF)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Gasto corriente
Institución donante:	INIAP
Número de memorando	INIAP-EESC_DIR-2019-1017
Contrato Marco:	MAAE-DNB-CM-2020-0142

ANTECEDENTES

El INIAP ha incursionado en el desarrollo de la tecnología NGS para el desarrollo de marcadores moleculares específicos en cultivos y especies nativas (Morillo&Buitron. 2017). Aplicando esta tecnología ha establecido bancos de secuencias en varios cultivos. En el marco del protocolo “Desarrollo de la tecnología de marcadores moleculares para el genotipaje de cultivos nativos” se estableció como objetivo desarrollar la tecnología de marcadores moleculares microsatélites para el genotipaje en chocho (*Lupinus mutabilis*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*) y jícama (*Smallanthus sonchifolia*). Para zanahoria blanca la actividad se concluyó anteriormente y los resultados están ya reportados (INIAP 2022).

OBJETIVOS

General

Validar primers para el desarrollo de marcadores moleculares SSRs en dos cultivos andinos: chocho y jícama

Específicos

1. Estandarizar las condiciones de genotipado con microsatélites mediante la metodología M13-tailing en chocho.
2. Estandarizar las condiciones de genotipado con microsatélites mediante la metodología M13-tailing en jícama.

METODOLOGÍA

Material vegetal: El estudio se realizó utilizando material vegetal de chocho y jícama. Para chocho se analizaron 180 muestras de 90 accesiones provenientes del PRONALEG con orígenes en Ecuador,

Perú, Bolivia y Bielorrusia, y 90 individuos pertenecientes a una población segregante F_3 (45 dulces y 45 amargos). En el caso de *S. sonchifolius*, se trabajó con 30 accesiones de la colección del INIAP.

Extracción y validación de ADN: La extracción de ADN genómico se realizó a partir de tejido vegetal joven utilizando el protocolo CTAB descrito por Ferreira y Grattapaglia (1998). La calidad y concentración del ADN extraído fueron verificadas mediante amplificación preliminar y análisis electroforético, asegurando su idoneidad para las reacciones de PCR posteriores

Selección y screening de primers: Se evaluaron inicialmente 80 primers SSR para chocho y 50 para jícama provenientes de un banco de secuencias. Para la amplificación de los primers se emplearon las concentraciones y programa térmico detallado por Morillo y Miño 2011.

Genotipado: La amplificación de los marcadores SSR se realizó utilizando la metodología M13-tailing, lo que permitió el marcaje fluorescente de los amplicones y la configuración de reacciones monoplex y dúplex. Para *L. mutabilis* se estandarizaron 13 marcadores SSR a una temperatura de alineamiento de 53 °C, mientras que para *S. sonchifolius* se estandarizaron 4 marcadores a 55 °C. El genotipado se efectuó mediante un analizador automático y los fragmentos amplificados fueron detectados por fluorescencia

RESULTADOS

Selección y amplificación de primers: Se determinó que la temperatura de anillamiento óptima para los 13 marcadores en chocho fue de 53 °C, lo que permitió configurar reacciones dúplex evaluándolas en el panel de 90 accesiones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Combinaciones de *primers* seleccionados para *Lupinus mutabilis*

Locus	Combinación	Temperatura (°C)	Marcaje (IRDye)	Producto(p b)
LM 22 LM23	DUPLEX 1	53	700	138-180
LM65 LM07	DUPLEX 2	53	800	104-146
LM34 LM43	DUPLEX 3	53	700	137-167
LM33	MONOPLEX 4	53	800	143
LM57	MONOPLEX 5	53	700	144
LM20	MONOPLEX 6	53	800	134
LM72	MONOPLEX 7	53	700	132
LM19	MONOPLEX 8	53	800	143
LM70	MONOPLEX 9	53	700	127
LM15	MONOPLEX 10	53	800	197

Estandarización del genotipado en jícama: Se evaluaron cuatro marcadores informativos en un panel de 30 muestras de jícama. Todos ellos se estandarizaron a 55 °C de temperatura de anillamiento, tal como se detalla en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Combinaciones de *primers* seleccionados para jícama

Locus	Combinación	Temperatura	Marcaje (nm)	Producto(pb)
PS39	MONOPLEX 1	55	700	110
PS40	MONOPLEX 2	55	800	164
PS49	MONOPLEX 3	55	700	111
PS51	MONOPLEX 4	55	800	140

Genotipado: El genotipado se realizó utilizando el analizador LI-COR 4300s DNA Analyzer (Lincoln, NE, USA), aplicando la metodología de M13 tailing, con un conjunto de 13 marcadores informativos para chocho y cuatro para jícama (Cuadros 1 y 2) siguiendo la metodología M13 Tailing descrita por Morillo y Miño 2011. La visualización de los microsatélites se realizó mediante escaneo por fluorescencia con el sistema IRDye, y el tamaño de los alelos fue determinado mediante el software SAGA-GT v3.3.0 (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando una escalera molecular de 50–350 pb marcada con IRDye.

CONCLUSIONES

- El estudio permitió estandarizar de manera efectiva las condiciones de genotipado con marcadores SSR mediante la metodología M13-tailing para chocho y jícama. Los marcadores seleccionados demostraron ser reproducibles y adecuados para evaluar la diversidad genética en ambos cultivos andinos. Se espera publicar los resultados obtenidos.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar y validar nuevos marcadores moleculares, especialmente SSR y SNP, que permitan mejorar la capacidad de discriminación genética entre individuos y poblaciones de ambos cultivos.
- Ampliar las colecciones de germoplasma, incorporando accesiones de diferentes regiones geográficas y, de ser posible, poblaciones silvestres, con el fin de capturar una mayor diversidad genética.
- Integrar los análisis moleculares con la caracterización agronómica y fenotípica, lo que permitirá establecer relaciones entre la variabilidad genética y caracteres de interés para programas de mejoramiento genético y conservación de cultivos andinos.

REFERENCIAS

- Ferreira, M. E., Fernández, J. N., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Federal District, Brazil: Embrapa
- INIAP (2022). Informe anual Departamento Nacional Biotecnología. Estación Experimental Santa Catalina. Mejía, Ecuador. Pg-8-11.
- Morillo E. y Buitrón 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. Pg. 31. UTC, Ecuador
- Morillo, E; Miño Castro, GM. 2011. Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP (en línea). Disponible en <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/848>.

ACTIVIDAD P1A2. Caracterización molecular de ishpingo

Responsable	Morillo Eduardo
Colaboradores	Buitrón Johanna, Meneses Santiago Fundación ISHPINGO (Napo) Fundación Chankuap (Morona Santiago)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Programa BIOVALOR 2
Institución donante:	GIZ
Número de memorando	En trámite

ANTECEDENTES

El ishpingo (*Ocotea quixos*) es una especie nativa de la Amazonía ecuatoriana con potencial por su alto valor aromático, y utilizada ancestralmente por pueblos indígenas como planta medicinal y cultural. La especie se obtiene principalmente de las cúpulas del fruto secas, aunque la corteza y las hojas también se cosechan y procesan. La producción es limitada ya que estas cúpulas solo se cosechan cada dos años a partir de árboles de 10 años con la primera floración (Gilardoni et al, 2021)

En la actualidad el ishpingo enfrenta una seria amenaza de conservación debido a la sobreexplotación, la deforestación y su baja productividad natural. Estas presiones han provocado una reducción significativa de las poblaciones silvestres y una preocupante erosión genética, agravada por la creciente demanda de sus productos aromáticos y las consecuentes presiones antropogénicas (Alvarado y Naula, 2021).

La evaluación de la diversidad genética resulta fundamental para comprender el estado de conservación de esta especie. En este sentido, los marcadores han demostrado ser herramientas eficaces en especies no domesticadas y con escasa información genética, como *O. quixos* (Vieira et al., 2016). Estos marcadores permiten analizar la variabilidad genética y detectar procesos de endogamia o pérdida de alelos, comunes en poblaciones reducidas o aisladas. Estudios recientes evidencian esta problemática en el ishpingo. Draper et al. (2024) reportaron bajos niveles de heterocigosidad observada en poblaciones de la Amazonía ecuatoriana (0,33–0,62), en comparación con valores esperados más altos (0,61–0,79), lo que sugiere un proceso activo de erosión genética.

A través de este estudio, el INIAP en apoyo al programa Biovalor II de la GIZ, busca identificar los genotipos de ishpingo que se están comercializando actualizando en la provincia de Napo y facilitar su trazabilidad para el acceso a mercados especializados. Los resultados permitirán

también generar información genética clave para trabajos de conservación y aprovechamiento sostenible de este recurso genético en el enfoque de bioeconomía.

OBJETIVOS

General

Determinar el perfil genético del ishpingo (*Ocotea quixos*) presente en zonas productivas de la Amazonia.

Específicos

1. Realizar el muestreo de materiales representativos de ishpingo provenientes de zonas productivas en las provincias de Napo y Morona Santiago.
2. Extraer y validar la calidad del ADN de ishpingo a partir de las muestras obtenidas.
3. Validar y determinar marcadores reportados para el genotipado de ishpingo.
4. Asignar los materiales en estudio a los grupos genéticos reportados para el ishpingo.

METODOLOGÍA

Material biológico: Las muestras de ishpingo fueron colectadas en la provincia de Napo; se tomaron hojas jóvenes y maduras (aproximadamente 5 gramos por muestra). Estas muestras fueron colocadas en bolsas hemáticas con sílica gel para su secado y traslado al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología del INIAP, donde fueron almacenadas hasta su procesamiento.

Extracción y validación de ADN: Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo convencional descrito por Souza et al. (2012) (Anexo 1). Las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en el equipo para microplacas EPOCH™ de Biotek®, empleado el programa GEN5. Se utilizó 2 µL de muestra de ADN en la microplaca Take 3, a través de las lecturas de absorbancias (260 nm y 280nm) el programa GEN5 determinó la concentración de las muestras y su índice de pureza (Biotek Instruments, 2011), las muestras fueron normalizadas a 10 ng/µL y se realizó una PCR de control para verificar la validez del ADN, empleando marcadores ISSR (HB-12/HB-14/17898A/844/844A) siguiendo a la metodología descrita por Morillo y Miño (2011) (Anexo 2).

Validación de marcadores SSRs: Se buscó validar la amplificación de los ocho marcadores SSRs reportados por Draper et al. (2024) (Anexo 3). Se ensayó la amplificación en ADNs de ishpingo previamente validados. Los componentes de la reacción PCR se describieron según Morillo y Miño (2011). La visualización de los resultados de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con Sybr Safe, empleando buffer TAE 1X. La validación se efectuó

verificando la presencia de amplicones con el tamaño molecular esperado del producto PCR. Se realizaron pruebas de amplificación con gradientes de temperatura y cambios en la concentración de $MgCl_2$ para optimizar las amplificaciones de los marcadores.

RESULTADOS

Material biológico: Se colectaron 71 muestras de ishpingo provenientes de la provincia de Napo, en el anexo 4 se detallan los códigos de las colectas.

Extracción y validación de ADN: Se realizó las 71 extracciones de material colectado con el protocolo convencional descrito por Souza et al. (2012) Se obtuvo en promedio una concentración de 237 ng/uL y un índice de pureza de 2.05. La validación se llevó a cabo con marcadores ISSR; se probaron los primers HB-12, HB-14, 17898A, 844, 844A. En la Figura 1 se observa la validación de muestras de ADN con estos primers.

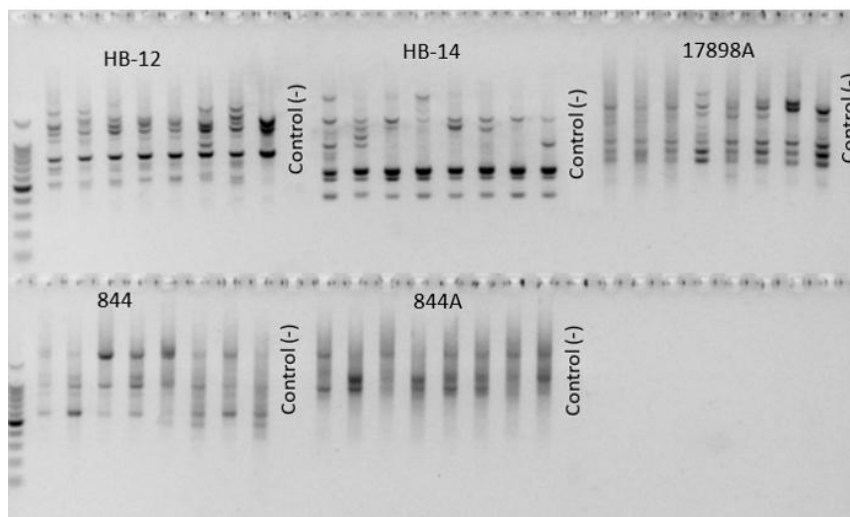


Figura 1. Validación del ADN de ishpingo (amplificación con primer ISSRs)

En la Figura 2, se visualiza la validación de todos los ADN extraídos del material colectado de ishpingo.

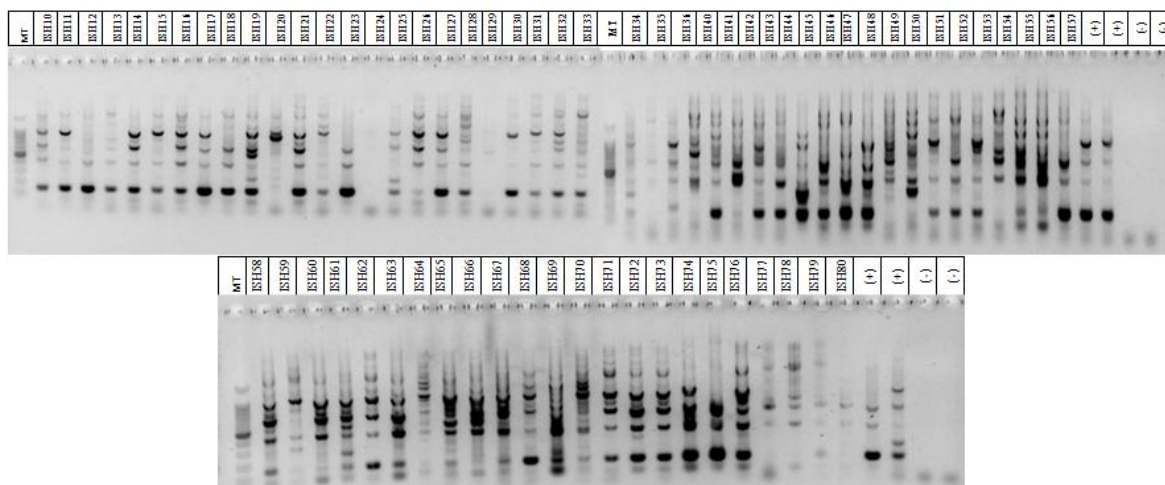


Figura 2. Validación de los ADN del material muestreado de ishpingo

Validación de marcadores SSRs: Se realizó una primera prueba PCR de los marcadores ISH_01 al ISH_08 empleándose las temperaturas de anillamiento reportadas por Draper et al. (2024). En la figura 3 se visualizan los resultados de esta prueba. No se presentó amplificaciones claras para ninguno de los marcadores SSR.

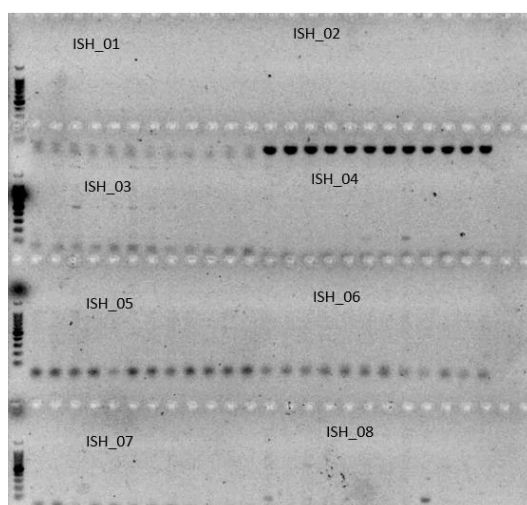


Figura 3. Prueba PCR de los marcadores SSRs reportados por Draper et al. (2024)

En un segundo ensayo se decidió realizar pruebas de amplificación con gradiente de temperatura. En la Figura 4 se observan los resultados de estas pruebas, donde se evidencio la amplificación de todos los marcadores a temperaturas entre 45 y 50 °C los que difiere de la reportada por Draper et al. (2024); sin embargo, se obtuvieron productos inespecíficos de amplificación.

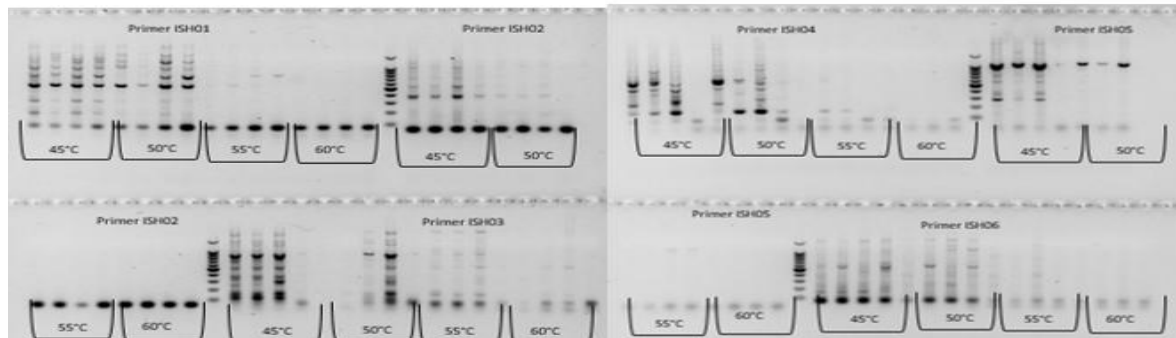


Figura 4. Pruebas PCR de los marcadores SSRs con gradientes de temperatura

En los primers ISH_04 e ISH_08 se evidenció el producto PCR reportado en la temperatura de anillamiento de 50°C, los primers restantes únicamente presenta amplificaciones inespecíficas, razón por la cual para los primers ISH_04 e ISH_08 se realizó una disminución del $MgCl_2$ de 2mM a 1.5 mM dentro de la reacción de amplificación con el objetivo de mejorar especificidad; en la Figura 5 se observan estos resultados.

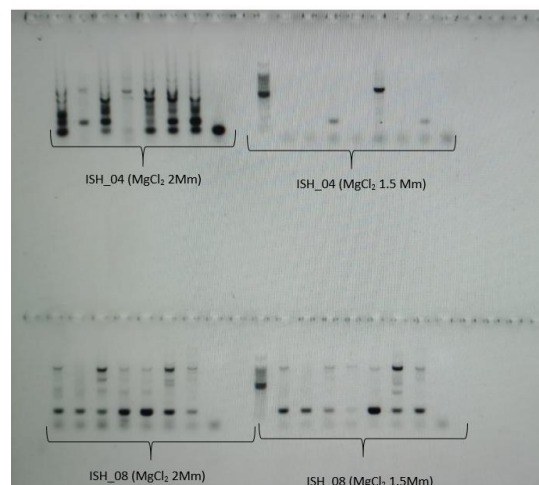


Figura 5. Prueba PCR con deducción de $MgCl_2$ para los primers ISH_04 y ISH_08

La disminución en la concentración de cloruro de magnesio mejoró la especificidad del marcador; sin embargo, aún hay presencia de productos inespecíficos.

CONCLUSIONES PRELIMINARES

- Se estableció un set de 71 muestras de ishpingo de árboles de zonas productivas de la provincia de Napo y Morona Santiago.
- Se obtuvo ADN genómico apto para análisis moleculares, validado por PCR.

- Los marcadores SSR reportados para ishpingo no presentaron amplificaciones claras bajo las condiciones originalmente descritas, evidenciando la necesidad de optimización para evaluar su aplicación en el genotipado de ishpingo.
- Las pruebas con gradientes de temperatura permitieron identificar rangos de anillamiento (45–50 °C) en los que se obtuvo amplificación, aunque con presencia de productos inespecíficos en la mayoría de los marcadores.
- La actividad permitió sentar las bases técnicas para la futura caracterización genética del ishpingo, aunque se requieren ajustes técnicos adicionales antes de avanzar al genotipado previsto en el estudio.

RECOMENDACIONES

- Realizar una optimización adicional de las condiciones de PCR para los primers ISH_04 e ISH_08, incorporando ajustes finos de $MgCl_2$, concentraciones de primers y uso de coadyuvantes que incrementen la especificidad de amplificación.
- Evaluar la posibilidad de rediseñar primers SSR o desarrollar nuevos marcadores útiles para el genotipado de ishpingo.

REFERENCIAS

- Alvarado Cuji, L. M., & Naula Shucad, M. R. (2021). Análisis de los principios activos y sus aplicaciones industriales de la canela (*Ocotea quixos*) y flor de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*) de la amazonía (Bachelor's thesis, Universidad Estatal Amazónica).
- BioTek Instruments. (2012). Gen5™ Getting Started Guide. Recuperado el 12 de junio de 2020, de https://dornsife.usc.edu/assets/sites/344/docs/Gen_5_v2.0_RevC.pdf
- Draper, D., Riofrío, L., Naranjo, C., & Marques, I. (2024). Genetic Diversity of Ishpingo Exploited Trees (*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, Lauraceae). Environmental and Earth Sciences Proceedings, 31(1), 6.
- Gilardoni, G.; Montalván, M.; Vélez, M.; Malagón, O. Chemical and Enantioselective Analysis of the Essential Oils from Different Morphological Structures of *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. Plants 2021, 10, 2171.
- Morillo, E., & Miño Castro, G. M. (2011). Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP.
- Souza, H. A. V., Muller, L. A. C., Brandão, 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. Genetics and Molecular Research, 11(1), 756-764.
- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and Molecular Biology, 39(3), 312–328.

ACTIVIDAD P1A3. Barcoding de ADN en material referencial (vainillas amazónicas)

Responsable	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	IKIAM (CONVENIO 026-IKIAM-2020)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Gasto corriente, Programa BIOVALOR (GIZ)
Institución donante:	INIAP, GIZ
Número de memorando aprobación	INIAP-EESC_PB-2023-0081-MEM
Contrato Marco	MAATE-DBI-CM-2024-0354

ANTECEDENTES

Ecuador es conocido por su gran diversidad de orquídeas, incluyendo a la vainilla debido a los diferentes microclimas y factores ecogeográficos. Pocos estudios sobre la diversidad genética de vainillas han sido reportados. Un estudio sobre caracterización morfológica del género *Vanilla* en el ecosistema Napo-Pastaza permitió identificar a los tipos *V. pompona*, *V. odorata*, *V. cribbiana* y dos no identificados como posibles nuevas especies (De la Cruz et al., 2022). La caracterización molecular de vainillas nativas provenientes de la Amazonia y particularmente de la provincia de Napo es de vital importancia para la identificación de los materiales con potencial económico. La falta de información sobre la identidad genética de las vainillas ha sido una limitación y este conocimiento es requerido para la trazabilidad de los sistemas de producción que se están implementando en la región norte de la Amazonia principalmente. La información obtenida de este estudio puede ser de gran interés para los productores de vainilla, ya que permitiría diferenciar sus productos en el mercado y podría implementarse un sistema de trazabilidad.

OBJETIVOS

General

Realizar análisis moleculares para la identificación de especies de vainilla mediante la secuenciación (*barcoding*) de marcadores de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

Específicos

1. Amplificar mediante la técnica de PCR un fragmento de la región ITS en 30 muestras de diferentes materiales de vainilla.
2. Verificar la calidad de los productos de PCR obtenidos para el análisis de secuenciación.

METODOLOGÍA

Selección de muestras: Se realizó la selección de 30 muestras de ADN de materiales representativos de vainillas seleccionadas de un estudio anterior (Vásquez-Arriaga 2024).

Amplificación de fragmento ITS: Se emplearon por primers reportados por Sun et al. (1994). Se realizaron las amplificaciones de las muestras de vainilla con los primers 17SE y 26SE generando un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases. En el Anexo 1 se detallan el coctel de PCR y programa térmico utilizados. Los productos PCR fueron purificados con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean UP System (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS

En la tabla 1 se detalla la lista de los 30 ADN de vainillas seleccionadas para la amplificación del marcador ITS. En la figura 1 se observa el fragmento de 700 pares de bases purificado en las muestras de vainilla seleccionadas.

Tabla 1. Muestras de vainilla seleccionadas para el análisis de barcoding

No.	Muestra	Tipo	260/280	260/230	ng/μL
1	Mv7-R1	V. spp	2.017	1.82	104.249
2	Mv8-R1	V. spp	2.041	1.624	104.066
3	Mv29-R1	V. spp	1.985	1.259	98.84
4	Mv42-R1	V. planifolia (Mx)	1.984	1.716	96.344
5	Mv031-R2	V. planifolia (Ec)	1.998	1.721	103.055
6	Vo2-R1	V. odorata (G1)	1.97	1.448	94.399
7	Vo6-R1	V. odorata (G3)	2.004	0.994	103.996
8	Vo14-R1	V. alba	1.979	0.472	94.219
9	Vo16-R1	V. spp	2	1.444	93.606
10	Vo22-R1	V. spp	2.02	1.664	97.352
11	Vo31-R1	V. odorata (G2)	1.964	1.512	89.325
12	Vo33-R1	V. spp	2.031	1.507	92.097
13	Vo37-R1	V. spp	1.991	1.697	92.532
14	Vo42- R1	V. cribbiana	1.963	1.702	91.551
15	Vo44- R1	V. spp	2.024	1.697	92.151
16	Vo52-R1	V. spp	2.004	1.467	104.906
17	Vo60-R1	V. dressleri	2.011	1.625	116.044
18	Vo61-R1	V. pejorata	2.021	1.429	105.298
19	Vo63-R1	V. guianensis	1.963	1.806	111.76
20	Vo66-R1	V. spp	1.87	1.567	102.741
21	V-ref	V. odorata	2	1.72	101.838

22	Odorata reina	V. odorata	1.993	1.477	98.556
23	V.al	V. alba	1.981	1.777	91.411
24	V.tht	V. tahitensis lab	1.989	1.502	97.261
25	V.pla (L)	V. planifolia lab	1.993	1.741	96.792
26	V. odo (L)	V. odorata lab	2.039	1.468	96.049
27	V.pom	V. pompona	2.004	1.839	158.812
28	V.tht (SD)	V. tahitensis-SD	1.988	1.69	141.438
29	V.tri	V. trigonocarpa	1.983	1.652	98.398
30	Vo-58	V. odorata	2.09	1.454	93.287

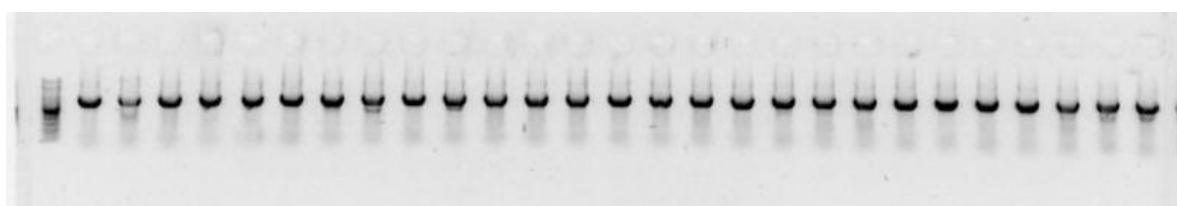


Figura 1. Fragmento ITS correspondiente a 700pb, muestras de vainilla

CONCLUSIONES

- Se logró amplificar exitosamente la región ITS en 30 muestras de ADN de vainilla seleccionadas, obteniendo un amplicón de aproximadamente 700 pb.
- Los resultados de electroforesis y cuantificación evidenciaron que los productos de PCR presentan adecuada calidad, pureza y concentración para su posterior secuenciación. El análisis de secuencias queda programado para el 2026, y los resultados permitirán completar el análisis de barcoding y filogenético de estos materiales.

REFERENCIAS

- De la Cruz, W., Samaniego, E., Soria, S., Domínguez, J., Zúñiga, S., & Rojas, L. (2022). Morphological characterization of the genus *Vanilla* in the Napo Pastaza ecosystem of the Ecuadorian Amazon. *Revista Ecvoda*, 12(1).
- Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89(1): 26–32.
- Vásquez Arriaga, E. L. (2024). Análisis preliminar de la diversidad genética de vainillas en lotes de producción de la provincia de Napo con marcadores moleculares. Tesis Ing. Biot. Universidad Regional Amazónica IKIAM, Tena, Ecuador.

2. ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 2

Actividades planificadas en el hito 2	
Actividades	Indicador de Resultado
P2A1: Ensayos de regeneración y transfección de protoplastos en papa	Hasta Diciembre 2025 se ha evaluado la regeneración de protoplastos de papa variedad INIAP- Gabriela

ACTIVIDAD P2A1: Ensayos de regeneración y transfección de protoplastos en papa

Responsable:	Meneses Santiago; Morillo Eduardo
Colaboradores:	Massa Gabriela; Feingold Sergio (INTA-Argentina)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	ATN/RF-18757-RG “Edición Génica para el Mejoramiento en Especies Vegetales y Animales”
Institución donante:	FONTAGRO
Número de memorando:	INIAP-EESC_DIR-2020-1091-MEM INIAP-EESC_DIR-2020-1635-MEM

ANTECEDENTES

El INIAP a través del Departamento de Biotecnología es parte del proyecto regional FONTAGRO: ATN/RF-18757-RG “Edición Génica para el Mejoramiento en Especies Vegetales y Animales”, que busca implementar e incursionar en el uso de esta tecnología, siendo la papa uno de los rubros establecidos con el fin incrementar la resistencia a virus y mejorar la calidad agroindustrial. El INTA, parte de este proyecto, ha desarrollado tecnología de edición con el uso de protoplastos para reducir el pardeamiento enzimático y el endulzamiento en frío e inducir resistencia al virus Y de la papa (PVY) (Nicolia et al., 2015; Fossi et al., 2019; González et al., 2020), técnicas que pueden ser aplicadas a los cultivares de papa interés del INIAP.

En el marco de este proyecto el DNB ejecuta actividades desde el año 2023 con el siguiente estado de avance:

En el componente 1 sobre transfección de protoplastos en papa, se continuaron con ensayos de regeneración de protoplastos en la variedad Gabriela previamente seleccionada (Obaco 2023, Meneses et al., 2023), incluyéndose además en los ensayos como control a la variedad Desiré con la que trabaja en INTA. Se implementó el test de competencia de protoplastos por fluorescencia y se realizaron pruebas con modificaciones de acuerdo a las recomendaciones indicadas por Moon et al (2021). Adicionalmente se concluyó el análisis de los ARNs guías seleccionados por el INTA en

las variedades locales de papa, resultados de los avances obtenidos se difundieron en el ALALP 2025.

A continuación se presentan las actividades realizadas en el 2025 en relación al asilamiento y cultivo de protoplastos.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad de regeneración de plantas a partir de protoplastos de la variedad INIAP-Gabriela de papa.

Específicos

1. Aislar protoplastos de tejido foliar procedentes de *in vitro* plantas de papa variedad INIAP-Gabriela.
2. Fortalecer las capacidades técnicas en el uso de metodologías de cultivo de tejidos vegetales para el mejoramiento genético utilizando técnicas en el aislamiento y regeneración *in vitro* de protoplastos desarrollada por el INTA de Argentina.

METODOLOGÍA

En el 2025 se realizaron 3 ensayos de aislamiento de protoplastos e inducción de callo de acuerdo al siguiente detalle:

El primer ensayo se realizó del 17 al 19 de febrero del 2025, en una visita técnica a AGROSAVIA-Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia con el fin de establecer un ensayo de regeneración de plantas de papa a partir de protoplastos aislados de tejido foliar utilizando la metodología del INTA, de esta manera se promovió el intercambio de conocimiento entre INIAP y AGROSAVIA en temas referentes a las actividades ejecutadas en el proyecto.

El segundo ensayo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la EESC-INIAP, replicando lo realizado en los laboratorios de AGROSAVIA con algunos reactivos que se trajeron, entre ellas las enzimas macerozima y celulasa.

El tercer ensayo se realizaron algunas modificaciones a la metodología del INTA Argentina con el fin de optimizar el número y la viabilidad de los protoplastos, sugeridas por Moon et al., 2021.

Micropropagación de papa: Se tomaron secciones nodales de *in vitro* plantas (10 mm) de papa variedad de papa INIAP-Gabriela provenientes del banco de germoplasma libre de virus que

mantiene el DNB y se cultivó en condiciones de asepsia en un medio de cultivo semisólido que contenía sales minerales Murashigue y Skoog con vitaminas 1X, sacarosa 3%, agar 0.8% y pH 5.7 y se mantuvieron durante 4 a 5 semanas en un cuarto de crecimiento en un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad, temperatura de 20 °C $\pm$ 2 y humedad relativa superior a 40%.

Aislamiento de protoplastos: Se elaboró soluciones stock y medios de cultivos para la metabolización de gránulos de almidón de las hojas de papa, que se transfirieron en el mismo medio. Las hojas se tomaron de *vitro* plantas de la variedad INIAP-Gabriela, de 4 semanas de edad. Al día siguiente se elaboró medios de cultivos para plasmólisis y digestión enzimática de pared celular y se colocaron las muestras de tejido foliar realizando cortes trasversales de 1 a 2 mm. Al día siguiente se elaboró medios de cultivo lavado, sucrosa, transformación 1 y 2, PEG 25, alginato de sodio, setting agar y flotación y medio E. Luego se filtró y centrifugó las muestras. Posteriormente se contó los protoplastos en cámara de Neubauer (Nicolia et al., 2015).

La determinación de la viabilidad de los protoplastos aislados se realizó basado en la metodología de tinción con diacetato de fluorecina (FDA) propuesta por Larkin, 1976 que consiste en pesar y disolver 5mg de FDA e 5 ml de acetona y almacenar a 0°C. Añadir 0.01% a la suspensión de protoplastos esperar de 2 a 5 minutos y observar en el microscopio de fluorescencia

Inducción de callos: Con los protoplastos obtenidos, se centrifugó la solución transformación 1 y se resuspendió el pellet en una solución transformación 2 y se obtuvo una suspensión madre que se colocó solución PEG 25 y se incubó por 3 minutos. La solución de protoplastos resuspendidos se colocaron en 1 ml de medio E y en el mismo volumen de solución de alginato y se transfirieron en alícuotas (4 gotas grandes) a la superficie del medio sólido setting agar. Las gotas se dejaron a temperatura ambiente durante un máximo de 2 h para permitir la solidificación del alginato. Posteriormente las lentes de alginato se liberaron de la superficie del agar con la ayuda de 2 ml de solución de flotado y se colocaron en placas de Petri que contenían 10 ml de medio E. Las placas de Petri se sellaron con parafilm y se cubrieron con papel de aluminio. Se incubó a 25°C durante 3 días y gradualmente se va incrementado la intensidad de luz por un periodo de 4 semanas (Nicolia et al., 2015).

Optimización de la viabilidad de protoplastos: Se realizaron diferentes modificaciones al protocolo original con el objetivo de mejorar la viabilidad de los protoplastos obtenidos en los ensayos experimentales anteriores que se muestran a continuación:

- Corte parcial desde la nervadura central (Figura 1), (Moon et al., 2021).
- Enzimólisis de 18 horas (Moon et al., 2021).
- Concentración de sucrosa al 10% (Moon et al., 2021).



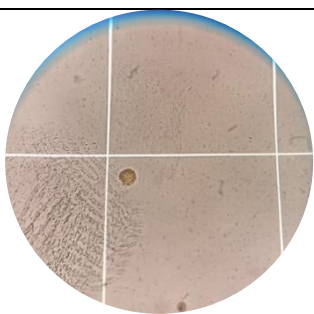
Figura 1. Corte en tejido foliar desde la nervadura central al borde

RESULTADOS

Aislamiento de protoplastos: En los tres ensayos se logró aislar protoplastos de tejido foliar de *vitro* plantas de papa de la variedad INIAP-Gabriela mostrando diferencias sobre el número de protoplastos aislados (Cuadro 1, Figura 2) mostrando la mayor cantidad de protoplastos en el tercer ensayo con 652500 protoplastos con una viabilidad del 50%, seguido por el segundo ensayo con 385500 protoplastos y un 55.88% de viabilidad, en tanto que la menor cantidad de protoplastos se alcanzó con el primer ensayo alcanzando 100000 protoplastos, en este caso no se pudo establecer el porcentaje de viabilidad.

Cuadro 1. Aislamiento de protoplastos a partir de tejido foliar de papa variedad INIAP-Gabriela

VARIEDAD	NÚMERO ENSAYO	PROTOPLASTOS	VIABILIDAD (%)
INIAP-GABRIELA	1 ^{er} (AGROSAVIA)	100000	s/n
	2 ^{do} (EESC-INIAP)	382500	55.88
	3 ^{ro} (EESC-INIAP)	652500	50.00

ENSAYO	REGISTRO FOTOGRÁFICO	PROTOPLASTOS TOTALES	PROTOPLASTOS VIABLES
1 ^{er} .		$C1 = 3+2+1+0 = 6$ $C2 = 0+0+2+2 = 4$ Total = 10 $\bar{x} = 10 \div 2 = 5$ $ppt/\mu l = (5 \div 0.4) = 12.5$ $ppt = 12.5ppt/\mu l \times 8000 \mu l$ $ppt = 100000$	No se realizó test de viabilidad de protoplastos

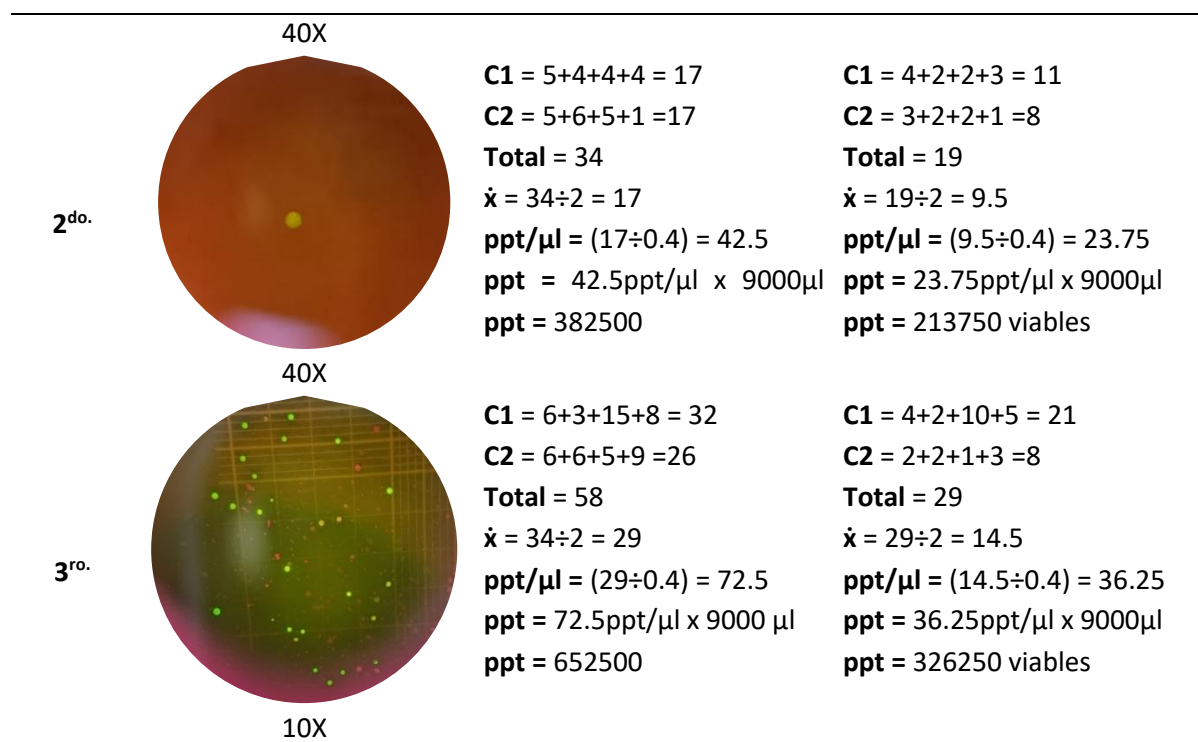


Figura 2. Protoplastos aislados de tejido foliar de INIAP-Gabriela en los tres ensayos

Inducción de callos: El ensayo realizado con los reactivos y las condiciones de AGROSAVIA se logró regenerar más de 100 microcallos por cada gota de alginato en la variedad INIAP-Gabriela a los 42 días después de la siembra (Figura 3). De Estos se seleccionaron los de mayor tamaño (2 mm) para evaluar su desarrollo y maduración y se los transfirió a medio F cada 15 días para el crecimiento y maduración del callo. A los 68 días se pasaron los callos a medio G para inducir la brotación y se refresco el medio cada 10 días (Figura 4). Trascurridos los 99 días después de la siembra se transfirieron a medio H para inducir brotes (Figura 5). Los callos no indujeron brotes y se oxidaron posterior al último cambio de medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por el INTA quienes regeneran aproximadamente 100 callos por placa en Desirée. Sin embargo, los niveles de regeneración en INIAP requieren aún optimización. Radice (2010) menciona que el genotipo es un factor determinante en los procesos morfogénicos, sin embargo los reactivos y condiciones de crecimiento parecen importantes para alcanzar los mejores niveles de regeneración. El resultado en INIAP-Gabriela confirma su totipotencia previamente reportada (Meneses et al., 2023).

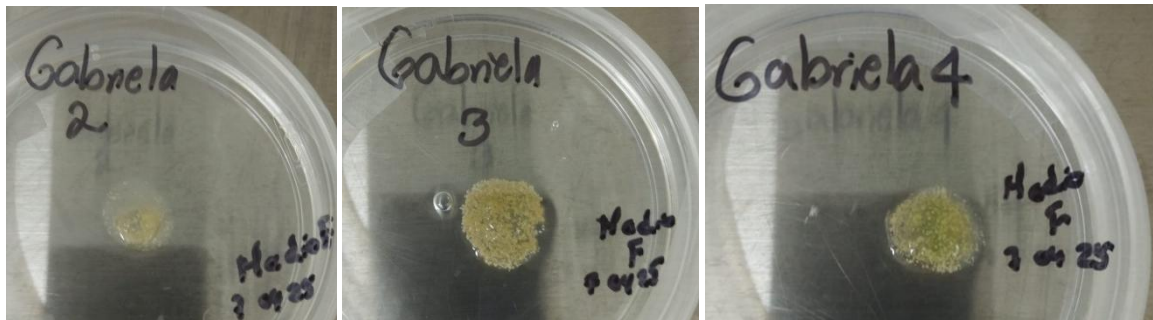


Figura 3. Microcallos a los 42 días posteriores a la implementación del ensayo. Fotografías: AGROSAVIA, Gina Garzón; Edgar Jiménez

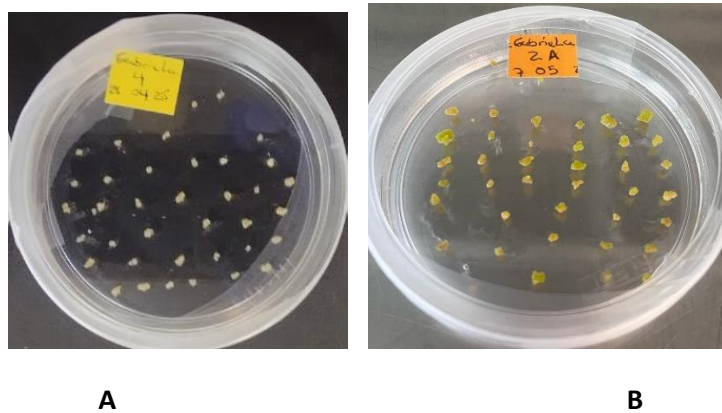


Figura 4. Desarrollo de microcallos en medio G a los **A)** 68 y **B)** 77 días posteriores a la implementación del ensayo. Fotografías: AGROSAVIA, Gina Garzón; Edgar Jiménez

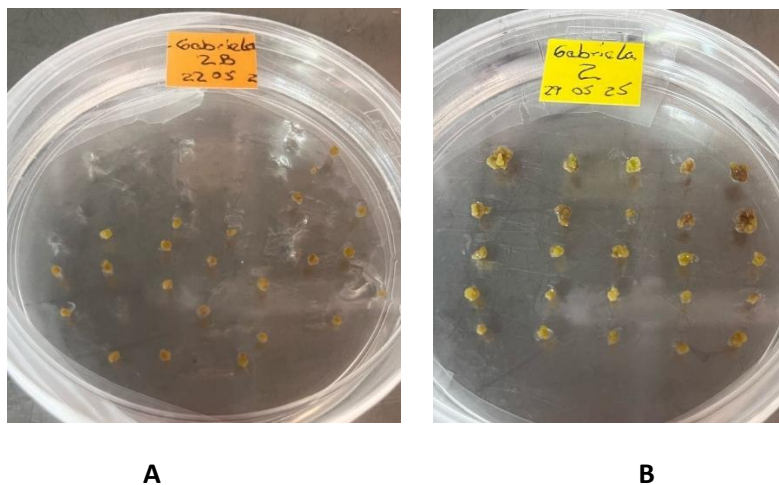


Figura 5. Desarrollo de microcallos en medio G a medio H a los **A)** 92 y **B)** 99 días posteriores a la implementación del ensayo. Fotografías: AGROSAVIA, Gina Garzón; Edgar Jiménez

Los resultados del segundo ensayo transcurridos 20 días muestran una pequeña regeneración de los protoplastos a microcallo (≤ 2 mm aproximadamente) sin embargo no prosperan y ni se desarrollan (Figura 6).

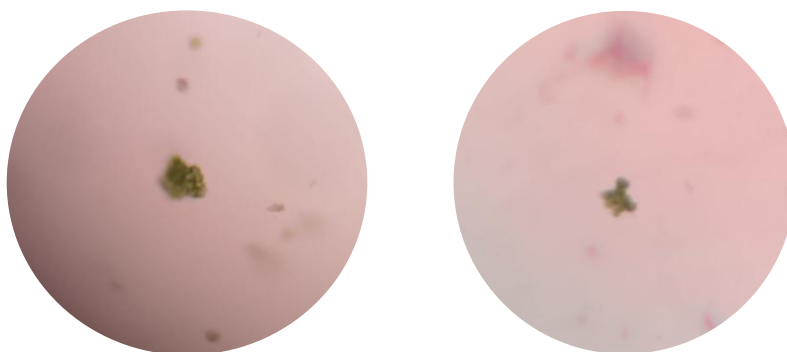


Figura 6. Desarrollo de microcallos en medio E a los 20 días del ensayo

CONCLUSIONES

La metodología desarrollada por el INTA para el aislamiento de protoplastos y su posterior regeneración de callos es posible en la variedad INIAP-Gabriela, constituyéndose en un avance para la aplicación de esta técnica y por lo tanto se perfila como un material candidato a ser modificado por edición génica. Sin embargo, es necesario concluir con la organogénesis para empezar con ensayos de transfección para evaluar la edición con la tecnología desarrollada por el INTA.

RECOMENDACIONES

Es necesario replicar la metodología para la generación de callos en la variedad INIAP-Gabriela en las condiciones de laboratorio de cultivo de tejidos de la EESC-INIAP.

REFERENCIAS

- Fossi, M., ... y Comai, L. (2019). Regeneration of *Solanum tuberosum* plants from protoplasts induces wide pread genome instability. *Plant Physiology* 180: 78-86
- González, M., Massa, G.... y Feingold S. (2020). Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via entrega de complejos de ribonucleoproteína del sistema CRISPR/Cas9. *Fuente. Ciencia de las plantas* 10:
- Meneses, S., Obaco, G. y E. Morillo. (2023). Evaluación de la regeneración *in vitro* vía organogénesis indirecta de diferentes genotipos de papa del INIAP. *En: Racines et al., Memorias X Congreso Ecuatoriano de la Papa. San Gabriel, Ecuador. pp. 65-68.*
- Nicolia, A., ... y HuaZhu, L. (2015). Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Journal of Biotechnology*. 204: 17-24.

- Obaco G. (2023). Evaluación de la capacidad de regeneración *in vitro* por organogénesis directa e indirecta de cinco genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Proyecto titulación Ing. Biot. UDLA, Quito.
- Larkin, P. (1976). Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta* 128: 213-216.
- Moon, B., y Kim, H. (2021). More Accessible, time-saving, and efficient method for *in vitro* plant regeneration from potato protoplasts. *Plants*. 10, 781.
- Radice, S. (2010). Morfogénesis pp 26-33. *En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio. 650 p.*

3. ACTIVIDADES PLANIFICADAS EN EL HITO 3

Actividades planificadas en el hito 3	
Actividad	Indicador de Resultado
P3A1: Producción de vitro plantas para producción y ensayos experimentales	Hasta Diciembre 2025 se han producido al menos 3000 vitro plantas de varios rubros para producción y ensayos de investigación
P3A2: Optimización de un protocolo de micropropagación acelerada de jícama	Hasta Diciembre del 2025 se ha validado y optimizado un protocolo para la propagación acelerada de materiales de jícama de altos contenidos de FOS
P3A3: Producción de vitro plantas irradiadas de banano	Hasta Diciembre del 2025 se han producido al menos 1500 vitro plantas de banano var. Williams a partir de explantes irradiados a 20 y 30 Gys

ACTIVIDAD P3A1: Producción de vitro plantas para producción y ensayos experimentales

Responsables:	Meneses Santiago, Morillo Eduardo
Colaboradores:	Dirección de Producción y servicios especializados Invernadero Automatizado EESD, EECA (vainilla, malanga) EETP (musáceas) UDLA, UTC (mortiño)
Proyectos que financiaron:	Gasto corriente Proyecto DAPME Proyecto mortino (UTC)
Institución donante:	Varios

ANTECEDENTES

Las biotecnologías de cultivo de tejidos son utilizadas actualmente en la gran mayoría de especies vegetales de importancia económica y tiene como propósito, multiplicar en forma masiva clones de plantas con alta producción, resistencia a enfermedades, o con cualidades para la agroindustria (Pérez, 1998). La técnica de propagación meristemática es la más utilizada y presenta las siguientes ventajas: obtención de material clonal en tiempos reducidos, mantenimiento de material libre de enfermedades sistémicas, producción de clones de difícil propagación por semilla o vegetativa, etc. (Cedres et al., 2015). El Departamento de Biotecnología con su laboratorio de cultivo de tejidos, dispone de espacios destinados al establecimiento, crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales; áreas que están reservadas para realizar investigación y producción comercial, contando con el equipamiento específico para desarrollar las actividades técnicas y de esta manera, ofrece servicios especializados en cultivo de tejidos como el establecimiento *in vitro* de material vegetal, multiplicación masiva por técnicas de micropropagación, erradicación de virus y estudios

especiales, conforme a los requerimientos de los clientes internos (apoyo a programas del INIAP) y externos al Instituto.

OBJETIVO

Dar respuesta a los requerimientos de clientes internos del Instituto en servicios de cultivo de tejidos para diversas especies vegetales.

METODOLOGÍA

INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

El material vegetal de partida en todo proceso de cultivo de tejidos es un factor importante para el éxito del establecimiento *in vitro*, es así que el estado fisiológico y la sanidad de la planta donante influirá en el desarrollo adecuado de los cultivos *in vitro*. En esta etapa se utilizaron plantas en estado de crecimiento activo, vigoroso y sano.

Plátano: Los cormos que fueron entregados al DNB por el Programa de Musaceas de la EETP, una parte se plantó en fundas plásticas y ubicó en el invernadero caliente de la EESC y la otra parte se realizó controles fitosanitarios para evitar el ataque de insectos plagas y reducir contaminantes microbianos principalmente de origen fúngico para su posterior establecimiento e introducción a condiciones *in vitro* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cormos de plátano entregado al DNB

GENOTIPO	CORMOS
Dominico Hartón	5
Barraganete	4

Para la desinfección se utilizó como explantes los cormos los que se sometieron a un lavado con agua, jabón y NaOCl al 1%. Luego se desinfectaron en una solución de fungicidas más un antioxidante (Benomil 0.5% más cisteína 0.5%) por treinta minutos. A continuación, y en cabina de flujo laminar se desinfectaron con alcohol al 70% por cinco minutos y se enjuagaron. Posteriormente se sometieron a una solución de NaOCl 2% más 5 gotas de Tween 20 por quince minutos, se enjuagaron y se sembraron los explantes en un medio de cultivo que contenía medio basal Murashigue and Skoog más vitaminas, sacarosa 3%, 6-bencilaminopurina (BAP) 6 mg.L⁻¹, ácido indolacético (AIA) 1 mg.L⁻¹, agua de coco 100 ml.L⁻¹, ácido cítrico 100 mg.L⁻¹, Gellam Gum 0.24% y se ajustó a un pH de 5.6. Los explantes se mantienen en un cuarto de cultivo con 24 horas de oscuridad, humedad relativa sobre el 60% y temperatura de 24 ± 2°C por 10 días. Posteriormente se lleva a fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad con las mismas condiciones antes mencionadas hasta completar los 28 días.

PRODUCCIÓN DE *VITRO* PLANTAS

Consiste en la producción a gran escala de un genotipo de interés empleando las técnicas de cultivo de tejidos, siendo una herramienta útil para producir plantas de calidad uniforme con una tasa de multiplicación limitada. Se realiza bajo condiciones de esterilidad en medios de cultivo artificiales y entornos controlados de temperatura, luz y humedad (Cedres et al., 2015).

Banano: Se partió de material entregado por el DNB-EELS de banano variedad William que se repico y se sembró cada 4 semas en un medio de cultivo que contenía sales minerales Murashige y Skoog con vitaminas, sacarosa 3%, 6-bencilaminipurina 4mg.L⁻¹, ácido indolacético 0.1 mg.L⁻¹, CCT 1 ml.L⁻¹, gelrite 0.25% y se ajustó a un pH de 5.8. Las *vitro* plantas se mantuvieron en un cuarto con temperatura promedio de 24±2°C, humedad relativa 40% y fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

Posteriormente las *vitro* plantas se individualizaron en un medio de cultivo para inducir el enraizamiento el cual contenía sales minerales Murashige y Skoog con vitaminas, sacarosa 3%, ácido indolacético 0.1 mg.L⁻¹, CCT 1 ml.L⁻¹, gelrite 0.25% y se ajustó a un pH de 5.8. Las plantas se mantuvieron durante 4 semanas en el cuarto de cultivo en las condiciones antes mencionadas.

Las plántulas enraizadas se adaptaron a condiciones *ex vitro*, para lo cual se utilizó como sustrato una mezcla de turba y pomina fina en relación 1:1, posteriormente se llenan bandejas de 90 pocillos y se humedecen con agua. A continuación, se retiran las *vitro* plantas con raíz y se colocan en un orificio realizado en el sustrato de cada pocillo, se regó con agua corriente y se tapan las plantas con un micro-invernadero de plástico para crear un microambiente. Se colocaron las bandejas en un sitio adaptado con alta humedad relativa y sombra en el invernadero DNB-EESC.

Naranja: En cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia y con la ayuda del material adecuado, se cortan los explantes en secciones nodales de 1 cm aproximadamente que contengan una yema y se colocan en el medio de cultivo que contenía MS con vitaminas 4.4 g.L⁻¹, sucrosa 2%, 6-bencilaminipurina (BAP) 0.5 mg.L⁻¹, ácido giberélico 3 (AG3) 2.5 mg.L⁻¹, pantotenato de calcio 2 mg.L⁻¹, agar 0.7% y pH 5.7 a razón de 2 explantes por tubo de 20 x 150 mm. Los tubos con los explantes se mantienen en cuartos de crecimiento a una temperatura de 24°C ±2, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa de 40% durante 8 semanas. Posteriormente se adaptaron a condiciones *ex vitro*, para lo cual se utilizó como sustrato turba más perlita en relación 3:1. Posteriormente, se retiran las *vitro* plantas con raíz y se colocan en un orificio realizado en el sustrato de cada vaso y se regó con agua corriente y se tapan las plantas con otro vaso de plástico para crear un microambiente. Se colocaron los vasos en un sitio adaptado con alta humedad relativa y sombra en el invernadero DNB-EESC.

Papa: En cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia y con la ayuda del material adecuado, se cortan los explantes en secciones nodales de 1 cm aproximadamente que contengan una yema y se colocan en el medio de cultivo que contenía MS con vitaminas 4.4 g.L⁻¹, sucrosa 30 g.L⁻¹, agar

0.8% y pH 5.7. Los tubos con los explantes se mantienen en cuartos de crecimiento a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa de 40%.

Vainilla: Las *vitro* plantas establecidas en el laboratorio pasaron a un medio de cultivo que contenía medio basal MS, sacarosa 3%, 6-bencilaminopurina 2.15 mg.L^{-1} , clorohidrato de L-cisteína 35 mg.L^{-1} , ácido ascórbico 150 mg.L^{-1} , carbón activado 0.2%, gelrite 0.22% y se ajustó el pH a 5.8. Se mantuvieron en cuarto de cultivo con temperatura promedio de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa 40% y fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

Después de 8 semanas las *vitro* plantas se individualizaron en un medio de cultivo para inducir el enraizamiento el cual contenía medio basal Murashigue y Skoog (0.5X), ácido naftalenacético 0.08 mg.L^{-1} , sacarosa 1.5%, gelrite 0.22% y se ajustó a pH 5.8. Las plantas se mantuvieron durante 8 semanas en el cuarto de cultivo en las condiciones antes mencionadas.

Mortño: Las *vitro* plantas establecidas pasaron a un medio de cultivo de multiplicación que contenía Woody Plant Medium (WPM) 2.3 g.L^{-1} , sucrosa 3%, TZR 0.5 mg.L^{-1} , agar 0.6% y pH 5.0 y se micropropagaron cada 8 semanas. Los tubos con los explantes se mantuvieron en cuartos de crecimiento a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una humedad relativa de 40%.

Para el enraizamiento *ex vitro* y adaptación a condiciones de invernadero, se esterilizó el sustrato (turba y perlita), posteriormente se llenan bandejas de 128 pocillos y se humedecen con agua. A continuación, se retiran las *vitro* plantas provenientes de la fase de multiplicación y se da un pulso auxínico con IBA a 500 mg.L^{-1} por cinco minutos en la parte basal de la *vitro* planta. Luego se colocan en un orificio en el sustrato, se fertiliza con fertilizante (10% N - 4% P_2O_5 - 7% K_2O) 5 ml.L^{-1} o con agua corriente y se tapan las plantas con un microinvernadero de plástico para crear un microambiente. Se colocaron las bandejas en el invernadero de DNB-EESC.

CONSERVACIÓN *IN VITRO*

La conservación *in vitro* constituye una estrategia de conservación y el intercambio de recursos genéticos. Ofrece la posibilidad de almacenar un gran número y variedad de muestras en un área reducida, garantiza la sanidad del material vegetal e incrementa la posibilidad del intercambio y propagación de los mismos. La metodología para el mantenimiento de las *vitro* plantas fue mediante medios de cultivo específicos y condiciones ambientales controladas que permitieron la conservación de genotipos de papa, naranjilla, yuca, mora, vainilla, banano, mortño y arándano. Se realizan monitoreos permanentes del material vegetal para establecer su sanidad y conservación.

MANEJO AGRONÓMICO

Mortiño: Se realizó el manejo agronómico al lote experimental de mortiño ubicado en la EESC, mismo que consistió en la limpieza de arvenses en camas bordes y caminos, formación de caminos, levantamiento de camas, cosecha de frutos, podas sanitarias y formación, plantado y fertilización.

Malanga: Parte de apoyo a los servicios de producción se elaboró un protocolo para la multiplicación de semilla de malanga partiendo de *vitro* plantas libres de virus y posteriormente sembradas en una primera fase en el invernadero automatizado del INIAP. Luego se recibió la cosecha tanto de malanga blanca y morada y se separó la semilla que presentaba la presencia de hongos o bacterias para luego ensacarlas y enviarlas a las EESD y EECA para el establecimiento de los hongos.

RESULTADOS

INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

Plátano: En el Cuadro 2, Figura 1 se muestran los resultados de las introducciones a condiciones *in vitro* de los dos genotipos de plátano.

Cuadro 2. Introducción *in vitro* de plátano. DNB-EESC, 2025

GENOTIPO	INTRODUCCIONES	EXPLANTES INTRODUCIDOS	EXPLANTES CON BROTE	EXPLANTES OXIDADOS
Dominico Hartón	2	5	2	3
Barraganete	2	3	1	2
TOTAL	4	8	3	5



A



B



C

D

Figura 1. Introducción *in vitro* de plátano Dominico Harton (derecha) y Barraganete (izquierda).
A) Explante inicial B) Desinfección C) Introducción *in vitro* D) Establecimiento *in vitro* de plátano

PRODUCCIÓN DE *VITRO* PLANTAS

En el Cuadro 3, se muestra la producción de *vitro* plantas realizada durante el 2025 y los beneficiarios de este servicio.

Cuadro 3. *Vitro* plantas entregadas como servicios internos en el 2024. DNB-EESC, 2025

CULTIVO	REQUIRIENTE	<i>VITRO</i> PLANTAS
Arándano/Biloxi	Ensayo investigación G. Obaco (UDLA)	26
Papa/diversos genotipos	Ensayos crioconservación/DENAREF	100
Papa/Superchola	Ensayo Jhonny Moreta (IS 17 julio)	200
Papa/Chaucha amarilla	Ensayo E. Peña (USFQ)	50
Naranja/chaucha amarilla	Ensayo investigación J. Ochoa DNPV	60
Papa/diversos genotipos	Ensayos de validación/PNRT; IA-INIAP	350
Papa/Superchola	Producción/IA-INIAP	200
<i>Vitro</i> plantas/diversos genotipos	Ensayos investigación DNB-INIAP	246
Vainilla/diversos genotipos	Ensayos investigación EECA-INIAP	40
Banano/Williams	Producción/DAPME (producción)	1500
Mortiño/Pedregal bote y semilla	Producción/UTC (ensayos)	1000
TOTAL		3772

En el cuadro 4 se muestran las especies vegetales conservadas *in vitro* que pertenecen al banco activo del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del DNB.

Cuadro 4. Banco *in vitro* activo del DNB

ESPECIE VEGETAL	ACCESIONES CONSERVADAS	MONITOREOS
Papa	88	5
Mora	8	4
Mortiño	12	4
Arándano	2	4
Tomate de árbol	9	2
Banano	4	2
Vainilla	7	4
Naranjilla	8	5
Yuca	10	4
TOTAL	148	38

MANEJO AGRONÓMICO: Durante el 2025 se realizó el manejo agronómico del lote de mortiño por trece ocasiones mismas que consistieron en el levantamiento de camas, limpieza y retiro de arvenses de camas y caminos, podas sanitarias y de formación, cosecha de frutos, plantado y fertilización (Figura 2).

En el Cuadro 5, se muestra los resultados de la cosecha de frutos del lote de mortiño.

Cuadro 5. Cosecha de mortiño. DNB-EESC, 2025

CAMA	COSECHA				TOTAL	
	1	2				
	Peso (g)	Frutos (No.)	Peso (g)	Frutos (No.)	Peso (g)	Frutos (No.)
1	0.27	1	229.50	765	229.77	766
2	10.69	35	416.92	1389	427.61	1424
3	34.15	177	269.85	899	304.00	1076
4	29.05	123	40.80	136	69.85	259
5	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n
6	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n	s/n
TOTAL	74.16	336	957.07	3189	1031.23	3525



Figura 2. Manejo agronómico realizado en el lote de mortío. DNB-EESC, 2025.

CONCLUSIONES

El establecimiento de los genotipos de las diferentes especies vegetales a condiciones *in vitro* permitirá continuar con las actividades de los programas de investigación del DNB y otras áreas requerientes del servicio.

La demanda de clientes internos y apoyo a investigaciones para la multiplicación de *in vitro* plantas fue respondida garantizando la calidad fitosanitaria requerida.

La conservación del material vegetal garantiza la sanidad del material vegetal e incrementa la posibilidad del intercambio y propagación para los servicios requeridos.

RECOMENDACIONES

Establecer y mantener los diversos genotipos en cantidades suficientes para atender la demanda de los programas y departamento del INIAP para que sean utilizados en el establecimiento de ensayos experimentales y producción de plantas.

REFERENCIAS

- Cedres, M., . y Gugole, F. (2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad De La Plata.
- Estrella, J. E., & Lazarte, J. E. (1994). In vitro propagation of jícama (*Polymnia sonchifolia* Poeppig & Endlicher): A neglected Andean crop. HortScience, 29(4), 331.
- Pérez, J. (1998). Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. ed., Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 400p
- Valero, A. (2017). Introducción a condiciones *in vitro* y análisis cualitativo de componentes fitoquímicos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Et Endl) [Tesis de pregrado]. Universidad El Bosque. Bogota, Colombia.

ACTIVIDAD P3A2: Optimización de un protocolo de micropropagación acelerada de jícama

Responsables:	Morillo Eduardo, Meneses Santiago
Colaboradores:	Páez Rodrigo
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Ensayo de validación y optimización de un protocolo para la propagación <i>in vitro</i> de jícama
Institución donante:	Gasto corriente/Empresa Privada- R. Páez
Número de memorando:	INIAP-EESC_DIR-2024-1508-MEM

ANTECEDENTES

La jícama, es una planta herbácea perenne que se encuentra en estado silvestre o cultivada desde los 2000 a 3100 msnm en las zonas andinas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina (de Almeida Paula et al., 2015; Seminario et al., 2003). Tiene compuestos bioactivos en las hojas (ácidos fenólicos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas) y sistema radicular (antioxidantes, fructoligosacáridos-FOS, fructosa, glucosa y sacarosa) que le confieren propiedades antioxidantes, antimicrobianas, hipolipidémicas, antidiabéticas e incluso anticancerígenas por lo que es considerado un alimento funcional (Kiszcak et al., 2022; Minchola-Castañeda et al., 2022). Estas propiedades le atribuyen un enorme potencial para convertirse en un cultivo valioso para los agricultores (Seminario et al., 2003). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se perfilan como una alternativa para la propagación comercial, fomentando su acceso y expansión del cultivo para productores que requieran diversificar su producción agrícola en las zonas interandinas del país.

Este proyecto estudió alternativas para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de jícama. Para este fin, se evaluó la respuesta del material vegetal a tecnologías de introducción *in vitro* y micropropagación en medios semisólidos. Posteriormente, se evaluó la respuesta a la fase de adaptación del material obtenido a condiciones *ex vitro*.

OBJETIVOS

General

Establecer *in vitro* materiales promisorios de jícama para evaluar y optimizar sus coeficientes de micropropagación.

Específicos

1. Comparar dos protocolos de introducción de jícama a condiciones *in vitro*.
2. Evaluar tres reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de jícama.
3. Evaluar dos sustratos para la adaptación en condiciones *ex vitro* de *in vitro* plantas de jícama.

METODOLOGÍA

Se utilizó la metodología de organogénesis directa la cual consiste en la formación de un nuevo órgano (brote vegetativo), a partir de zonas meristemáticas totipotentes (yemas apicales, laterales, meristemos) (George et al., 2008). Para el caso de la jícama se utilizó la corona de las raíces con zonas meristemáticas de dos accesiones del banco de germoplasma del DENAREF.

INTRODUCCIÓN *IN VITRO*: Se consideró materiales de jícama con alta productividad y contenido de FOS de acuerdo a Morillo (1998) y Balladares & Través (2009). Los colinos de dos accesiones de jícamas (G) del banco de germoplasma del DENAREF (ECUs 1237 y 9109), se establecieron en invernadero para el respectivo control fitosanitario (Anexo 1). Para los ensayos de introducción, los explantes (yemas laterales) se sometieron a desinfecciones (PD) con agentes químicos para su esterilización y posteriormente se cultivó en un medio de cultivo para su establecimiento *in vitro* de acuerdo al tratamiento en estudio (Cuadro 1). El material se mantuvo en cuarto de crecimiento y se evaluó su respuesta a los 30 días.

Cuadro 1. Tratamientos para el ensayo del establecimiento *in vitro* de clones promisorios de jícama

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
T1	PD1G1	Protocolo Estrella y Lazarte, 1994 + ECU 9109
T2	PD1G2	Protocolo Estrella y Lazarte, 1994 + ECU 1237
T3	PD2G1	Protocolo Valero, 2017 + ECU 9109
T4	PD2G2	Protocolo Valero, 2017 + ECU 1237

Unidad experimental: La unidad experimental para la introducción consistió en 10 explantes cultivados en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con 5 ml de medio de cultivo de introducción compuesto por medio basal MS, sacarosa 3%, 6-bencilaminopurina 1 mg.L-1, ácido indolbutírico 0.1 mg.L-1, agar 0.8% y pH 5.7 (Estrella y Lazarte, 1994). Los explantes se mantuvieron en un cuarto de cultivo con condiciones controladas de temperatura 20 ±2°C, humedad relativa 40%, fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad.

Diseño experimental y análisis de datos: Se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 10 observaciones. Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2).

Cuadro 2. ADEVA para el ensayo del establecimiento *in vitro* de clones promisorios de jícama

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	39
Tratamiento	3
Protocolo de desinfección (PD)	1
Genotipo (G)	1
PD x G	1
Error experimental	36

Variables y métodos de evaluación:

Sobrevivencia: Se estableció mediante relación entre el número de brotes vivos y el número total de explantes introducidos, la observación se realizó a los 30 días.

Contaminación: Se estableció mediante relación entre el número de explantes con problemas de contaminación microbiana y el número total de explantes introducidos, la observación se realizó a los 30 días.

Oxidación: Se estableció mediante relación entre el número de explantes con problemas de oxidación y el número total de explantes introducidos, la observación se realizó a los 30 días.

PROPAGACIÓN *IN VITRO*: En cámara de flujo laminar y con el instrumental esterilizado se realizaron repiques del ECU-1237 de la fase de introducción para disponer de la cantidad requerida de *vitro* plantas para el ensayo de multiplicación (Anexo 2). Los explantes se mantuvieron en cuarto de cultivo con condiciones controladas antes descritas durante 30 días. A las cuatro semanas las plántulas se cortaron en secciones nodales de ocho mm de longitud aproximadamente rescatando las yemas laterales, y se colocaron en medio basal MS (sin vitaminas), sacarosa 3%, agar 0.8%, pH 5.7 y los reguladores de crecimiento en estudio (RC) (Cuadro 3). La evaluación de las variables en estudio se realizó a los 30 días posteriores al repique.

Cuadro 3. Tratamientos para del ensayo de propagación *in vitro* de jícama

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
T1	RC1	BAP (2.5 mg.L ⁻¹)
T2	RC2	TDZ (1.0 mg.L ⁻¹)
T3	RC3	AG3 (0.3 mg.L ⁻¹)
T4	RC4	Control (sin hormona)

Unidad experimental: La unidad experimental para la propagación *in vitro* consistió en 12 yemas laterales provenientes de *vitro* plantas que fueron cultivados en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con 5 ml de medio de cultivo de multiplicación en estudio. Cada observación se constituyó por el promedio de 2 yemas obteniendo un total de 6 observaciones por cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis de datos: Se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 6 observaciones. Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. ADEVA para ensayo de la propagación *in vitro* de jícama

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	23
Reguladores de crecimiento (RC)	3
Error experimental	20

Variables y métodos de evaluación:

Número de brotes: Se contabilizó la formación de brotes en los explantes introducidos, la observación se realizó a los 30 días. Los contejes se promediaron y se expresaron en número de brotes.

Longitud de brote: Se registró a los 30 días, utilizando papel milimetrado, midiendo desde la base del brote hasta meristemo apical. Las mediciones se promediaron y se expresaron en mm.

Coefficiente de multiplicación: Es el cociente de dividir el número de brotes vivos obtenidos a los 30 días para el número de explantes cultivados al inicio del ensayo. Las mediciones se promediaron y se expresaron en brotes explante⁻¹ según el siguiente cálculo:

$$CM = \frac{BV}{TEC}$$

Dónde:

CM= Coeficiente de multiplicación

BV= Número de brotes vivos

TEC= Total de explantes cultivados

ADAPTACIÓN EX VITRO: La adaptación *ex vitro* consistió en crear condiciones adecuadas como humedad relativa, temperatura, luz, CO₂, recipientes y sustrato para promover que las plantas *in vitro* adquieran la habilidad fotosintética y puedan desarrollarse autotróficamente. Para esta fase experimental se utilizó 40 *in vitro* plantas de jícama (ECU-1237) micropropagadas en el laboratorio provenientes de la fase de estudio anterior y se evaluó la respuesta a dos sustratos (S) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos para del ensayo de la adaptación *ex vitro* de jícama

TRATAMIENTO	CODIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
T1	S1	Turba
T2	S2	Turba + perlita (1:1)

Unidad experimental: La unidad experimental para la adaptación *ex vitro* consistió en 20 *in vitro* plantas por cada tratamiento que se cultivaron en vasos plásticos de 10 onzas con que contenía el sustrato en estudio. Posteriormente fueron tapadas con otro vaso plástico de 9 onzas para crear un microclima de alta humedad relativa. Cada observación se obtuvo del promedio de cuatro *in vitro* plantas con un total de cinco observaciones por cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis de datos: Se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco observaciones. Se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% para las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas (Cuadro 6).

Cuadro 6. ADEVA para ensayo de la adaptación *ex vitro* de jícama

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	9
Sustratos (S)	1
Error experimental	8

Variables y métodos de evaluación:

Sobrevivencia: Se estableció mediante relación porcentual entre el número de plantas vivas y el número total de plantas sembradas, la observación se realizó a los 30 días.

Longitud de planta: Se determinó mediante la diferencia entre la longitud de la planta a los 30 días después de la siembra (DDS) menos la longitud al inicio del ensayo. La distancia se estableció desde la base del tallo hasta la yema apical de la planta utilizando una regla metálica graduada. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm.

Numero de raíces: El conteo se realizó mediante observación determinando el número de raíces por planta. Se registró como número de raíces por planta.

Longitud de raíz: Se registró a los 30 días, utilizando una regla metálica graduada, midiendo desde la base del brote hasta zona apical de la raíz. Las mediciones se promediaron y se expresaron en cm.

RESULTADOS

INTRODUCCIÓN *IN VITRO*: En el ADEVA (Cuadro 7) los valores de F inferiores a 0,05 indican que existen diferencias en las variables evaluadas. Para protocolos de desinfección (PD) se observan diferencias significativas para la variable contaminación y oxidación; para sobrevivencia y brotes viables no se muestran diferencias. Para el genotipo (G) en todas las variables evaluadas no se observan diferencias significativas. Además, en la interacción PD x G para la sobrevivencia y contaminación se observa diferencias significativas, al contrario de la oxidación y brotes viables no presentan significación estadística.

Cuadro 7. ADEVA para el ensayo de introducción y establecimiento *in vitro* de jícama

Fuente variación	Grados libertad	Pr(>F)			
		Sobrevivencia	Contaminación	Oxidación	Brotes
Total	39				
Tratamientos	3				
Protocolo de desinfección (PD)	1	0.47 ^{ns}	1.00e ^{-4**}	1.5e ^{-3**}	0.70 ^{ns}
Genotipo (G)	1	0.15 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.06 ^{ns}
PD x G	1	7.00e ^{-4**}	1.00e ^{-4**}	0.99 ^{ns}	0.26 ^{ns}
Error Experimental	36		36		
Promedio general		1.17	1.17	1.08	1.09
√x+1					
CV		15.08%	12.03%	13.84%	15.45%

Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 15.08, 12.03, 13.84 y 15.45% para la sobrevivencia, contaminación, oxidación y brotes viables respectivamente, que para este tipo de ensayos son aceptables. Las pruebas de significación y comparación de medias para las cuatro variables en el estudio de la introducción y establecimiento *in vitro* de la jícama se muestran en la Cuadro 8. Para protocolos de desinfección, se identifican dos rangos de significación para contaminación y oxidación, en tanto que, para sobrevivencia y brotes viables no existen diferencias. Para el factor genotipo, en todas las variables en estudio no se identifican rangos de significación. Para la interacción PD x G, se reconocen tres rangos de significación en la variable sobrevivencia y dos para contaminación. Para oxidación y brotes viables no se identifican diferencias estadísticas. El análisis detallado de los resultados obtenidos en las pruebas de significación de cada una de las variables se describe en los factores en estudio que se presentan a continuación.

Cuadro 8. Prueba de significancia y medias - introducción y establecimiento *in vitro*

FACTORES	DESCRIPCIÓN	SOBREVIVENCIA (número)	CONTAMINACIÓN (número)	OXIDACIÓN (número)	BROTES VIALES
PD	PD1	1.14	1.27 b	1.00 a	1.08
	PD2	1.18	1.06 a	1.16 b	1.10
G	9190	1.21	1.12	1.08	1.14
	1237	1.12	1.21	1.08	1.04
PD x G	PD1 + 9109	1.29 a	1.12 a	1.00	1.16
	PD1 + 1237	1.00 b	1.41 b	1.00	1.00
	PD2 + 9109	1.12 ab	1.12 a	1.16	1.12
	PD2 + 1237	1.25 a	1.00 a	1.16	1.08

Nota: Medias sin letra no son significativamente diferentes. Datos transformados √x+1

Protocolos de desinfección (PD): Los protocolos de desinfección incidieron poco en el establecimiento *in vitro* de los genotipos de jícama por el uso de los desinfectantes a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los explantes para la eliminación de microorganismos. Se observó que con el método PD1 se obtuvo una mayor contaminación (1.27) y una menor oxidación (1.00). Con el método PD2 se obtuvieron resultados con un rango estadístico diferente para el ECU-9109 en la variable sobrevivencia, pero que no incide mayormente en el establecimiento de material de jícama.

Genotipo (G): Los resultados manifiestan que no hay diferencias estadísticas con respecto a las dos accesiones promisorias de jícama, sin embargo las medias obtenidas indican que la accesión ECU-9109 respondió de mejor forma al establecimiento *in vitro* obteniéndose una mayor sobrevivencia (1.21), menor contaminación (1.12) y un mayor número de brotes viables (1.14).

PD x G: En cuanto a la interacción de los factores protocolos de desinfección y genotipo se detectaron diferencias, se observó que el método PD1 y el genotipo 9109 y PD2 y el genotipo 1237 logran las mejores respuestas para el factor sobrevivencia (1.29 y 1.25 explantes respectivamente); y una menor contaminación que ayuda a su establecimiento *in vitro* (1.12 y 1.00 explantes respectivamente). Además, con el método PD1 y el genotipo 9109 se obtuvo un mayor número de brotes (1.16). En el Anexo 1 se muestra el estado del material (ECU-1237 y ECU-9109) establecido *in vitro* con los dos protocolos de introducción.

PROPAGACIÓN IN VITRO: En el análisis de Varianza-ADEVA (Cuadro 9) los valores de F inferiores a 0,05 indican que existen diferencias en las variables evaluadas. Para los reguladores de crecimiento (RC) se observan diferencias significativas para las variables número de brotes, longitud de brote y coeficiente de multiplicación.

Cuadro 9. ADEVA para el ensayo de micropropagación de jícama a los 30 días

Fuente de variación	Grados de libertad	Pr(>F)		
		Número de brotes	Longitud de brote	Coeficiente de multiplicación
Total	23			
Reguladores de crecimiento (RC)	3	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Error Experimental	20			
Promedio general				1.73 brotes.explante ⁻¹
Promedio general vx+1		1.62 brotes	2.34 mm	

Los coeficientes de variación para las variables número y longitud de brotes fueron de 11 y 14.66 % respectivamente.

Las pruebas de significación y comparación de medias para las tres variables en estudio de la micropropagación se muestran en la Cuadro 10.

Cuadro 10. Prueba de significancia y medias obtenido a los 30 días de evaluación

FACTOR	DESCRIPCIÓN	No. BROTES (brote)	LONGITUD BROTE (mm)	CM (brote.explante ⁻¹)
RC	BAP	2.03 a	2.43 b	3.17 a
	TDZ	1.22 c	1.24 c	0.50 c
	AG3	1.58 b	2.47 b	1.50 bc
	Control	1.65 b	3.24 a	1.75 b

Los reguladores de crecimiento muestran tres rangos de significación estadísticas para las variables número y longitud de brotes, en tanto que, para el coeficiente de multiplicación se observan cuatro rangos de significación. El análisis de los resultados obtenidos en las pruebas de significación de cada una de las variables se describe a continuación.

Reguladores de crecimiento (RC): Las dosis recomendadas incidieron de diferente forma en la proliferación de brotes. Se observó que la citoquinina BAP a 2.5 mg.L⁻¹ incidió en la división celular, promoviendo el crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes, observándose la mejor respuesta para el número de brotes y coeficiente de multiplicación (2.03 brotes y 3.17 brotes.explante⁻¹ respectivamente). Para la variable longitud alcanzó 2.43 mm de longitud que corresponde al segundo rango de significación estadística. Esta respuesta se debe a que esta citoquinina tiene efectos en los procesos que inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical (Cedres et al., 2015). En el Anexo 2 se muestra el estado del ECU-1237 propagado en los tres medios.

ADAPTACIÓN EX VITRO: En el análisis de Varianza-ADEVA (Cuadro 11) los valores de F inferiores a 0,05 indican que existen diferencias en las variables evaluadas. Para los sustratos (S) se observan diferencias significativas para la longitud de planta y raíz

Cuadro 11. ADEVA para el ensayo de adaptación *ex vitro* de jícama a los 30 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Pr(>F)			
		Sobrevivencia	Longitud de planta	Número de raíces	Longitud de raíz
Total	9				
Sustrato (S)	1	0.00	0.0006**	0.7404	0.0201*
Error	8				
Experimental					
Promedio general		100 %	2.02 cm	6.85 raíces	4.48 cm
CV (%)		0	21.32	13.46	10.68

Los coeficientes de variación para las variables sobrevivencia, longitud de planta, número de raíces y longitud de raíz fueron de 0.00, 21.32, 13.46 y 10.68 % respectivamente que para este tipo de ensayos se consideran aceptables.

Las pruebas de significación y comparación de medias para las tres variables en estudio de la adaptación *ex vitro* se muestran en la Cuadro 12.

Cuadro 12. Prueba de significancia y medias obtenido a los 30 días de evaluación.

FACTOR	DESCRIPCIÓN	SOBREVIVENCIA (%)	LONGITUD DE PLANTA (cm)	NÚMERO RAÍCES (raíz)	LONGITUD RAÍZ (cm)
S	Turba	100	1.27 b	6.95	4.04 b
	Turba + Perlita	100	2.78 a	6.75	4.92 a

Nota: Medias sin letra no son significativamente diferentes.

Los sustratos muestran dos rangos de significación estadísticas para las variables longitud de planta y raíz. El análisis de los resultados obtenidos en las pruebas de significación de cada una de las variables se describe a continuación.

Sustratos (S): Los sustratos evaluados incidieron de diferente forma en el desarrollo y crecimiento de la planta y raíces. Se observó que el uso del sustrato compuesto por turba más perlita (S2) permite mayor crecimiento de vegetal (2.78 cm) y del sistema radicular (4.92 cm) comparado con el uso de solo turba (S1), lo que evidencia que existe una correlación entre la vitalidad de las plantas sometidas a la aclimatación y la composición del sustrato que se manifiesta en el desarrollo de la planta y raíces (Hidalgo et al., 2009). El uso de un sustrato con buena proporción volumétrica, liviano, poroso, con buen drenaje, aireación suficiente y capacidad de retención de agua optimizará las condiciones de adaptación para obtener plantas mejor desarrolladas (Cedres et al., 2015; Efraín Gil Rivero et al., 2017). En el Anexo 3 se muestra el estado del material (ECU-1237) adaptado en los dos sustratos evaluados.

COSTOS DE PRODUCCIÓN

La estimación de los costos de producción se realizó para el número de plantas originadas del mejor tratamiento durante el tiempo de evaluación, para lo cual, se tomaron en cuenta los costos de los insumos directos, materiales de laboratorio, insumos de laboratorio, equipos del laboratorio, servicios básicos, infraestructura y mano de obra. Se determinó el valor de planta *in vitro* y preadaptación a condiciones de invernadero, para lo cual se tomó en cuenta la metodología de

análisis de costos de producción y servicios que se utiliza en el INIAP acorde a las actividades que implican el proceso de producción (Cuadro 13).

Cuadro 13. Costos de producción de planta *in vitro* y preadaptación de jícama

PLANTA <i>IN VITRO</i>	
ACTIVIDAD	COSTO POR <i>VITRO</i> PLANTA (USD)
Esterilización de materiales e instrumental	0.031
Elaboración de medio de cultivo	0.093
Micropropagación	0.191
Actividades técnico-administrativos	0.004
Infraestructura	0.017
Servicios básicos	0.017
SUBTOTAL	0.35
PREADAPTACIÓN	
Esterilización de sustrato	0.120
Siembra de plántulas	0.109
Infraestructura	0.017
Servicios básicos	0.017
SUBTOTAL	0.26
TOTAL	0.61

CONCLUSIONES

- Fue posible establecer un protocolo de propagación *in vitro* el material vegetal de jícama que permita la propagación comercial para la expansión del cultivo para productores.
- Los dos protocolos ensayados para la desinfección e introducción de explantes de las dos accesiones de jícama resultaron efectivos. No se determinaron diferencias estadísticas significativas entre los dos métodos, aunque se obtuvo una pequeña variación en la interacción entre genotipo y sobrevivencia que no es relevante para el proceso.
- Existieron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos en estudio, observándose los mejores resultados con el tratamiento T1 (BAP a 2.5 mg.L⁻¹). Este medio es por tanto efectivo en la proliferación de brotes (2.03 brotes) y el mejor coeficiente de multiplicación obtenido (3.17 brotes explante⁻¹) en comparación con los otros dos reguladores de crecimiento evaluados.
- Se registraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en estudio para la fase de adaptación. Se observó un mayor crecimiento de planta (2.7 cm) y un mejor sistema radicular (4.92 cm) con el sustrato S2 (turba más perlita en relación 1:1).

- El costo de producción de una *vitro* planta de jícama es de 0.35 USD y el costo de la adaptación a condiciones de invernadero es de 0.26 USD obteniendo un costo total de planta de jícama adaptada de 0.61USD.

RECOMENDACIONES

El uso de esta tecnología es recomendable para la producción eficiente de plantas de jícama de alto contenido de FOS en busca de fomentar su acceso al material vegetal y la expansión del cultivo.

REFERENCIAS

- Balladares Oña, M. H., & Trávez Castellano, B. R. (2009). Evaluación de seis morfotipos (ecu-1247, ecu-1251, ecu-9109, ecu-12767 del banco germoplasma del INIAP; Sanbuenaventura y Loco) de Jícama (*Smallanthus sonchifolius* poep. &. endl) con tres fertilizaciones de fondo en San José Pichul–Cotopaxi.
- Cedres, M., C., y Gugole, F. (2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Universidad De La Plata.
- De Almeida Paula, Luces Fortes Ferreira, C. L. (2015). Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*): A Food with Multiple Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1), 32–40.
- Efraín Gil Rivero, A., Eloy López Medina, S., & López Zavaleta, A. (2017). Acclimation of *in vitro* seedlings of *Saintpaulia ionantha* H.Wendl. (Gesneriaceae) 'African violet' to greenhouse condition." *Arnaldoa*, 24(1), 343–350.
- Estrella, J. E., & Lazarte, J. E. (1994). *In vitro* propagation of jícama (*Polymnia sonchifolia* Poeppig & Endlicher): A neglected Andean crop. *HortScience*, 29(4), 331.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. De. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Kiszcza, W., ..., & Górecka, K. (2022). Elaboration of micropropagation system of medicinal plant yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. H. Rob.). *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 21(1), 131–141.
- Morillo, E. (1998). Análisis de polimorfismo en las colecciones de jícama (*Polymnia sonchifolia* P & E) y miso (*Mirabilis expansa* R & P.) del banco de germoplasma del INIAP. Tesis Lic. C. Biol. PUCE, Quito, Ecuador.
- Minchola-Castañeda, .. J., Morales-Ibañez, F., & Gil-Reyes, W. (2022). Propiedades beneficiosas del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en la salud. *Más Vida*, 4(3), 87–98.
- Seminario, J., Valderrama, M., & Manrique, I. (2003). El Yacon Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio (Centro Int).
- Valero, A. (2017). Introducción a condiciones *in vitro* y análisis cualitativo de componentes fitoquímicos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Et Endl) [Universidad El Bosque].

ACTIVIDAD P3A3: Producción de vitro plantas irradiadas de banano

Responsable:	Meneses Santiago; Morillo Eduardo
Colaboradores:	Vera Georgina, Vera Danilo, Quiala Elisa, Vera Edison (EPN)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Strengthening national capacities for the development of bananas resistant to their main diseases (ECU5034)
Institución donante:	Organismo internacional de energía atómica (IAEA)
Número de memorando	INIAP-EESC_DIR-2025-1001-MEM

ANTECEDENTES

La variabilidad genética en algunos cultivos como el banano es limitada dificultando el desarrollo de métodos convencionales de mejoramiento genético, que garantice la obtención de resistencia a enfermedades y conservar su calidad. Las técnicas de mutagénesis inducida son una alternativa para generar variabilidad genética que permita obtener materiales con características favorables (Jankowicz-Cieslak y Ingelbrecht, 2022).

Los problemas fitosanitarios más importantes que aquejan al cultivo en Ecuador son la Sigatoka Negra y el Moko causando grandes pérdidas en la producción que tienen repercusiones socioeconómicas en las zonas bananeras (Ramírez et al., 2020; Ricardo, 2021). Al no tener variedades completamente resistentes, los métodos de propagación *in vitro* en banano son útiles para el mejoramiento genético por mutación, la cual consiste en aislar las yemas emergentes que se inducen a mutagénesis física por radiación gamma Co60. Esta tecnología ha logrado avances significativos en el cultivo de banano que incluyen mutantes tolerantes a Fusarium (Jankowicz-Cieslak y Ingelbrecht, 2022). EMBRAPA usa mutagénesis como una herramienta viable para generar fuentes de resistencia genética en banano, determinando útil la metodología para el mejoramiento genético. En el marco del proyecto ECU5034 el INIAP irradió banano Williams replicando las metodologías de EMBRAPA enfocado a buscar resistencia a moko y sikatoka.

OBJETIVOS

General

Evaluar la regeneración de *vitro* plantas a partir del microcormos irradiados de banano variedad Williams.

Específicos

1. Evaluar la regeneración de microcormos de banano var. Willimas irradiados en dosis de 20 y 30 Gys de rayos gamma.
2. Evaluar la preadaptación de *vitro* plantas irradiadas en dosis de 20 y 30 Gys en M1V3 a condiciones de invernadero.

METODOLOGÍA

Se utilizó la metodología de organogénesis directa la cual consiste en la formación de un nuevo órgano (brote vegetativo), a partir de zonas meristemáticas totipotentes (yemas apicales, laterales, meristemos) (George et al., 2008). Para el caso del banano se utilizó microcormos procedentes de *vitro* plantas ya establecidas en el laboratorio de 30 días de edad.

Micropropagación: En una cámara de flujo laminar y con el instrumental esterilizado se retiraron las *vitro* plantas de banano, se cortaron retirando el tejido foliar y las raíces hasta obtener los microcormos de 10 mm de longitud aproximadamente, luego se colocaron en los medios de cultivo de multiplicación. Los explantes se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad y una humedad relativa del 40%. En esta etapa se utilizaron plantas *in vitro* de banano en repique número 4.

Irradiación: Se irradiaron microcormos de banano los cuales se colocaron en cajas Petri con papel filtro humedecido con agua estéril para evitar deshidratación. Posteriormente se trasladaron al irradiador de la EPN para ser tratadas con el nivel de radiación gamma recomendado (20 y 30 Gys). Se irradiaron 20 explantes por caja alcanzando a 950 explantes por cada dosis de irradiación gamma dando un total de 1900 expantes irradiados.

Siembra de explantes irradiados: Una vez irradiados los explantes, se realizó el corte del microcormo en cabina de flujo laminar, los cuales se sembraron en medio de cultivo MS suplementado con 4 ml.L^{-1} de BAP, 0.1 mg.L^{-1} de ácido indolacético (AIA), 3% de sucrosa, 0.25% de gelrite y pH 5.8. Los tratamientos se mantuvieron en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad, humedad relativa de 40% y una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Multiplicación y desagregación de quimeras: Cuando las *vitro* plantas se desarrollaron hasta observar las primeras hojas verdaderas, aproximadamente a los 30 días, se realizaron la multiplicación M1V1. El procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar y se sembraron en el medio antes descrito. Después de cumplidos los 30 días y verificado su desarrollo se realizó nuevamente la multiplicación de los brotes hasta llegar a la M1V3 para la disolución de quimeras. Las quimeras surgen por mutaciones que ocurren en una o más capas celulares durante el desarrollo del meristemo, lo que da lugar a individuos compuestos por células con al menos dos tipos de ADN diferentes. Este fenómeno no es deseable en la mutagénesis aplicada a los cultivos

vegetales *in vitro* por su origen multicelular lo que origina que se presente en alta frecuencia y para disociarlos es necesario aislar los meristemas y dividirlos en dos partes mediante un corte longitudinal, lo que, en la mayoría de los casos, da lugar a la generación de dos plantas hijas permitiendo la recuperación de los explantes y este procedimiento se repite tres veces (Geier, 2012; Jankowicz-Cieslak y Ingelbrecht, 2022).

En cada fase de multiplicación se evaluarán las variables en estudio para identificar si existen cambios visibles atribuibles a las irradiaciones. Se segregarán las quimeras en los repiques. Los explantes se mantendrán en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad, humedad relativa de 40% y una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Enraizamiento y pre adaptación: Una vez obtenido las plantas M1V3 se colocaron en un medio para la inducción de raíces que tendrá MS suplementado con 0.1 mg.L^{-1} de AIA, 3% de sucrosa, 0.25% de gelrite y pH 5.8. Los explantes se mantuvieron en las condiciones del cuarto de cultivo antes mencionadas. Luego se pre adaptaron en invernadero para su evaluación.

RESULTADOS

Micropropagación: Se logró establecer *vitro* plantas de banano variedad Williams superior a 2500 de las que se rescataron 1900 microcormos que se utilizaron para las irradiaciones en las dos dosis evaluadas (Figura 1).



Figura 1. A) *Vitro* plantas de banano var. Williams **B)** Microcormos de banano para irradiación

Irradiación: Se indujo a mutagénesis física por radiación gamma Co60 a microcormos de banano tomando en cuenta los estudios de dosimetría que recomiendan la dosis de 30 Gy (Jankowicz-Cieslak y Ingelbrecht, 2022). Por experiencia del programa de mejoramiento de banano que

manejo EMBRAPA se incluyó trabajar con la dosis de 20 Gy, mismas que se llevaron a cabo en el irradiador de la EPN (Cuadro1).

Cuadro 1. Irradiaciones y microcormos sometidos a dos dosis de radiación gamma Co60.

IRRADIACIÓN	FECHA DE IRRADIACIÓN	No. MICROCORMOS	DOSIS
1	11/03/2025	50	20 Gy
2	02/04/2025	300	
3	11/06/2025	300	
4	13/08/2025	300	
1	11/03/2025	50	30 Gy
2	15/05/2025	300	
3	16/07/2025	300	
4	17/09/2025	300	

Siembra de explantes: Las dosis recomendadas de radiación gamma Co60 en banano incidieron en la oxidación y sobrevivencia de los microcormos irradiados como se muestran en el (Cuadro 2). Para la variable oxidación para las dosis 20 y 30 Gy se obtuvo en promedio 11.50 y 8.17 % respectivamente que observando que la radiación tuvo un efecto sobre el material vegetal dado que en las plantas control no se observa oxidación. En tanto que el mayor porcentaje de sobrevivencia comparadas las dos dosis de estudio se logró con 30 Gy con el 91.84 %. Estos datos concuerdan con lo expuesto por Jankowicz-Cieslak y Ingelbrecht (2022) quienes mencionan que uno de los requisitos críticos para el éxito del mejoramiento por mutación es la determinación de la dosis óptima del mutágeno, existiendo una fuerte correlación entre el genotipo y la sensibilidad del material vegetal a los tratamientos mutagénicos. Las dosis altas pueden generar mutaciones graves, aberraciones cromosómicas daño celular y la muerte del explante y las dosis optimas inducen el desarrollo de los explantes y procuran una tasa de supervivencia del 40-60 % dependiendo de la sensibilidad del material vegetal.

Cuadro 2. Promedios de las variables en estudio a los 30 días

IRRADIACIÓN	M1V1 (20 Gy)		M1V1 (30 Gy)	
	Oxidación	Sobrevivencia	Oxidación	Sobrevivencia
1	12.00	88.00	4.00	96.00
2	8.00	92.00	3.33	96.67
3	7.33	92.67	6.33	93.67
4	18.67	81.33	19.00	81.00
Promedio	11.50	88.50	8.17	91.84
Control (sin irradiar)	0	100	0	100

Enraizamiento y pre adaptación

La pre adaptación *ex vitro* consistió en crear condiciones adecuadas como humedad relativa, temperatura, luz, CO₂, recipientes y sustrato para promover que las plantas *in vitro* adquieran la habilidad fotosintética y puedan desarrollarse autotróficamente. Al momento se ha realizado la adaptación de los lotes de planta correspondientes a la primera y segunda irradiación de ambas dosis, obteniendo porcentajes de sobrevivencia superiores al 99% similares a los resultados del control (Cuadro 3, Figura 2), mostrando que las plantas provenientes de las irradiaciones trascurrido los tres repiques de segregación de quimeras se comportan igual que una planta sin irradiar.

Los lotes de plantas *in vitro* de la tercera y cuarta irradiación de las dos dosis en estudio se encuentran en proceso de segregación de quimeras y en enraizamiento respectivamente, por lo que continúa las actividades hasta terminar con la fase de preadaptación.

Cuadro 3. Preadaptación de material irradiado de banano var. Williams

IRRADIACIÓN	M1V1 (20 Gy) Sobrevivencia	M1V1 (30 Gy) Sobrevivencia
1	100.00	98.00
2	99.67	100.00
	99.84	99.00
Control (sin irradiar)	100.00	100.00



Figura 2. Preadaptación de banano. Plántulas de banano variedad Williams en microinvernaderos

CONCLUSIONES

- Se logró regenerar *vitro* plantas de banano a partir de microcormos irradiados a las dosis recomendadas mismas que servirán para evaluaciones posteriores en busca de resistencia a enfermedades que afectan al cultivo.
- En comparación con el control (material vegetal sin irradiar) se evidencia que existe una relación entre material vegetal evaluado y el tratamiento mutagénico, observando sensibilidad a la radiación gamma siendo la dosis de 30 Gy la que tiene un efecto de menor oxidación y mayor sobrevivencia.
- Las condiciones adecuadas de humedad relativa, temperatura, luz, CO₂, recipientes y sustrato promueven la pera-dapatación de las *vitro* plantas de banano provenientes de microcormos irradiados observando un comportamiento similar a las *vitro* plantas de banano sin irradiar.

RECOMENDACIONES

Se deben continuar con las actividades de segregación de quimeras, enraizamiento y pre-adaptación de los lotes de *vitro* plantas previstos entregar al proyecto.

REFERENCIAS

- Geier, T., (2012). Chimeras: Properties and Dissociation in Vegetatively Propagated Plants. Chapter 16. 191-201 in: Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa (Eds.): Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Published by CAB International, Wallingford, UK, FAO, Rome, Italy.
- George, E. F., Hall, M. A., y Klerk, G. J. De. (2008). Plant propagation by tissue culture. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- Jankowicz-Cieslak, J., y Ingelbrecht, I. (2022). Efficient Screening Techniques to Identify Mutants with TR4 Resistance in Banana. Viena, Austria <https://doi.org/10.1007/978-3-662-64915-2>
- Ramírez, M., . & Ramírez, C. A. (2020). Phylogenetic and pathogenic variability of strains of *R. solanacearum* causing moko disease in Colombia. *Plant Pathology*, 69(2), 360–369.
- Ricardo, F. Á. S. (2021). Cultivo agroecológico del banano y plátano / Agroecological culture of the banana crop. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4(4), 4950–4972.

ACTIVIDADES PROYECTOS FIASA:

Actividades planificadas en el hito 1	
Actividades	Indicador de Resultado
PF1: Caracterización molecular de palma oleífera	Hasta Diciembre 2025 se han caracterizado molecularmente al menos 100 materiales de palma oleífera de la EESD
PF2: Caracterización molecular de cacao blanco	Hasta Diciembre 2025 se han caracterizado molecularmente al menos 100 materiales de cacao blanco de la provincia de Zamora
PF3: Caracterización molecular de chirimoyas	Hasta Diciembre 2025 se han caracterizado molecularmente al menos 100 materiales de chirimoya del sur del país
PF4: Caracterización molecular de guarango	Hasta Diciembre 2025 se han caracterizado molecularmente al menos 100 materiales de guarango del banco de germoplasma

ACTIVIDAD PF1. Caracterización molecular de palma oleífera

Responsable	Morillo Eduardo Buitrón Johanna
Colaboradores	Zambrano Silvia, Digner Ortega (EESD)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Proyecto de Investigación Enfermedades Letales en la Palma Aceitera en Ecuador (FIASA-EESD-2022-015)
Institución donante:	FIASA
Número de memorando aprobación:	INIAP-EESD_DIR-2025-0111-MEM
Contrato marco	MAATE-CMARG-2025-007

ANTECEDENTES

Una de las limitantes en América del Sur para la producción de racimo de fruta fresca de palma especie *E. guineensis* es el problema fitosanitario denominado Pudrición de Cogollo (PC). Los Programas de Mejoramiento Genético en la búsqueda de genotipos tolerantes y/o resistentes a PC han encontrado en la palma aceitera americana (*Elaeis oleifera* H.B.K. Cortés) una alternativa para la obtención de híbridos interespecíficos que contrarrestan en campo la pérdida de plantas por este problema (Alvarado et al., 2013).

En este contexto el Programa de Palma Africana de la EESD del INIAP entre los años 2004 y 2009 en conjunto con personal del Malaysian Palm Oil Board investigadores de la EECA y EESC, colectaron semillas de plantas oleíferas en la amazonía ecuatoriana resultando un banco de recursos genéticos. Además, según registro del Programa de Palma Africana la introducción de palmas oleíferas en el INIAP inició en 1988, con la donación de semillas por parte de CORPOICA,

actualmente AGROSAVIA, que han sido base para la creación de nuevas duras oleíferas con mejores características genéticas.

En el año 2022 se aprobó el Proyecto con el FIASA denominado “Enfermedades Letales en Palma Aceitera en Ecuador” donde se incluye la caracterización molecular de las plantas duras oleíferas que se encuentran en el banco de recursos genéticos de la EESD, por lo que el Departamento de Biotecnología de EESC ha realizado en este periodo la colecta de 260 muestras de las diferentes accesiones de oleíferas completando el muestreo para completar la caracterización molecular del material de oleíferas del INIAP en el 2026.

OBJETIVOS

General

Caracterizar molecularmente accesiones de palma aceitera dura oleífera conservadas en el banco de germoplasma de la EESD.

Específicos

1. Colectar la totalidad de muestras de palma oleífera para realizar el genotipado de las colecciones.
2. Extraer y validar el ADN de las muestras colectadas

METODOLOGÍA

Muestras biológicas: Durante el 2025 se completó la toma de muestras en la EESD y EECA con los que se concluyó con este proceso. El tejido foliar fue conservado en bolsas herméticas con 100 g sílica gel.

AVANCE DE RESULTADOS

Un total de 260 muestras fueron colectadas en el año 2025, estas fueron trasladadas al Departamento de Biotecnología donde en el primer trimestre de 2026 serán analizadas. En el Anexo 1 se enlistan las muestras colectadas. A la fecha se ha realizado la extracción y validación de 40 muestras de ADN.

REFERENCIAS

Alvarado A., Escobar R., & Henry, J. (2013). El híbrido OxG Amazon: una alternativa para regiones afectadas por Pudrición del cogollo en palma de aceite. *Palmas*, 34, 305-314.

ACTIVIDAD PF2: Caracterización molecular de cacao blanco

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	Meneses Santiago (DNB-EESC) Quiroz James (EELS) Iza Mario (DNB-EETP)
Proyecto que financió el estudio:	Rescate y selección de especies cultivadas de cacao de almendra blanca en fincas de productores de la provincia de Zamora Chinchipe, centro de origen, con fines de conservación y mejoramiento genético (FIASA-EELS-2024-025)
Institución donante:	FIASA
Contrato marco	MAATE-DBI-CM-2025-0515

ANTECEDENTES

El cacao de almendra blanca (*Theobroma cacao* L.) representa un recurso fitogenético estratégico para el Ecuador debido a su alta calidad organoléptica y su reconocimiento en mercados especializados de cacao fino de aroma. Diversas investigaciones históricas, arqueológicas y moleculares han demostrado que la región amazónica ecuatoriana, en particular la provincia de Zamora Chinchipe, constituye un área fundamental en el origen, domesticación y diversificación del cacao tipo Nacional, con evidencias que datan de más de 5.500 años. Actualmente, estos materiales genéticos se encuentran en situación de alta vulnerabilidad, ya que han sido progresivamente reemplazados por cultivares clonales de mayor rendimiento productivo, pero de menor calidad sensorial. Esta dinámica ha provocado una reducción significativa de la diversidad genética local, limitando su aprovechamiento en programas de conservación y mejoramiento genético. Frente a este escenario, la caracterización molecular mediante el uso de marcadores microsatélites (SSR) se plantea como una herramienta clave para identificar, diferenciar y validar genotipos promisorios. El presente estudio se orienta al rescate, colecta y caracterización molecular del cacao de almendra blanca en la provincia de Zamora Chinchipe, estableciendo una base científica sólida para su conservación, uso sostenible y futura incorporación en programas de mejoramiento genético del cacao fino de aroma.

OBJETIVOS

General

Caracterizar molecularmente materiales de cacao de almendra blanca colectados en los cantones Palanda, Chinchipe y Centinela del Cóndor de la provincia de Zamora Chinchipe, mediante el uso de marcadores microsatélites (SSR), con fines de conservación y mejoramiento genético.

Específicos

1. Extraer, cuantificar y validar ADN genómico de materiales de cacao de almendra blanca colectados en la provincia de Zamora Chinchipe.
2. Genotipar los materiales colectados utilizando un panel de marcadores SSR mediante la metodología M13-Tailing.
3. Generar una matriz de datos genotípicos confiable que permita la diferenciación genética de los materiales analizados.

METODOLOGÍA

Material vegetal: De las colectas realizadas se obtuvieron 353 materiales provenientes de las localidades de Centinela del Cóndor, Zumba y Palanda. Se recibió tejido foliar preservado en sílica gel. El material fue entregado al Departamento de Biotecnología de la EESC. En el Anexo 1 se detallan los códigos de los materiales analizados.

Extracción y validación de ADN: La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Souza et al., (2012) (Anexo 2). Las muestras de ADN obtenidas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en el equipo para microplacas EPOCH™ de Biotek®, empleado el programa GEN5. Se utilizó 2 µL de muestra de ADN en la microplaca Take 3, a través de las lecturas de absorbancias (260 nm y 280nm) el programa GEN5 determinó la concentración de las muestras y su índice de pureza (Biotec Instruments, 2011). La validación del ADN se verificó por PCR con el marcador mTcCIR92 (Fouet et al., 2011). En el Anexo 3 se muestran el cóctel de amplificación para la validación de las muestras de ADN (Morillo y Miño, 2011).

Amplificación M13 Tailing: Se realizaron las amplificaciones de las 353 muestras de ADN de cacao blanco con el set de marcadores reportados por Lozada (2014). En el Cuadro 1 se detallan los microsatélites en combinaciones dúplex utilizados para este trabajo.

Cuadro1. Combinaciones en dúplex de microsatélites para genotipaje de cacao

Combinación	Marker	Pb	Cromosoma	°T annealing (°C)	Marcaje M13 (nm)
Dúplex 1	mTcCIR 1	128 -151	8	51	700
	mTcCIR 40	259 - 296	3		
Dúplex 2	mTcCIR 7	148 - 163	7	51	700
	mTcCIR 33	273 - 348	4		
Dúplex 3	mTcCIR 230	231	2	51	700
	mTcCIR 60	190 - 218	2		
Dúplex 4	mTcCIR 58	208 - 324	9	51	800
	mTcCIR 290	175	6		

Dúplex 5	mTcCIR 37	134 - 178	10	46	800
	mTcCIR 8	290 - 307	9		
Dúplex 6	mTcCIR 6	224 - 253	6	46	800
	mTcCIR 11	282 - 321	2		
Dúplex 7	mTcCIR15	234 - 263	1	46	700
	mTcCIR 22	273 - 301	1		
Dúplex 8	mTcCIR 26	272 - 310	8	46	700
	mTcCIR 12	165 - 256	4		
Dúplex 9	mTcCIR 29	155 - 187	1	46	700
	mTcCIR 10	196 - 226	5		
Dúplex 10	mTcCIR 274	185 - 215	5	50	800
	mTcCIR 293	325 - 255	9		

En el Anexo 3 se detallan las concentraciones de los reactivos empleados para la amplificación con la metodología M13 Tailing.

Genotipaje: Se aplicó el protocolo de rutina del laboratorio.

RESULTADOS

Extracción y validación de ADN: Se concluyó con las extracciones de ADN de las muestras colectadas, un total de 353 muestras de ADN fueron validadas para realizar el estudio de caracterización molecular. Se obtuvo en promedio una concentración de 262 ng/uL y un índice de pureza de 1.9.

Genotipaje: Al momento se realizaron las amplificaciones con el panel de 20 marcadores microsatélites de dos placas (200 muestras de ADN) obteniéndose un total de 4000 data points. La genotipificación se llevó a cabo en el software SAGA-GT. En el Anexo 4 se incluyen imágenes de las corridas obtenidas.

CONCLUSIONES

- Se logró la extracción y validación exitosa de ADN genómico de 353 muestras de cacao de almendra blanca, confirmando la calidad del material genético para estudios moleculares.
- La aplicación del panel de 20 marcadores SSR, mediante la metodología M13-Tailing, permitió la obtención de 4000 datos genotípicos al momento.
- En el 2026 se completará el genotipado de las muestras restantes y los análisis estadísticos respectivos.

REFERENCIAS

- BioTek Instruments. (2012). Gen5™ Getting Started Guide. Recuperado el 12 de junio de 2020, de https://dornsife.usc.edu/assets/sites/344/docs/Gen_5_v2.0_RevC.pdf
- Fouet, O., Allegre, M., Argout, X., Jeanneau, M., Lemainque, A., Pavek, S., ... & Lanaud, C. (2011). Structural characterization and mapping of functional EST-SSR markers in *Theobroma cacao*. *Tree Genetics & Genomes*, 7, 799-817.
- Lozada Vargas, P. F. (2014). Caracterización molecular de 42 accesiones de la colección de genotipos de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de la EET Pichilingue, INIAP, mediante el uso de marcadores microsatélites (SSRs). ESPE.
- Morillo, E., & Miño Castro, G. M. (2011). Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP.
- Souza, H., Muller, L., Brandão, R., & Lovato, M. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*, 756-764.

ACTIVIDAD PF3: Caracterización molecular de chirimoyas

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	Valverde Marilú (DENAREF-EEA) Capa Mirian (UNL)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Identificación y conservación de poblaciones de chirimoya nativa y desarrollo de tecnologías de producción sustentable en la provincia de Loja (FIASA-CA-2023-011)
Institución donante:	FIASA
Contrato marco	MAATE-CMARG-2025-008

ANTECEDENTES

A través de la convocatoria abierta FIASA 2023 la Universidad La Universidad Nacional de Loja, logró la adjudicación de fondos para la ejecución del proyecto de investigación “Identificación y conservación de poblaciones de chirimoya nativa y desarrollo de tecnologías de producción sustentable en la provincia de Loja”, siendo el INIAP co-ejecutor del proyecto. Esta investigación, busca la identificación y conservación de poblaciones de chirimoya nativa en la región sur del país, la cual es considerada un posible centro de origen, con el objetivo de; potenciar el bíoconocimiento, rescate y uso de recursos fitogenéticos para una agricultura sustentable y mejorar la alimentación y medios de vida de las zonas de influencia.

Los estudios de diversidad a nivel molecular en poblaciones locales de chirimoya son escasos. Estudios previos en Loja usaron 54 individuos los cuales fueron caracterizados con cuatro marcadores tipo microsatélites y cuatro AFLPs (Morales et al., 2008) y en colección de chirimoya de INIAP (Tumbaco), se evaluaron 27 individuos de Ecuador y otros provenientes de otros países usando nueve marcadores microsatélites (Andrade, 2009). El Departamento de Biotecnología de la EESC realizará la caracterización molecular de los materiales de chirimoya colectados en este proyecto. La propuesta actual propone la utilización de entre 30 a 40 marcadores tipo microsatélite que permitirá incrementar considerablemente la robustez de la información genética de chirimoya en el Ecuador.

OBJETIVOS

General

Caracterizar molecularmente materiales de chirimoya del austro ecuatoriano mediante el genotipado de ADN.

Específicos

1. Extraer, cuantificar y validar ADN de muestras de chirimoya del sur del país.
2. Realizar el genotipado de las muestras con las combinaciones de marcadores establecidas para la selección de materiales representativos.

METODOLOGÍA

Extracción, cuantificación y validación de ADN: se receptaron 187 muestras de chirimoya, colectadas por La Universidad Nacional de Loja y EEA, en el Anexo 1 se detalla la lista de materiales mencionados. Se receptó tejido foliar seco (material colectado en bolsas herméticas con sílica gel), las muestras fueron pulverizadas en el molino MM 400 Retsch. Las extracciones de ADN se realizaron con el protocolo descrito por Souza et al., (2012). La cuantificación de ADN realizó mediante espectrofotometría utilizando el equipo EPOCH TM de Biotek® (Biotek Instruments, 2012). Los ADN obtenidos fueron diluidos a 10 ng/uL para su amplificación. La verificación de la validez el ADN se realizó mediante una amplificación sencilla con *primer* LMCH139 siguiendo la metodología descrita por Morillo y Miño 2011, esta amplificación garantizó la validez del ADN antes de iniciar con las amplificaciones con todos los *primers* seleccionados.

Validación de la amplificación de *primers* SSR: Para la validación de la amplificación de *primers* se emplearon ADNs previamente validados, se realizaron amplificaciones con el mix y el programa térmico descrito por Morillo y Miño (2011) (Anexo 2). Se probaron 34 *primers* (Anexo 3), se realizaron cocteles de amplificación para las muestras con un control negativo. Las amplificaciones se corrieron en geles de agarosa al 2% con TAE 1X a 100 voltios por 35 minutos, los geles fueron teñidos con Sybr Safe (Thermo Fisher Scientific).

Pruebas de multiplexaje: Con los *primers* seleccionados de las pruebas de amplificación se realizaron pruebas de polimorfismo y de multiplexaje, se armaron combinaciones con *primers* de similar temperatura de anillamiento y rangos de amplificación diferenciados en al menos 30 pb. Se empleó la metodología M13 Tailing según lo descrito en Morillo y Miño (2011), para las amplificaciones en múltiplex.

Amplificación con marcaje M13: Con los ADN validados se procedió con la amplificación con la metodología M13 Tailing metodología descrita por Morillo y Miño 2011(Anexo 2), para la Placa I (en el Anexo 4 se detalla la disposición y los materiales de esta placa), se realizaron las amplificaciones con las combinaciones multiplex estandarizados.

RESULTADOS

Extracción, cuantificación y validación de ADN: Hasta el momento se han realizado la extracción de 114 de chirimoyas con el protocolo descrito por Souza et al., (2012), se obtuvo una

concentración promedio de 845,9 ng/uL con un índice promedio de pureza de 2.044, en el Anexo 1 se detallan las concentraciones y los índices de pureza para cada una de las extracciones.

Validación de la amplificación, polimorfismo y multiplexaje *primers* SSR: de las pruebas de amplificación de los *primers* SSRs se verificó la amplificación de 31 *primers* SSR. En la tabla 1 se detallan los primers que presentaron amplificación.

Con los primers validados se realizaron pruebas de verificación de polimorfismo y multiplexaje con lo que se obtuvieron 2 combinaciones tríplex y 9 combinaciones dúplex útiles para el genotipaje (Tabla 2). Adicionalmente se dispone de 5 primers que se pueden analizar individualmente.

Tabla 1. Lista de primers SSR validados

No.	SSR	Ta(°C)	Validación m13 tailing	Marcaje	No.	SSR	Ta(°C)	Validación m13 tailing	Marcaje
1	LMCH1	50	Amplifica	700	17	LMCH80	55	No amplifica	700
2	LMCH3	50	Amplifica	700	18	LMCH83	55	Amplifica	700
3	LMCH4	50	Amplifica	700	19	LMCH87	55	Amplifica	800
4	LMCH6	55	Amplifica	700	20	LMCH88	55	Amplifica	700
5	LMCH12	55	Amplifica	700	21	LMCH89	55	Amplifica	800
6	LMCH16	55	Amplifica	700	22	LMCH91	55	Amplifica	700
7	LMCH29	45	Amplifica	800	23	LMCH98	55	Amplifica	700
8	LMCH33	50	Amplifica	800	24	LMCH103	55	Amplifica	700
9	LMCH36	50	Amplifica	800	25	LMCH106	55	Múltiples bandas	700
10	LMCH37	50	Amplifica	800	26	LMCH115	50	Amplifica	800
11	LMCH38	55	Amplifica	700	27	LMCH122	55	Amplifica	800
12	LMCH39	55	Amplifica	700	28	LMCH127	55	Amplifica	700
13	LMCH48	55	Amplifica	800	29	LMCH128	55	Amplifica	700
14	LMCH63	50	Amplifica	800	30	LMCH139	55	Amplifica	800
15	LMCH69	55	Amplifica	700	31	LMCH144	55	Amplifica	800
16	LMCH71	55	Amplifica	700					

Tabla 2. Combinaciones de marcadores para el genotipaje de chirimoya

PRIMER	COMBINACIÓN	MARCAJE (nm)	TA °C
LMCH 1	TRÍPLEX 1	700	50
LMCH 3			
LMCH 4			
LMCH 29	TRÍPLEX 2	800	45
LMCH 37			
LMCH 63			
LMCH 71	DÚPLEX 1	700	50
LMCH 91			
LMCH 88	DÚPLEX 2	700	50
LMCH 83			
LMCH 38	DÚPLEX 3	700	50
LMCH 69			
LMCH 115	DÚPLEX 4	800	45
LMCH139			
LMCH 6	DÚPLEX 5	700	55
LMCH 12			
LMCH 98	DÚPLEX 6	700	55
LMCH 103			
LMCH127	DÚPLEX 7	700	55
LMCH 128			
LMCH 48	DÚPLEX 8	800	45
LMCH 144			
LMCH 33	DÚPLEX 9	800	45
LMCH 122			
LMCH 16	MÓNOPLEX 1	700	55
LMCH 36	MÓNOPLEX 2	800	50
LMCH 39	MÓNOPLEX 3	700	55
LMCH 87	MÓNOPLEX 4	800	55
LMCH 89	MÓNOPLEX 5	800	50

Amplificación con marcaje M13: se realizó la amplificación con la metodología M13 Tailing para la Placa I (en el Anexo 4 se detalla la disposición y los materiales de esta placa). Los productos PCR obtenidos fueron cargados en gel de poliacrilamida al 3,5% en el analizador LICOR 4300s. En anexos se incluyen las corridas de ADN (Figura 2 a la 12) para la Placa I.

CONCLUSIONES

- Se cuenta con 187 muestras de chirimoya receptadas, de las cuales se ha realizado la extracción de ADN, los cuales están validados y listo para ser analizados.
- Se encuentran amplificados 90 ADN dispuestos en la Placa I con 24 primers con la metodología M13, se han generado once imágenes a partir de corridas electroforéticas en el LICOR 4300s para ser genotipificadas, un total de 2160 productos PCR han sido obtenidos para el genotipado.

REFERENCIAS

Andrade Calderón, R. P. (2009). Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de chirimoya *Annona cherimola* Mill en la Granja Experimental Tumbaco INIAP-Ecuador
BioTek Instruments. (2012). Gen5TM Getting Started Guide.
https://dornsife.usc.edu/assets/sites/344/docs/Gen_5_v2.0_RevC.pdf

- Morales Astudillo, A. R., Narvaez, A., Morales, N., & Castro, P. (2008). Variación genética de la chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) usando marcadores moleculares AFLPs y SSRs. Universidad Nacional de Loja.
- Morillo, E. 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 Santa Catalina. Quito. 121 p.
- Souza, H. A., Muller, L. A., Brandão, 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. Genetics and Molecular Research : GMR, 11(1), 756–764.

ACTIVIDAD PF4. Caracterización molecular de guarango

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	Ríos Emily (tesista ESPE) Sigcha Franklin (FIASA) Monteros Álvaro (DENAREF-EESC)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Conservación y Manejo del Banco de Germoplasma del INIAP (FIASA – EESD-2024-022)
Institución donante:	FIASA
Contrato Marco	MAATE-DBI-CM-2024-0387

ANTECEDENTES

En Ecuador, a pesar de ser uno de los 17 países megadiversos en el mundo, en las últimas décadas ha perdido un promedio de 94353 hectáreas por año de bosque debido al aumento de las actividades humanas. La especie forestal guarango (*Caesalpinia spinosa*), no ha sido la excepción en estos procesos erosivos, ha venido desapareciendo debido a que la mayoría de los ejemplares han sido talados, tanto por el desconocimiento de sus propiedades y usos, así como, por la carencia de un mercado local. Los árboles que han sobrevivido en estado silvestre se encuentran en su mayor parte en lugares alejados, de difícil acceso y de topografía irregular. Actualmente, existe la demanda internacional de productos de guarango tanto en la industria de la curtiembre (taninos) como la alimenticia (estabilizantes y espesantes) debido a la prohibición de compuestos como plomo, mercurio, cadmio y cromo. Considerando estos aspectos, es fundamental planificar un programa que considere fuentes semilleras diversas para el suministro de semillas tanto para la conservación como para su producción sostenible. Pese a la importancia de esta especie, tanto desde el punto ambiental, así como el punto de vista económico, no se han realizado estudios de su variabilidad genética.

Bajo esta perspectiva, surge la necesidad de una agricultura conservacionista, sustentable y sostenible basada en la revaloración y restitución de la diversidad del guarango en los Andes del Ecuador. Por lo cual son necesarios estudios sobre la variabilidad genética del germoplasma local. Así mismo es necesario potenciar el aprovechamiento de este recurso biológico, como alternativa productiva eficiente que fortalezca su cadena de valor, generando conocimiento para potenciar su utilización y fomentar estrategias de conservación.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la diversidad genética de la colección de guarango (*Caesalpinia spinosa*) ecuatoriano que mantiene el Banco de Germoplasma del INIAP.

Específicos

1. Determinar las condiciones técnicas para el genotipaje de guarango con un set de marcadores microsatélites polimórficos de otras especies del género.
2. Establecer la diversidad genética de las poblaciones de guarango colectadas en Ecuador.

METODOLOGÍA

Muestras biológicas: Las muestras de hojas se tomaron de la colección de campo que el DENAREF estableció en el año 2023 en la Granja Experimental Yachay (Urcuquí-Imbabura). Se tomó muestras de 6 árboles representativos de las 39 accesiones con un total de 234 muestras (Anexo 1). Se empleó 12 muestras representativas de guarango que se encuentren distribuidas uniformemente en el callejón interandino del Ecuador con el propósito de contar con alta variabilidad genética que permita verificar la transferibilidad de los marcadores al igual que su polimorfismo.

Extracción y validación de ADN: Para la extracción de ADN genómico se utilizó un el protocolo descrito por Souza et al., 2012 usando buffers Sorbitol y CTAB (Anexo 2 y 3). El ADN genómico obtenido se diluyó en 100µL de buffer TE. El ADN se cuantificó por espectrofotometría en el equipo EPOCH TM de Biotek®, con el programa Take 3 y el software GEN5 (BioTeK Instruments). Con la concentración determinada se procedió a normalizar las soluciones a una concentración de 5 ng/µL. Para la validación por PCR se utilizó un marcador arbitrario y el coctel de reacción indicado en Morillo & Miño, (2011). Los resultados de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SybrSafe DNA utilizando el buffer TAE 1X.

Screening de primers SSRs: Se realizó primero la validación por PCR, y luego una prueba de polimorfismo de los primers validados, los procesos mencionados se detallan a continuación. Se verificó la amplificación de marcadores SSRs en 12 muestras de ADN de *C. spinosa* previamente validadas. Se ensayó la amplificación de primers SSRs reportados para especies relacionadas (*C. echinata* en Oliveira et al., 2007; y *Balsamocarpon brevifolium* en Ravest et al., 2019). Los componentes para la reacción PCR se describen en Morillo & Miño (2011) (Anexo 4 y 5).

Screening de primers ISSRs: Se validó los primers aleatorios ISSRs con las 12 muestras aleatorias antes mencionadas. Los componentes para la reacción PCR (Anexo 6 y 7). Se seleccionó los primers que presentaban amplificaciones para luego escoger los primers con posibles polimorfismos y se los ensayó en subplacas con 80 muestras que sean representativas de toda la población, para finalmente amplificar con toda la población.

Genotipaje: Se utilizó los primers que se seleccionaron como informativos. Los datos del genotipado se registró en una matriz binaria en Excel, la cual posee a tener los siguientes

parámetros: Presencia de la banda codificada con “1”, mientras que la ausencia de esa banda se la codificó con “0”. Los datos dudosos o ambiguos se codificaron con “9”.

RESULTADOS

Extracción y Validación de ADN: Se realizó la extracción y validación de ADN de un total de 234 muestras. Se logró obtener ADN de calidad. En la Figura 1 se observa los resultados de las validaciones.

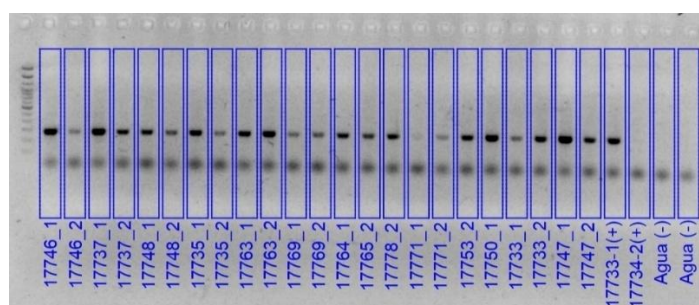


Figura 1. Validación de las muestras de ADN de guarango

Validación y Transferibilidad de marcadores SSRs: Se realizó la validación de 25 primers SSRs, se utilizaron muestras de *C. spinosa* del INIAP en conjunto de muestras de *C. spinosa* originarias de Perú y muestras de *C. erostachy*, con la finalidad de determinar la transferibilidad de los marcadores. En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 1. Resultados de transferibilidad (T) en *C. spinosa* de marcadores SSRs ensayados

Primer	Secuencia (5'-3')	Motif	Temp.	Rango (pb)	T
CE02*	F: ggCAAggTgAACAgCAAC R: CATACACAggCCTggTT	(GA) ₁₇	56	250 – 290	X
CE07*	F: ACTAgTCggAACTCgCA R: CTgTgATTcTCAATCTT	(CT) ₂₅	59	90- 144	X
CE09*	F: CTCCTCCTTCTAAgTTgC R: gTCATgCTCCAAGTTCTC	(CT) ₂₄	59	140 -160	X
CE11*	F: TCTCTCTCCTCCAATCC R: CCTCTTCgTACgTTCATC	(TC) ₁₅	59	100- 140	X
CE14*	F: CTTTATgggCCAgATCATgT R: gAgCCTTgAATCCgTCCA	(CT) ₂₃ AT(CT) ₃	59	190 – 200	X
CE18	F: CATgCAAAGCTAATCTgTg R: gCCATggAgAAGgTTAC	(TA) ₁ CTGTTG(TA) ₂	59	178 – 200	
CE19*	F: CAAAgACCAAATTgAgAA	(AG) ₁₈	59	220 – 250	X

	R: AgTgAgAgCATggACTgT				
CE23*	F: gCTCCgATTATCTCCTCC R: AAgACCAAAgACgTgAgC	(AG) ₁₁	63	100 – 140	X
CE25	F: CAggATCCAACgTTAACT R: ggCCACAATgTATCagAA	(AG) ₂₄	59	170 – 200	
CE26	F: gATCACACACACCACCTCTCT R: TgCCAAGgTggAgTCAAg	(GA) ₁₉	63	170 – 190	
BBR005	F: TGGCTCCTAAGTGTCATGC R: CTCATTCTTTACGAAATTGCCCC	(GAA) ₁₃	60	190	
BBR007	F: TCGTACAGAATGAGGGACTAAAG R: CCTCCTTTTACAAAATTGCCCC	(AGA) ₁₂	60	135	
BBR008*	F: TGCAAGCATACCTCAGAAAGC R: TCGATCATCACCTGCCACTC	(TG) ₁₂	60	158	X
BBR009	F: CTGACGTCCATTTTCCCCTC R: GCAGCACCTCTGTTTGGG	(TTC) ₁₂	60	150 – 190	
BBR010	F: GTTCTACACACACTCACAGCG R: TTTCCGACGTCCATTTTCCC	(AGAA) ₁₂	60	175 – 220	
BBR014	F: GCTTCCCGTCAATGCTCTTC R: GCCACCCCAAGTGATTTTCC	(CT) ₁₁	60	160 – 190	
BBR017	F: TGAAAGCTATGCTCTTTTCTTACTG R: GTCCCTTTCCATCGCAGTTG	(TCTT) ₁₁	60	170	
BBR018	F: GTCCCAAAAAGCCTAACTGTTTTTC R: GACTGTGGGTAGTTCATTATGGC	(ATAC) ₁₁	60	170 – 215	
BBR022	F: TCCGGATACTGTTCTGCGTC R: CTAACCGGCGATGAGAGG	(TCTT) ₁₀	60	120 – 130	
BBR025	F: GTGTTAGAGCTGATACATGAAATGC R: TGCCTTCTTTAATTCTGGTTTTTAG	(CATA) ₁₀	60	130 – 150	
BBR026	F: AAAGTTGGGTCGCGAATGAC R: CGCGATTTGATAACTATGCACC	(TTTC) ₁₀	60	170 – 178	
BBR039*	F: GCCCATTCATAAAAGAGTCACAAG R: TGCTTCTCAATTCGCCGTC	(AAG) ₁₅	60	237	X
BBR041*	F: ACGTACAGACATAGTGCTCAATC R: AGCCGGGAAGATACTCATCG	(ACAT) ₁₀	60	190 – 200	X
BBR043*	F: TCCCTGAGTGATCTGTCGC R: AGGCTGGTCAACTTTGTGG	(TATG) ₁₀	60	174 – 220	X
BBR078*	F: TGAGGGTTTTTCATCATACCTGC R: AACCTACCGATTGAAGGGGC	(AC) ₁₇	60	244 – 282	X

Sin embargo, en las pruebas de polimorfismos los marcadores SSR transferidos en *C. spinosa* no revelaron diferencias o polimorfismos, por lo que se descartaron del estudio.

Validación de primers ISSRs: Se ensayó con marcadores aleatorios (ISSRs), se realizó la amplificación de 56 marcadores. Los primers IISR que presentaron polimorfismos fueron HB14, HB11 Y 17898A, en el la Figura 2 se observa un ejemplo de amplificación.

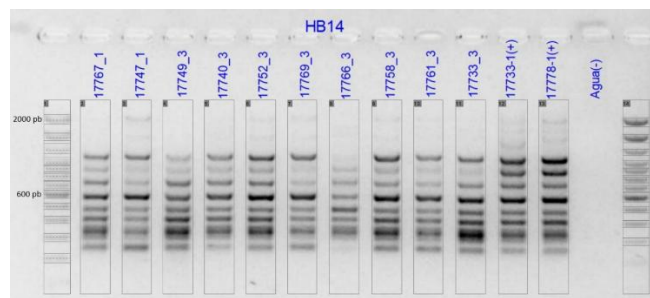


Figura 2. Amplificación de ISSRs en geles de agarosa

Genotipaje: Se realizaron los respectivos análisis de las bandas resultantes de los 3 marcadores ISSRs seleccionados, de la cual se obtuvo una matriz binaria correspondiente a 234 muestras y 24 locis, luego de aplicar los parámetros de depuración se obtuvo una matriz de 234 muestras con 9 locis presentando una diversidad genética muy baja.

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones técnicas para el genotipaje de guarango mediante un set de marcadores microsatélites, los cuales se determinaron 4 SSRs que presentaban amplificaciones monomórficas y 3 ISSRs con amplificaciones polimórficas. Los primers ISSRs se utilizarán para el análisis de diversidad de los materiales de guarango.

REFERENCIAS

- Morillo E. & 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 Santa Catalina. Quito. 121 p.
- Oliveira, S., Amato, F., Barbosa, F., Correa, R., Moreira, A., Grattapaglia, D., Pereira, R. (2017). Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. *Conserv Genet* (8)1269-1271. DOI 10.1007/s10592-006-9274-y
- Ravest, G., Leon-Lobos, P., Aguirre, P., Hernández, G., Bolados, G., Castro, M., Silva, S., Hinrichsen, P. (2019). New microsatellites for the Atacama Desert endemic *Balsamocarpon brevifolium* (Fabaceae). *Applications in Plant Sciences* 7(6): e11271. doi.org/10.1002/aps3.11271.

ACTIVIDAD: Análisis de transcriptoma de genotipos resistentes y susceptibles de genotipos de naranjilla infectados con *F. oxysporum* y *Meloidogyne*

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	LLumiquinga Pablo, Ochoa José (DNPV-EESC) Fernández Noe (IHSM La Mayora- España)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Fortalecimiento de la investigación para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla y tomate de árbol en el Ecuador
Institución donante:	AECID
Número de memorando aprobación	INIAP-EESC-DIR-0422-MEM
Contrato Marco	MAAE-DNB-CM-2020-0143

ANTECEDENTES

El INIAP trabaja en el mejoramiento genético de la naranjilla usando dos estrategias, la una mediante la evaluación de la resistencia de especies silvestres a enfermedades causadas por patógenos como *Fusarium oxysporum* f. *sp. quitoense* y *Meloidogyne incógnita* (Pujota, 2005; Viteri Ochoa J. com. pers). Una segunda estrategia consiste en la evaluación de progenies obtenidas de cruzamientos interespecíficos, buscando generar materiales con características de productibilidad y tolerancia/resistencia a las principales enfermedades que afectan al cultivo (Perachimba et al., 2004). El uso de herramientas biotecnológicas puede aportar al mejoramiento molecular de la naranjilla, y un análisis del transcriptoma puede aportar a la identificación de genes implicados en las fuentes de resistencia. El acceso a las tecnologías de secuenciación de última generación del ADN tiene alto potencial para identificar regiones del genoma implicadas en los caracteres de interés para los fitomejoradores. En esta actividad se buscó realizar un análisis del transcriptoma aplicando la tecnología RNAseq con el fin de identificar genes que presenten diferentes niveles de expresión entre genotipos resistentes y susceptibles de naranjillas silvestres y cultivadas.

OBJETIVOS

General

Realizar un análisis del transcriptoma en genotipos resistentes y susceptibles de naranjilla infectados con *Fusarium oxysporum* y nematodos.

Específicos

1. Inocular *Fusarium oxysporum* y nematodos en materiales susceptibles y resistentes de naranjilla (especies silvestres).
2. Realizar un análisis RNAseq en diferentes estadios de la infección en ambos patógenos.

3. Generar datos del transcriptoma en diferentes estadios de la infección en ambos patógenos.
4. Realizar un análisis de expresión diferencial en base a los datos del transcriptoma para ambos patógenos.

METODOLOGÍA

Selección y establecimiento *in vitro*: En una fase inicial se seleccionaron 17 materiales para ensayar su introducción *in vitro* con el fin de clonar plantas para los ensayos de inoculación. Los materiales se seleccionaron de un genotipado con marcadores SSRs de germoplasma de naranjilla y especies silvestres relacionadas con la tecnología reportada por Morillo et al., (2025). Con los materiales seleccionados del estudio (Tabla 1) se realizaron ensayos de introducción *in vitro*.

Tabla 1. Materiales silvestres y cultivados de naranjilla seleccionados para introducción *in vitro*

No.	TIPO	CODIGO	FUENTE
1	<i>S.hirtum x Sq</i>	F-16	campo
2	<i>S.hirtum</i>	F-56	campo
3	<i>S. quitoense</i>	TUM6	campo
4	<i>S. quitoense</i>	TUM24	campo
5	<i>S.hirtum x Sq</i>	F-16	campo
6	<i>S.hirtum</i>	F-56	campo
7	<i>S.hirtum</i>	F-57	estaca
8	<i>S.hyporodum</i>	T1P6	invernadero
9	<i>S. quitoense</i>	Q1	invernadero
10	<i>S. quitoense</i>	Q2	invernadero
11	<i>S.hyporodum</i>	N8-59	invernadero
12	<i>S.hyporodum</i>	N8-51	invernadero
13	<i>S.hirtum</i>	F-57	campo
14	<i>S.hirtum</i>	F-67	estaca
15	<i>S.hyporodum x Sq</i>	N8-46	invernadero
16	<i>S.hyporodum x Sq</i>	N8-48	invernadero
17	<i>S.hyporodum x Sq</i>	N8-54	invernadero

De los 17 materiales ensayados se lograron establecer *in vitro* siete y clonarlos por micropropagación (Tabla 2; Anexo 1). De estos materiales se adaptaron a invernadero (Granja Tumbaco) 12 *in vitro* plantas de *S. quitoense* (Q1 y Q2) para un ensayo preliminar de inoculación con *F. oxysporum* y *M. incognita*. Con estos materiales inoculados se validó la extracción de ARN a partir de tejido infectado (radicular y foliar) y se establecieron los momentos apropiados de muestreo para el análisis del transcriptoma.

Tabla 2. Materiales genéticos seleccionados para el ensayo de inoculación en invernadero

N	MATERIAL	TIPO	CODIGO
1	<i>S. hirtum</i>	Silvestre	F-56
2	<i>S. hyporodum</i>	Silvestre	T1 P6
3	<i>S. quitoense</i>	Cultivada (sin espinas)	Q1
4	<i>S. quitoense</i>	Cultivada (con espinas)	Q2
5	<i>S. hyporodum x S. quitoense</i>	cruza	N8-48
6	<i>S. hyporodum x S. quitoense</i>	cruza	N8-51
7	<i>S. hyporodum x S. quitoense</i>	cruza	N8-59

Ensayos de inoculación: Se establecieron dos ensayos experimentales de inoculación (años 2022 y 2023). Para cada genotipo (tabla 2) se estableció una docena de vitro plantas para su adaptación en invernadero. En primera instancia se ensayó en la Granja Tumbaco, pero para promover un mejor desarrollo de los inóculos se optó por instalar los ensayos en la EESD. Para ambos patógenos se usó en los ensayos plantas endurecidas de ocho semanas. Se inocularon dos plantas con cada patógeno (*M. incognita* y *F. oxysporum*) y como testigos se dejaron dos plantas sin inocular.

Fusarium: Para la inoculación de Fusarium se utilizaron cultivos monospóricos entregados por el Departamento de Protección Vegetal de la EESC. Estos cultivos fueron inoculados por separado a una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Para el primer ensayo (año 2022) se utilizó una sola cepa de Fusarium, mientras que para el segundo ensayo (año 2023) se inocularon dos cepas diferenciadas por su virulencia (R1 y R2. J. Ochoa, com. pers.). Este ensayo contó con 58 plantas en total; 28 plantas por cada cepa R1 y R2 respectivamente, cada una con cuatro plantas por genotipo, dos inoculadas y dos sin inocular. Se programó la toma de muestras según lo descrito en tabla 3. Se realizaron inoculaciones a una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Se tomaron muestras de raíces, hojas y peciolo (mínimo 100 mg/muestra) en nitrógeno líquido de las plantas inoculadas y sin inocular (testigos) en los diferentes momentos establecidos para el ensayo (3, 5, 10 y 14 días). Para cada genotipo se realizó la toma de muestra de únicamente una planta inoculada y una sin inocular, esto con el propósito de contar con plantas inoculadas intactas para la evaluación de infección. Las muestras criopreservadas se conservaron a -80°C hasta la extracción del ARN.

Tabla 3. Momentos establecidos para la toma de muestras con Fusarium

PATÓGENO	MOMENTO	TIEMPO
FUSARIUM	M0	0 días
	M1	3 días
	M2	5 días
	M3	10 días
	M4	14 días

Nematodos: para este ensayo se utilizaron cuatro plantas por genotipo, dos inoculadas y dos sin inocular. Se programó la toma de muestras según lo descrito en tabla 2. En el ensayo del 2022 se utilizó una cepa de alta virulencia de la Granja Tumbaco. En el ensayo del 2023 se utilizó una cepa identificada molecularmente como *M. incognita*. La densidad del inóculo fue de 7500 huevos por planta. La toma de muestras (raíces) se realizó en nitrógeno líquido 36h, 7 y 45 días desde la inoculación (Tabla 4). Para cada genotipo se realizó la toma de muestra de una planta inoculada y una sin inocular (esto con el propósito de contar con plantas intactas para la evaluación). Las muestras tomadas fueron criopreservadas a -80°C hasta la extracción del ARN.

Tabla 4. Momentos establecidos para la toma de muestras de naranjilla inoculada con nematodos

PATÓGENO	MOMENTO	TIEMPO
NEMATODOS	M0	0 días
	M1	36 h
	M2	7 días
	M3	45 días

Extracción de ARN: en primera instancia se realizaron pruebas de extracción de ARN en tejido de raíces, peciolo y hojas de plantas de naranjilla. Se empleó el reactivo Trizol (*Thermo Fisher Scientific*) siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad y cantidad del ARN se visualizó por electroforesis en geles de agarosa 2% y en un fluorímetro QUBIT con el kit RNA-HS Assay y por espectrofotometría en un equipo EPOCH. Validado el método de extracción se realizaron las extracciones de ARN de las muestras de tejido de plantas inoculadas con *Fusarium* y nematodos en los diferentes tiempos establecidos en el ensayo experimental.

Purificación del ARN: se utilizó el kit PureLink™ RNA Mini (*Thermo Fisher Scientific*, cat. 12183018A). Primero, las muestras se aforaron a 500 uL con agua etanol 75%. Se transfirió la muestra a la columna de purificación y se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm. Luego, se eliminó el desecho del tubo colector. Se agregó 700 uL de buffer de lavado I a la columna de purificación y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos. Después, se eliminó el desecho y se cambió el tubo colector. Se añadió 500 uL de buffer de lavado II a la columna de purificación y se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm. A continuación, se eliminó el desecho del tubo colector. Se volvió a colocar 500 uL de buffer de lavado II a la columna de purificación. Se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm y se eliminó el desecho del tubo colector. Se centrifugó la columna a 12000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo. Se añadió 30 uL de agua del kit en la columna de purificación; se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a una temperatura de -80°C.

Análisis RNA-seq: se contrató el servicio de secuenciación NGS a un prestador especializado en el Ecuador (www.biosequenceec.com). Las 64 muestras de ARN purificadas se entregaron para el control de calidad respectivo. Para las librerías de cDNA se utilizó 500 ng-1 µg de RNA purificado por muestra. El protocolo utilizado para la construcción de librerías fue con el kit *Truseq Stranded mRNA Library Prep Kit* de ILLUMINA según las especificaciones del fabricante. La secuenciación en paired end se realizó con la plataforma ILLUMINA con una demanda de 30 millones de lecturas por librería.

Análisis de Expresión Diferencial

Preprocesamiento de datos NGS: Las lecturas brutas se analizaron con *FastQC* v0.11.9 y *MultiQC* v1.13a (Ewels et al., 2016) para verificar su calidad. Se utilizó *Kraken2* v2.1.3 (Wood et al., 2019) para clasificar taxonómicamente las lecturas contra la base de datos PlusPFP, y *KrakenTools* v1.2 (Lu et al., 2022) para seleccionar las que habían clasificado como Viridiplantae o no clasificadas y descartar lecturas contaminadas. Las lecturas descontaminadas se limpiaron con *Fastp* v0.23.4 (Chen et al., 2018) con las opciones `-f 15 -F 15 -l 36 --adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA --adapter_sequence_r2=AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT -x` para eliminar adaptadores y secuencias de baja calidad. Las lecturas limpias y descontaminadas volvieron a analizarse con *FastQC* v0.11.9 y *MultiQC* v1.13a (Ewels et al., 2016) para verificar de nuevo su calidad.

Ensamblaje de novo: El ensamblaje de *novo* es un método bioinformático para construir una secuencia genómica (o transcriptoma) desde cero, sin usar una secuencia de referencia preexistente. En este caso para el ensamblaje de *novo* para *Fusarium* y nematodos, las lecturas limpias se ensamblaron con *rnaSPAdes* v4.2.0 (Bushmanova et al, 2019) por separado: las raíces infectadas por nematodos y las hojas infectadas por *Fusarium*. Se eliminaron las duplicaciones con *CD-HIT-EST* v4.8.1 (Li et al, 2006; Fu et al, 2012) con las opciones `-g 1 -n 9`, y se filtraron los transcritos por una longitud mínima de 200 bp con *awk* y *Seqtk* v1.4 (<https://github.com/lh3/seqtk>). Se utilizó *Kraken2* v2.1.3 (Wood et al, 2019) con la base de datos PlusPFP y *KrakenTools* v1.2 (Lu et al, 2022) para seleccionar los transcritos clasificados como Viridiplantae y no clasificados. Por último, se utilizó *DIAMOND* v2.1.8 (Buchfink et al, 2021) contra la base de datos de las proteínas no redundantes del NCBI (actualizada a 18 de abril de 2024) con las opciones `blastx --outfmt 5 --ultra-sensitive`, junto con la versión de escritorio de *MEGAN6* v6.25.10 (Huson et al, 2016) para extraer los transcritos clasificados como Viridiplantae.

Mapeo y recuento: Cada librería se mapeó contra el transcriptoma *de novo* correspondiente utilizando *Bowtie 2* v2.5.1 (Langmead et al, 2012) con las opciones `-k 40 --no-mixed --no-discordant`. Las lecturas mapeadas se ordenaron e indexaron con *SAMtools* v1.21 (Danecek et al, 2021) con la opción `-F 0x4`, y se recontaron con el programa *featureCounts* (Liao et al., 2014) del paquete *Subread* v2.0.6 (Liao et al, 2013) con las opciones `-p --countReadPairs -d 0 -D 1000 -C -t`

transcript. De forma paralela, esas mismas librerías se mapearon contra los genomas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706 ITAG4.1 descargado del [SGN](#)) y patata (*Solanum tuberosum* v6.1 descargado de Phytozome) usando *HISAT2* v2.2.1 (Kim et al, 2019) con las opciones `--dta` y *SAMtools*. Debido a que el mapeo sobre patata resultó en un promedio del 22.46% de las lecturas mapeadas, y el mapeo sobre tomate devolvió un promedio de 19.30%, se decidió descartar esta opción y no seguir con el recuento.

Evaluación de las réplicas: Los análisis posteriores se realizaron usando R v4.4.1. Los recuentos de genes obtenidos con *featureCounts* fueron normalizados a Counts per Million (CPM) con *edgeR* v4.4.2 (Robinson et al, 2010), y así realizar el análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función *prcomp* del paquete *stats* de R. Por otro lado, los recuentos se normalizaron a Transcripts per Million (TPM) utilizando la función *convertCounts* del paquete de R *DGEobj.utils* (Thompson et al, 2025), y los genes con una expresión TPM ≥ 1 fueron considerados para elaborar un atlas de expresión utilizando un script desarrollado por el IHSM (https://github.com/kikelg/expression_atlas) basado en *EasyGDB* (Fernandez et al., 2022), y una matriz de correlación utilizando el paquete *corrplot* v0.95 (<https://github.com/taiyun/corrplot>).

Anotación funcional: Se elaboraron archivos de anotaciones de los genes de los tres transcritos ensamblados. Para ello se utilizó *DIAMOND* v2.1.8.162 (Buchfink et al., 2021) contra las bases de datos de referencia Araport11, SwissProt, TrEMBL, ITAG4.0 y NCBI con la opción `blastp`. A su vez, se generó el archivo de ortología contra *Arabidopsis thaliana*, utilizando *DIAMOND* contra Araport11 de manera recíproca con la opción `blastp` y descartando aquellos resultados con un bit-score menor a 45.

Análisis de expresión diferencial: La normalización e identificación de genes expresados de manera diferencial (DEGs) se realizó utilizando un script personal (https://github.com/kikelg/DESeq2_volcano) basado en *DESeq2* v1.46.0 (Love et al., 2014).

Enriquecimiento funcional: Los ortólogos de *Arabidopsis thaliana* presentes en los DEGs encontrados se utilizaron para realizar el enriquecimiento funcional, el cual fue ejecutado utilizando un script personal (<https://github.com/bullones/FunRichR>) basado en el paquete *ClusterProfiler* v4.14.6 (Wu et al., 2021).

RESULTADOS

Extracción de ARN: El detalle del ARN obtenido para el ensayo de inoculación con *Fusarium* se detalla en la tabla 5. De las 84 muestras de ARN obtenidas, la concentración promedio fue de 718 ng/ul por muestra.

Tabla 5. Cuantificación del ARN obtenido en 84 muestras del ensayo con Fusarium

Patógeno	Momento 1				Momento 2				Momento 4			
	Genotipo	Hoja (H) /Raiz (R)	Índice de pureza	[ng/μL]	Genotipo	Hoja (H) /Raiz (R)	Índice de pureza	[ng/μL]	Genotipo	Hoja (H) /Raiz (R)	Índice de pureza	[ng/μL]
FUSARIUM	INOCULADAS	Q1	H	1.355		Q1	H	1.517		Q1	H	1.631
		Q1	R	1.233		Q1	R	1.255		Q1	R	1.462
		Q2	H	1.924		Q2	H	1.532		Q2	H	1.673
		Q2	R	1.563		Q2	R	1.373		Q2	R	1.469
		T1P6	H	1.737		T1P6	H	1.484		T1P6	H	1.802
		T1P6	R	1.84		T1P6	R	1.374		T1P6	R	1.513
		F56	H	1.773		F56	H	1.681		F56	H	1.75
		F56	R	1.78		F56	R	1.493		F56	R	1.665
		N848	H	1.802		N848	H	1.204		N848	H	1.694
		N848	R	1.886		N848	R	1.518		N848	R	1.462
		N851	H	1.801		N851	H	1.422		N851	H	1.43
		N851	R	1.618		N851	R	1.361		N851	R	1.716
		N859	H	1.893		N859	H	1.5		N859	H	1.561
		N859	R	1.7		N859	R	1.401		N859	R	1.424
	NO INOCULADAS	Q1	H	1.722		Q1	H	1.838		Q1	H	1.407
		Q1	R	1.418		Q1	R	1.615		Q1	R	1.444
		Q2	H	1.874		Q2	H	1.649		Q2	H	1.674
		Q2	R	1.898		Q2	R	1.316		Q2	R	1.526
		T1P6	H	1.799		T1P6	H	1.49		T1P6	H	1.412
		T1P6	R	1.741		T1P6	R	1.464		T1P6	R	1.255
		F56	H	1.88		F56	H	1.408		F56	H	1.622
		F56	R	1.192		F56	R	1.637		F56	R	1.598
		N848	H	1.38		N848	H	1.555		N848	H	1.744
		N848	R	1.281		N848	R	1.446		N848	R	1.186
		N851	H	1.256		N851	H	1.92		N851	H	1.541
		N851	R	1.121		N851	R	1.038		N851	R	1.405
		N859	H	1.471		N859	H	1.539		N859	H	1.582
		N859	R	1.208		N859	R	1.87		N859	R	1.54

La integridad del ARN obtenido se visualiza en la figura 1.

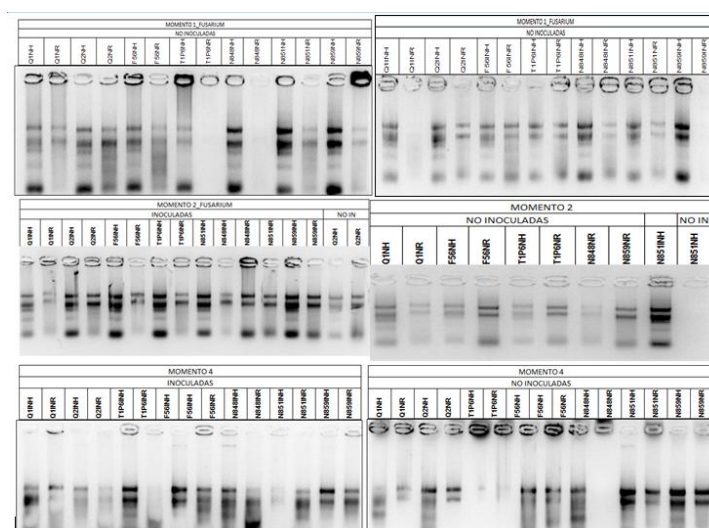


Figura 1. Integridad de las muestras de ARN extraídas para el ensayo de Fusarium

El detalle del ARN obtenido para el ensayo de inoculación de nematodos se detalla en la tabla 6. De las 36 muestras de ARN obtenido, la concentración promedio fue 204 ng/ul.

Tabla 6. Cuantificación del ARN obtenido en 36 muestras del ensayo de nematodos

Patógeno	Genotipo	Momento	Muestra	Índice de pureza	[ng/ μ L]
Nematodos	Q2	M1	INOCULADA	1.622	314.4
			TESTIGO	1.381	130.4
		M2	INOCULADA	1.522	219.2
			TESTIGO	1.367	155.2
		M3	INOCULADA	1.473	265.5
			TESTIGO	1.404	359
	N8-59	M1	INOCULADA	1.602	212
			TESTIGO	1.481	211.2
		M2	INOCULADA	1.436	144.8
			TESTIGO	1.544	121.6
		M3	INOCULADA	1.554	256.7
			TESTIGO	1.533	341.3
	T1P6	M1	INOCULADA	1.452	146.4
			TESTIGO	1.404	39.3
		M2	INOCULADA	1.395	157.6
			TESTIGO	1.35	51.4
		M3	INOCULADA	1.38	194.9
			TESTIGO	1.305	217.9
	N8-51	M1	INOCULADA	1.502	292
			TESTIGO	1.632	1.632
		M2	INOCULADA	1.459	192
			TESTIGO	1.459	188
		M3	INOCULADA	1.554	182
			TESTIGO	1.37	228.4
	Q1	M1	INOCULADA	1.564	158.4
			TESTIGO	1.514	148.8
		M2	INOCULADA	1.462	112.8
			TESTIGO	1.339	138.4
		M3	INOCULADA	1.369	228.7
			TESTIGO	1.556	294.5
	F56	M1	INOCULADA	1.723	229.6
			TESTIGO	1.765	274.4
		M2	INOCULADA	1.199	260.8
			TESTIGO	1.365	304
		M3	INOCULADA	1.281	163.2
			TESTIGO	1.456	221.3

La integridad del ARN del ensayo de nematodos se reveló de óptimas condiciones como lo muestra la figura 2.

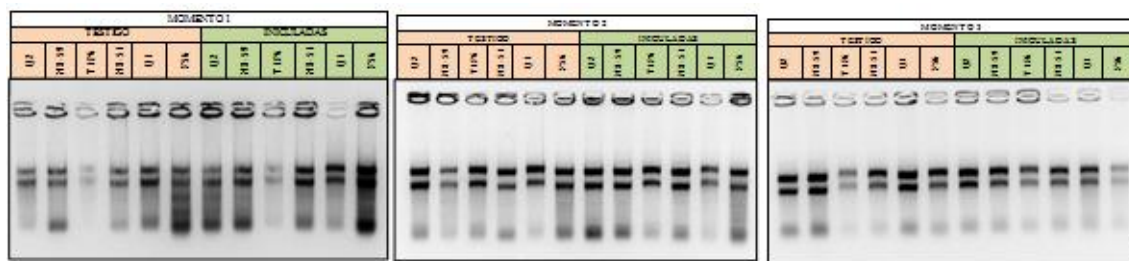


Figura 2. Integridad de las muestras de ARN extraídas del ensayo de nematodos

Selección de ARNs para la secuenciación NGS: En la tabla 7 se detallan las 46 muestras de ARN seleccionadas para la secuenciación NGS. Para nematodos se seleccionaron 18 muestras correspondientes a *S. hyporodum* y *S. quitoense* (sin espinas) en cada momento establecido (M1-M3). Para cada genotipo se incluyeron dos plantas inoculadas (replicas biológicas) y un testigo (sin inocular). Adicional se incluyó una muestra de *S. hirtum* inoculada en M1.

Para Fusarium se seleccionaron 27 muestras: *S. hyporodum*, *S. quitoense* (sin espinas) y una planta proveniente de la cruz *S. hyporodum* x *S. quitoense*, en cada momento establecido (M1-M3).

Igualmente para cada genotipo se incluyeron dos plantas inoculadas (réplicas biológicas) y un testigo (sin inocular).

Análisis RNA-seq

Datos obtenidos y control de calidad (FastQC) El número de fragmentos secuenciados (reads) en paired-end para cada librería de cDNA (ARN) se indica en la tabla 7. Para las 46 librerías secuenciadas se obtuvo entre 7' y 329 millones de lecturas. Los 92 archivos de secuencia en formato fastq.gz están almacenados y disponibles en la nube del INIAP ([\\10.150.112.35\biotecnologia\Secuencias_AECID\naranjilla](https://10.150.112.35/biotecnologia/Secuencias_AECID/naranjilla)). Así mismo se incluyen los valores de calidad Q30 para cada librería los mismos que superaron valores de 90 para todos los casos exceptuando dos librerías.

El análisis FastQC de las secuencias obtenidas confirmo en la mayoría de los casos una buena calidad de los datos generados para el análisis bioinformático. El reporte del análisis FASTQC de los datos crudos (raw data) está disponible para recarga en el siguiente link: <https://drive.google.com/file/d/16OyhnZYVtTr-D8fXuhpLJ1vUTaN79RhF/view?usp=sharing>

Tabla 7. Lista ARNs secuenciados y datos NGS obtenidos con la tecnología ILLUMINA. Raiz (nematodos), hoja (Fusarium). Planta 1 y 2 (réplicas biológicas), testigos (T)

INOCULO	NARANJILLA	MOMENTO	PLANTA*	TEJIDO	ARN	[ng/ul]	MGEN_ID	No. Reads	Q30 val.	Sample
Nematodos	<i>S. hyporodum</i>	M1	1	RAIZ	N1	120	2410253-001	30'301.444	95,1	nem_w_M1
			2	RAIZ	N2	120	2410253-002	35'668.108	93,3	nem_w_M1
			30 (T)	RAIZ	N3	480	2410253-003	24'842.662	77,8	
		M2	1	RAIZ	N4	120	2410253-004	22'581.788	89,5	nem_w_M2
			2	RAIZ	N5	180	2410253-005	46'927.724	95	nem_w_M2
			30 (T)	RAIZ	N6	120	2410253-006	30'612.680	92,7	nem_w_M2_ctrl
		M3	1	RAIZ	NARAJILLA_N7	82,95	2412184-004	15'656.436	89,2	nem_w_M3
			2	RAIZ	N8	120	2410253-008	26'916.054	89,6	nem_w_M3
			30 (T)	RAIZ	NARAJILLA_N9*	369,5	2412184-027	69'835.480	96,2	nem_w_M3_ctrl
	<i>S. quitoense</i>	M1	25	RAIZ	N10	540	2410253-010	44'229.954	93,8	nem_C_M1
			26	RAIZ	N11	300	2410253-011	51'687.944	94,1	nem_C_M1
			42(T)	RAIZ	N12	210	2410253-012	59'722.668	96,9	nem_C_M1_ctrl
		M2	25	RAIZ	NARAJILLA_N13	104,4	2412184-006	79'781.814	97	nem_C_M2
			26	RAIZ	N14	300	2410253-014	326'625.530	98,2	nem_C_M2
			42 (T)	RAIZ	N15	300	2410253-015	105'285.796	98,3	nem_C_M2_ctrl
		M3	25.3	RAIZ	N16	300	2410253-016	134'284.482	98,3	nem_C_M3
			26.3	RAIZ	N17	300	2410253-017	123'502.032	98,3	nem_C_M3
			42.3 (T)	RAIZ	N18	300	2410253-018	25'777.930	98,2	nem_C_M3_ctrl
Fusarium	<i>S. hyporodum</i>	M1	113	HOJA	N19	240	2410253-019	54'951.692	98,3	fus_w1_m1
			114	HOJA	N20	480	2410253-020	52'925.326	98,3	fus_w1_m1_1
			142 (T)	HOJA	NARAJILLA_N21	97,05	2412184-007	77'257.734	97,2	fus_w1_m1_ctrl
		M3	113	HOJA	N22	480	2410253-022	44'472.020	98,4	fus_w1_m3
			114	HOJA	N23	300	2410253-023	87'924.932	98,3	fus_w1_m3_1
			142 (T)	HOJA	NARAJILLA_N24	23,17	2412184-008	10'870.588	77	
		M4	113	HOJA	NARAJILLA_N25	123,67	2412184-009	139'793.170	97,7	fus_w1_m4
			114	HOJA	N26	300	2410253-026	44'429.246	98,2	fus_w1_m4
			142 (T)	HOJA	NARAJILLA_N27*	315	2412184-030	82'369.090	97,3	fus_w1_m4_ctrl
	<i>S. quitoense</i>	M1	137	HOJA	N28	540	2410253-028	5'017.9852	98,3	fus_c_m1
			138	HOJA	N29	540	2410253-029	55'649.164	98,3	fus_c_m1_1
			154 (T)	HOJA	N30	540	2410253-030	45'083.658	98,4	fus_c_m1_ctrl
		M3	137	HOJA	N31	540	2410253-031	34'635.042	98,1	fus_c_m3
			138	HOJA	N32	480	2410253-032	53'663.674	98,3	fus_c_m3
			154 (T)	HOJA	N33	540	2410253-033	299'989.152	98,3	fus_c_m3_ctrl
		M4	137.4	HOJA	N34	540	2410253-034	37'156.338	98,3	fus_c_m4
			138.4	HOJA	N35	540	2410253-035	7'429.094	97,8	fus_c_m4
			154.4(T)	HOJA	N36	540	2410253-036	63'790.182	98,2	fus_c_m4_ctrl
	HIBRIDO (N8-51)	M1	129	HOJA	N37	540	2410253-037	40'129.598	98,2	fus_h_m1
			130	HOJA	N38	540	2410253-038	59'769.778	98,3	fus_h_m1
			150 (T)	HOJA	N39	240	2410253-039	57'444.168	98,3	fus_h_m1_ctrl
		M3	129	HOJA	N40	240	2410253-040	104'960.424	98,3	fus_h_m3
			130	HOJA	N41	240	2410253-041	125'632.166	98,2	fus_h_m3
			150 (T)	HOJA	N42	240	2410253-042	172'058.032	98	fus_h_m3_ctrl
		M4	129	HOJA	N43	240	2410253-043	164'665.154	97,8	fus_h_m4
			130	HOJA	NARAJILLA_N44	82,5	2412184-012	125'018.164	97,4	fus_h_m4
			150 (T)	HOJA	N45	240	2410253-045	79'626.730	96,7	fus_h_m4_ctrl
	<i>S. hirtum</i>	M1	5	RAIZ	NARAJILLA_N46*	295	2412184-031	78'005.126	96,1	

Ensamblaje *de novo*: En la tabla 1 se observa el resumen del número de transcritos de los dos ensamblajes *de novo* realizados (hojas infectadas por *Fusarium* y raíces infectadas por nematodos). Cuadros resumen de reads mapeados para los transcriptomas de *Fusarium* y nematodos se incluyen en los anexos 2 y 3 respectivamente.

Tabla 8. Resumen de reads ensamblados después de la depuración de datos

ensamblaje	rnaSPAdes	CD-HIT-EST	>=200bp	MEGAN6
Fusarium	245,559	227,214	147,705	86,555
Nematodos	341,155	330,678	148,026	64,238

En el siguiente link de descarga se adjuntan los informes de MultiQC, tablas de resúmenes de limpieza y alineamiento de lecturas, y ficheros fasta de ensamblajes *de novo*:
https://drive.google.com/drive/folders/1gvfQtHwU_cwdUMByH9gez-67_N0MezSB?usp=sharing

Evaluación de réplicas:

Se realizó en R un análisis de Componentes Principales (PCA) con el fin de verificar si las réplicas biológicas se agrupan correctamente entre sí. Este análisis multivariado permite detectar consistencia experimental y ayuda a decidir sobre la exclusión de réplicas, debido a errores técnicos o de variación biológica. Para complementar el PCA se obtuvo una matriz de correlación, esta permite observar las relaciones entre todas las réplicas e identificar casos de réplicas inconsistentes. En el anexo 4 se adjuntan los análisis de componentes principales (PCA) obtenidos para la evaluación de réplicas.

Se realizaron análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional para las siguientes comparaciones.

Naranjilla en respuesta a Fusarium:

- fus_ctrl vs fus_w1_M1
- fus_ctrl vs fus_w1_M3
- fus_ctrl vs fus_w1_M4
- fus_ctrl vs fus_w1_M (unión de todos los tiempos)
- fus_ctrl vs fus_h_M1
- fus_ctrl vs fus_h_M3
- fus_ctrl vs fus_h_M4
- fus_ctrl vs fus_h_M (unión de todos los tiempos)
- fus_ctrl vs fus_c_M1
- fus_ctrl vs fus_c_M3
- fus_ctrl vs fus_c_M4
- fus_ctrl vs fus_c_M (unión de todos los tiempos)

Naranjilla en respuesta a nemátodos

- nem_ctrl vs nem_c_M1
- nem_ctrl vs nem_c_M2
- nem_ctrl vs nem_c_M3
- nem_ctrl vs nem_c_M (unión de todos los tiempos)
- nem_ctrl vs nem_w1_M1

Los resultados del análisis de expresión diferencial entre estas combinaciones con la lista de genes y los valores de sobre o subexpresión (log2FoldChange) están disponibles en formato *.xls y html para su descarga en el siguiente link:

<https://drive.google.com/drive/folders/1DvivNh7JCCdz9LwvxNnxrxDuLOJTMjqE?usp=sharing>

Los plot de Correlación, DSP plot, heatmap, PCA, scatter y volcano plot para la comparación w1_ctrl vs w1_M para el ensayo con Fusarium constan en el anexo 5. Los plot de Correlación, DSP plot, heatmap, PCA, scatter y volcano plot para la comparación w1_ctrl vs w1_M para el ensayo con Fusarium constan en el anexo 5. Los plot de Correlación, DSP plot, heatmap, PCA, scatter y volcano plot para la comparación ctrl vs c_M para el ensayo con nematodos constan en el anexo 6.

CONCLUSIONES

Los objetivos de la actividad 1.7 se han cumplido eficientemente:

- Se desarrollaron librerías de cDNA del tejido (foliar y radicular) obtenido de los ensayos de inoculación en naranjilla con Fusarium y nematodos en las condiciones experimentales establecidas
- Se aplicó la tecnología RNA-seq para la caracterización de los niveles de expresión de genes asociados con la resistencia a Fusarium y nematodos en las especies silvestres y cultivadas de naranjilla
- Se realizó un análisis de expresión diferencial en los genotipos resistentes y susceptibles de naranjilla infectados con Fusarium y nematodos.

Del análisis del transcriptoma se detectaron múltiples genes expresados entre las diferentes combinaciones realizadas para los ensayos con Fusarium y nematodos. Esta información está disponible para descarga y permitirá la identificación de genes de interés asociados a los mecanismos de resistencia a ambos patógenos. La información generada del análisis del transcriptoma para ambos patógenos constituye una fuente de datos valiosa que se buscará valorizar en un artículo científico, y podría dar continuidad a una nueva fase del estudio con el fin de validar genes asociados a las fuentes de resistencia en las naranjillas silvestres.

Del análisis sobre las funciones asociadas a los genes diferencialmente expresados se observan procesos biológicos bien descritos en la bibliografía tanto para la respuesta de defensa de solanáceas como al ataque de nemátodos como de Fusarium.

En los experimentos de defensa frente a nemátodos aparecen algunos términos relacionados con respuesta frente a nemátodos, ácido jasmónico, resistencia sistémica inducida por ácido jasmónico, biosíntesis de fenilpropanoides, biosíntesis de esteroides, lignificación, ácido salicílico, ácido abscísico, etileno, senescencia, respuesta a ROS y términos relacionados con el transporte, secuestro y respuesta a iones de hierro.

En los experimentos de defensa frente a fusarium aparecen algunos términos relacionados con defensa frente a simbionte, respuesta inmune, defensa frente a hongos, respuesta a moléculas

de origen fúngico, engrosamiento de la pared celular, desarrollo de la cutícula, regulación del cierre de estomas, respuesta a la falta de agua y ROS, resistencia sistémica adquirida, ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido abscísico, y senescencia.

RECOMENDACIONES

- Validar experimentalmente los genes candidatos identificados mediante técnicas como RT-qPCR o ensayos funcionales.
- Integrar los genes de interés en programas de mejoramiento genético asistido por marcadores.
- Ampliar el estudio a un mayor número de genotipos y condiciones ambientales para fortalecer la inferencia biológica.
- Profundizar en análisis comparativos entre especies silvestres y cultivadas para identificar fuentes de resistencia durables.
- Publicar los resultados en revistas científicas especializadas y asegurar la disponibilidad pública de los datos transcriptómicos para su análisis y validación.

REFERENCIAS

- Buchfink B, Reuter K, Drost HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat Methods*. abril de 2021;18(4):366-8.
- Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Pribelski AD. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*. 1 de septiembre de 2019;8(9):giz100.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 1 de septiembre de 2018;34(17):i884-90.
- Danecek P,...Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 29 de enero de 2021;10(2):giab008.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 32(19):3047-8.
- Fernandez-Pozo N, Bombarely A. EasyGDB: a low-maintenance and highly customizable system to develop genomics portals. *Bioinformatics*. 38(16):4048-50.
- Huson DH, Beier S, Flade I, Górski A, El-Hadidi M, Mitra S, et al. MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. Poiset T, editor. *PLoS Comput Biol*.12(6):e1004957.
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol*. 37(8):907-15.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. abril de 2012;9(4):357-9.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 30(7):923-30.

- Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*. 41(10):e108-e108.
- Li W, Godzik A. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 1 de julio de 2006;22(13):1658-9.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 5 de diciembre de 2014;15(12):550.
- Lu J, Rincon N, Wood DE, Breitwieser FP, Pockrandt C, Langmead B, et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc*. 17(12):2815-39.
- Morillo, E., Buitron, J., Yanez, D., Mournet, P., Vásquez-castillo, W., & Viteri, P. (2025). Genetic Assessment in the Andean Tropical Fruits *Solanum quitoense* Lam. and *S. betaceum* Cav.: Efforts Towards a Molecular Breeding Approach. *Plants*, 14(6), 874
- Perachimba, G., León, J., and Viteri, P. (2004). Caracterización agromorfológica, pomológica y análisis sensorial de 18 ecotipos de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) para seleccionar ecotipos promisorios. I Seminario de Frutales Andinos y Amazónicos y Primera Muestra Agroindustrial (Quito, Ecuador).
- Pujota, M. (2005). Evaluación de la resistencia a *Meloidogyne incognita* y a *Fusarium oxysporum* en una colección de solanáceas para mejoramiento de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), Tumbaco-Pichincha. Tesis Ing. Agr. (Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas), pp.165.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1):139-40.
- Thompson J, Brett C, Neuhaus I, Thompson R. DGEobj.utils: differential gene expression (DGE) analysis utility toolkit [Internet]. 2021 [citado 4 de agosto de 2025]. p. 1.0.6. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=DGEobj.utils>
- Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 28 de noviembre de 2019;20(1):257.
- Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*. agosto de 2021;2(3):100141.

ACTIVIDAD B. Análisis transcriptómico de genes de calidad de fruta en tomate de árbol

Responsables	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	Martinez Aníbal Viera William Fernández Noe (IHSM La Mayora- España)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Fortalecimiento de la investigación para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla y tomate de árbol en el Ecuador
Institución donante:	AECID
Número de memorando aprobación	INIAP-EESC_DIR-2020-0511-MEM
Contrato Marco	MAAE-DNB-CM-2020-0146

ANTECEDENTES

El Programa de Fruticultura del INIAP desde 2006 ha evaluado cruces interespecíficos entre especies relacionadas al tomate de árbol. Estas especies producen resistencia diferencial a algunas enfermedades, pero presentan mala calidad del fruto (tamaño y sabor), por lo que se realizaron retrocruzas para recuperarla (Proaño, 2008). Al momento el INIAP cuenta con progenies con distinto color de mucílago y distinta calidad a antioxidante, esta nueva variabilidad puede utilizarse en nuevos programas de mejoramiento (Viera et al., 2016). Por otro lado, estudios del transcriptoma son investigaciones prácticamente inexistentes en frutales andinos. Por ese motivo, generar información básica en esta temática contribuirá a futuras investigaciones aplicadas al mejoramiento genético de frutales como el tomate de árbol. Conocer el determinismo genético de caracteres como el color de la pulpa y del mucílago, es un paso importante en la investigación de este frutal ya que permitirá en el corto plazo generar herramientas moleculares con posibles aplicaciones en mejoramiento asistido de *S. betaceum*. Si bien existe un trabajo existente para la anotación del transcriptoma en dos cultivares de tomate de árbol (Pacheco et al., 2021), en el que genes asociados a biosíntesis de carotenoides fueron significativamente altos en la variedad morada, este trabajo puede ser considerado como preliminar ya que se realizó en condiciones de invernadero, en otra latitud geográfica (España), y además la expresión de genes no se realizó en frutos como es el caso de nuestro estudio.

OBJETIVOS

General

Realizar un análisis transcriptómico (RNA-seq) en frutos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) de dos variedades comerciales con diferente coloración (anaranjada y morada), en distintos estadios de desarrollo y maduración, con el fin de identificar genes asociados a la calidad del fruto, particularmente aquellos relacionados con la síntesis de carotenoides en pulpa y mucílago.

Específicos

1. Generar librerías de cDNA y datos de secuenciación mediante tecnología RNA-seq.
2. Ensamblar de novo el transcriptoma de fruto de tomate de árbol.
3. Analizar la expresión génica diferencial entre variedades, tejidos (pulpa y mucílago) y estadios de desarrollo.
4. Identificar genes diferencialmente expresados asociados a la calidad del fruto, en particular a rutas de biosíntesis de carotenoides.

METODOLOGÍA

Ensayo experimental: Con apoyo del programa de Fruticultura se estableció un ensayo experimental para realizar autofecundaciones en las dos variedades comerciales de tomate, anaranjada y morada. En este ensayo, localizado en la zona de Valle Hermoso en Pelileo, provincia de Tungurahua se iniciaron ciclos sucesivos de polinización semanal a partir de abril del 2021 (tabla 1).

Tabla 1. Ensayo experimental con autopolinizaciones en dos variedades de tomate de árbol

Variedad	Fecha Polinizacion	Momento	Replica 1	Replica 2
Anaranjada	Abril 7-2021	M1	Arbol 6	Arbol 7
		M2	Arbol 1	
		M3	Arbol 6	Arbol 7
	Abril 12-2021	M2	Arbol 4	Arbol 5
		M2	Arbol 1	Arbol 2
		M3	Arbol 1	Arbol 4
Morada	Abril 7-2021	M1	Arbol 7	Arbol 10
		M2	Arbol 7	Arbol 10
		M3	-	-
	Abril 12-2021	M1	Arbol 4	Arbol 5
		M2	Arbol 4	Arbol 1,2
		M3	Arbol 4	Arbol 1,2

A partir de los frutos autopolinizados se realizó la toma de material en tres momentos de desarrollo del fruto a partir de la fecundación, M1 a los 50 días, M2 a los 83 días (estado de diferenciación de pulpa y mucílago, Viera com. Pers.) y M3 a la madurez fisiológica (160-180 días) (Anexo 1). La toma de muestras (frutos) se realizó en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C hasta la extracción de RNA.

Pruebas de extracción de ARN en mucilago y pulpa: Se realizaron pruebas de extracción de ARN en pulpa (“p”) y mucilago (“m”). Para la extracción de ARN se ensayaron tres métodos: Trizol, Qiazol y PureLink® Plant RNA Reagent, en todos los casos se siguieron las especificaciones del fabricante.

Extracción de ARN de frutos autopolinizados: Validado el mejor método de extracción, se realizó la extracción de ARN en todas las muestras de pulpa y mucilago con los frutos cosechados en los momentos definidos en el ensayo experimental. La cuantificación de los ARNs se realizó por fluorometría en QUBIT con el kit RNA-HS Assay y la verificación del índice de pureza por espectrofotometría en un equipo EPOCH. La integridad de la molécula se verificó en geles de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr Gold.

Purificación del ARN: se utilizó el kit PureLink™ RNA Mini (Thermo Fisher Scientific, cat. 12183018A). Primero, las muestras se aforaron a 500 uL con agua etanol 75%. Se transfirió la muestra a la columna de purificación y se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm. Luego, se eliminó el desecho del tubo colector. Se agregó 700 uL de buffer de lavado I a la columna de purificación y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 segundos. Después, se eliminó el desecho y se cambió el tubo colector. Se añadió 500 uL de buffer de lavado II a la columna de purificación y se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm. A continuación, se eliminó el desecho del tubo colector. Se volvió a colocar 500 uL de buffer de lavado II a la columna de purificación. Se centrifugó por 30 segundos a 12000 rpm y se eliminó el desecho del tubo colector. Se centrifugó la columna a 12000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo. Se añadió 30 uL de agua del kit en la columna de purificación; se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a una temperatura de -80oC.

Análisis RNA-seq: se contrató el servicio de secuenciación NGS a un prestador especializado en el Ecuador (www.biosequenceec.com). Las 64 muestras de ARN purificadas se entregaron para el control de calidad respectivo. Para las librerías de cDNA se utilizó 500 ng-1 µg de RNA purificado por muestra. El protocolo utilizado para la construcción de librerías fue con el kit *Truseq Stranded mRNA Library Prep Kit* de ILLUMINA según las especificaciones del fabricante. La secuenciación en paired end se realizó con la plataforma ILLUMINA con una demanda de 30 millones de lecturas por librería.

Análisis de Expresión Diferencial

Preprocesamiento de datos NGS: Las lecturas brutas se analizaron con *FastQC* v0.11.9 y *MultiQC* v1.13a (Ewels et al 2016) para verificar su calidad. Se utilizó *Kraken2* v2.1.3 (Wood et al, 2019) para clasificar taxonómicamente las lecturas contra la base de datos PlusPFP, y *KrakenTools* v1.2 (Lu et al., 2022) para seleccionar las que habían clasificado como Viridiplantae o no clasificadas y

descartar lecturas contaminadas. Las lecturas descontaminadas se limpiaron con *Fastp* v0.23.4 (Chen et al., 2018) con las opciones `-f 15 -F 15 -I 36 --adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA --adapter_sequence_r2=AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT -x` para eliminar adaptadores y secuencias de baja calidad. Las lecturas limpias y descontaminadas volvieron a analizarse con *FastQC* v0.11.9 y *MultiQC* v1.13a (Ewels et al., 2016) para verificar de nuevo su calidad.

Ensamblaje *de novo*: El ensamblaje de *de novo* es un método bioinformático para construir una secuencia genómica (o transcriptoma) desde cero, sin usar una secuencia de referencia preexistente. En este caso para el ensamblaje de *de novo* para *Fusarium* y nematodos, las lecturas limpias se ensamblaron con *rnaSPAdes* v4.2.0 (Bushmanova et al, 2019) por separado: las raíces infectadas por nematodos y las hojas infectadas por *Fusarium*. Se eliminaron las duplicaciones con *CD-HIT-EST* v4.8.1 (Li et al., 2006; Fu et al, 2012) con las opciones `-g 1 -n 9`, y se filtraron los transcritos por una longitud mínima de 200 bp con *awk* y *Seqtk* v1.4 (<https://github.com/lh3/seqtk>). Se utilizó *Kraken2* v2.1.3 (Wood et al., 2019) con la base de datos PlusPFP y *KrakenTools* v1.2 (Lu et al., 2022) para seleccionar los transcritos clasificados como Viridiplantae y no clasificados. Por último, se utilizó *DIAMOND* v2.1.8 (Buchfink et al, 2021) contra la base de datos de las proteínas no redundantes del NCBI (actualizada a 18 de abril de 2024) con las opciones `blastx --outfmt 5 --ultra-sensitive`, junto con la versión de escritorio de *MEGAN6* v6.25.10 (Huson et al., 2016) para extraer los transcritos clasificados como Viridiplantae.

Mapeo y recuento: Cada librería se mapeó contra el transcriptoma *de novo* correspondiente utilizando *Bowtie 2* v2.5.1 (Langmead et al., 2012) con las opciones `-k 40 --no-mixed --no-discordant`. Las lecturas mapeadas se ordenaron e indexaron con *SAMtools* v1.21 (Danecek et al., 2021) con la opción `-F 0x4`, y se recontaron con el programa *featureCounts* (Liao et al., 2014) del paquete *Subread* v2.0.6 (Liao et al., 2013) con las opciones `-p --countReadPairs -d 0 -D 1000 -C -t transcript`. De forma paralela, esas mismas librerías se mapearon contra los genomas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706 ITAG4.1 descargado del [SGN](#)) y patata (*Solanum tuberosum* v6.1 descargado de Phytozome) usando *HISAT2* v2.2.1 (Kim et al., 2019) con las opciones `--dta` y *SAMtools*. Debido a que el mapeo sobre patata resultó en un promedio del 22.46% de las lecturas mapeadas, y el mapeo sobre tomate devolvió un promedio de 19.30%, se decidió descartar esta opción y no seguir con el recuento.

Evaluación de las réplicas: Los análisis posteriores se realizaron usando R v4.4.1. Los recuentos de genes obtenidos con *featureCounts* fueron normalizados a Counts per Million (CPM) con *edgeR* v4.4.2 (Robinson et al., 2010), y así realizar el análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función *prcomp* del paquete *stats* de R. Por otro lado, los recuentos se normalizaron a Transcripts per Million (TPM) utilizando la función *convertCounts* del paquete de R *DGEobj.utils* (Thompson et al., 2025), y los genes con una expresión TPM ≥ 1 fueron considerados para elaborar un atlas de expresión utilizando un script desarrollado por el IHSM

(https://github.com/kikelg/expression_atlas) basado en *EasyGDB* (Fernandez et al., 2022), y una matriz de correlación utilizando el paquete *corrplot* v0.95 (<https://github.com/taiyun/corrplot>).

Anotación funcional: Se elaboraron archivos de anotaciones de los genes de los tres transcritos ensamblados. Para ello se utilizó *DIAMOND* v2.1.8.162 (Buchfink et al, 2021) contra las bases de datos de referencia Araport11, SwissProt, TrEMBL, ITAG4.0 y NCBI con la opción blastp. A su vez, se generó el archivo de ortología contra *Arabidopsis thaliana*, utilizando *DIAMOND* contra Araport11 de manera recíproca con la opción blastp y descartando aquellos resultados con un bit-score menor a 45.

Análisis de expresión diferencial: La normalización e identificación de genes expresados de manera diferencial (DEGs) se realizó utilizando un script personal (https://github.com/kikelg/DESeq2_volcano) basado en *DESeq2* v1.46.0 (Love et al, 2014).

Enriquecimiento funcional: Los ortólogos de *Arabidopsis thaliana* presentes en los DEGs encontrados se utilizaron para realizar el enriquecimiento funcional, el cual fue ejecutado utilizando un script personal (<https://github.com/bullones/FunRichR>) basado en el paquete *ClusterProfiler* v4.14.6 (Wu et al., 2021).

RESULTADOS

Validación del método de extracción de ARN: Los reactivos PureLink, Trizol y Qiazol empleados en las pruebas de extracción de ARN presentaron buenos resultados. En la Figura 1 se observa la integridad del ARN extraído; sin embargo, con el reactivo Trizol se obtuvo un ARN sin restos de ADN por lo que este se seleccionó para realizar las extracciones de las muestras del ensayo experimental.

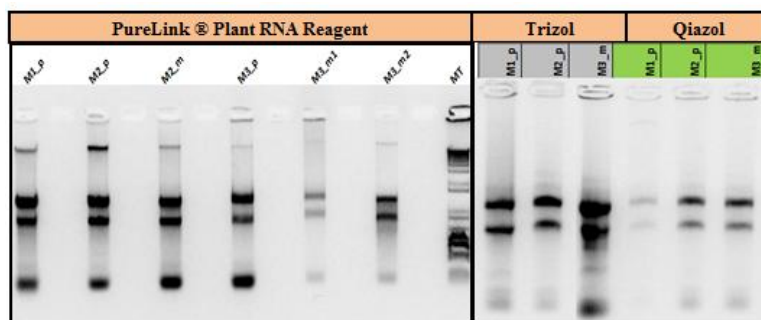


Figura 1. Pruebas de extracción de ARN para mucílago y pulpa

Extracción de ARNs: Se realizaron extracciones de frutos autofecundados de dos fechas de polinización (7 y 12 de abril 2021). Se colectaron muestras de dos árboles para cada genotipo por cada momento establecido (replicas biológicas). Se realizaron un total de 36 extracciones de pulpa y mucílago conforme al detalle de la tabla 1.

En la Figura 2 se observan los resultados de control de integridad de algunos ARNs seleccionados para la construcción de librerías.

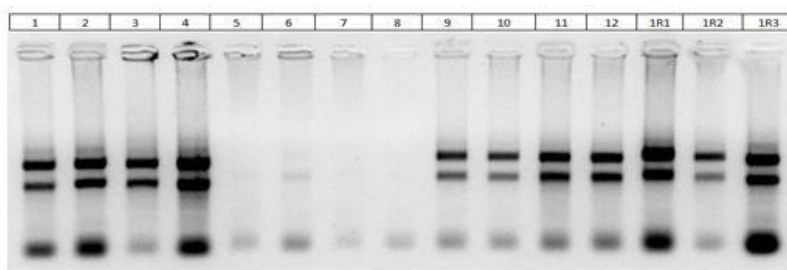


Figura 2. Control de integridad del ARN obtenido en pulpa y mucilago de frutos

Extracción de ARNs: Se realizó la extracción de 36 muestras de ARN (pulpas y mucilagos), por duplicado (réplicas técnicas). En la Tabla 2 se detallan las muestras colectadas del ensayo experimental de campo.

Tabla 2. Muestras de frutos de tomate árbol autofecundados para la extracción de ARN

Tipo	Polinización	Momento	REPLICA1	REPLICA 2	REPLICA3
ANARANJADO	abr-07	M1	ARBOL 6 (P6-A-F1)	ARBOL 7 (P7-A-F1)	
		M2 (83DIAS)	ARBOL 1 (P1-A-07-04-83D)		
		M3	ARBOL 6 (P6-A-07-04-F2)	ARBOL 7 (P7-A-107/04)	
	abr-12	M1	ARBOL 1 (2 FRUTOS) (P1-A-12-04 83D)	ARBOL 2 (2 FRUTOS) (P2-A-12-04 F1)	ARBOL 4 (P4-A- 12-04-83D)
		M2 (83DIAS)	(P1-A--F2-12-04 83D)		
		M3			
MORADO	abr-07	M1	ARBOL 7 (P7-M-F1 -07-04)	ARBOL 10 (P10-M-F1-07-04)	
		M2 (83DIAS)	ARBOL 1 (P1-M-07-04-83D)	ARBOL 1 (P1-M-07-04-83D)	
		M3			
MORADO	abr-12	M1	ARBOL 4 (P4-M-F1 -12-04)	ARBOL 5 (P5-M-F1-12-04)	
		M2 (83DIAS)	ARBOL 1 (P1-M-12-04 83D)	ARBOL 2 (P2-M-12-04 F1)	
			ARBOL 4(2 FRUTOS) (P4-M-12-04 F1)		
		M3	(P4-M-12-04 F2)	ARBOL1 (P1-M-12-04 F1)	

En la Tabla 3 se detallan las concentraciones y el índice de pureza de los ARN obtenidos (el detalle de la muestra corresponde a la numeración (Tabla 2).

Tabla 3. Concentraciones e índice de pureza del ARN obtenidos

ARN	Muestra	Índice pureza	Concentración (ng/uL)
T1	Fruto inmaduro	1.402	249.59
T2	Fruto inmaduro	1.624	465.24
T3P	Pulpa	1.287	696.71
T4M	Mucilago	1.447	362.61
T5P	Pulpa	1.227	175.18
T6M	Mucilago	1.322	152.11
T7P	Pulpa	1.202	447.48
T8M	Mucilago	1.269	230.35
T9P	Pulpa	1.468	289.2
T10M	Mucilago	1.26	305.49
T11P	Pulpa	1.433	380.91
T12M	Mucilago	1.66	426.51
T13P	Pulpa	1.379	311.1
T14M	Mucilago	1.345	367.93
T15P	Pulpa	1.257	174.23
T16M	Mucilago	1.439	212
T17P	Pulpa	1.297	222.74
T18M	Mucilago	1.496	239.1
T19	Fruto inmaduro	1.532	472.23
T20	Fruto inmaduro	1.47	216.16
T21P	Pulpa	1.321	264.91
T22M	Mucilago	1.494	164.78
T23P	Pulpa	1.173	274.58
T24M	Mucilago	1.376	347.8
T25	Fruto inmaduro	1.379	319.85
T26	Fruto inmaduro	1.766	521.68
T27P	Pulpa	1.311	301.29
T28M	Mucilago	1.383	176.94
T29P	Pulpa	1.451	220.72
T30M	Mucilago	1.489	346.74
T31P	Pulpa	1.255	255.85
T32M	Mucilago	1.289	202.07
T33P	Pulpa	1.305	200.08
T34M	Mucilago	1.282	119.47
T35P	Pulpa	1.261	153.46
T36M	Mucilago	1.246	132.02

En la tabla 4 se detalla la lista de 18 ARNs purificados para la construcción de librería.

Tabla 4. Lista de ARNs purificados y seleccionados para la construcción de librerías

No	VARIEDAD	MOMENTO	MUESTRA	ARN	ng
1	Anaranjada	M1	Fruto inmaduro	T1	295
2			Fruto inmaduro	T2	540
3		M2	Pulpa	T3P	110,7
4			Mucilago	T4M	113,1
5			Pulpa	T5P	86,9
6			Mucilago	T6M	540
7		M3	Pulpa	T7P	180
8			Mucilago	T8M	180
9			Pulpa	T19P	180
10	Morada	M1	Fruto inmaduro	T9	180
11			Fruto inmaduro	T10	300
12		M2	Pulpa	T11P	205
13			Mucilago	T12M	80
14			Pulpa	T13P	180
15			Mucilago	T14M	540
16		M3	Pulpa	T15P	540
17			Pulpa	T17P	762
18			Mucilago	T18M	253

Datos obtenidos y control de calidad (FastQC) El número de fragmentos secuenciados (reads) en paired-end para cada librería de cDNA (ARN) se indica en la tabla 5. Para las 18 librerías secuenciadas se obtuvo entre 7' y 329 millones de lecturas. Los 36 archivos de secuencia en formato fastq.gz están almacenados y disponibles en la nube del INIAP ([\\10.150.112.35\biotecnologia\Secuencias_AECID\tomate](https://10.150.112.35/biotecnologia/Secuencias_AECID/tomate)). Así mismo se incluyen los valores de calidad Q30 para cada librería los mismos que superaron valores de 90 para todos los casos exceptuando tres librerías (82.5, 88.9 y 89.6)

El análisis FastQC de las secuencias obtenidas confirmo en la mayoría de los casos una buena calidad de los datos generados para el análisis bioinformático. El reporte del análisis FASTQC de los datos crudos (raw data) está disponible para recarga en el siguiente link: <https://drive.google.com/file/d/16OyhnZYvtTr-D8fXuhpLJ1vUTaN79RhF/view?usp=sharing>

Tabla 5. Librerías secuenciadas y datos NGS obtenidos con la tecnología ILLUMINA

No.	ARN	Librería ID	Total reads	Q30 (%)	PCA sample
1	T1	2412184-032	50,506,834	94.4	01_A_fruit_M1_1
2	T2	2410253-048	148,160,744	97.8	02_A_fruit_M1_2
3	T3P	2412184-015	77,069,036	97.4	03_A_pulp_M2_1
4	T4M	2412184-016	100,349,304	97.0	04_A_muc_M2_1
5	T5P	2412184-017	124,332,644	97.5	05_A_pulp_M2_2
6	T6M	2410253-052	134,872,078	97.4	06_A_muc_M2_2
7	T7P	2410253-053	10,719,858	88.9	07_A_pulp_M3_1
8	T8M	2410253-054	110,360,544	97.2	08_A_muc_M3_1
9	T19P	2412184-025	19,864,624	89.6	09_A_pulp_M3_2
10	T9	2410253-055	79,168,060	96.8	10_M_fruit_M1_1
11	T10	2410253-056	92,445,722	97.2	11_M_fruit_M1_2
12	T11P	2410253-057	48,917,796	96.5	12_M_pulp_M2_1
13	T12M	2412184-019	48,799,598	95.0	13_M_muc_M2_1
14	T13P	2412184-020	9,810,870	82.5	14_M_pulp_M2_2
15	T14M	2410253-060	151,667,948	97.9	15_M_muc_M2_2
16	T15P	2410253-061	96,489,714	97.3	16_M_pulp_M3_1
17	T17P	2410253-063	57,447,566	96.5	17_M_pulp_M3_2
18	T18M	2412184-024	108,838,390	97.0	18_M_muc_M3_1

Ensamblaje de novo: En la tabla 6 se observa el resumen del número de transcritos del ensamblaje de novo realizado. Cuadros resumen de reads mapeados para el transcriptoma se incluye en el anexo 2.

Tabla 6. Resumen de reads ensamblados después de la depuración de datos

ensamblaje	rnaSPAdes	CD-HIT-EST	>=200bp	MEGAN6
Fruta	214,652	200,625	138,358	79,709

En el siguiente link de descarga se adjuntan los informes de MultiQC, tablas de resúmenes de limpieza y alineamiento de lecturas, y ficheros fasta de ensamblajes *de novo*:
https://drive.google.com/drive/folders/1gvfQtHwU_cwdUMByH9gez-67_N0MezSB?usp=sharing

Evaluación de réplicas: Se realizó en R un análisis de Componentes Principales (PCA) con el fin de verificar si las réplicas biológicas se agrupan correctamente entre sí. Este análisis multivariado permite detectar consistencia experimental y ayuda a decidir sobre la exclusión de réplicas, debido

a errores técnicos o de variación biológica. Para complementar el PCA se obtuvo una matriz de correlación, esta permite observar las relaciones entre todas las réplicas e identificar casos de réplicas inconsistentes. En el anexo 3 se adjuntan los análisis de componentes principales (PCA) obtenidos para la evaluación de réplicas.

Se realizaron análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional para las siguientes comparaciones:

- A_fruit_M1 vs M_fruit_M1
- A_muc_M2 vs M_muc_M2
- A_pulp_M2 vs M_pulp_M2

Los resultados del análisis de expresión diferencial entre estas combinaciones con la lista de genes y los valores de sobre o subexpresión (log2FoldChange) están disponibles en formato *.xls y html para su descarga en el siguiente link:

<https://drive.google.com/drive/folders/13CGCXVQUlfakunNWU1likh2tRXrFGVQs?usp=sharing>

Los plot de Correlación, DSP plot, heatmap, PCA, scatter y volcano plot para las tres comparaciones realizadas constan en el anexo 4.

CONCLUSIONES

Los objetivos de la actividad 1.8 se han cumplido eficientemente:

- Se obtuvieron frutos autofecundados de cultivares comerciales de tomate de árbol de diferente coloración de pulpa.
- Se realizó un análisis RNAseq en pulpa obtenida de frutos autofecundados durante diferentes estadios del desarrollo y maduración desde la polinización.
- Se realizó un análisis de expresión diferencial en base a los datos del transcriptoma obtenidos. Se identificaron varios genes diferencialmente expresados asociados a la síntesis de carotenoides en pulpa y mucilago entre las dos variedades de tomate, principalmente en el momento 2 a partir de la autofecundación (83 días). Estos genes deberán validarse en ensayos de cuantificación por qPCR para el desarrollo de marcadores moleculares de selección aplicables al mejoramiento del tomate de árbol.
- Los resultados de este estudio proporcionan una gran cantidad de datos genómicos asociados al desarrollo del fruto en tomate de árbol, están disponibles y son insumos para una publicación científica.

RECOMENDACIONES

- Validar los genes diferencialmente expresados identificados en este estudio mediante técnicas de cuantificación dirigida, como RT-qPCR.
- Desarrollar y evaluar marcadores moleculares asociados a genes de interés para su aplicación en programas de mejoramiento genético de tomate de árbol.
- Ampliar el análisis transcriptómico a un mayor número de genotipos y ambientes para fortalecer la identificación de genes asociados a la calidad del fruto.
- Integrar la información transcriptómica generada con datos fenotípicos y bioquímicos de calidad de fruto (color, antioxidantes, compuestos nutricionales).
- Utilizar los datos obtenidos como base para publicaciones científicas y para el desarrollo de futuras investigaciones en frutales andinos, un área aún poco explorada a nivel transcriptómico.

REFERENCIAS

- Buchfink B, Reuter K, Drost HG. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat Methods*. abril de 2021;18(4):366-8.
- Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Prjibelski AD. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*. 1 de septiembre de 2019;8(9):giz100.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 1 de septiembre de 2018;34(17):i884-90.
- Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*. 29 de enero de 2021;10(2):giab008.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 1 de octubre de 2016;32(19):3047-8.
- Fernandez-Pozo N, Bombarely A. EasyGDB: a low-maintenance and highly customizable system to develop genomics portals. Robinson P, editor. *Bioinformatics*. 10 de agosto de 2022;38(16):4048-50.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 1 de diciembre de 2012;28(23):3150-2.
- Huson DH, Beier S, Flade I, Górski A, El-Hadidi M, Mitra S, et al. MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. Poisot T, editor. *PLoS Comput Biol*. 21 de junio de 2016;12(6):e1004957.
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol*. agosto 2019;37(8):907-15.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. abril de 2012;9(4):357-9.
- Li W, Godzik A. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 1 de julio de 2006;22(13):1658-9.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*. 1 de mayo de 2013;41(10):e108-e108.

- Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 1 de abril de 2014;30(7):923-30.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 5 de diciembre de 2014;15(12):550.
- Lu J, Rincon N, Wood DE, Breitwieser FP, Pockrandt C, Langmead B, et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc*. diciembre de 2022;17(12):2815-39.
- Pacheco, J., Vilanova, S., Grillo-Risco, R., García-García, F., Prohens, J., & Gramazio, P. (2021). De novo transcriptome assembly and comprehensive annotation of two tree tomato cultivars (*Solanum betaceum* cav.) with different fruit color. *Horticulturae*, 7(11), 431.
- Proaño, D. (2008). Caracterización y selección de segregantes de cruzamientos interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), y atributos agronómicos deseables evaluados en las provincias de Pichincha y Tungurahua. Tesis Ing. Agr. (Latacunga, Ecuador: Universidad Técnica de Cotopaxi).
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 1 de enero de 2010;26(1):139-40.
- Thompson J, Brett C, Neuhaus I, Thompson R. DGEobj.utils: differential gene expression (DGE) analysis utility toolkit [Internet]. 2021 [citado 4 de agosto de 2025]. p. 1.0.6. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=DGEobj.utils>
- Viera, W., Sotomayor, A., Tamba, V., Vásquez, A., Martínez, A., Viteri, P., y Ron, L. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la antracnosis (*Collectotrichum acutatum* J.H.). *Acta Agronómica*. 65, 304–311.
- Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*. 28 de noviembre de 2019;20(1):257.
- Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*. Agosto 2021;2(3):100141.

ACTIVIDAD C. Genotipado de materiales de café

Responsable	Morillo Eduardo, Buitrón Johanna
Colaboradores	Ortega Julio (UNESUM)
Nombre del proyecto que financió el estudio:	Mejoramiento genético de café” UNESUM
Institución donante:	UNESUM (actividad en colaboración técnica)

ANTECEDENTES

El café constituye uno de los cultivos agrícolas de mayor relevancia económica y social a nivel nacional y regional, siendo fundamental para la sostenibilidad de los sistemas productivos y la generación de ingresos para pequeños y medianos productores. La caracterización genética del germoplasma de café es una herramienta clave para la conservación de la diversidad genética, la correcta identificación de materiales y el fortalecimiento de programas de mejoramiento, especialmente frente a amenazas fitosanitarias como la roya del café (*Hemileia vastatrix*). En este contexto, el uso de marcadores moleculares, particularmente microsatélites (SSR) y marcadores SCAR, ha demostrado ser altamente eficiente para el análisis de variabilidad genética, estudios de parentesco y detección de genes asociados a resistencia. La Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM), en coordinación con el Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, ha impulsado la evaluación genética de materiales de café, con enfoque de resistencia a roya, mediante técnicas de biología molecular. Estas iniciativas permiten generar información confiable que respalde la toma de decisiones en investigación, conservación y mejoramiento genético del cultivo, contribuyendo al desarrollo sostenible del sector cafetalero.

OBJETIVO

Realizar el genotipado de un lote de 55 muestras de Café entregados por la UNESUM con un panel de marcadores microsatélites (SSRs).

METODOLOGÍA

Material vegetal: El material de café fue proporcionado por el Dr. Julio Gabriel Ortega de la UNESUM. En el Anexo 1 se detalla los códigos e identificación del material recibido. Se recibió tejido foliar preservado en sílica gel. El material fue entregado al Departamento de Biotecnología de la EESC en Julio 2025 para su procesamiento y análisis.

Extracción de ADN: La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por De Souza et al. (2012) el cual se detalla a continuación. Para cada muestra se pulverizó 100 mg de tejido deshidratado en tubos Eppendorf de 1,5 mL con un molino MM 400 Retsch. Luego se adicionó un 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), se agitó por vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 5800 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en un mL de buffer Sorbitol, repitiéndose este paso de lavado tres o cuatro veces. Al pellet obtenido tras el último lavado se le adicionó 1 mL de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 3 M NaCl; 3% CTAB; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoetanol; 0,2% sarkosyl; precalentado a 60 °C) y las muestras se incubaron por una hora a 60 °C. Posteriormente se centrifugó por cinco minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionaron 600 µL de CIA (24:1), se mezcló suavemente durante 10 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se transfirió a tubos limpios y se le añadieron 70 µL de acetato de sodio (3 M; 1/10 del volumen) y 460 µL de isopropanol (2/3 del volumen). La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos. El pellet obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% y luego con 500 µL de etanol absoluto, centrifugando cinco minutos en cada paso. Finalmente, el pellet de ADN fue secado y resuspendido en 100 µL de buffer TE.

Cuantificación y validación del ADN: Las muestras de ADN obtenidas se cuantificaron por espectrofotometría en el equipo para microplacas EPOCH™ de Biotek®, empleado el programa GEN5. Se utilizó 2 µL de muestra de ADN en la microplaca Take 3, a través de las lecturas de absorbancias (260 nm y 280nm) el programa GEN5 determinó la concentración de las muestras y su índice de pureza (Biotec Instruments, 2011). La validación del ADN se verificó por PCR con el marcador CAM03 (Hendre et al., 2008). La tabla 1 muestra el cóctel de amplificación para la validación de las muestras de ADN (Morillo y Miño, 2011). Se utilizó el marcador CAM03. Con el procedimiento de validación de las muestras usado en el laboratorio (Morillo y Miño, 2011).

Pruebas PCR y multiplexaje de primers: Se amplificaron siete muestras de ADN validadas con 23 marcadores SSR y tres marcadores SCAR de una nueva síntesis (tabla 1). Se empleó un control negativo por cada primer probado y se empleó una temperatura de anillamiento entre 50 y 60°C.

Tabla 1. Marcadores moleculares utilizados para el genotipado de café

MARCADOR	PRIMERS	AMPLICÓN	REFERENCIA
SSRCa003	F: ATGATTCGTAGGTGGAGTGG	196	
	R: CTAAGCCGCAAATGACAGA		
SSRCa016	F: AGCAGATTCCATCCTTATCCT	172	
	R: CCACTAATCCATTCCATTCC		
SSRCa019	F: GGGTTAGATAGAGCAAGAATGA	379	
	R: CTGTGAAGGTGTGGAGTTTT		
SSRCa020	F: GGTAGGCGAAGGACAGATAA	264	
	R: TGGGGCAGAGTGAAGATAAG		
SSRCa023	F: GACCCTTGCCCTTTTGTG	259	
	R: GCCATTCATCCATTCATTC		

SSRCa026	F: GAATCTGGTGGGCTTTGA R: AAGGAGAGGGGAAGAAAATG	289	Missio et al.,2010
SSRCa052	F: GATGGAAACCCAGAAAGTTG R: TAGAAGGGCTTTGACTGGAC	129	
SSRCa062	F: AAGTTATTAGGGCAAGAGTGGA R: AAGCTCCAAGACCAAAGATG	275	
SSRCa068	F: ATGTTGTTGGAGGCATTTTC R: AGGAGCAGTTGTTGTTTCC	236	
SSRCa079	F: AAGTGGAGGAGTTTTGTGGA R: CCAAGTGGATAGGTGTGAGAG	287	
SSRCa080	F: GTTCTTTCCGCCGTCAAT R: GAGAAGAGAGAGGAAGGGAAA	250	
SSRCa081	F: ACCGTTGTTGGATATCTTTG R: GGTGAACCTAGACCTTATTT	229	
SSRCa082	F: GCTTGTTCATCGCTAAA R: TTACACGTCAACCCACAAAC	178	
SSRCa083	F: TCCAACAACATTAAGCGTATTC R: GACAAACCTGAGGGAAAAGA	223	
SSRCa087	F: TCACTCTCGCAGACACACTAC R: GCAGAGATGATCACAAGTCC	143	
SSRCa088	F: TACCTCTCCTCCTCCTTCCT R: ATTTCTATGGACCGGCAAC	180	
SSRCa092	F: ATAGCCTGAGCCGTAACCA R: GGGTAATTATGACGAGGGACA	142	
SSRCa094	F: GTGTCCTAGGGAAGGGTAAG R: GAGTGCTAGGAGAGGGAGAG	195	
SSRCa095	F: GAGAGAGCCGAGTGAAGAGA R: GAGAGAGAAGCCATGATTGA	185	
CaM16	F: AAGGCAGCTGAAGCGGGACAAA R: TGGGGAGAGCTGCAGTTGGAGG	199	Hendre et al., 2008
Sat160	F: TGCTTAGGCACTTGATATAGGA R: CACGTGCAAGTCACATACTTTA	133	Mahé et al., 2008; Nagaño et al., 2022
Sat281	F: TCTTCGTCTTTGCTATTGGT R: TATTAACGTCCATCCACACA	95	
Sat244	F: GCATGTGCTTTTGATGTCGT R: GCATACTAAGGAAATTATCTGACTGCT	280-307-313	
BA-42-21B-r	F: CACACACAGCCTAAGCATCAA R: GGATTGACTCGACTCACCAA	378	
BA-48-21O-f	F: ACAGTGAATCCCCAAGCAC R: ACTTGGCAGGCGTAATTGAA	301-315	
BA-124-12K-f	F: TGATTTGCTTGTGTCGAG R: TGCAGATTGATGGCACGTTA	230	

Con los *primers* amplificados se realizaron las pruebas de polimorfismo y multiplexaje con la tecnología M13 tailing (Tablas 4 y 5; Morillo y Miño, 2011). Los productos PCR se corrieron en el LI-COR 4300s. Los *primers* seleccionados se completaron con marcadores previamente validados en el laboratorio (Tabla 2).

Tabla 2. Combinaciones dúplex SSR previamente validadas (DNB 2018)

Combinaciones 2018		
Dúplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
CaM17- CaM26	50	800
CaM32- CaM55	50	800
CaM22- CaM24	57	800
Mónoplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
CaM42	55	700

Genotipaje: Se realizó con las condiciones de rutina del laboratorio.

RESULTADOS

Extracción cuantificación y validación de ADN: La extracción de ADN resultó satisfactoria, obteniéndose una concentración promedio de 876 ng/μL y un índice de pureza medio de 1,9. En el Anexo 1 se presenta la cuantificación de todas las muestras de ADN extraídas. La validación de las muestras resultó eficiente

Pruebas PCR y multiplexaje: se validaron los 26 marcadores con temperaturas de anillamiento entre 50 y 60 ° C.

Las pruebas de polimorfismo y multiplexaje con los 26 nuevos marcadores sintetizados dió como resultado las combinaciones detalladas en la tabla 3 que incluyen 5 nuevas combinaciones dúplex. Este resultado más los marcadores previamente validados en el laboratorio resultó en un total de 27 marcadores analizados en las 55 muestras de café del presente proyecto.

Tabla 3. Marcadores utilizados para el genotipado de ADN de café

Síntesis 2025		
Dúplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
SSRCa019- SSRCa023	55	700

SSRCa003- SSRCa020	55	700
SSRCa016- SSRCa026	55	800
SSRCa052- SSRCa062	55	800
SSRCa068- SSRCa082	55	700
Mónoplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
SSRCa079	55	700
SSRCa087	55	800
SSRCa088	55	800
SSRCa092	55	700
CaM16	55	700
Sat160	50	700
Sat281	56	700
Sat244	56	800
BA-48-210-f	50	800
BA-124-12K-f	60	800
Síntesis 2018		
Dúplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
CaM17- CaM26	50	800
CaM32- CaM55	50	800
CaM22- CaM24	57	800
Mónoplex	Temp. annealing (°C)	Marcaje M13
CaM42	55	700

Las imágenes de los geles obtenidos con su genotipificación se visualizan en el Anexo 2. En el Anexo 3 se detallan la matriz de datos genotípicos obtenidos para las 55 muestras de café con 22 marcadores SSRs genómicos y cinco marcadores asociados a la resistencia a roya: tres SSRs (Sat 160, Sat244, Sat281) y dos marcadores SCAR (BA-48-210-f y BA- 124-12K-f)

CONCLUSIONES

- Se realizó el genotipado de 55 muestras de café con 27 marcadores generándose un total de 1485 data points. Se obtuvieron datos de 25 marcadores SSR genómicos que incluyen tres SSRs asociados a la resistencia a roya (Sat 160, Sat244, Sat281) y dos marcadores SCAR (BA-48-210-f y BA-124-12K-f).
- De los 25 marcadores SSR solo siete mostraron polimorfismo: SSCa023, SSRCa052, SSRCa068,

SSRCa082, CaM26, CaM32, SSRCa087 y SAT281. El marcador Sat281, , resultó el único de los cinco asociados a la resistencia a roya que reveló polimorfismo, diferenciándose tres muestras: 021_105_3, 021_105_7 y 021_107_1.

- El análisis de la información generado por parte de la UNESUM permitirá asociar la información molecular con los datos de resistencia a roya que se dispone.

RECOMENDACIONES

Los marcadores SCAR asociados a la resistencia a roya, incluyen polimorfismos de secuencia que no pueden distinguir con la tecnología M13-Tailing. Se recomienda detectar un posible polimorfismo de estos marcadores con el uso de enzimas de restricción o secuenciación de los amplicones.

REFERENCIAS

- Biotech Instruments, Inc. 2011. Epoch microplate Spectrophotometer Operator's manual.
- Hendre, P. S...., A., & Aggarwal, R. K. (2008). Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. BMC Plant biology, 8(1), 51.
- Mahé, L., Combes, M. C., Várzea, V. M., Guilhaumon, C., & Lashermes, P. (2008). Development of sequence characterized DNA markers linked to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) resistance in coffee (*Coffea arabica* L.). Molecular breeding, 21(1), 105- 113.
- Missio, R. F., Caixeta, E. T., Zambolim, E. M., Zambolim, L., Cruz, C. D., & Sakiyama, N. S. (2010). Polymorphic information content of SSR markers for Coffea spp. Crop Breed Applied Biotechnology, 10, 89-94.
- Morillo E. & Miño G. 2011. Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. Manual técnico No. 91. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina. Quito. 121 p.
- Nagaño, T. F. S., Santos, N. R. S., Santos, D. M. C., & Cao, E. P. (2022). In Silico Physical Mapping of Resistance and Resistance-associated Genes in the S H³ Region of the *Coffea canephora* Genome. Philippine Journal of Science, 151(1).
- 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.

ANEXOS. 1.1. Matrices de datos genotípicos, jícama y chocho

MUESTRAS	LM19	LM19	LM70	LM70	LM20	LM20	LM72	LM72	LM07	LM07	LM05	LM05	LM15	LM15	LM22	LM22	LM23	LM23	LM34	LM34	LM43	LM43	LM57	LM57	LM57	LM57	LM33	LM33
AELO REPORTADO	ATG16	ATG16	(AAG14)	(AAG14)	(ATG18)	(ATG18)	LM72	LM72	LM07	LM07	LM05	LM05	LM15	LM15	LM22	LM22	LM23	LM23	LM34	LM34	LM43	LM43	LM57	LM57	LM57	LM57	LM33	LM33
ENCUENTROS A ELOS	143	127	124,127	134	134	132	125	132	104	104	146	146	146	146	138	138	180	180	143	143	137	137	144	144	144	144	143	143
MUESTRAS	143	173	124,127	134	134	132	125	132	104	104	146	146	146	146	138	138	180	180	143	143	137	137	144	144	144	144	143	143
2676	143	143	124	127	131	134	129	132	104	104	143	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e1	-1	-1	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	143	143	143	143
e19	173	173	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e24	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e28	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e28	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	143	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e30	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	-1	-1	138	138	180	180	-1	-1	167	167	157	157	137	137	-1	-1
e31	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
e35	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e38	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
e39	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	154	154	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	143	144	143	146
e4	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	154	154	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	-1	-1	143	143
e40	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	154	154	137	137	143	144	143	143
e41	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	143	146	154	154	138	138	180	180	167	167	174	174	137	137	143	144	143	143
e42	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e5	-1	-1	124	127	131	134	129	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e50	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e55	143	143	124	124	134	134	129	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	174	174	137	137	143	143	143	143
e58	143	143	124	124	134	134	129	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	174	174	137	137	143	144	143	143
e60	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e61	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e62	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e63	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e64	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	146
e65	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	146
e66	143	143	127	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	146
e67	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e7	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e72	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e73	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e75	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	143	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e79	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e80	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e81	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e82	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e83	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e84	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e85	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e86	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e87	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e88	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e89	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e90	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e91	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e92	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e93	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e94	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e95	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e96	143	143	124	127	131	134	132	132	104	104	146	146	157	157	138	138	180	180	167	167	157	157	137	137	144	144	143	143
e97	1																											

- **Matriz de datos genotípicos de población F3 de lupinus**

MUESTRAS	LM33	LM33	LM70	LM70	LM34	LM34	
	(TAT)4		(AAG)14		(TTG)4		
ALELO REPORTADO	143		127		167		
ALELO ENCONTRADO	140,143,146		121,124,127		161,167,170		
MUESTRAS							
a10	143	143	124	124	167	167	0
a14	143	143	124	124	167	167	0
a24	143	146	124	127	170	170	0
a40	143	146	124	127	167	167	0
d36	143	143	124	124	170	170	0
d4	143	143	124	124	167	170	0
d9	140	140	-1	-1	161	167	2
a1	143	143	127	127	167	167	0
a11	143	143	124	127	167	167	0
a12	143	143	127	127	167	167	0
a13	143	143	124	127	167	167	0
a15	143	143	127	127	167	167	0
a16	143	140	124	127	167	167	0
a17	143	143	127	127	167	167	0
a18	143	143	127	127	167	167	0
a19	143	143	127	127	167	167	0
a2	143	143	127	127	167	167	0
a20	143	143	127	127	167	167	0
a21	143	143	127	127	167	167	0
a22	143	143	127	127	167	170	0
a23	143	146	127	127	167	170	0
a25	143	146	127	127	167	170	0
a26	143	146	127	127	167	170	0
a27	143	146	124	127	167	170	0
a28	143	143	127	127	167	167	0
a29	143	146	127	127	167	167	0
a3	143	143	124	124	167	170	0
a30	143	146	124	127	167	170	0
a31	143	146	127	127	167	170	0
a32	143	146	127	127	167	167	0
a33	143	146	127	127	167	170	0
a34	143	146	124	127	167	167	0
a35	143	146	124	127	167	170	0
a36	143	146	127	127	170	170	0
a37	143	143	127	127	167	170	0
a38	143	146	124	127	167	167	0
a39	143	146	124	127	167	170	0
a4	143	143	121	124	167	167	0
a41	143	146	124	127	167	167	0
a42	143	146	124	127	167	167	0
a43	143	146	127	127	170	170	0
a5	143	143	124	127	170	170	0
a6	143	143	124	124	170	170	0
a7	143	140	124	127	167	167	0
a8	143	143	127	127	167	167	0
a9	143	143	127	127	167	167	0
d1	143	143	124	124	167	170	0
d10	140	140	127	127	167	167	0
d11	140	140	124	127	167	167	0
d12	140	140	124	127	167	170	0
d13	140	140	127	127	170	170	0
d14	140	140	127	127	167	167	0
d15	140	140	127	127	167	167	0
d16	143	143	124	127	167	167	0
d17	143	140	124	127	167	170	0
d18	140	140	124	127	167	170	0
d2	143	143	127	127	167	167	0
d20	143	143	124	127	167	167	0
d21	143	143	124	127	167	170	0
d22	140	140	124	127	170	170	0
d23	140	140	124	127	167	167	0
d24	140	140	127	127	167	167	0
d25	140	140	124	127	167	170	0
d26	140	140	127	127	167	167	0
d27	143	143	124	127	167	167	0
d28	143	140	127	127	170	170	0
d29	140	140	124	124	167	167	0
d3	143	143	124	127	167	167	0
d30	140	140	124	124	167	170	0
d31	143	140	124	127	170	170	0
d32	143	140	124	127	167	167	0
d33	143	143	124	124	167	167	0
d34	140	140	124	127	167	170	0
d35	143	143	124	124	167	167	0
d37	143	143	127	127	167	170	0
d38	143	143	124	127	167	170	0
d39	140	140	127	127	167	170	0
d40	140	140	124	127	170	170	0
d41	143	140	124	127	167	167	0
d42	143	143	124	127	167	170	0
d43	143	140	124	127	167	167	0
d5	140	140	124	127	167	167	0
d6	-1	-1	127	127	167	167	2
d7	140	140	127	127	167	167	0
d8	140	140	127	127	167	167	0
m7	146	146	124	127	167	167	0
mu7	146	146	124	127	167	167	0
mue9	143	143	121	124	167	170	0
mues9	143	143	124	124	167	170	0

- Matriz de datos genotípicos de jícama

MUESTRA	PS39	PS39	PS40	PS40	PS49	PS49	PS50	PS50	PS50	PS50	PS51	PS51
	(AAT)15		(ATT)17		(ATT)15		(ATA)18				(ATC)11	
ALELO REPORTADO	142		164		111		192				140	
ALELOS ENCONTRADOS	123,138,141		155,161,164		87,102,111,114,117		186,189,192,195				137.14	
MUESTRAS	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼
1236	123	138	161	164	114	117		186	189	192	140	140
1239	123	138	161	164	114	117			186	192	140	140
1240	-1	-1	161	164	117	117			186	192	140	140
1241	123	138	164	164	117	117			186	192	140	140
1242	123	123	164	164	102	102			186	192	137	137
1243	123	141	161	164	114	114			186	192	140	140
1246	123	138	164	164	114	117			186	192	140	140
1247	-1	-1	161	164	114	117			186	192	140	140
1248	123	123	161	164	114	117			186	192	137	140
1249	123	123	164	164	117	117			192	192	140	140
1252	123	138	164	164	102	102			186	192	140	140
1253	123	123	164	164	117	117			186	192	-1	-1
1254	141	141	155	164	117	117			189	192	140	140
1255	141	141	155	155	-1	-1			189	192	137	137
1259	-1	-1	164	179	114	117			189	192	140	140
1261	141	141	161	164	-1	-1			192	192	137	140
1267	123	141	-1	-1	87	87		165	189	192	137	140
12767	123	141	164	164	-1	-1		165	189	192	137	140
12768	138	141	164	164	114	114			186	192	137	140
12769	123	141	161	164	114	117	186	189	192	195	140	140
1277	141	141	155	155	114	117			189	192	137	137
19526	123	123	161	164	117	117			186	192	140	140
19527	123	138	161	164	114	117		186	189	192	140	140
2320	141	141	164	179	87	111			192	192	137	140
2321	138	141	155	164	117	117		189	192	195	137	137
6566	138	141	155	155	114	117			189	192	140	140
6665	141	141	155	155	117	117			189	192	137	137
9109	141	141	155	164	117	117			189	192	137	137
9110	123	141	161	164	114	117	186	189	192	195	140	140

Anexo 2.1. Extracción de ADN protocolo descrito por Souza et al. (2012)

Para cada muestra se pulverizó 100 mg de tejido deshidratado en tubos Eppendorf de 1,5 ml con un molino MM 400 Retsch. Luego se adicionó un 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), se agitó por vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 5800 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en un ml de buffer Sorbitol, repitiéndose este paso de lavado tres o cuatro veces. Al pellet obtenido tras el último lavado se le adicionó 1 ml de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 3 M NaCl; 3% CTAB; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoetanol; 0,2% sarkosyl; precalentado a 60 °C) y las muestras se incubaron por una hora a 60 °C. Posteriormente se centrifugó por cinco minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionaron 600 µL de CIA (24:1), se mezcló suavemente durante 10 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se transfirió a tubos limpios y se le añadieron 70 µL de acetato de sodio (3 M; 1/10 del volumen) y 460 µL de isopropanol (2/3 del volumen). La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos. El pellet obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% y luego con 500 µL de etanol absoluto, centrifugando cinco minutos en cada paso. Finalmente, el pellet de ADN fue secado y resuspendido en 100 µL de buffer TE.

Anexo 2.2 Cocteles y programas térmicos para amplificación

REACTIVO	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			4.1
BUFFER PCR (X)	5	1	2
MgCl ₂ (mM)	25	2	0.8
dNTP's (mM)	5	0.1	0.2
Primer (uM)	10	0.2	0.2
Taq casera (U/uL)	5	0.1	0.2
MUESTRA (ng/uL)	20	5	2.5
Volumen de reacción (uL)			10

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	92	4 min	
2	92	30 seg	40 ciclos
3	45 (TA)	1 min	
4	72	1min	
5	72	10 min	
6	4	10 min	

Coctel de y programa térmico para la amplificación para la validación de primers SSR

REACTIVO	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP	-	-	2,18
BUFFER PCR (X)	5,00	1,00	1,50
MgCl ₂ (mM)	25,00	2,00	0,60
dNTP's (mM)	5,00	0,25	0,38
Primer (uM) F	10,00	0,50	0,38
Primer (uM) R	10,00	0,50	0,38
Taq polimerasa (U/uL)	5,00	0,06	0,10
ADN (ng/uL)	5,00	1,33	2,00
VOL. TOTAL (uL)			7,50

Anexo 2.3. Marcadores SSRs reportados por Draper et al. (2024) para ishpingo

Marcador	Locus Primers (5'-3')		Ta (°C)	Repeat	Size Range (bp)
ISH_01	Oqui1	TTCCTTCAAAAGTATGCCCCT	58	(TA)5	142–147
		CCCGTAGTTCAGGTAGTCCC			
ISH_02	Oqui2	GGTGTGAATGGACTCGGGAT	59	(CCT)3	136–142
		CCCGGAGTCAGGACATCAAT			
ISH_03	Oqui3	TCATGGATTAGGACGAGATAGCT	58	(CT)9	119–131
		TCTCTCTCCCACTCTCCAGT			
ISH_04	Oqui4	CATATGCCGGAGTTGAGGGT	59	(TA)13	128–135
		CAGTCTCCTAACGATGGGGT			
ISH_05	Oqui5	GAGTTATGAGTAGGATCGGGGA	58	(CCAA)4	111–118
		TCGGGTAAACTCTCAAGGGG			
ISH_06	Oqui6	AAATGGAAAATCACTGGGTAGGG	59	(ATA)4	103–119
		TCTCTAACTCTCTAAACTCCGCC			
ISH_07	Oqui7	CCTTAATGTGGAGTTTACCGAGA	58	(GA)5	113–123
		TGGTTAACTCTAAACGTGTGGG			
ISH_08	Oqui8	TTATCCTATGTGCGCGCTTG	58	(GCT)5	115–119
		GCCAACACAAACCACAACCTC			

Anexo 2.4. ADN de ishpingo obtenido para el estudio

	COD. MUESTRA	260/280	ng/ μ L
1	ISH1	1.912	204.411
2	ISH2	1.904	988.103
3	ISH3	1.948	170.368
4	ISH10	2.01	150.734
5	ISH11	2.064	238.146
6	ISH12	2.091	375.797
7	ISH13	2.049	55.33
8	ISH14	2.042	229.942
9	ISH15	2.1	813.009
10	ISH16	2.029	62.117
11	ISH17	2.074	492.198
12	ISH18	2.034	84.618
13	ISH19	2.043	179.533
14	ISH20	2.013	33.936
15	ISH21	2.081	625.301
16	ISH22	2.063	215.233
17	ISH23	2.072	222.56
18	ISH24	1.652	1.04
19	ISH25	2.002	310.355
20	ISH26	2.043	155.737
21	ISH27	2.015	1021.5
22	ISH28	2.055	242.529
23	ISH29	2.237	22.802
24	ISH30	1.951	887.25
25	ISH31	2.102	299.3
26	ISH32	2.071	100.038
27	ISH33	2.048	434.436
28	ISH34	2.027	64.963
29	ISH35	1.953	500.082
30	ISH36	2.044	82.085
31	ISH40	2.058	428.329
32	ISH41	2.021	879.176
33	ISH42	2.05	479.477
34	ISH43	2.006	615.118
35	ISH44	1.968	149.068
36	ISH45	2.019	496.402
37	ISH46	2.003	223.419
38	ISH47	1.997	223.946

39	ISH48	2.022	425.505
40	ISH49	2.071	386.344
41	ISH50	2.066	563.979
42	ISH51	2.103	194.049
43	ISH52	2.076	636.202
44	ISH53	2.05	452.591
45	ISH54	2.043	648.396
46	ISH55	1.814	645.436
47	ISH56	1.906	387.401
48	ISH57	1.944	542.83
49	ISH58	1.785	124.754
50	ISH59	1.973	697.066
51	ISH60	1.959	482.1
52	ISH61	1.911	359.946
53	ISH62	1.966	613.077
54	ISH63	1.968	277.959
55	ISH64	1.998	745.572
56	ISH65	1.921	293.205
57	ISH66	2.005	457.755
58	ISH67	2.453	488.903
59	ISH68	2.464	513.145
60	ISH69	2.565	386.104
61	ISH70	10.088	82.54
62	ISH71	6.191	97.653
63	ISH72	-9.023	54.835
64	ISH73	2.841	212.17
65	ISH74	1.938	63.349
66	ISH75	1.927	79.725
67	ISH76	1.939	57.848
68	ISH77	2.002	68.652
69	ISH78	1.917	67.16
70	ISH79	2.012	26.843
71	ISH80	1.986	70.718

Anexo 3.1. Coctel de PCR y programa térmico utilizado para la amplificación del fragmento ITS

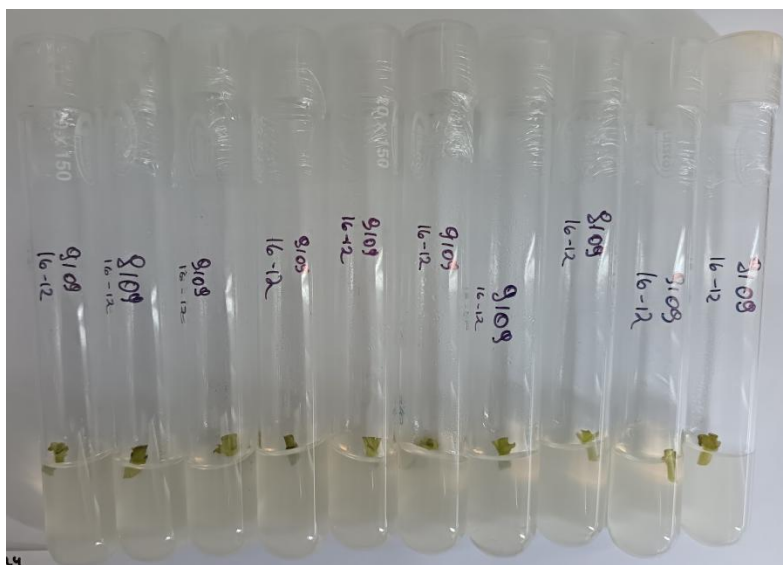
Amplificación ITS	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			8
BUFFER PCR (X)	5	1	5
MgCl ₂ (mM)	25	2.5	2.5
dNTP's (mM)	5	0.2	1
Primer (uM)	10	0.5	1.25
Primer (uM)	10	0.5	1.25
Taq casera (U/uL)	5	0.3	1.5
MUESTRA (ng/uL)	5	1	5
VOL. TOTAL (uL)			25

	Temperatura	Tiempo	
1	94 °C	3 min	
2	94°C	1 min	35 CICLOS
3	58°C	1 min	
4	72°C	2 min	
5	72°C	5 min	
6	4°C	10min	

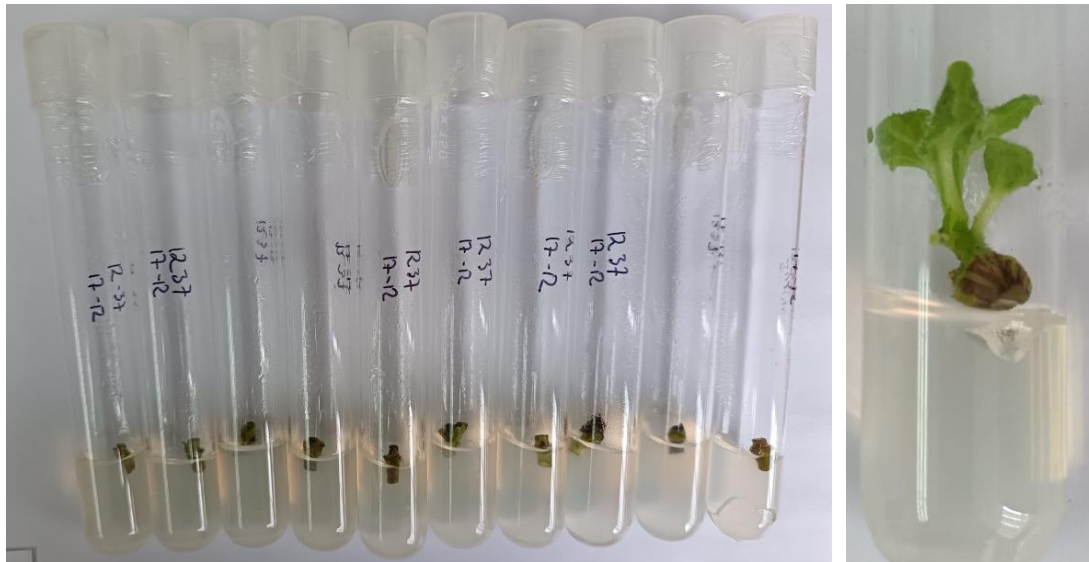
Anexo 6.1. Introducción *in vitro* de jicama (materiales de altos contenidos de FOS)



Plantas establecidas en invernadero: accesión ECU-9109 (Izquierda), ECU-1237 (derecha).



A



B

Establecimiento *in vitro* y brotación **A)** PD1 + genotipo 9091. **B)** PD2 + genotipo 1237. DNB-EESC.

Anexo 6.2. Propagación *in vitro* de jicama de altos contenidos de FOS



Plantas utilizadas para los ensayos de micropropagación de Jicama (ECU-1237).

A



B



C



D



Ensayos de la propagación *in vitro* de jicama **A)** T1: BAP (2.5 mg.L^{-1}). **B)** T2: TDZ (1 mg.L^{-1}). **C)** T3: AG3 (0.3 mg.L^{-1}). **D)** T4: Control

Anexo 3. Adaptación *ex vitro* de jicama de altos contenidos de FOS

A



B



Adaptación a condiciones de invernadero de *vitro* plantas de jícama (ECU-1237). **A)** longitud inicial de *vitro* planta. **B)** condiciones microambientales para adaptación.

A



B



Ensayo de adaptación a condiciones de invernadero de *vitro* plantas de jícama (ECU-1237) a los 30 días. **A)** S1 Turba **B)** S2 Turba + perlita.

Anexo 1. Lista de materiales receptados. Material colectado en Julio de 2025

[illegible]

Material colectado en septiembre de 2025

NO	ID	NO	ID
1	12P_012	32	12P_205
2	12P_026	33	12P_206
3	12P_027	34	12P_207
4	12P_028	35	12P_249_T7_R2
5	12P_029	36	12P_256_T7_R1
6	12P_031	37	12p_302_T11_R1
7	12P_032	38	12P_307_T2_R1
8	12P_033	39	12P_310
9	12P_034	40	12P_355_T1_R4
10	12P_037	41	12P_356
11	12P_038	42	12P_357
12	12P_040	43	12P_359
13	12P_080	44	12P_360_T10_R2
14	12P_081	45	12P_361
15	12P_082	46	12P_418
16	12P_088	47	12P_419
17	12P_089	48	12P_420
18	12P_090	49	12P_428
19	12P_093	50	12P_470
20	12P_094	51	12P_471
21	12P_095	52	12P_472
22	12P_135	53	15_005
23	12P_136	54	15_006
24	12P_137	55	15_007
25	12P_143	56	15_008
26	12P_144	57	15_010
27	12P_145	58	15_116
28	12P_192	59	15_117
29	12P_196	60	15_118
30	12P_197	61	15_119
31	12P_198	62	15_120

Material colectado en octubre de 2025

NO.	Lote	Tratamiento	Repetición	Planta	Material	NO.	Lote	Tratamiento	Repetición	Planta	Material
1	Tolita	1	1	13	Duras	48	Tolita	2	4	190	Duras
2	Tolita	1	1	12	Duras	49	Tolita	2	4	191	Duras
3	Tolita	1	1	17	Duras	50	Tolita	3	4	219	Duras
4	Tolita	2	1	9	Duras	51	Tolita	3	4	220	Duras
5	Tolita	2	1	10	Duras	52	Tolita	3	4	221	Duras
6	Tolita	2	1	19	Duras	53	Tolita	3	4	222	Duras
7	Tolita	2	1	21	Duras	54	Tolita	3	4	231	Duras
8	Tolita	2	1	22	Duras	55	Tolita	3	4	232	Duras
9	Tolita	3	1	27	Duras	56	Tolita	3	4	233	Duras
10	Tolita	3	1	28	Duras	57	Tolita	3	4	234	Duras
11	Tolita	3	1	29	Duras	58	15			11	Duras
12	Tolita	3	1	30	Duras	59	15			12	Duras
13	Tolita	3	1	39	Duras	60	15			13	Duras
14	Tolita	3	1	40	Duras	61	15			14	Duras
15	Tolita	3	1	41	Duras	62	15			15	Duras
16	Tolita	3	1	42	Duras	63	15			16	Duras
17	Tolita	4	1	32	Duras	64	15			17	Duras
18	Tolita	4	1	33	Duras	65	15			18	Duras
19	Tolita	4	1	34	Duras	66	15			114	Duras
20	Tolita	4	1	36	Duras	67	15			115	Duras
21	Tolita	4	1	38	Duras	68	8B	1	1	20	(O X O) X G
22	Tolita	6	1	51	Duras	69	8B	1	1	21	(O X O) X G
23	Tolita	6	1	52	Duras	70	8B	1	1	22	(O X O) X G
24	Tolita	6	1	54	Duras	71	8B	2	1	37	(O X O) X G
25	Tolita	6	1	55	Duras	72	8B	2	1	38	(O X O) X G
26	Tolita	6	1	56	Duras	73	8B	2	1	39	(O X O) X G
27	Tolita	6	1	57	Duras	74	8B	3	1	52	(O X O) X G
28	Tolita	6	1	58	Duras	75	8B	3	1	54	(O X O) X G
29	Tolita	5	1	59	Duras	76	8B	3	1	55	(O X O) X G
30	Tolita	2	2	70	Duras	77	8B	4	1	69	(O X O) X G
31	Tolita	2	2	71	Duras	78	8B	4	1	70	(O X O) X G
32	Tolita	2	2	73	Duras	79	8B	4	1	71	(O X O) X G
33	Tolita	2	2	74	Duras	80	8B	5	1	86	(O X O) X G
34	Tolita	2	2	75	Duras	81	8B	5	1	87	(O X O) X G
35	Tolita	2	2	76	Duras	82	8B	5	1	88	(O X O) X G
36	Tolita	2	2	77	Duras	83	8B	6	1	102	(O X O) X G
37	Tolita	3	2	66	Duras	84	8B	6	1	103	(O X O) X G
38	Tolita	3	2	67	Duras	85	8B	6	1	104	(O X O) X G
39	Tolita	3	2	68	Duras	86	8B	7	1	384	O X G
40	Tolita	3	2	69	Duras	87	8B	7	1	385	O X G
41	Tolita	3	2	78	Duras	88	8B	7	1	386	O X G
42	Tolita	3	2	79	Duras	89	8B	8	1	411	O X G
43	Tolita	3	2	80	Duras	90	8B	8	1	412	O X G
44	Tolita	5	4	195	Duras	91	8B	8	1	413	O X G
45	Tolita	2	4	186	Duras	92	8B	9	1	420	O X G
46	Tolita	2	4	188	Duras	93	8B	9	1	421	O X G
47	Tolita	2	4	189	Duras	94	8B	9	1	422	O X G

ANEXOS PF2

Anexo 1. Lista de materiales analizados, concentración de ADN obtenida e índice de pureza.

LOCALIDAD PALANDA (129 MUESTRAS)								LOCALIDAD ZUMBA (74 MUESTRAS)								LOCALIDAD CENTINELA DEL CONDOR (150 MUESTRAS)											
No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]	No.	Código	Pureza	[ng/uL]
1	pal1	1.749	162.842	66	pal74	1.906	221.185	1	z1	1.951	254.545	1	zca1	1.6	54	76	zca 81	1.902	365.49								
2	pal2	1.754	171.174	67	pal75	1.955	538.141	2	z2	1.757	179.433	2	zca2	1.8	200	77	zca 82	1.874	299.64								
3	pal3	1.628	146.572	68	pal76	1.968	740.013	3	z3	1.96	233.681	3	zca3	1.783	238	78	zca 83	1.884	339.94								
4	pal4	1.805	259.307	69	pal77-1	1.87	326.584	4	z4	1.95	173.081	4	zca4	1.815	146	79	zca 84	1.762	156.98								
5	pal5	1.777	181.503	70	pal77-2	1.86	515.401	5	z5	2.025	339.881	5	zca5	1.8	488	80	zca 85	1.958	308.23								
6	pal6	2.34	29.877	71	pal77-3	1.993	1.601.474	6	z6	2.044	333.609	6	zca6	1.748	251	81	zca 86	1.944	510.11								
7	pal7	1.555	98.077	72	pal78	2.007	1.250.986	7	z7	1.624	282.105	7	zca7	1.823	585	82	zca 87	1.968	315.17								
8	pal8	1.711	174.391	73	pal79	1.864	237.143	8	z8	1.984	344.5	8	zca8	1.801	360	83	zca 88	1.8	70.442								
9	pal9	1.728	199.166	74	pal80	1.842	426.116	9	z9	2.017	346.17	9	zca9	1.797	241	84	zca89	1.884	462.44								
10	pal10	1.758	203.363	75	pal81	0.592	15.966	10	z10	2.037	227.282	10	zca10	1.8	392	85	zca90	1.88	417.582								
11	pal11	1.673	107.808	76	pal82	2.009	788.487	11	z11	2.024	303.311	11	zca11	1.81	376	86	zca91	1.826	227.014								
12	pal12	1.763	298.852	77	pal83	1.741	90.215	12	z12	2.002	172.808	12	zca12	1.856	299	87	zca92	1.795	544.484								
13	pal13	1.727	187.551	78	pal84	1.945	158.098	13	z13	2.007	222.348	13	zca13	1.799	261	88	zca93	1.845	299.342								
14	pal14	2.183	30.204	79	pal85	20.001	126.09	14	z14	2.006	71.017	14	zca14	1.881	226.16	89	zca94	1.441	77.374								
15	pal16	1.769	193.348	80	pal86	1.799	149.201	15	z15	1.998	123.318	15	zca15	1.87	296	90	zca95	1.611	117.152								
16	pal17	1.676	115.943	81	pal87	1.585	166.041	16	z16	2.016	155.811	16	zca16	1.862	186.96	91	zca96	1.877	344.447								
17	pal18	1.659	89.69	82	pal88	1.926	525.973	17	z17	1.952	65.816	17	zca17	1.6	78	92	zca97	1.68	201.913								
18	pal20	1.758	221.84	83	pal89	1.92	669.11	18	z18	1.996	217.941	18	zca18	1.801	270	93	zca98	1.935	655.241								
19	pal21	1.702	169.333	84	pal90	1.812	78.468	19	z19	2.014	162.411	19	zca19	1.762	70	94	zca99	1.497	403.745								
20	pal22	1.661	78.426	85	pal91	1.643	104.998	20	z20	1.996	271.741	20	zca20	1.823	1.823	95	zca100	1.851	201.319								
21	pal23	1.781	326.115	86	pal92	1.909	654.826	21	z21	1.981	160.115	21	zca21	1.834	172.103	96	zca101	1.999	541.265								
22	pal24	1.686	185.807	87	pal93	2.082	510.124	22	z22	2	190.148	22	zca22	1.843	209.225	97	zca102	2.035	827.571								
23	pal25	1.69	156.537	88	pal94	2.022	510.053	23	z23	1.966	278.594	23	zca23	1.82	281.437	98	zca103	1.88	368.092								
24	pal26	1.754	285.502	89	pal95	1.944	489.484	24	z24	2.036	353.391	24	zca24	1.846	227.719	99	zca104	1.967	152.535								
25	pal27	1.73	250.412	90	pal96	1.719	107.315	25	z25	2.018	170.305	25	zca25	1.797	237.593	100	zca105	1.647	103.697								
26	pal28	1.743	223.211	91	pal97	1.942	302.747	26	z26	1.986	158.819	26	zca26	1.865	289.601	101	zca106	1.988	205.564								
27	pal29	1.655	196.019	92	pal98	1.817	316.878	27	z27	1.973	159.984	27	zca27	1.778	490.901	102	zca107	1.958	142.034								
28	pal30	1.823	1.276.617	93	pal99	1.923	337.701	28	z28	2.026	476.636	28	zca28	1.829	282.884	103	zca108	1.881	263.788								
29	pal31	1.653	207.511	94	pal100	1.958	510.197	29	z29	1.981	97.451	29	zca29r	1.924	594.13	104	zca109	1.978	459.844								
30	pal32	1.714	164.447	95	pal101	1.895	341.93	30	z30	1.992	214.08	30	zca30r	1.912	200.38	105	zca111	2.007	308.308								
31	pal33	1.777	228.203	96	pal102	1.95	831.143	31	z31	1.989	321.443	31	zca32	1.529	79.015	106	zca112	1.958	115.526								
32	pal34	1.772	363.576	97	pal103	1.968	763.187	32	z32	2	118.359	32	zca33	1.501	46.573	107	zca113	1.946	212.824								
33	pal35	1.681	144.788	98	pal104	1.944	417.141	33	z33	1.997	153.035	33	zca34	1.81	154.55	108	zca114	1.795	106.845								
34	pal36	1.736	182.888	99	pal105	1.855	187.844	34	z34	1.945	165.87	34	zca35	1.851	177.44	109	zca115	2.01	553.773								
35	pal37	1.721	211.017	100	pal106	1.806	310.746	35	z35	1.997	123.289	35	zca36	2.021	143.85	110	zca116	1.98	873.412								
36	pal38	1.786	202.473	101	pal107	1.736	303.963	36	z36	1.953	205.75	36	zca41	0.578	8.091	111	zca118	2.044	1124.672								
37	pal39	1.632	89.881	102	pal108	1.547	199.628	37	z37	1.951	122.35	37	zca42	1.677	242.753	112	zca119	1.835	93.041								
38	pal40	1.886	585.732	103	pal109	1.744	271.583	38	z38	1.939	101.399	38	zca43	1.825	373.433	113	zca120	1.909	252.741								
39	pal42	1.901	28.55	104	pal110	1.78	395.675	39	z39	2.036	100.724	39	zca44	1.859	166.684	114	zca122	1.809	206.301								
40	pal43	1.741	213.781	105	pal111	1.788	316.304	40	z40	2.014	116.315	40	zca45	1.745	207.46	115	zca123	1.935	157.099								
41	pal44	1.8	166.135	106	pal112	1.117	29.504	41	z41	2.06	165.157	41	zca46	1.887	151.78	116	zca124	1.822	532.194								
42	pal45	1.775	206.654	107	pal113	1.371	39.167	42	z42	2.027	62.268	42	zca47	1.812	402.984	117	zca125	1.788	208.132								
43	pal46	1.82	342.244	108	pal114	1.556	146.57	43	z43	2.067	333.847	43	zca48	1.83	447.879	118	zca126	1.88	361.537								
44	pal47	1.899	250.875	109	pal115	1.55	84.776	44	z44	2.051	166.427	44	zca49	1.836	235.189	119	zca127	1.875	242.017								
45	pal48	1.657	94.368	110	pal116	1.4	35.36	45	z45	2.037	186.061	45	zca50	1.826	340.137	120	zca128	1.636	188.268								
46	pal49	1.76	406.289	111	pal117	1.642	104.235	46	z46	2.029	240.288	46	zca51	1.827	467.74	121	zca129	1.781	93.536								
47	pal50	1.749	183.991	112	pal118	1.662	99.733	47	z47	2.038	182.634	47	zca52	1.856	157.56	122	zca130	1.709	376.832								
48	pal51	1.713	189.739	113	pal119	1.934	641.09	48	z48	2.024	279.972	48	zca53	1.772	345.76	123	zca131	1.87	392.912								
49	pal52	1.755	216.848	114	pal120	1.875	291.034	49	z49	1.954	98.875	49	zca54	1.767	225.651	124											

Anexo 2. Extracción de ADN protocolo descrito por Souza et al. (2012)

Para cada muestra se pulverizó 100 mg de tejido deshidratado en tubos Eppendorf de 1,5 ml con un molino MM 400 Retsch. Luego se adicionó un 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), se agitó por vórtex y se centrifugó durante 10 minutos a 5800 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en un ml de buffer Sorbitol, repitiéndose este paso de lavado tres o cuatro veces. Al pellet obtenido tras el último lavado se le adicionó 1 ml de buffer CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 3 M NaCl; 3% CTAB; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% PVP-40; 0,2% 2-mercaptoetanol; 0,2% sarkosyl; precalentado a 60 °C) y las muestras se incubaron por una hora a 60 °C. Posteriormente se centrifugó por cinco minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se adicionaron 600 µL de CIA (24:1), se mezcló suavemente durante 10 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se transfirió a tubos limpios y se le añadieron 70 µL de acetato de sodio (3 M; 1/10 del volumen) y 460 µL de isopropanol (2/3 del volumen). La mezcla se incubó a -20 °C durante 1 hora y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos. El pellet obtenido se lavó con 500 µL de etanol al 70% y luego con 500 µL de etanol absoluto, centrifugando cinco minutos en cada paso. Finalmente, el pellet de ADN fue secado y resuspendido en 100 µL de buffer TE.

Anexo .3. Cocteles y programas térmicos para amplificación

A3. 1. Coctel de amplificación para la validación de ADN

REACTIVO	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP	-	-	2,18
BUFFER PCR (X)	5,00	1,00	1,50
MgCl ₂ (mM)	25,00	2,00	0,60
dNTP's (mM)	5,00	0,25	0,38
Primer (uM) F	10,00	0,50	0,38
Primer (uM) R	10,00	0,50	0,38
Taq polimerasa (U/uL)	5,00	0,06	0,10
ADN (ng/uL)	5,00	1,33	2,00
VOL. TOTAL (uL)			7,50

A3.2 Programa de amplificación utilizado para la validación del ADN

Pasos	T (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	45 seg	30 ciclos
Annealing	46	1 min	
Elongación	72	2 min	
Elongación Final	72	7 min	1 ciclo
Almacenamiento	10	α	1 ciclo

A3.3. Cóctel de amplificación, metodología M13-Tailing.

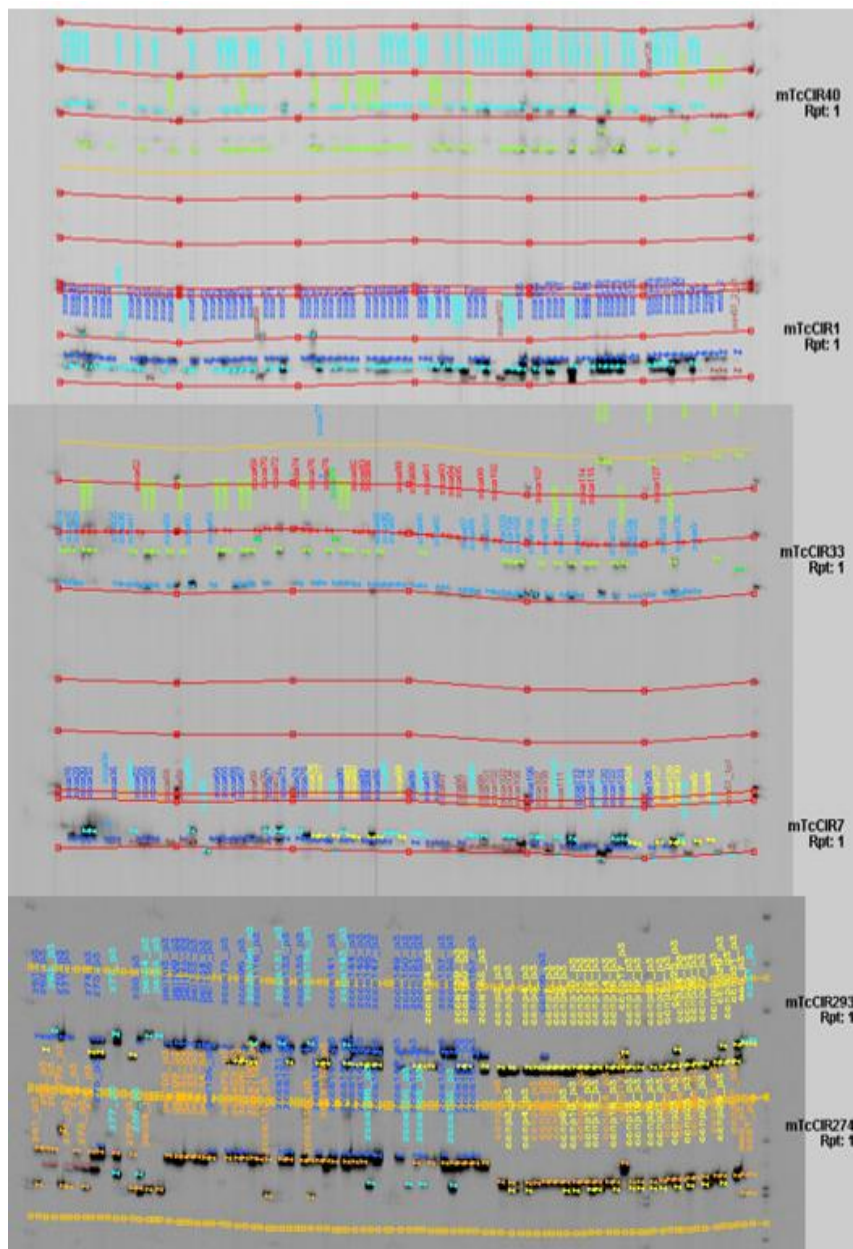
M 13 Tailing PCR (Dúplex)	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			0.19
BUFFER PCR (X)	5	1	1.00
MgCl ₂ (mM)	25	2.5	0.50
dNTP's (mM)	5	0.2	0.20
M13 700/800	1	0.16	0.80
Primer (uM) F - M13	1	0.01	0.05
Primer (uM) R	10	0.16	0.08
Primer (uM) F-M13	1	0.01	0.05

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

Programa térmico para la PCR con la tecnología M13-Tailing

Programa	Pasos	°T (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización in.	94 °C	2 min	1 ciclo
2		95 °C	4 min	1 ciclo
3	Desnaturalización	95 °C	1 min	25 Ciclos
4	Annealing	TA °C	2 min	
5	Elongación	72 °C	2 min	
6	Elongación Final	72 °C	10 min	1 ciclo
	Almacenamiento	4 °C	α	1 ciclo

Anexo 4. Genotipificación de cacao blanco (software SAGA-GT)



ANEXOS PF3

Anexo 1. Lista de materiales de chirimoya y ADN extraídos

Extraídas				Por procesar	
Nro.	Codificación	Nro.	Codificación	Nro.	Codificación
1	CECAA 04	1	LACH 036	1	CECAB01
2	CaMUA 01	2	LACH 038	2	CEPRA1
3	CaMUA 02	3	LACH 042	3	CEPRA2
4	CaMUA 03	4	LACH 143	4	CEPRA03
5	CaMUA 04	5	LACH 147	5	CEPRA04
6	CaMUA 06	6	LACH 148	6	GND01
7	CaMUB 01	7	LACH 149	7	GND02
8	CaMUB 02	8	LACH 144	8	GNB01
9	CaMUB 03	9	LACH 150	9	GNB02
10	CaMUB 04	10	LACH 151	10	GNB03
11	CATA 01	11	LACH 152	11	GNB05
12	CATA 02	12	LACH 154	12	GNA01
13	CATA 03	13	LACH 157	13	GNA02
14	CATA 04	14	LACH 158	14	GNA05
15	CATA 05	15	LACH 159	15	GNA06
16	CATA 06	16	LACH 160	16	GNA07
17	CATA 07	17	LACH 037	17	GNA08
18	CATB 01	18	LACH 039	18	GNA09
19	CATB 02	19	LACH 161	19	GNA10
20	CATB 03	20	LACH 162	20	CEPN01
21	CATB 04	21	AACH 168	21	PTA01
22	CATB 05	22	AACH 169	22	PTA02
23	CATB 06	23	AACH 191	23	PTA03
24	CATB 07	24	AACH 192	24	PTA05
25	CATC 01	25	AACH 193	25	PTA06
26	CATC 02	26	AACH 194	26	PTA07
27	CATC 03	27	ECU 17536	27	PTA08
28	CATC 04	28	ECU 17539	28	PTA09
29	CATC 05	29	ECU 17540	29	PTA10
30	CATC 06	30	ECU 17541	30	PTA11
31	CATC 07	31	ECU 17545	31	PTA12
32	CATC 08	32	ECU 17546	32	GNB04
33	CATC 09	33	ECU 17547	33	GNF01
34	CATC 10	34	Nambacola 002	34	GNF02
35	CAUA 01	35	SanPedro 003	35	GNF03
36	CAUA 02	36	Granja MAG 004	36	GNC02
37	CAUA 03	37	Gonzanama 005	37	PCB01
38	CAUA 04			38	CECAB02
39	EACB 01			39	CECAA01
40	EACD 07			40	CECAA02
41	EACD 08			41	PCD03
42	EGA 02			42	PCD04
43	EGA 04			43	PCD06
44	EGA 07			44	PCD07
45	EGB 03			45	PCC01
46	EGC 01			46	PCC02
47	ESB 07			47	CECAA01
48	GNA 03			48	CECAA02
49	GNA 07			49	CECAA03
50	GNA 14			50	CECAA05
51	GNB 09			51	CECAA06
52	GNE 04			52	CECAA07
53	GPA 01			53	CECAA08
54	GPA 02			54	CECAA09
55	GPA 03			55	CECAA10
56	GPA 04			56	CECAA11
57	GPB 01			57	CECAA12
58	GPB 03			58	CEPOB01
59	GPB 04			59	CEPOB02
60	GPC 01			60	CEPOB03
61	GPC 02			61	CEPRB01
62	GPC 03			62	CEROB01
63	GPC 04			63	CEROB02
64	GPC 05			64	GNE01
65	GPC 06			65	GNE02
66	PCA 02			66	GNC01
67	PLA 01			67	GNC03
68	PTA 02			68	LACH279
69	PTA 04			69	LACH290
70	QPA 01			70	LACH266-SUMA01
71	QPIA 02			71	LACH269-SME01
72	QPIA 03			72	LACH267-SUMB01
73	QQA 02			73	LACH270-SMD01
74	QQA 03				
75	QSA 01				
76	QSA 02				
77	QSA 03				

Cuantificación e índices de purezas de los 114 ADN extraídos

NO.	Identificación	260/280	260/230	ng/μL	NO.	Identificación	260/280	260/230	ng/μL
1	LACH 036	2.062	2.2	1579.01	58	EACD 07	2.105	2.385	173.873
2	LACH 038	2.03	1.807	1695.88	59	EACD 08	2.114	2.128	694.175
3	LACH 042	1.871	2.519	61.378	60	EGA 02	2.037	2	1160.91
4	LACH 143	2.047	1.993	931.703	61	EGA04	2.129	2.288	1844.2
5	LACH 147	2.165	1.996	751.697	62	EGA 07	2.055	2.271	2082.31
6	LACH 148	2.188	2.229	777.197	63	EGB 03	2.096	2.161	434.478
7	LACH 149	2.025	2.345	467.599	64	EGC 01	1.808	1.913	2820.53
8	LACH 144	2.04	1.753	235.831	65	ESB 07	2.092	2.135	2030.82
9	LACH 150	2.033	1.701	902.374	66	GNA 03	2.143	2.254	1598.38
10	LACH 151	2.012	2.031	450.777	67	GNA 07	2.097	2.14	776.578
11	LACH 152	2.089	2.143	525.769	68	GNA 14	2.114	2.054	768.342
12	LACH 154	2.074	2.103	855.134	69	GNB 09	2.101	2.099	719.286
13	LACH 157	2.097	2.041	418.025	70	GNE 04	2.131	2.042	671.574
14	LACH 158	2.128	2.144	815.735	71	GPA 01	2.1	1.943	472.198
15	LACH 159	2.082	2.121	1008.8	72	GPA 02	2.096	2.024	1476.7
16	LACH 160	2.12	2.041	726.701	73	GPA 03	2.084	2.141	1443.49
17	LACH 037	2.002	1.919	124.069	74	GPA 04	2.041	2.21	669.711
18	LACH 039	2.082	2.018	666.484	75	GPB 01	2.015	2.007	2337.33
19	LACH 161	2.059	1.932	179.838	76	GPB 03	2.113	2.268	1166.87
20	LACH 162	2.048	1.895	724.73	77	GPB 04	2.083	2.111	1630.8
21	AACH 168	2.019	1.664	115.789	78	CATA 01	2.003	1.838	922.47
22	AACH 169	2.047	1.717	244.742	79	CATA 02	2.058	2.054	1591.21
23	AACH 191	2.079	2.055	436.666	80	CATA 03	2.024	1.925	1373.91
24	AACH 192	2.064	1.757	219.916	81	CATA 04	2.009	2.098	1950.34
25	AACH 193	2.111	2.137	1039.56	82	CATA 06	2.028	2.188	1155.15
26	AACH 194	2.096	2.115	833.993	83	CATA 05	1.944	2.109	184.68
27	ECU 17536	2.112	2.431	64.279	84	CATA 07	2.077	2.039	501.264
28	ECU 17539	2.073	2.036	418.022	85	CATB 01	1.914	2.059	130.856
29	ECU 17540	2.095	2.124	979.641	86	CATB 03	2.085	2.173	858.787
30	ECU 17541	2.034	1.873	933.275	87	CATB 02	2.007	2.195	1983.18
31	ECU 17545	2.028	1.826	324.452	88	CATB 04	2.016	2.308	1163.65
32	ECU 17546	2.057	2.026	1049.59	89	CATB 05	1.894	2.652	22.747
33	ECU 17547	2.105	2.018	905.491	90	CATB 06	1.88	2.066	175.727
34	Nam 002	2.042	1.977	924.597	91	CATB 07	2.043	2.195	2142.86
35	SanPe 003	2.086	1.879	1258.97	92	CATC 02	2.019	1.973	1431.88
36	Granj 004	2.093	1.924	781.477	93	CATC 04	2.037	2.087	1387.63
37	Gonz 005	2.11	1.955	332.429	94	CATC 10	2.015	2.315	800.593
38	GPC 01	2.117	2.096	1269.97	95	CATC 01	1.893	2.434	47.969
39	GPC 02	2.088	2.213	1642.65	96	CATC 03	1.889	1.992	91.882
40	GPC 03	1.911	1.996	175.92	97	CATC 05	2.047	2.248	473.907
41	GPC 04	2.024	2.09	631.374	98	CATC06	2.063	2.069	995.062
42	GPC 05	1.999	1.965	224.77	99	CATC 07	2.023	2.116	91.243
43	GPC 06	2.025	2.075	1487.28	100	CATC 08	2.086	2.114	1290.06
44	PCA 02	2.072	2.158	1589.53	101	CATC 09	2.082	2.138	365.502
45	PLA 01	2.042	2.093	482.566	102	CaUA 03	1.976	1.702	75.659
46	PTA 02	2.048	1.932	616.222	103	CAUA 01	2.025	2.215	745.02
47	PTA 04	2.001	2.051	348.035	104	CAUA 02	1.933	2	311.22
48	QPA 01	2.044	1.871	692.839	105	CAUA 04	2.091	2.063	501.716
49	QPIA 02	2.021	2.204	1670.68	106	CaMUA 01	1.893	1.876	112.94
50	QPIA 03	2.037	1.86	461.309	107	CaMUA 02	2.023	2.116	91.243
51	QQA 02	2.063	2.144	1443.5	108	CaMUA 03	2.066	2.012	159.803
52	QQA 03	1.989	2.215	1995.95	109	CaMUA 04	2.034	2.016	144.479
53	QSA 01	2.045	1.95	904.692	110	CaMUA 06	2.002	1.917	796.583
54	QSA 02	2.031	2.116	1736.74	111	CaMUB 01	2.071	1.914	1056.27
55	QSA 03	2.031	1.767	367.465	112	CaMUB 02	2.05	1.962	284.579
56	CECAA 04	2.062	2.037	2219.17	113	CaMUB 03	2.023	1.824	764.468
57	EACB 01	2.03	14.242	48.516	114	CaMUB 04	2.042	2.008	516.057

Anexo 2. Cocteles de amplificación

Coctel de amplificación para la validación de ADN

REACTIVO	CI*	CF*	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP	-	-	2,18
BUFFER PCR (X)	5,00	1,00	1,50
MgCl ₂ (mM)	25,00	2,00	0,60
dNTP's (mM)	5,00	0,25	0,38
Primer (uM) F	10,00	0,50	0,38
Primer (uM) R	10,00	0,50	0,38
Taq polimerasa (U/uL)	5,00	0,06	0,10
ADN (ng/uL)	5,00	1,33	2,00
VOL. TOTAL (uL)			7,50

Programa de amplificación utilizado para la validación del ADN

Pasos	T (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94	45 seg	30 ciclos
Annealing	46	1 min	
Elongación	72	2 min	
Elongación Final	72	7 min	1 ciclo
Almacenamiento	10	α	1 ciclo

Cóctel de amplificación, metodología M13-Tailing.

M 13 Tailing PCR (Dúplex)	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP			0.19
BUFFER 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

Programa térmico para la PCR con la tecnología M13-Tailing

Programa	Pasos	°T (°C)	TIEMPO	CICLOS
1	Desnaturalización in.	94 °C	2 min	1 ciclo
2		95 °C	4 min	1 ciclo
3	Desnaturalización	95 °C	1 min	25 Ciclos
4	Annealing	TA °C	2 min	
5	Elongación	72 °C	2 min	
6	Elongación Final	72 °C	10 min	1 ciclo
	Almacenamiento	4 °C	α	1 ciclo

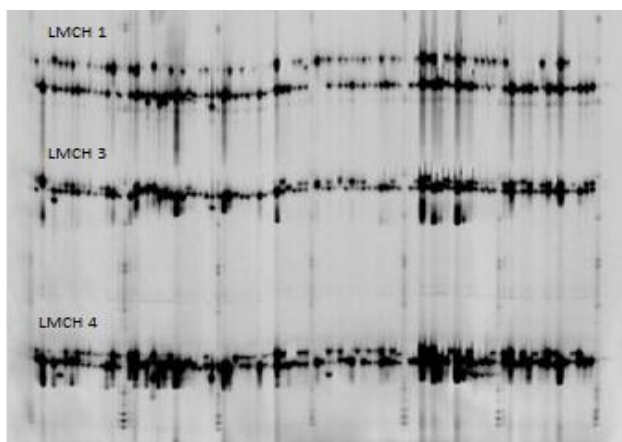
Anexo 3. Información de los marcadores SSRs ensayados y resultados de su validación por PCR

No.	SSR	Forward and reverse primers (5'-3')	Accession no.	Ta(°C)	Repeat	Expected size	Validación
1	LMCH1	F: CTCTTCAAAGGTACGACTTC R: TTGAGAAAGGATAAGGATT	AY685388	55	(CT)20	291 – 312	Amplifica
2	LMCH3	F: TCTGTGAAAATACTCTCGTA R: TCTCCACTGAATAATCTTTAAT	AY685390	55	(GA)13	225 – 248	Amplifica
3	LMCH4	F: ATTAGAACAAGGACGAGAAT R: CCTGTGTCTTTCATGGAC	AY685391	55	(GA)14	112 – 128	Amplifica
4	LMCH6	F: GGCATCCTATATTGAGGTTT R: TTAACATTTTGGACAGACC	AY685393	55	(CT)14	220 – 254	Amplifica
5	LMCH12	F: TATCTGCTTGAACCAAAAC R: GCATTAGATGAGAAGGACTC	AY685399	55	(CT)17	152 – 168	Amplifica
6	LMCH16	F: TGAAAAATAACAAGATGTAA R: GGATAACAAGCAGTAAATC	AY685402	55	(GA)20	216 – 230	Amplifica
7	LMCH29	F: GTACCATCTTTAGGAAATC R: TGAATCTATGTTAGTCAC	DQ923748	45	(GA)9	192	Amplifica
8	LMCH33	F: AAGAAATGGGAGTAAATAGTG R: ACGTTGTGAATAGTTGAGT	DQ923749	50	(CT)11	243	Amplifica
9	LMCH36	F: ATAGAAGATTTACCCAGGAG R: GTAAGTACGTGATTGTTGATCT	EF424137	50	(GA)10	194	Amplifica
10	LMCH37	F: TATCGACAACATAGAAAAGTTA R: TAGTTAAATCACATCGATGAC	EF424138	50	(GA)15	239	Amplifica
11	LMCH38	F: GTTAAGAACCAACAAAGAAAT R: CCCCTCTATTCCCTCTCTAT	EF424139	55	(GA)22	271	Amplifica
12	LMCH39	F: AATTTGTATGGTGTGACAG R: AGTTGTAGGTGGTTAAGTTC	EF424140	55	(CT)11	190	Amplifica
13	LMCH48	F: TTAGAGTGAAAGCGGCAAG R: TCAAGCTACAGAAAGTCTACCG	EF424148	55	(GA)12	148	Amplifica
14	LMCH63	F: TTCCCAAAATTAATGAAATA R: ATGAAGAACCGAATACAAAA	EF424158	50	(GA)13	283	Amplifica
15	LMCH69	F: AGCTTTAGCCATGAATTAGA R: GAAAGGCTGACGAGATATAA	EF424161	55	(GA)9	167	Amplifica
16	LMCH71	F: AGATAACACCGCCCACTAT R: ACAACTTTTCTCCCAACCTATC	EF424163	55	(GA)14	282	Amplifica
17	LMCH80	F: AAAACAGAGACTAAAATGAAAT R: GAAGATATGCAAGGTATAAATC	EF424171	55	(GA)15	226	Amplifica
18	LMCH83	F: CTCTCGTTGACTCGTTTACT R: GGTCTCTAGCCTTTACAATC	EF424172	55	(CT)36	162	Amplifica
19	LMCH87	F: AGTTAAGACAGAGATGATAAA R: CAAGTAAAGACTGAAAGGTG	EF424176	55	(GA)15	144	Amplifica
20	LMCH88	F: GGGAGTTATTAGAGTGTATTG R: AAATTAAAGGATTGACTATTTCA	EF424177	55	(CT)17	277	Amplifica
21	LMCH89	F: AATACAAATGGAGACGAATA R: GTGTCTAATACCATACATACCA	EF424178	55	(CT)11	229	Optimizar la amplificación
22	LMCH91	F: CCTTGAGAAAGTGTATCTAT R: ATTCTGGCTTTTAATTGAGGA	EF424180	55	(CT)8	146	Amplifica
23	LMCH98	F: ATACAAGAGTGATATTGATTG R: GTCTCAGCTACTTCTCCTGA	EF424185	55	(GA)10	132	Amplifica
24	LMCH102	F: GCTAACCATCCATTACATA R: ATAACATTCTTTATCACCATCT	EF424187	55	(CT)13	194	Optimizar la amplificación
25	LMCH103	F: CACAATAATCAGAAAAACATCA R: GTGTCTCGTATCCCTCCATA	EF424188	55	(GA)19	257	Amplifica
26	LMCH106	F: AACAAATGACAGGAGAGC R: ATAAATGTATGACGCTGCT	EF424191	55	(GA)13	251	Amplifica
27	LMCH115	F: TATAATCCATCAACACAAATAA R: GTGGGTGGGTTTTATAGGTC	EF424197	50	(GA)13	213	Optimizar la amplificación
28	LMCH122	F: AGCAAAGATAAGAGAAAGATAA R: ATCCAAGCCTATTAACTCACT	EF424200	55	(GA)9	184	Optimizar la amplificación
29	LMCH127	F: TTTCTCAAGTCAGGTTGAAAT R: AATAGAAGTTTAAGGAGAGGTT	EF424205	55	(CT)9	168	Amplifica
30	LMCH128	F: CTTGTTAAAAATGGCTGTACT R: GCATTGAGCTGACATAACTC	EF424206	55	(GA)11	269	Amplifica
31	LMCH131	F: AGAAGCACCAGATAGTCAC R: GAAGAAAATGGTAGGATG	EF424208	55	(GA)10	191	Optimizar la amplificación
32	LMCH137	F: ACTCGATTATGATTACAAATTA R: AAAGTATCCACATAGACT	EF424210	48	(GA)24	224	Optimizar la amplificación
33	LMCH139	F: CTATCCATCTACGCTTCAAAAT R: GGAATGACCTTAAAACTCT	EF424212	55	(CT)9	296	Amplifica
34	LMCH144	F: GTTTGGAAGAGTCGAGGAT R: ACTGTAAAACGCAGACCAAGAT	EF424215	55	(CT)12	196	Amplifica

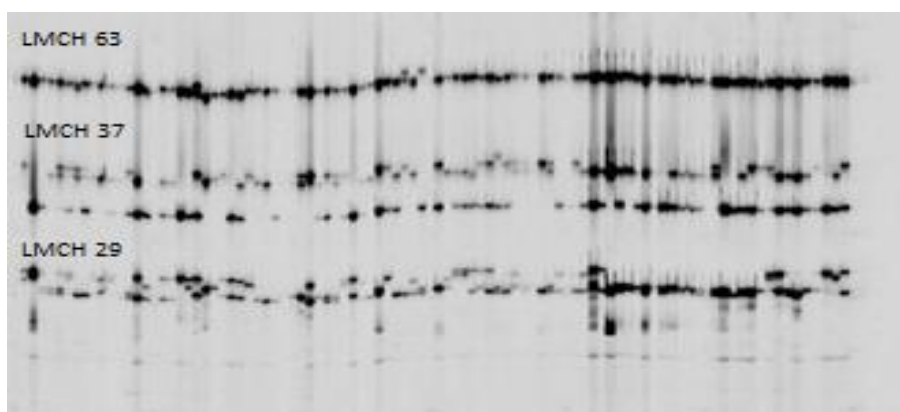
Anexo 4. Placa I de ADN, orden de las muestras dispuestas en placa de 96 pocillos

	PLACA 1							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	M	LACH 150	LACH 159	LACH 162	AACH 194	ECU 17546	GPC05	EACB 01
2	LACH 036	LACH 151	LACH 160	AACH 168	ECU 17536	Granja MAG 004	GPC06	EACD 07
3	LACH 042	LACH 152	LACH 037	AACH 169	ECU 17539	M	PTA 02	EACD 08
4	LACH 147	LACH 154	LACH 039	AACH 191	ECU 17540	Gonzanama 005	PTA 04	EGA 02
5	LACH 148	LACH 157	M	AACH 192	ECU 17541	GPC03	QPA 01	EGA 04
6	LACH 149	LACH 158	LACH 161	AACH 193	ECU 17545	GPC04	CECAA 04	EGA 07
7	M	GNA 14	GPA 04	GPC 02	CATB 05	CATC 07	CAUA 01	CaMUA 04
8	EGB 03	GNB 09	GPB 01	CATA 05	CATB 06	CATC 08	CAUA 02R	CaMUA 06
9	EGC 01	GNE 04	GPB 03	CATA 07	CATC 10	M	CAUA 03R	CaMUB 01
10	ESB 07	GPA 01	GPB 04	CATB 01	CATC 03	CATC 09	CAUA 04	CaMUB 02
11	GNA 03	GPA 02	M	CATB 03	CATC 05	CAUA 02	CaMUA 01	CaMUB 03
12	GNA 07	GPA 03	GPC 01	CATB 04	CATC 06	CAUA 03	CaMUA 03	CaMUB 04
								NEG

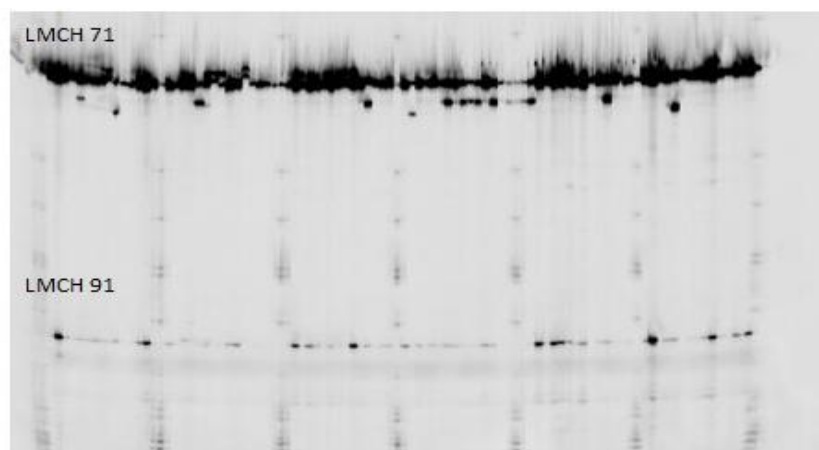
Anexo 5. Corridos de la placa 1 de chirimoya para los 24 marcadores seleccionados para el analisis



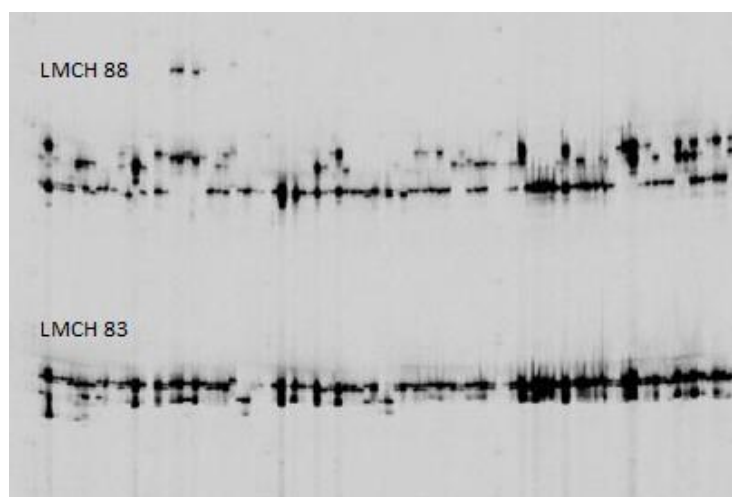
Amplificación de la Placa I Triplex 1 (LMCH 1, 3, 4)



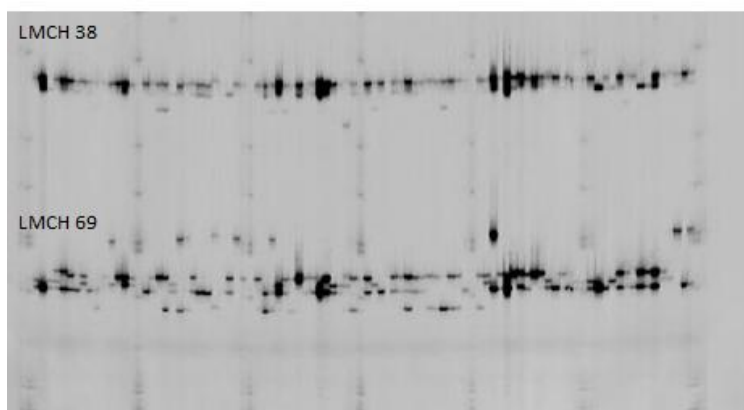
Amplificación de la Placa I Triplex 2 (LMCH 63, 37, 29)



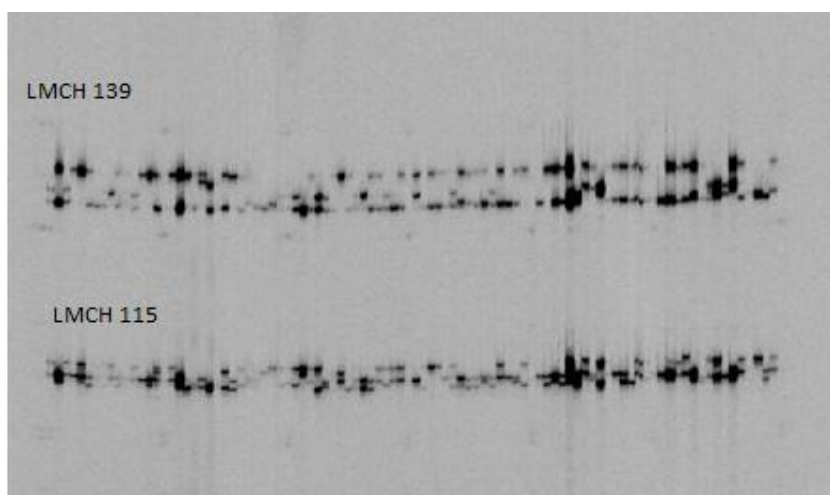
Amplificación de la Placa I Dúplex 1 (LMCH 71,91)



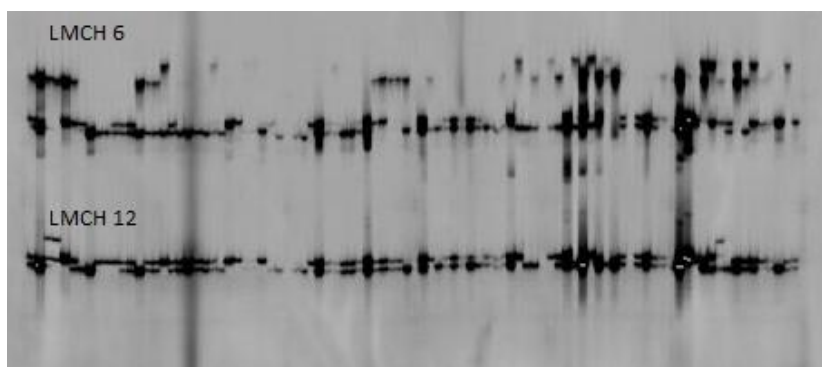
Amplificación de la Placa I Dúplex 2 (LMCH 88,83)



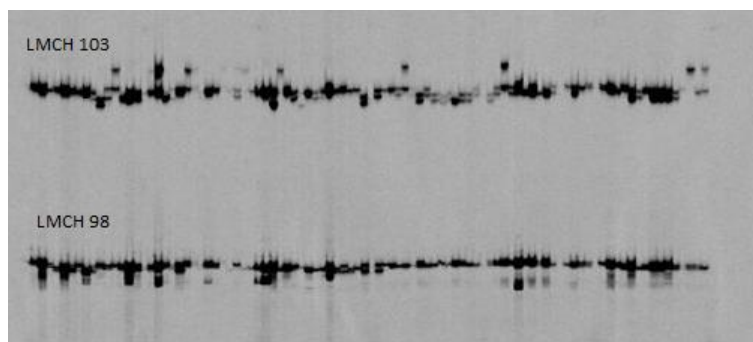
Amplificación de la Placa I Dúplex 3 (LMCH 38,69)



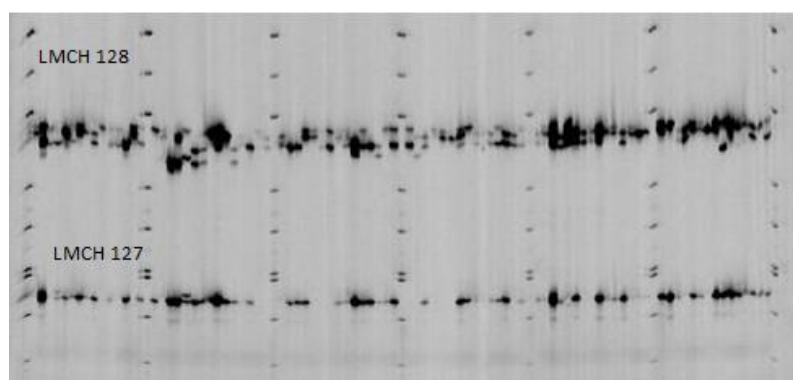
Amplificación de la Placa I Dúplex 4 (LMCH 139,115)



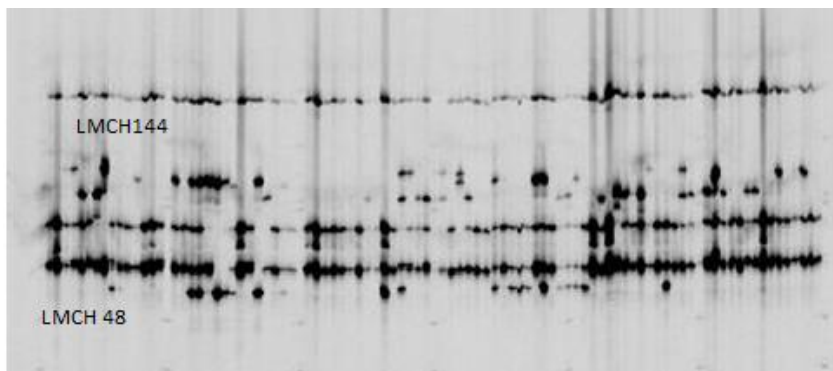
Amplificación de la Placa I Dúplex 5 (LMCH 6,12)



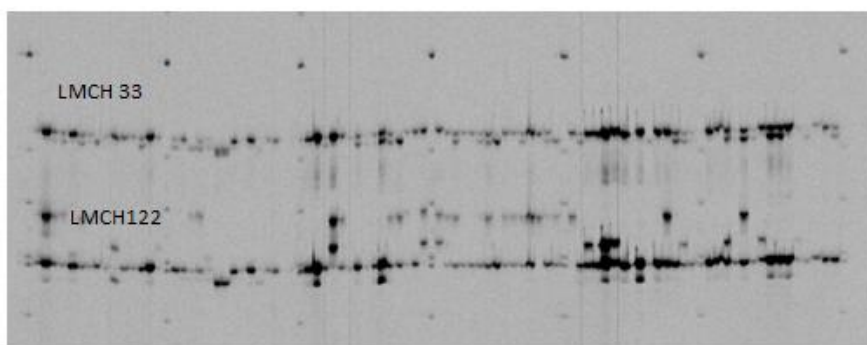
Amplificación de la Placa I Dúplex 6 (LMCH 98, 103)



Amplificación de la Placa I Dúplex 7 (LMCH 127, 128)



Amplificación de la Placa I Dúplex 8 (LMCH 48, 144)



Amplificación de la Placa I Dúplex 9 (LMCH 33, 122)

ANEXOS PF4

Anexo 1. Muestras seleccionadas de *Caesalpinia spinosa*

N.º	Accesión	Procedencia	
		Provincia	Cantón
1	ECU-17733	Pichincha	Quito
2	ECU-17734	Cotopaxi	Latacunga
3	ECU-17735	Pichincha	Quito
4	ECU-17736	Pichincha	Pedro Moncayo
5	ECU-17737	Imbabura	Pimampiro
6	ECU-17740	Imbabura	Antonio Ante
7	ECU-17741	Imbabura	Ibarra
8	ECU-17743	Imbabura	Antonio Ante
9	ECU-17744	Imbabura	Urcuquí
10	ECU-17746	Imbabura	Urcuquí
11	ECU-17747	Imbabura	Urcuquí
12	ECU-17748	Imbabura	Urcuquí
13	ECU-17749	Carchi	Bolívar
14	ECU-17750	Imbabura	Ibarra
15	ECU-17751	Pichincha	Quito
16	ECU-17752	Cotopaxi	Salcedo
17	ECU-17753	Chimborazo	Riobamba
18	ECU-17755	Chimborazo	Guano
19	ECU-17756	Chimborazo	Riobamba
20	ECU-17757	Cotopaxi	Pujilí
21	ECU-17758	Cotopaxi	Latacunga
22	ECU-17759	Cotopaxi	Salcedo
23	ECU-17761	Tungurahua	Patate
24	ECU-17763	Loja	Loja
25	ECU-17764	Loja	Loja
26	ECU-17765	Loja	Loja
27	ECU-17766	Loja	Catamayo
28	ECU-17767	Loja	Catamayo
29	ECU-17768	Loja	Gonzanamá
30	ECU-17769	Loja	Loja
31	ECU-17770	Loja	Catamayo
32	ECU-17771	Pichincha	Quito
33	ECU-17772	Bolívar	Guaranda
34	ECU-17773	Cañar	Azogues
35	ECU-17774	Azuay	Chordeleg
36	ECU-17775	Azuay	Paute

37	ECU-17776	Chimborazo	Guano
38	ECU-17777	Chimborazo	Alausí
39	ECU-17778	Chimborazo	Guamote

Anexo 2. Componentes de Buffer Sorbitol.

Componentes Buffer Sorbitol	50ml
Tris HCl pH 8, 1M	5 ml
Sorbitol	0,32 g
EDTA pH8, 0.5M	0,5 ml
PVP	0,5 g
B-mercaptoetanol	0,5 ml

Anexo 3. Componentes de Buffer CTAB.

Componentes Buffer CTAB	50ml
Tris HCl pH 9, 1M	5 ml
NaCl	30 ml
CTAB	1,5 g
EDTA pH8, 0.5M	2 ml
PVP	0,5 g
Sarkosyl	0,1 g
B-mercaptoetanol	0,1 ml

Anexo 4. Mix general para realizar PCR (Morillo y Miño, 2011).

Reactivo	Concentración	Volumen 1 Rx (μL)
Agua UP	Ultrapura	2,18
Buffer PCR (x)	5	1,50
MgCl ₂ (mM)	25	0,60
dNTP's (mM)	5	0,38
Primer F (μM)	10	0,38
Primer R (μM)	10	0,38
Taq (U/μL)	5	0,10
ADN (ng/μL)	10	2,00
Volumen Total		7,5

Anexo 5. Programa de amplificación para validación (Morillo y Miño, 2011).

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturación inicial	94°	5 min

2	Desnaturación	94°	45 seg	30 ciclos
3	Recombinación ADN	46°	1 min	
4	Extensión	72°	2min	
5	Extensión final	72°	7 min	
6	Enfriamiento	10°	5 min	

Anexo 6. Mix general para realizar PCR con marcadores ISSRs.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración</i>	<i>Volumen 1 Rx (μL)</i>
<i>Agua UP</i>	Ultrapura	4,10
<i>Buffer PCR (x)</i>	5	2,00
<i>MgCl₂ (mM)</i>	25	0,80
<i>dNTP's (mM)</i>	5	0,20
<i>Primer (μM)</i>	10	0,20
<i>Taq (U/μL)</i>	5	0,20
<i>ADN (ng/μL)</i>	20	2,5
<i>Volumen Total</i>		7,5

Anexo 7. Programa de amplificación para validación ISSRs

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	40 ciclos
1	Desnaturación inicial	92°	4 min	
2	Desnaturación	92°	30 seg	
3	Recombinación ADN	Ta°	1 min	
4	Extensión	72°	1 min	
5	Extensión final	72°	10 min	
6	Enfriamiento	4°	10 min	

ANEXOS ACTIVIDAD A

Anexo 1. Preparación del material experimental y los ensayos de inoculación

Materiales cultivados y silvestres de naranjilla establecidos *in vitro* para los ensayos de inoculación en invernadero



S. quitoense



S. hyrtum



S. hyporodum



S. quitoense x *S. hyporodum*

Establecimiento en invernadero de los materiales para los ensayos de inoculación (izquierda).

Plantas de 12 semanas de naranjilla cultivadas y silvestre en invernadero (derecha)



Preparación de inóculo de *Fusarium* (izq). Inoculación de nematodos (centro). Toma de muestras para la extracción de ARN: hojas y raíces (derecha).



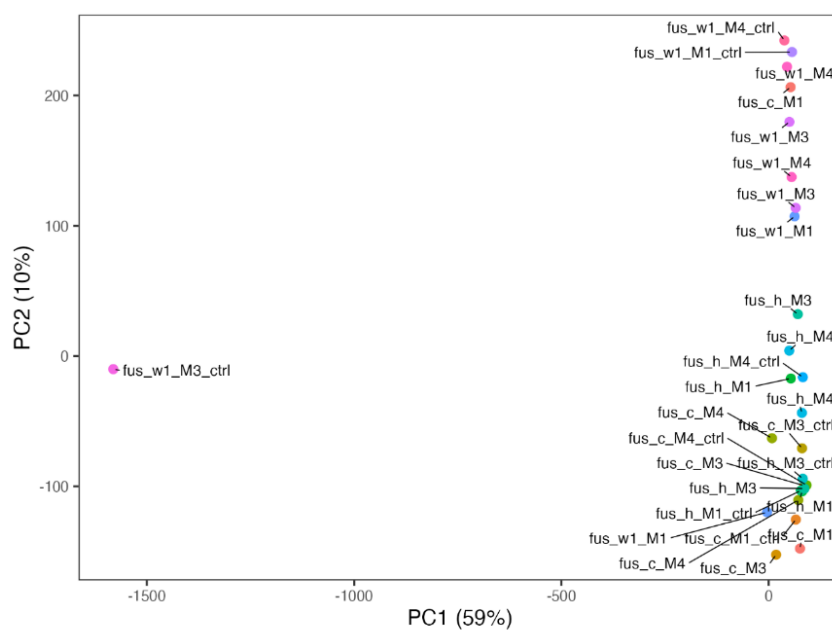
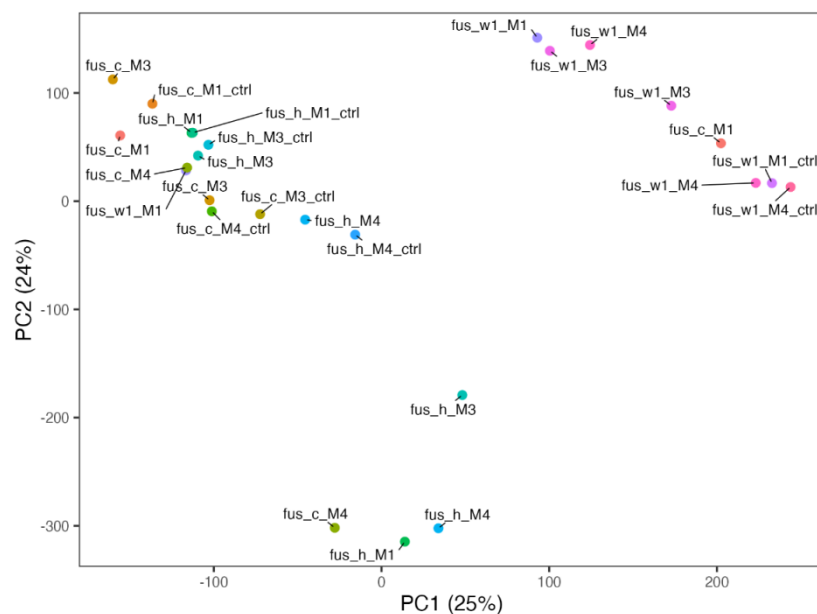
Anexo 2. Cuadro resumen de reads mapeados para el transcriptoima de Fusarium. La correspondencia de la muestra (primera columna) se indica en la tabla 7.

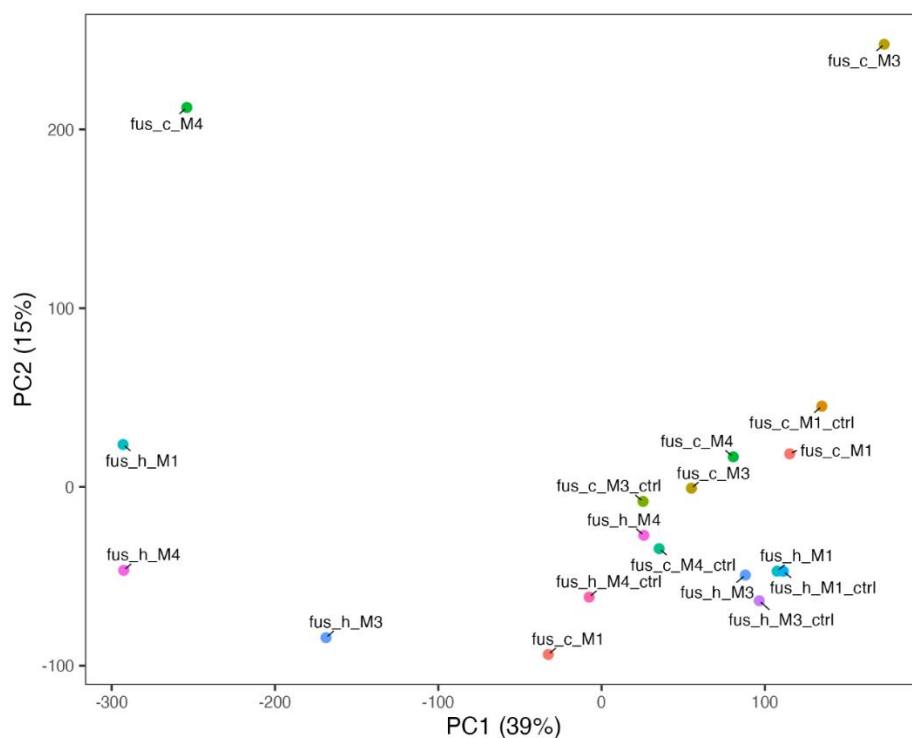
	raw reads	Kraken2	% passed	% viridiplantae	% unclassified	fastp	% passed	% bowtie2
19_fus_w1_M1_1	27475846	27327623	99,46	91,11	8,35	27038864	98,41	87,47
20_fus_w1_M1_2	26462663	26432061	99,88	91,13	8,76	26157832	98,85	88,92
21_fus_w1_M1_ctrl	38628867	38183338	98,85	91,65	7,19	36650014	94,88	83,14
22_fus_w1_M3_1	22236010	22215998	99,91	93,27	6,64	22010758	98,99	88,75
23_fus_w1_M3_2	43962466	43916354	99,90	91,46	8,44	43467929	98,88	87,42
24_fus_w1_M3_ctrl	5435294	5203768	95,74	93,60	2,14	303636	5,59	55,57
25_fus_w1_M4_1	69896585	69794545	99,85	93,09	6,76	68115805	97,45	83,24
26_fus_w1_M4_2	22214623	22146409	99,69	91,90	7,79	21879963	98,49	85,42
27_fus_w1_M4_ctrl	41184545	40198959	97,61	89,36	8,25	38782957	94,17	81,51
28_fus_c_M1_1	25089926	25062693	99,89	92,04	7,85	24820707	98,93	87,54
29_fus_c_M1_2	27824582	27778819	99,84	88,02	11,81	27509900	98,87	88,60
30_fus_c_M1_ctrl	22541829	22522790	99,92	92,49	7,42	22315618	99,00	90,95
31_fus_c_M3_1	17317521	17215468	99,41	92,61	6,80	16934221	97,79	86,72
32_fus_c_M3_2	26831837	26716160	99,57	90,57	9,00	26389860	98,35	87,11
33_fus_c_M3_ctrl	149994576	149854473	99,91	92,43	7,48	148426583	98,95	89,84
34_fus_c_M4_1	18578169	18557981	99,89	91,10	8,79	18363392	98,84	88,59
35_fus_c_M4_2	3714547	3679134	99,05	86,90	12,15	3582208	96,44	84,33
36_fus_c_M4_ctrl	31895091	31854509	99,87	90,52	9,35	31453316	98,61	88,35
37_fus_h_M1_1	20064799	19978758	99,57	87,84	11,73	19721428	98,29	85,59
38_fus_h_M1_2	29884889	29835651	99,84	91,05	8,78	29515865	98,77	88,45
39_fus_h_M1_ctrl	28722084	28635002	99,70	90,86	8,84	28326307	98,62	87,01
40_fus_h_M3_1	52480212	52401228	99,85	89,35	10,50	51850601	98,80	88,77
41_fus_h_M3_2	62816083	62671730	99,77	90,61	9,16	61979171	98,67	87,34
42_fus_h_M3_ctrl	86029016	85714164	99,63	90,00	9,63	84306659	98,00	84,75
43_fus_h_M4_1	82332577	82123815	99,75	86,49	13,26	80455187	97,72	82,94
44_fus_h_M4_2	62509082	61451934	98,31	89,97	8,34	59426543	95,07	83,53
45_fus_h_M4_ctrl	39813365	39589695	99,44	90,81	8,63	37472817	94,12	85,81
46_fus_w2_M1_1	39002563	38783960	99,44	88,31	11,13	35210610	90,28	NA

Anexo 3. Resumen de reads mapeados para el ensayo de nematodos

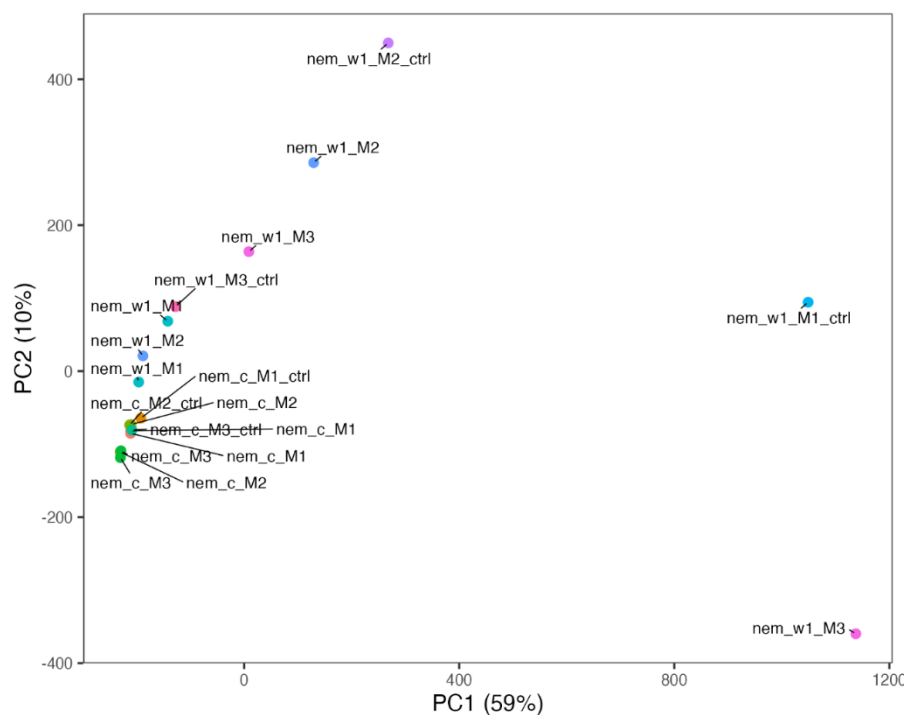
	raw reads	Kraken2	% passed	% viridiplantae	% unclassified	fastp	% passed	% bowtie2
01_nem_w1_M1_1	15150722	14684982	96,93	87,79	9,14	12864896	84,91	83,40
02_nem_w1_M1_2	17834054	17692026	99,20	91,41	7,80	14643853	82,11	84,92
03_nem_w1_M1_ctrl	12421331	11622327	93,57	88,86	4,71	2518584	20,28	72,63
04_nem_w1_M2_1	11290894	10533010	93,29	87,10	6,19	6762923	59,90	83,71
05_nem_w1_M2_2	23463862	23252833	99,10	90,34	8,76	20585351	87,73	86,94
06_nem_w1_M2_ctrl	15306340	13228215	86,42	71,75	14,67	10376349	67,79	74,15
07_nem_w1_M3_1	7828218	7103044	90,74	88,96	1,78	3783701	48,33	63,75
08_nem_w1_M3_2	13458027	12877455	95,69	89,89	5,79	8482348	63,03	86,85
09_nem_w1_M3_ctrl	34917740	32862226	94,11	86,03	8,08	30300029	86,78	81,92
10_nem_c_M1_1	22114977	21864226	98,87	89,54	9,32	18760720	84,83	88,88
11_nem_c_M1_2	25843972	25580541	98,98	90,80	8,18	22246589	86,08	89,96
12_nem_c_M1_ctrl	29861334	29746121	99,61	86,67	12,94	28291076	94,74	89,58
13_nem_c_M2_1	39890907	39359904	98,67	90,81	7,86	37519461	94,06	85,54
14_nem_c_M2_2	163312765	162979292	99,80	89,83	9,97	161367693	98,81	89,86
15_nem_c_M2_ctrl	52642898	52304259	99,36	85,17	14,19	51771871	98,35	87,55
16_nem_c_M3_1	67142241	66985341	99,77	91,53	8,24	66358349	98,83	87,42
17_nem_c_M3_2	61751016	61607037	99,77	90,67	9,10	61010723	98,80	89,53
18_nem_c_M3_ctrl	12888965	12810297	99,39	85,34	14,05	12663765	98,25	87,98

Anexo 4. Plots PCA de: 1) datos; 2) datos filtrados y 3) con la especie wild1 (*S. hyporodum*) del ensayo con Fusarium

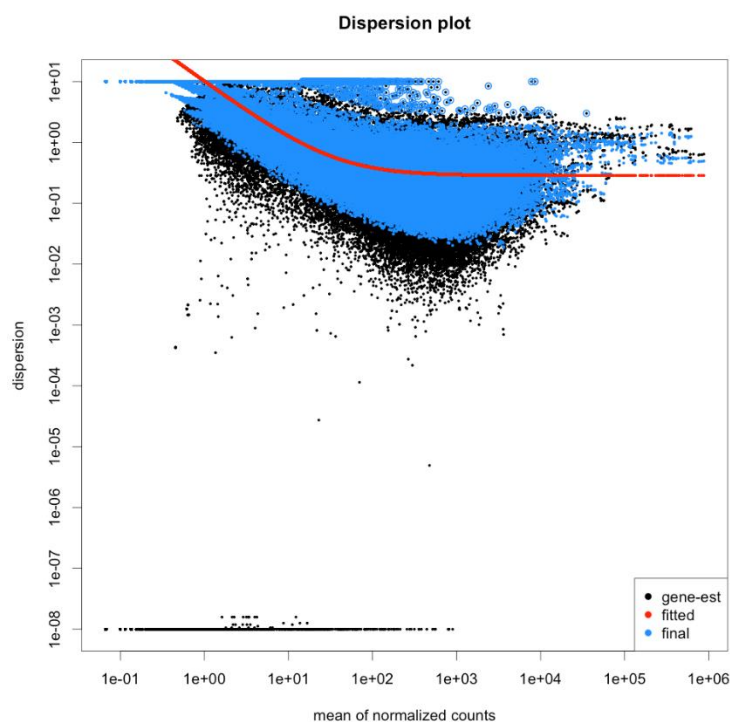
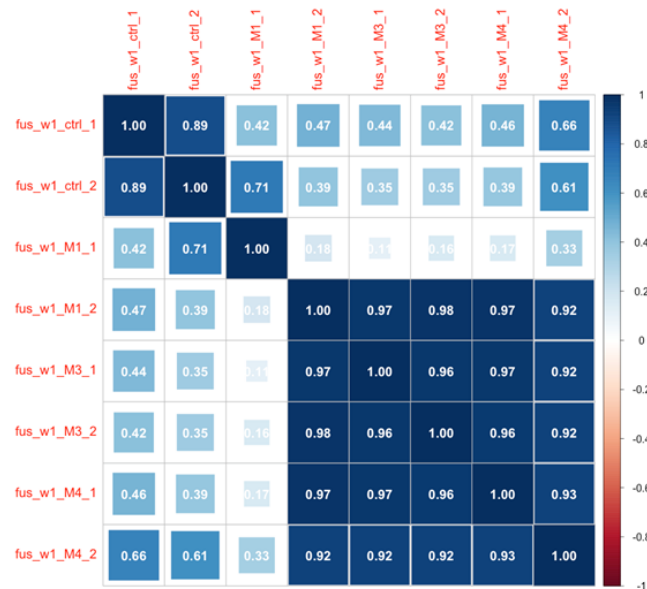


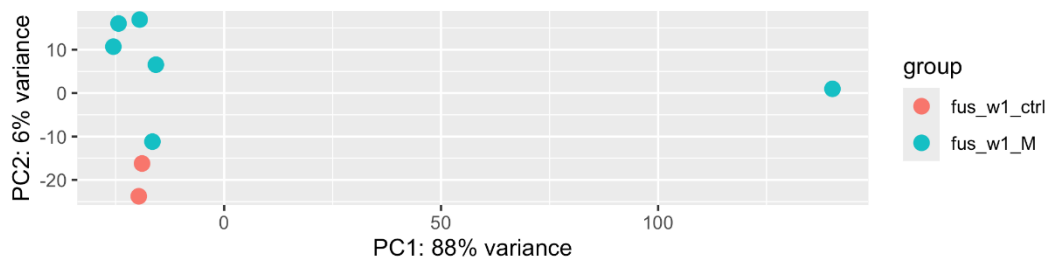
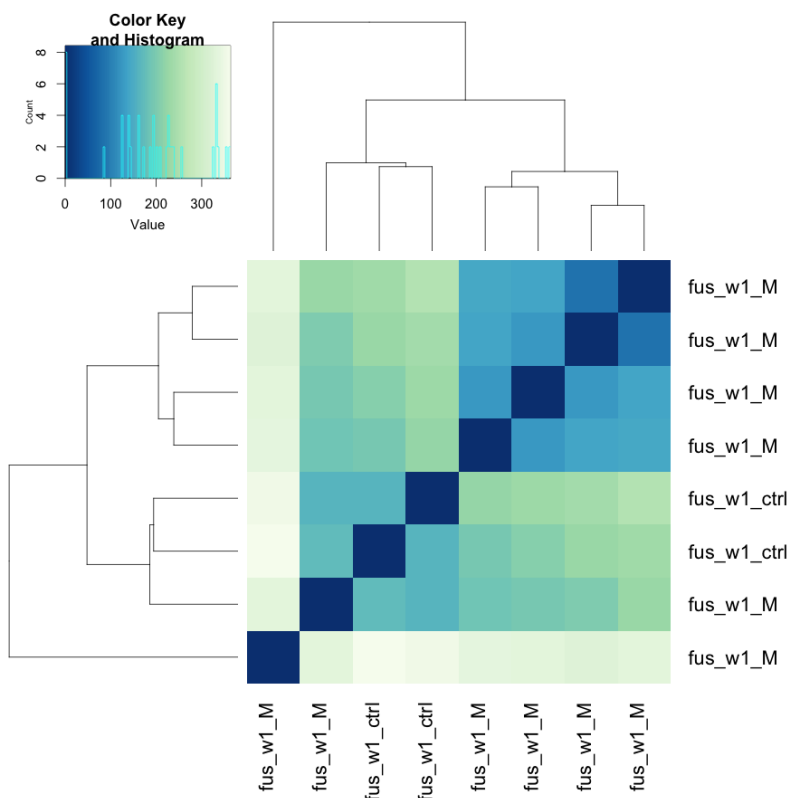


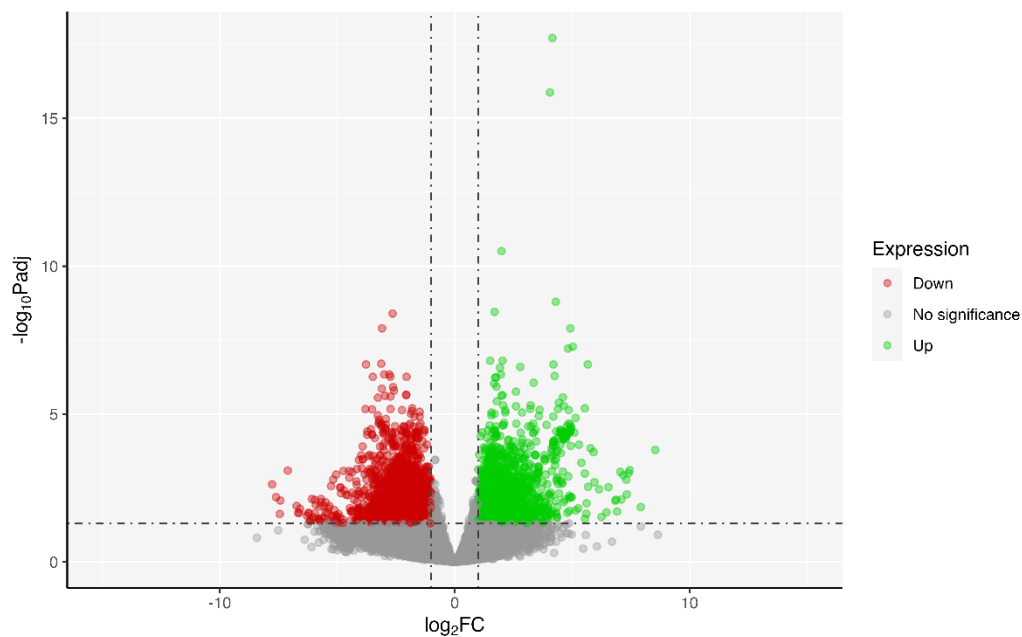
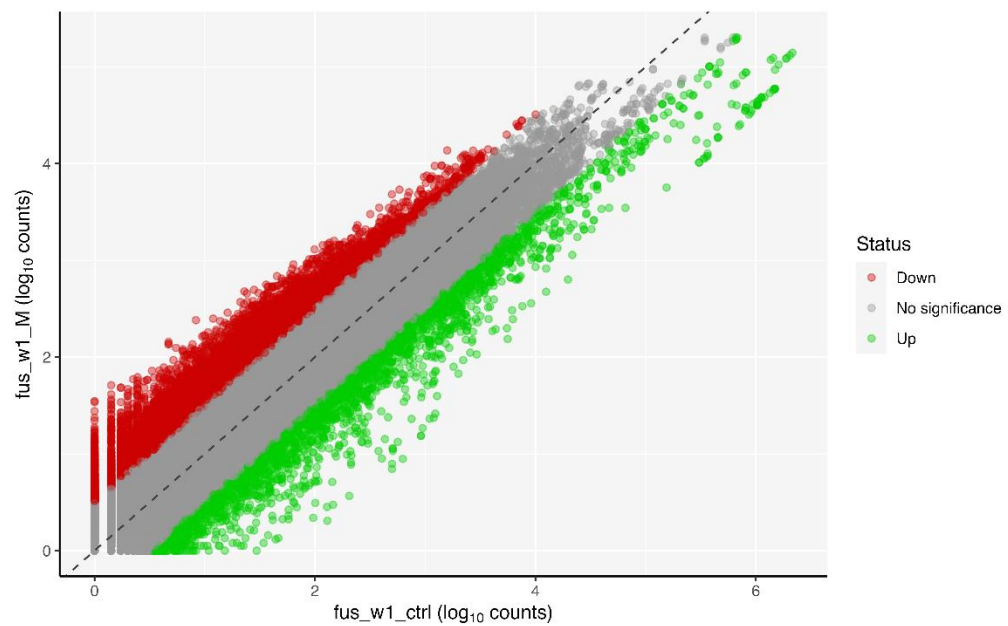
PCA de 1) datos; y 2) datos filtrados del ensayo con nematodos



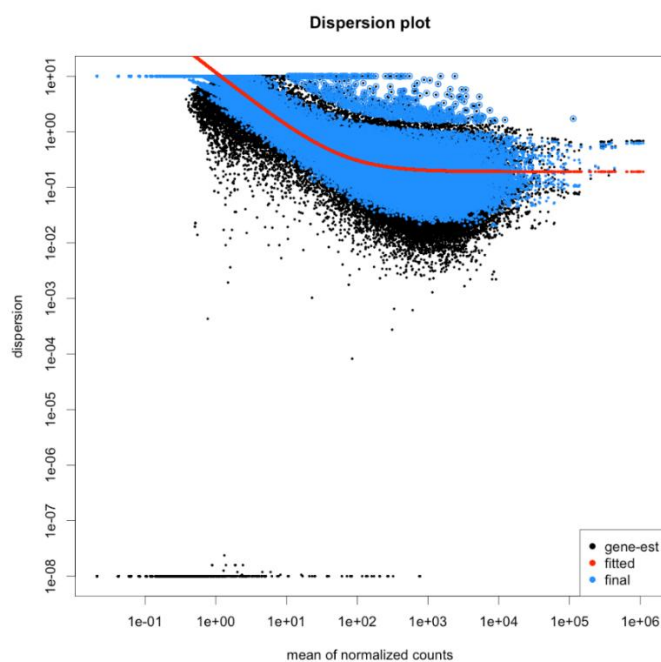
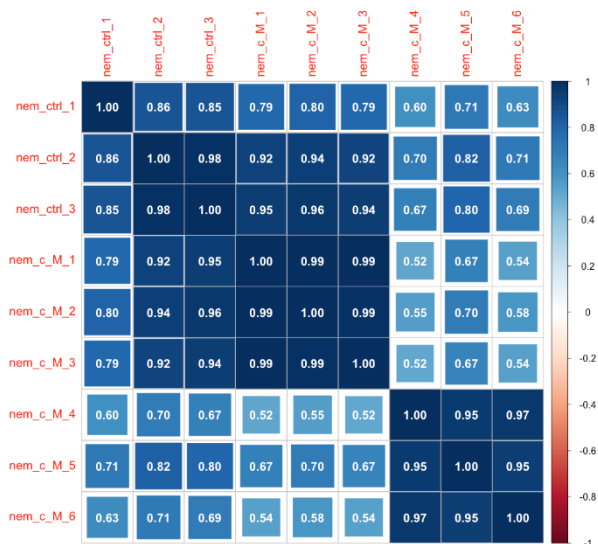
Anexo 5) Plot de Correlación, 2) DSP plot, 3) heatmap, 4) PCA, 5) scatter y 6) volcano plot de la comparación de expresión entre la comparación w1_ctrl vs w1_M para el ensayo con Fusarium

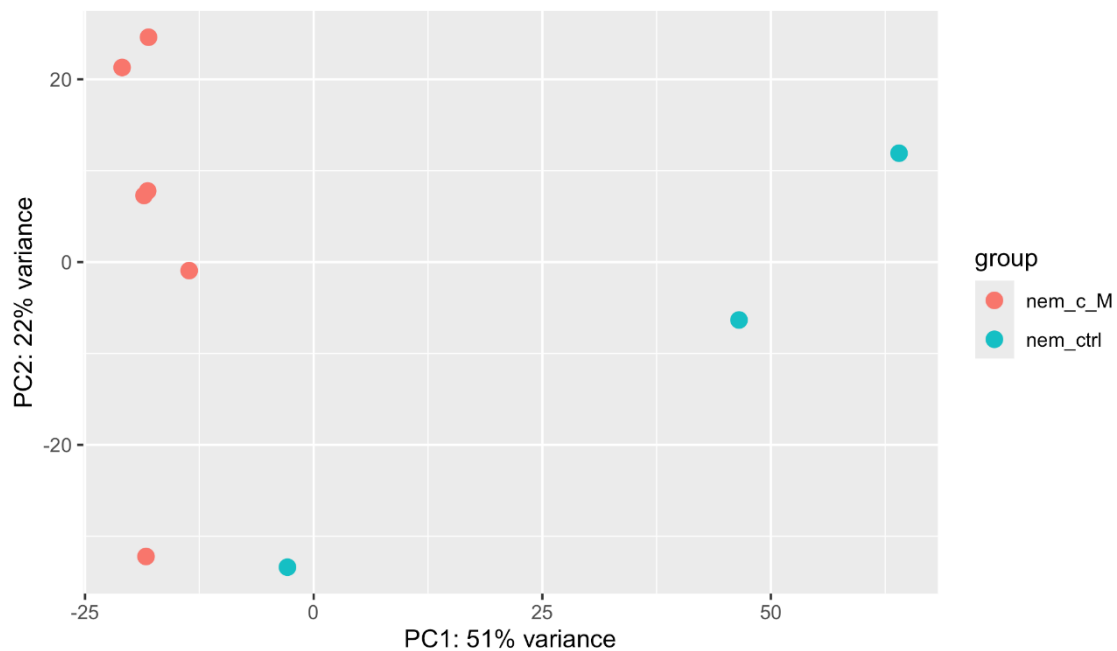
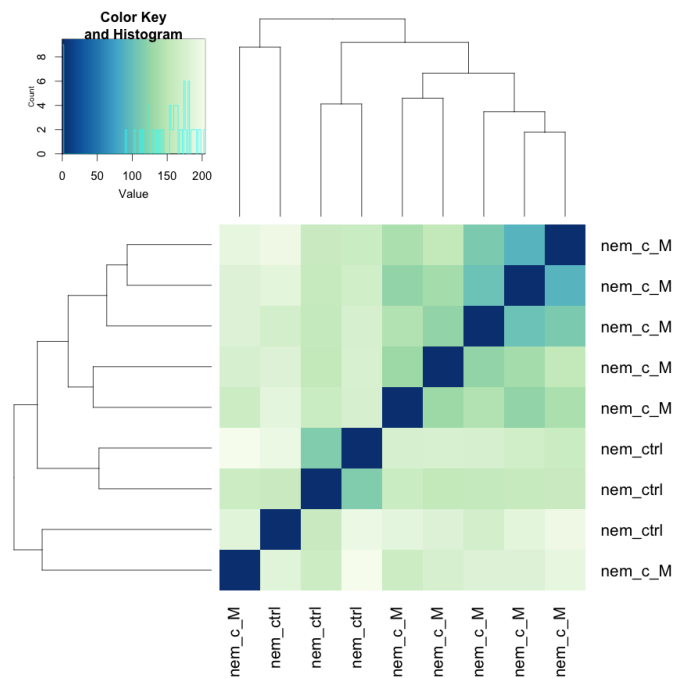


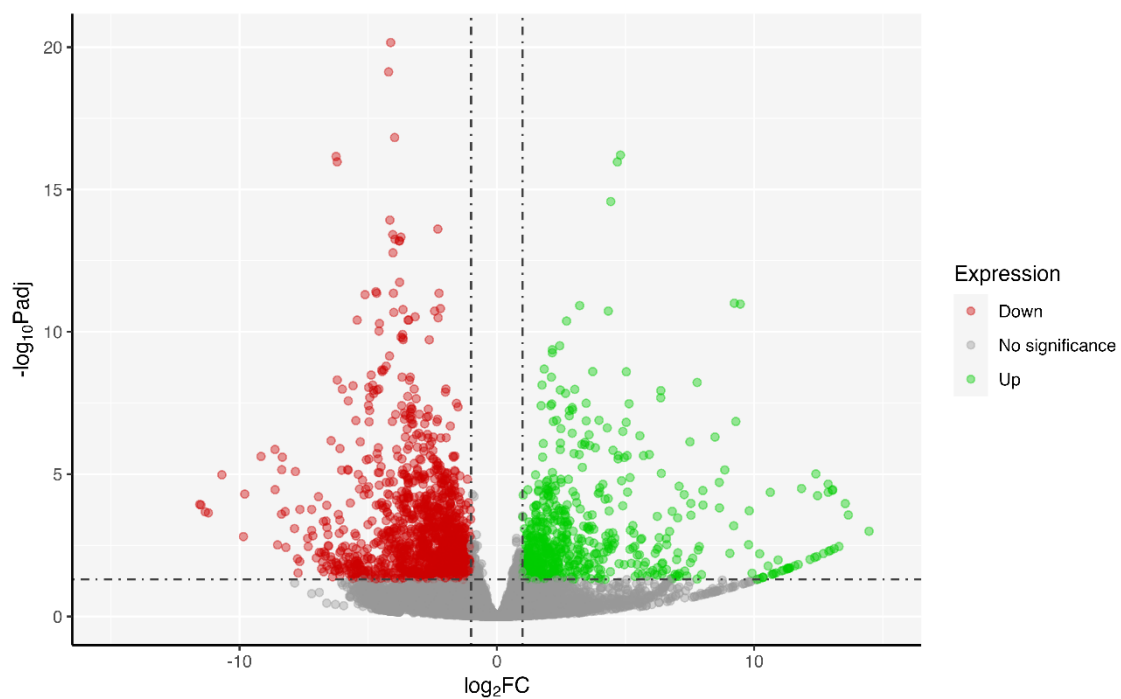
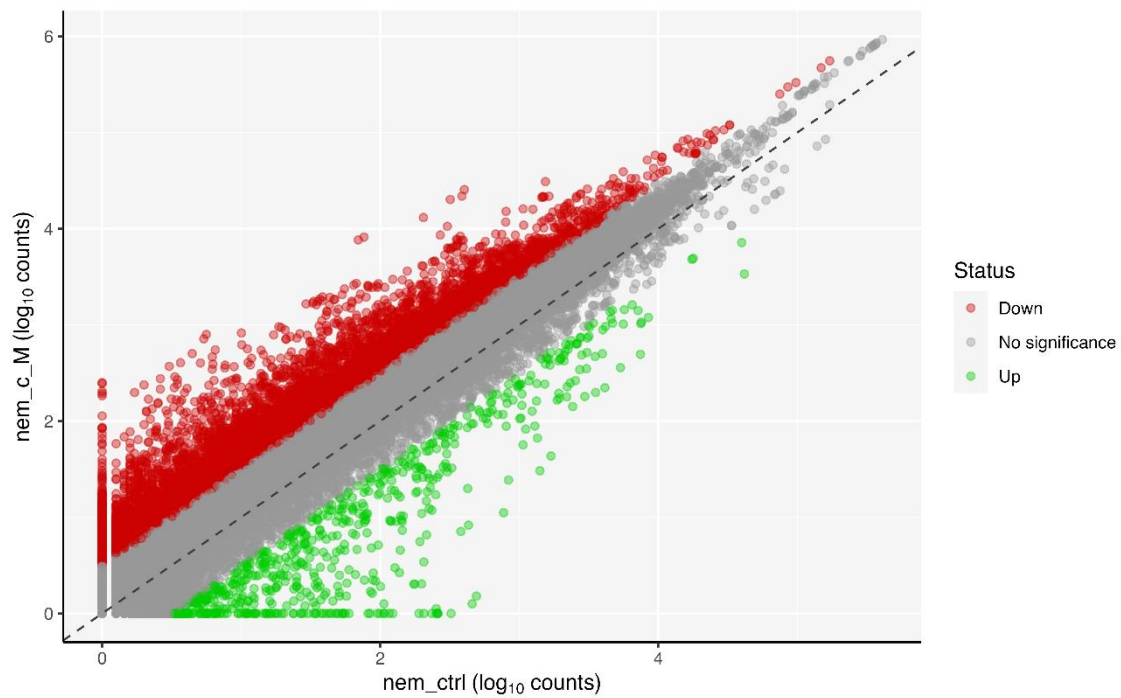




Anexo 6. 1) Plot de Correlación, 2) DSP plot, 3) heatmap, 4) PCA, 5) scatter y 6) volcano plot de la comparación de expresión entre la comparación ctrl vs c_M para el ensayo con nematodos







ANEXOS ACTOVODAD B

Anexo 1. Frutos de tomate de árbol obtenidos de autofecundaciones del ensayo experimental en campo (Localidad Valle Hermoso, Pelileo, Tungurahua-Ecuador)

Fruto a los 50 días (M1)



Fruto a los 83 días (M2)



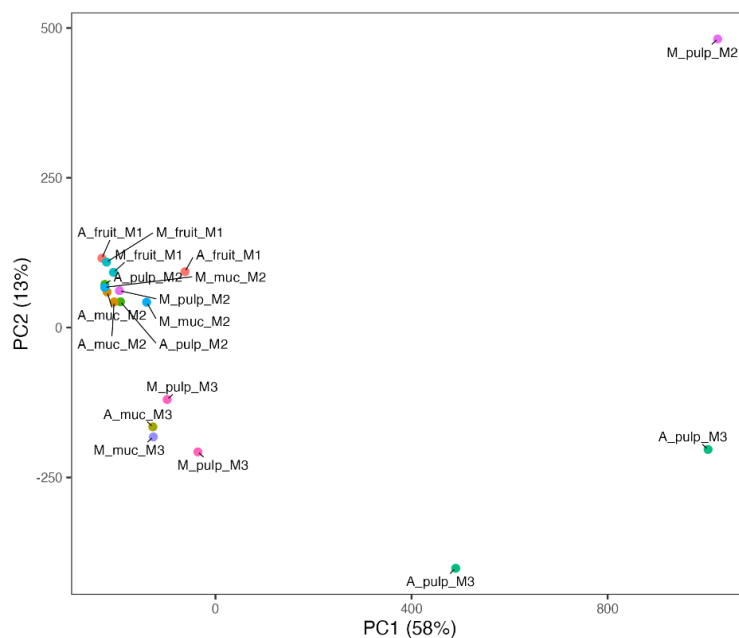
Frutos a la madurez, 170 días (M3), variedades anaranjadas y moradas



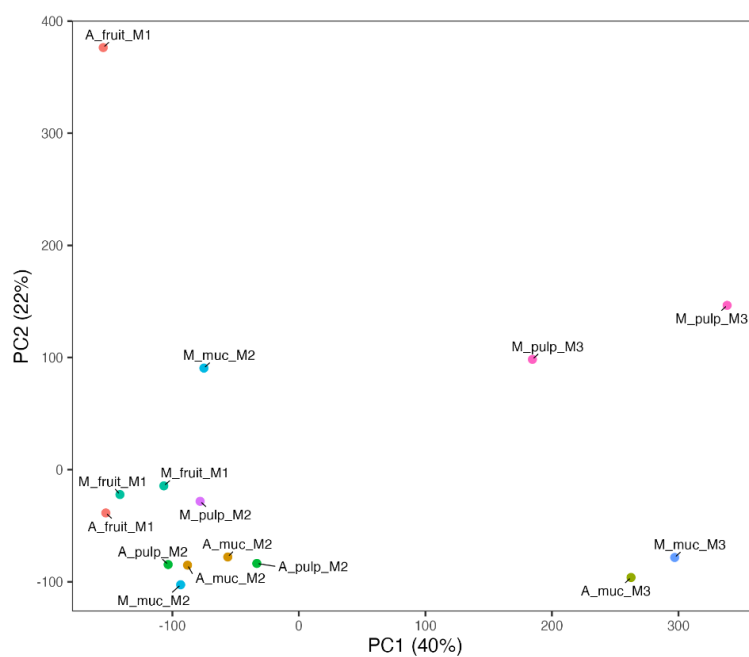
Anexo 2. Resumen de datos mapeados del transcriptoma obtenido en tomate de arbol

	raw reads	Kraken2	% passed	% viridiplant	% unclassified	fastp	% passed	% bowtie2
01_A_fruit_M1_1	25253417	23841729	94,41	85,31	9,10	20275460	80,29	81,15
02_A_fruit_M1_2	74080372	73842307	99,68	91,39	8,29	72425994	97,77	85,72
03_A_pulp_M2_1	38534518	38453765	99,79	80,91	18,88	37166304	96,45	88,42
04_A_pulp_M2_1	50174652	50086082	99,82	85,36	14,46	47813632	95,29	87,20
05_A_pulp_M2_2	62166322	61753891	99,34	47,81	51,53	59908232	96,37	85,59
06_A_muc_M2_2	67436039	67314740	99,82	87,47	12,35	65165489	96,63	86,44
07_A_pulp_M3_1	5359929	4924651	91,88	87,09	4,79	2955415	55,14	75,89
08_A_muc_M3_1	55180272	55089469	99,84	86,96	12,88	53311573	96,61	87,15
09_A_pulp_M3_2	9932312	9293434	93,57	86,66	6,91	5972119	60,13	78,91
10_M_fruit_M1_1	39584030	39477045	99,73	64,60	35,13	37302817	94,24	87,66
11_M_fruit_M1_2	46222861	46124769	99,79	91,44	8,35	44224658	95,68	84,49
12_M_pulp_M2_1	24458898	24201218	98,95	86,25	12,70	22689869	92,77	84,94
13_M_muc_M2_1	24399799	24209653	99,22	89,91	9,32	20940543	85,82	84,90
14_M_pulp_M2_2	4905435	4563817	93,04	88,05	4,98	1055287	21,51	75,82
15_M_muc_M2_2	75833974	75516828	99,58	87,63	11,95	74146760	97,78	87,24
16_M_pulp_M3_1	48244857	47886088	99,26	71,80	27,45	45580434	94,48	84,93
17_M_pulp_M3_2	28723783	28541885	99,37	81,36	18,01	26179330	91,14	87,77
18_M_muc_M3_1	54419195	54294778	99,77	89,09	10,68	52831989	97,08	87,84

Anexo 3. A) Plot PCA de datos del transcriptoma obtenido de tomate

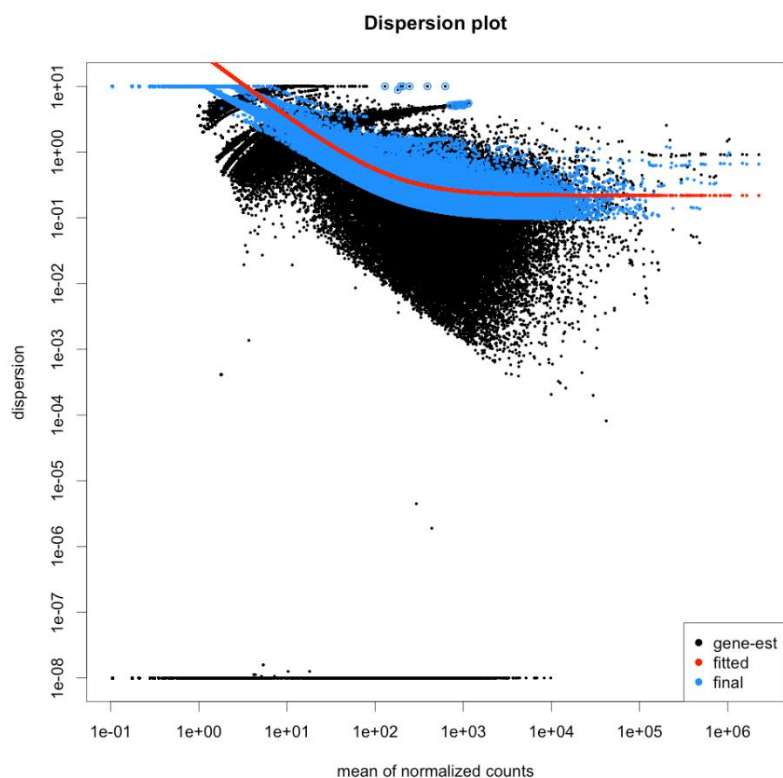
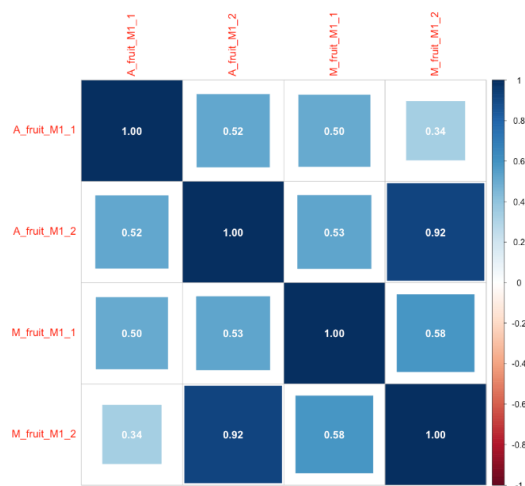


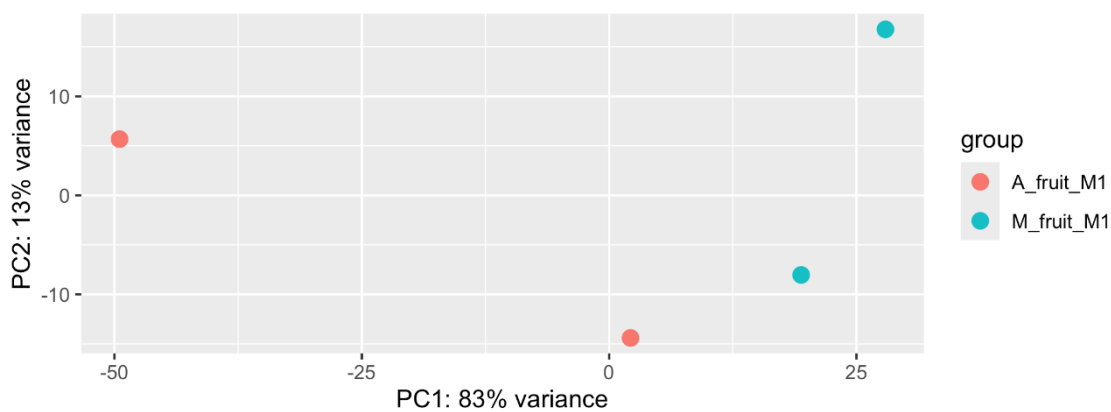
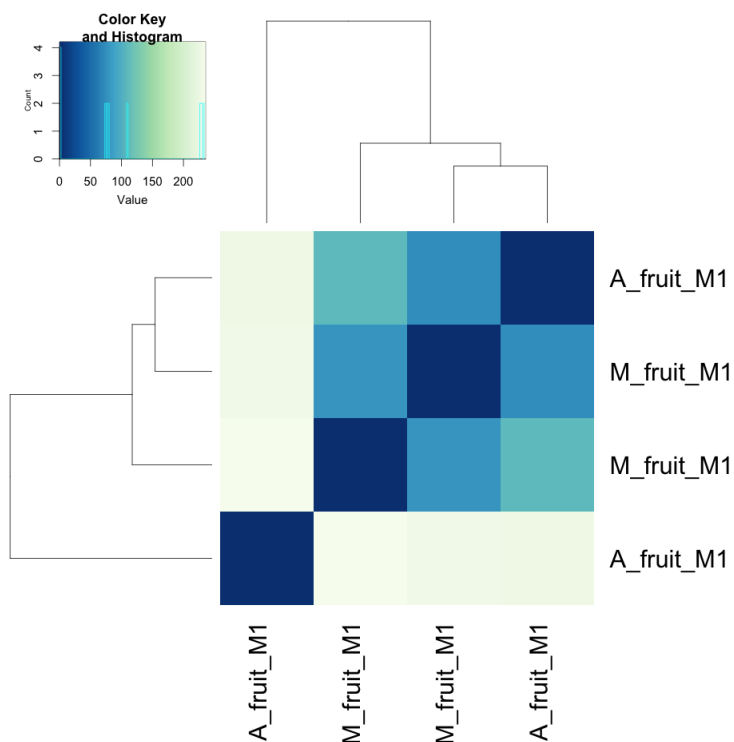
B) Plot PCA de datos filtrados de transcriptoma obtenido de tomate

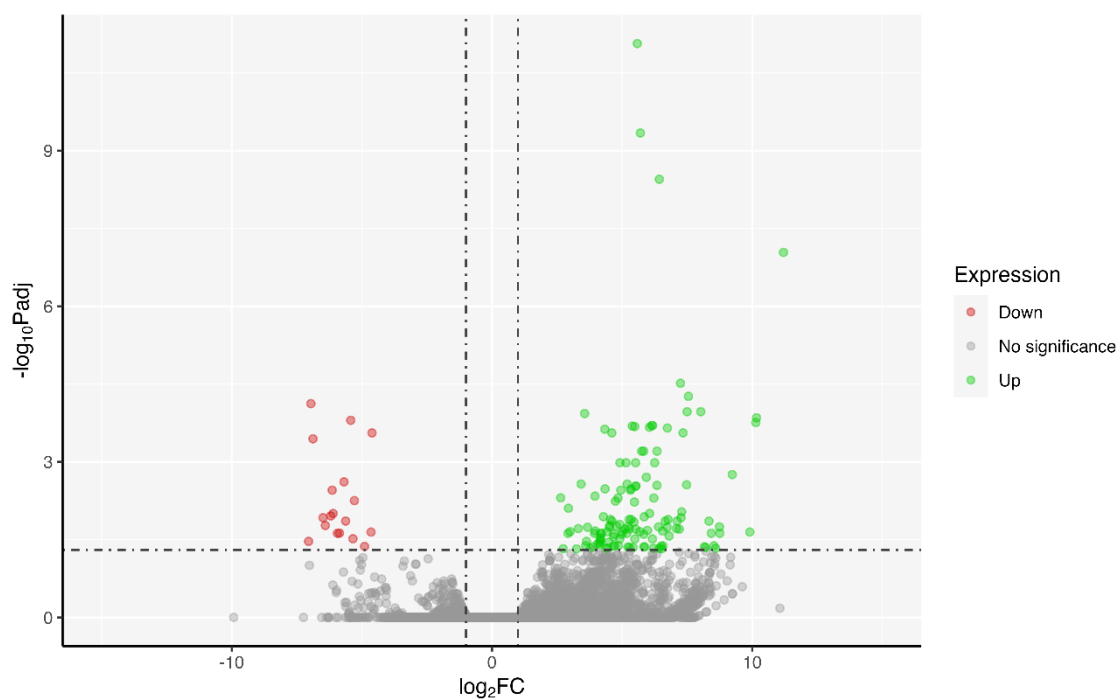
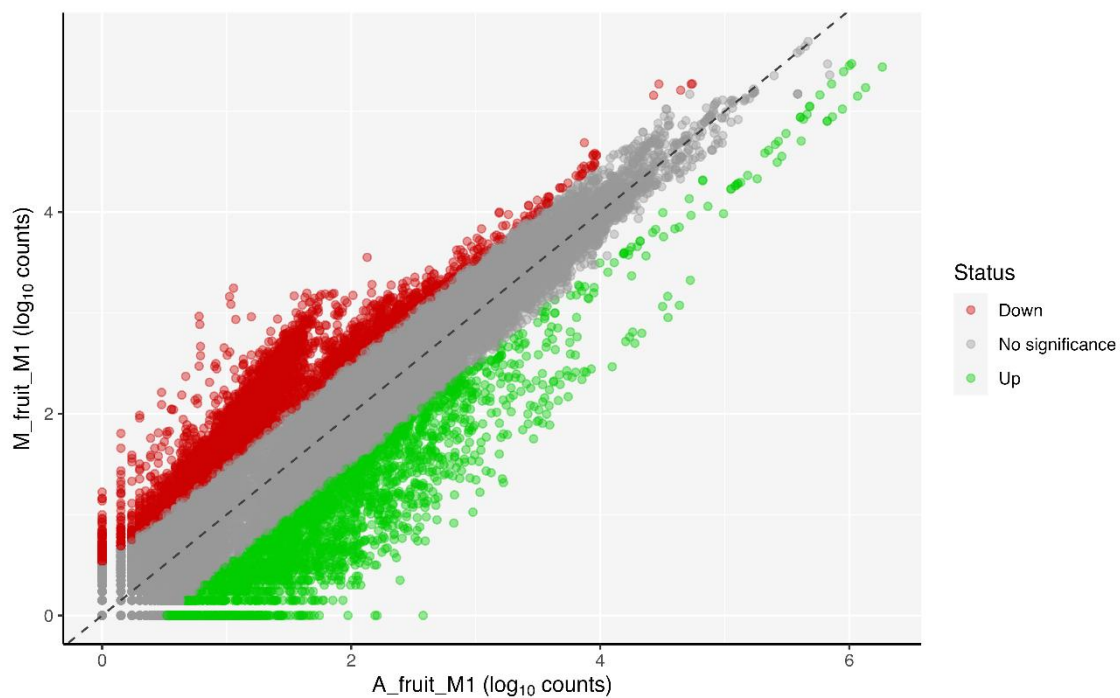


Anexo 4) Plots y gráficos obtenidos de las tres comparaciones realizadas

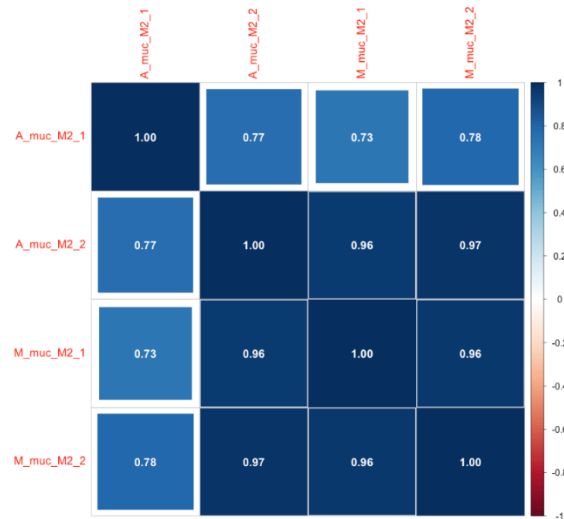
- 1) Plot de Correlación, 2) DSP plot, 3) heatmap, 4) PCA, 5) scatter y 6) volcano plot de la comparación de expresión entre la comparación A_fruit_M1 vs M_fruit_M1



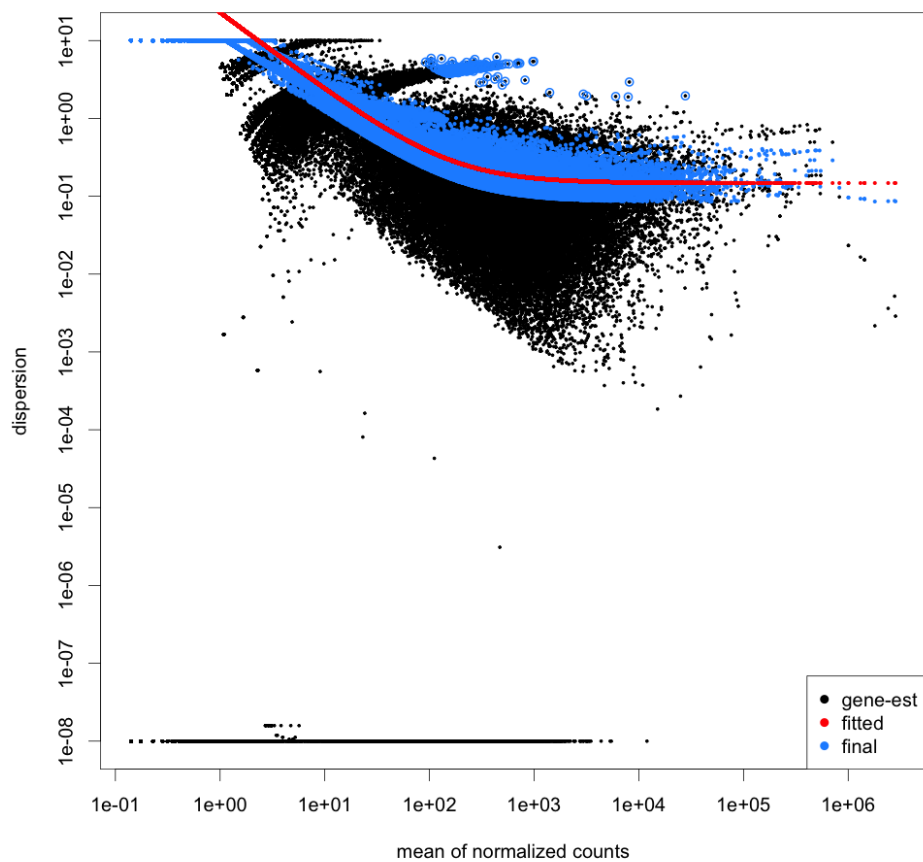


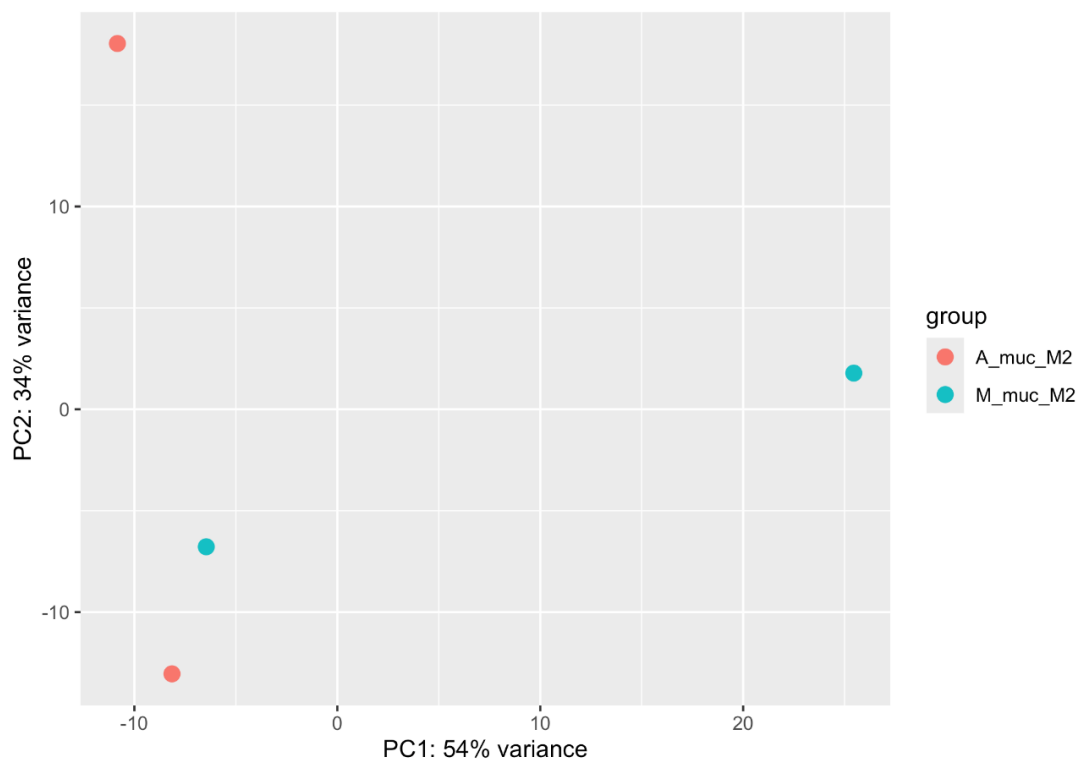
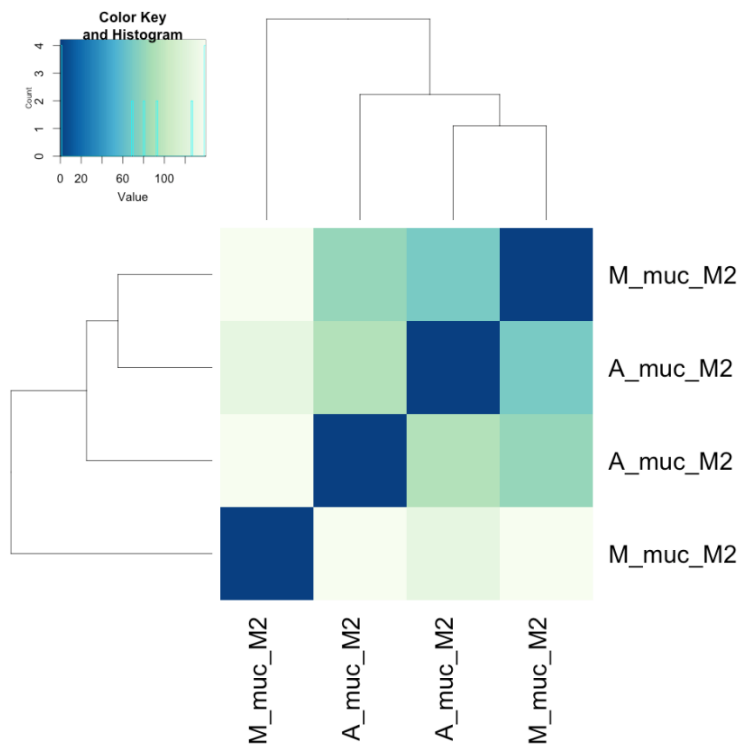


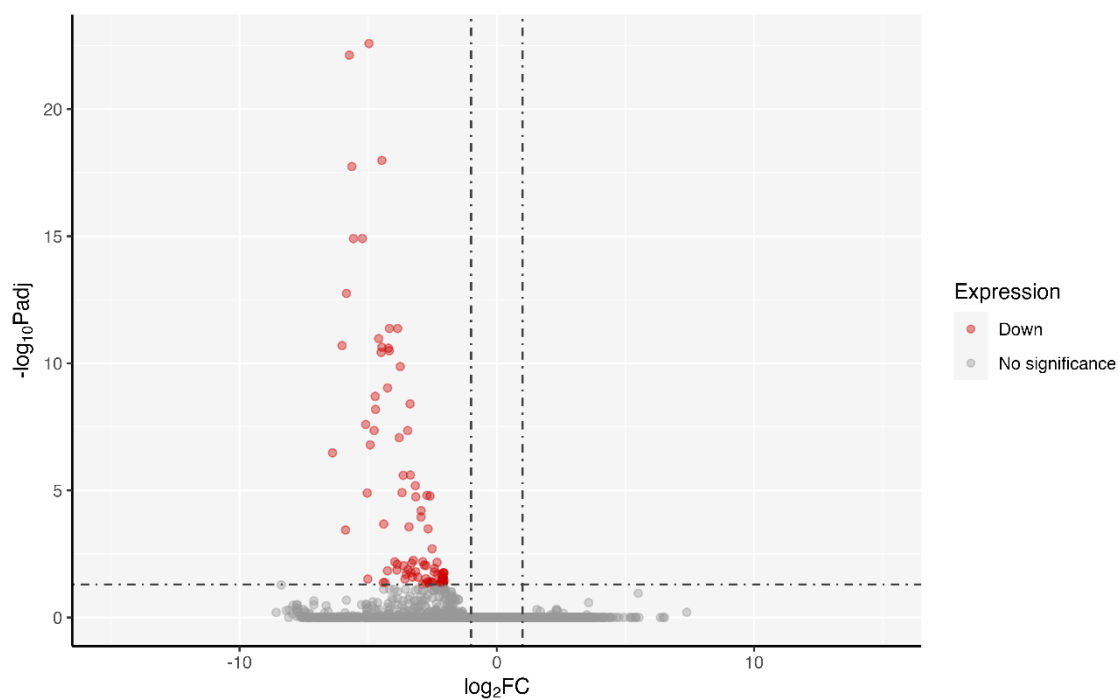
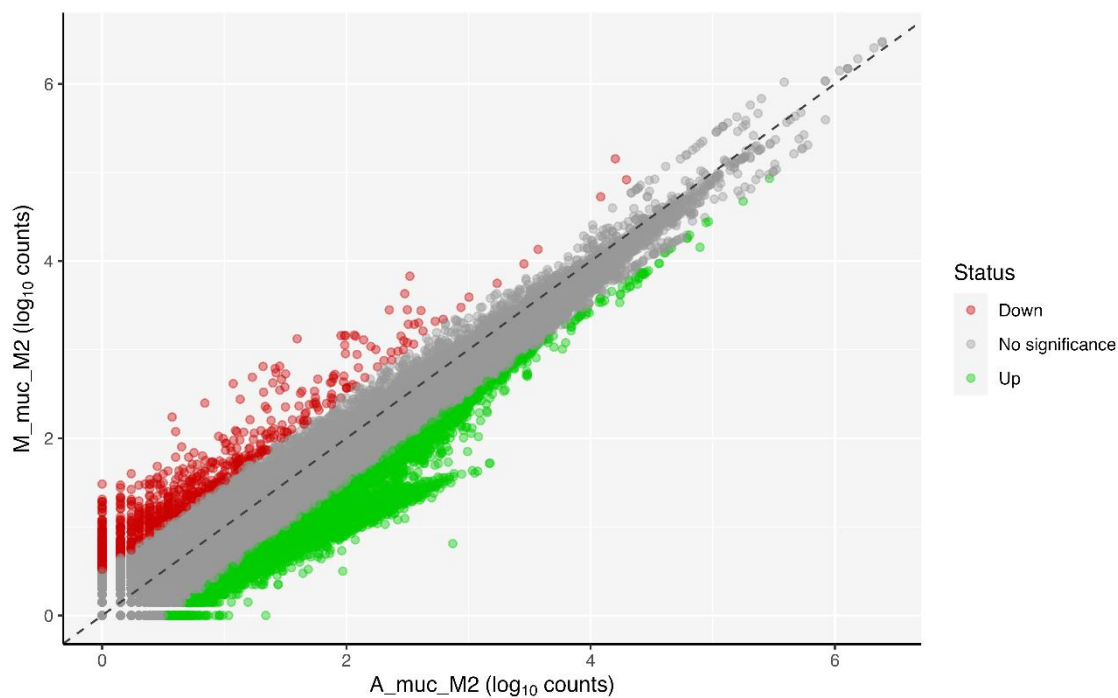
1) Plot de Correlación, 2) DSP plot, 3) heatmap, 4) PCA, 5) scatter y 6) volcano plot de la comparación de expresión entre la comparación A_muc_M2 vs M_muc_M2



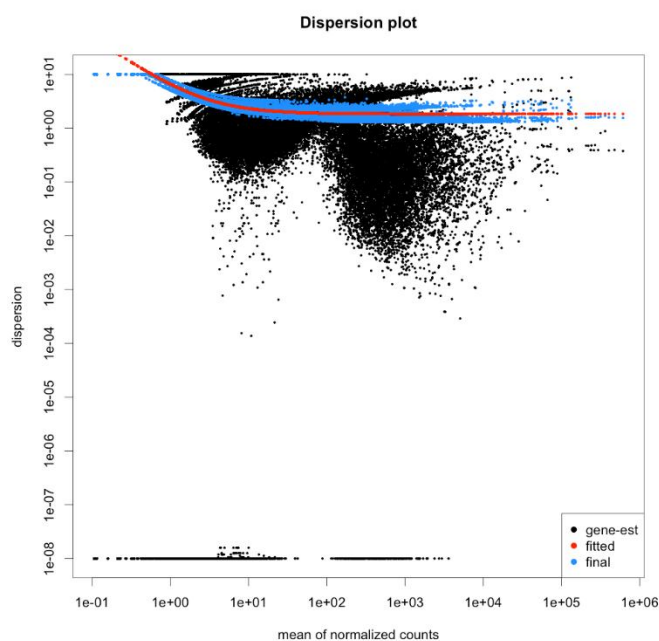
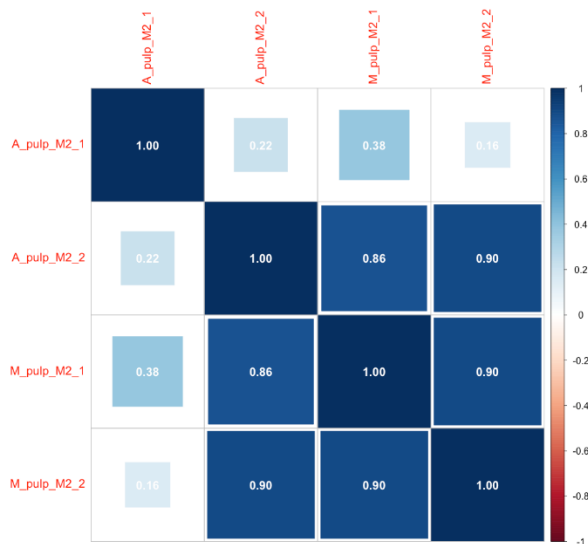
Dispersion plot

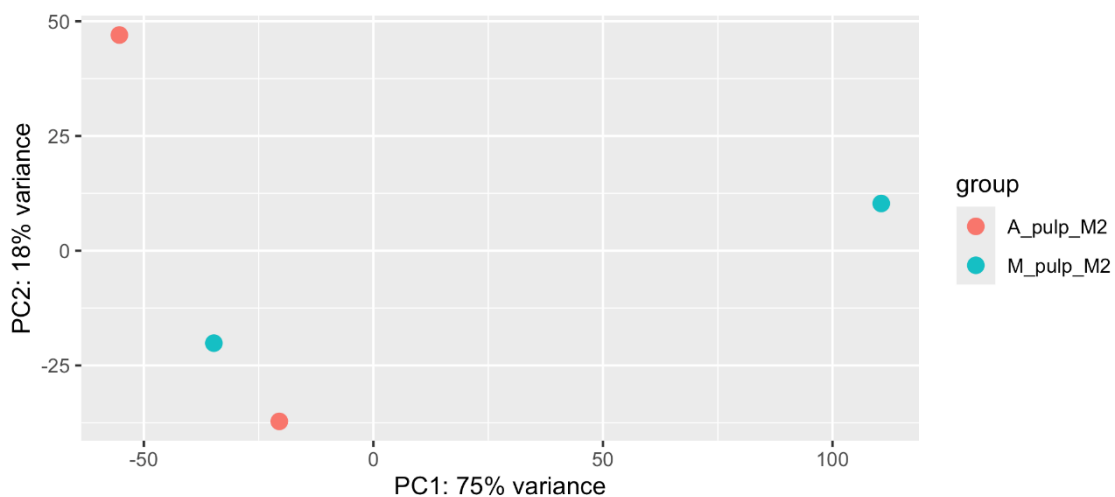
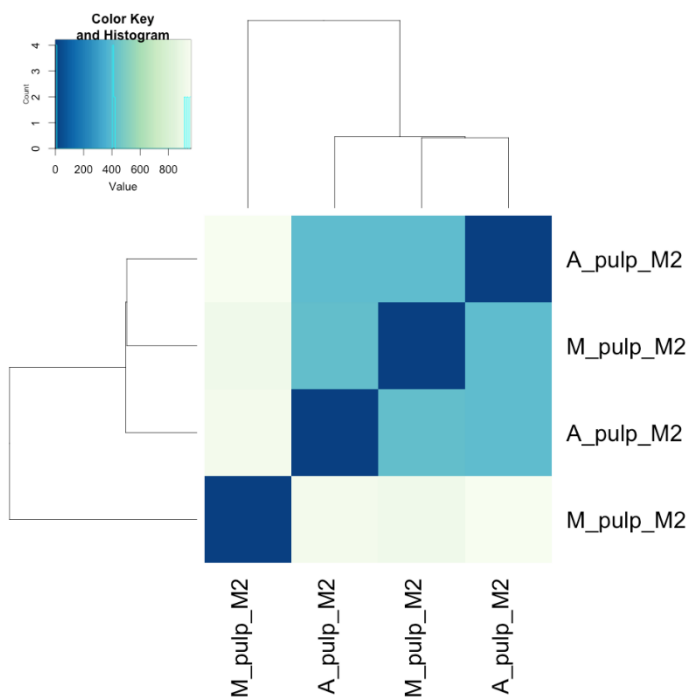


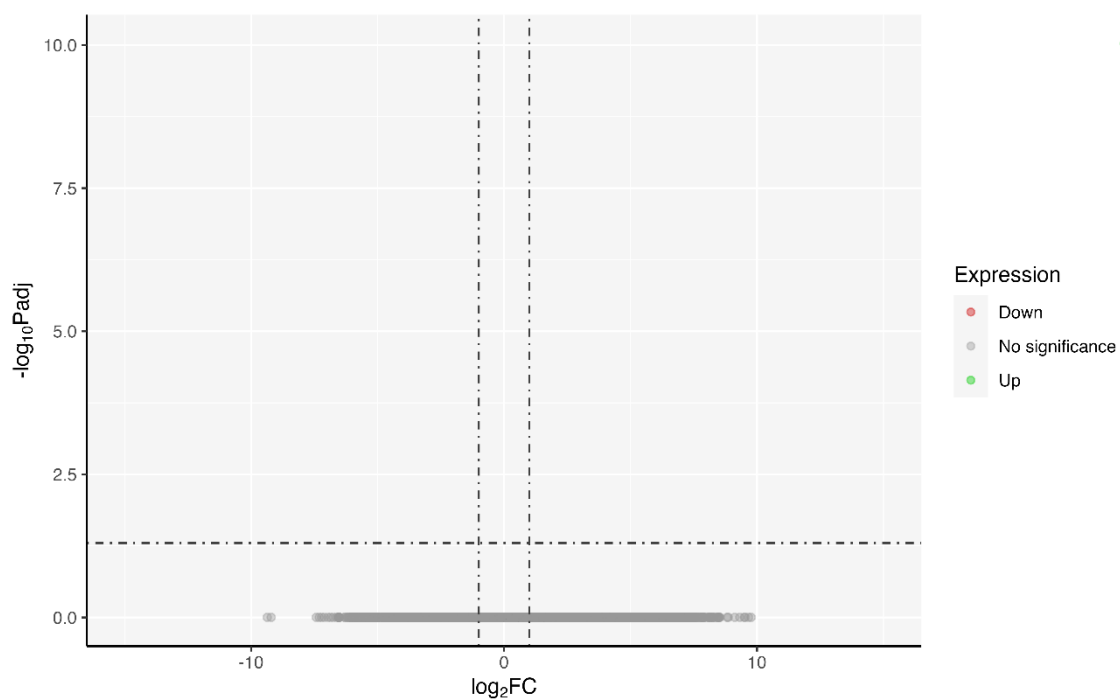
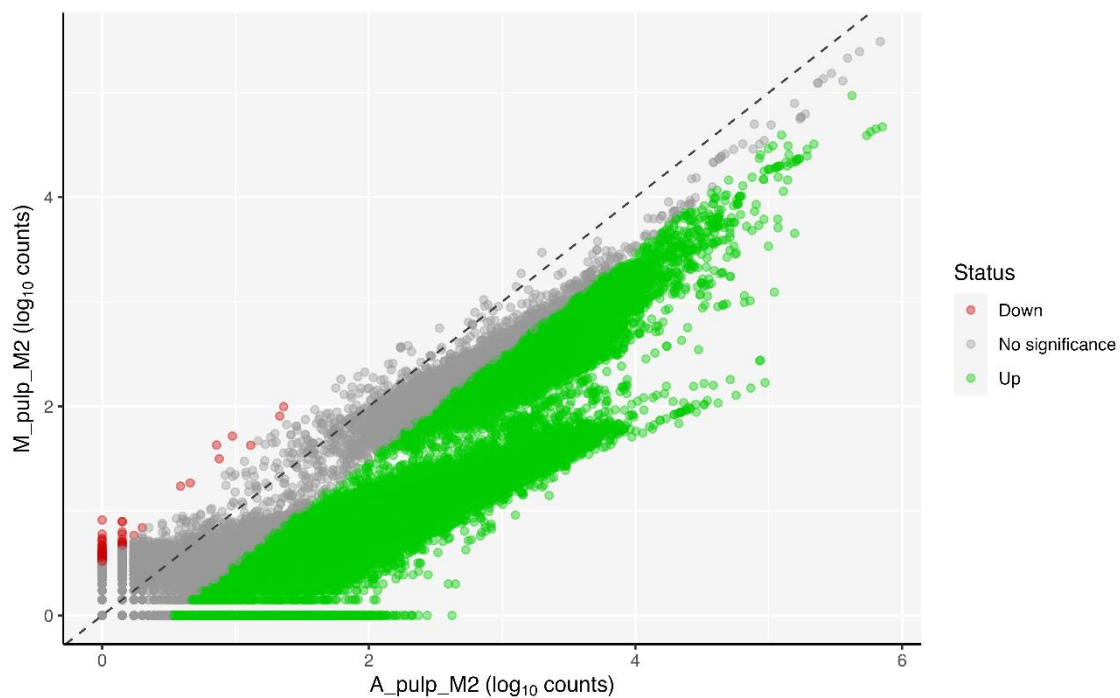




1) Plot de Correlación, 2) DSP plot, 3) heatmap, 4) PCA, 5) scatter y 6) volcano plot de la comparación de expresión entre la comparación A_pulp_M2 vs M_pulp_M2







ANEXOS ACTIVIDAD C

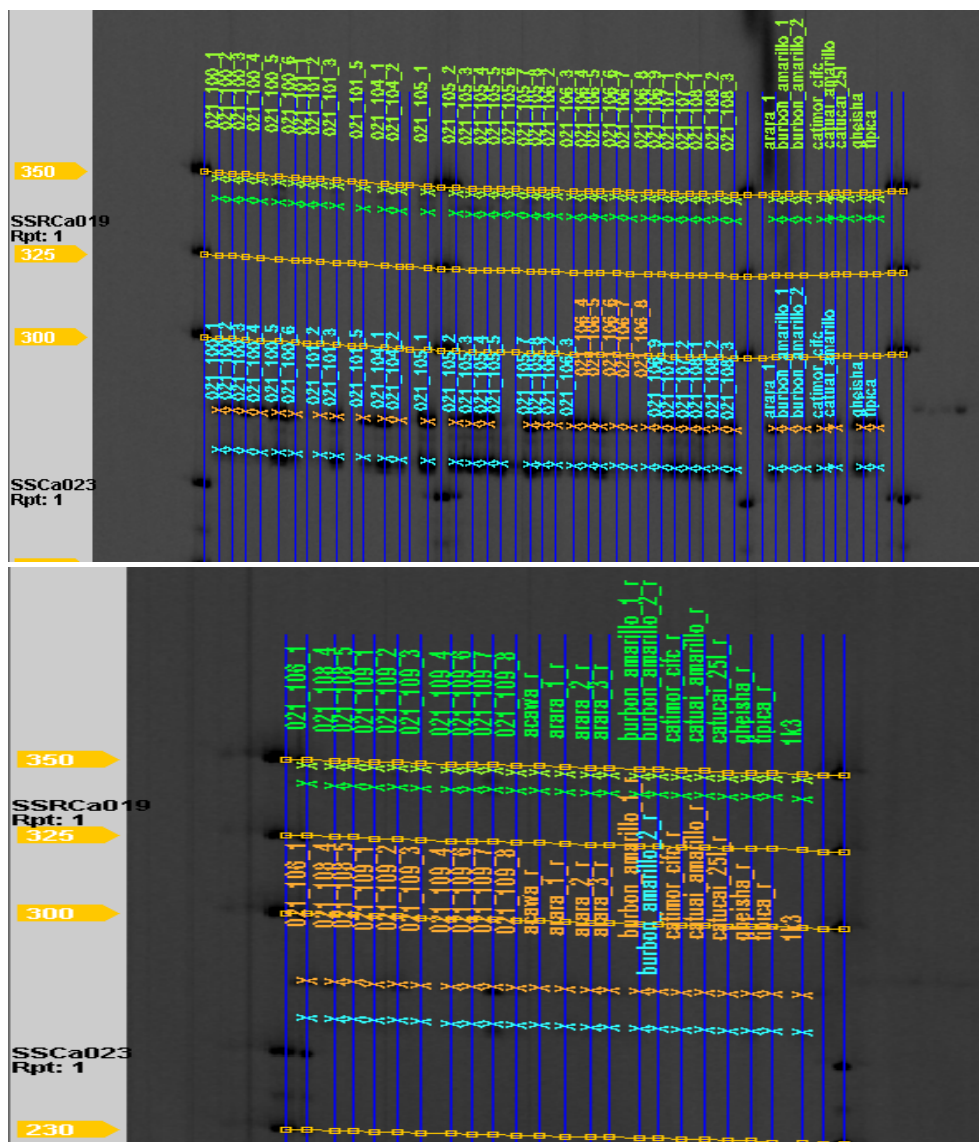
Anexo 1. Lista de materiales de café y datos de cuantificación e índice de pureza.

No.	Código Lab.	MUESTRA	ECTURA (260/280)	LECTURA (ng/μL)
1	CF1	021_100_1	2.164	1.384.286
2	CF2	021_100_2	2.161	1.290.937
3	CF3	021_100_3	1.946	2.788.813
4	CF4	021_100_4	2.159	1.092.654
5	CF05	021_100_5	2.016	493.977
6	CF06	021_100_6	2.051	1370.33
7	CF07	021_101_1	2	991.353
8	CF08	021_101_2	1.927	433.054
9	CF09	021_101_3	1.972	623.355
10	CF10	021_101_4	2.027	1.400.155
11	CF11	021_101_5	2.063	1530.3
12	CF12	021_104_1	1.968	839.7
13	CF13	021_104_2	2.103	970.115
14	CF14	021_104_3	1.951	936.497
15	CF15	021_105_1	1.973	766.442
16	CF16	021_105_2	1.806	317.953
17	CF17	021_105_3	1.954	1.014.564
18	CF18	021_105_4	2.028	919.89
19	CF19	021_105_5	1.976	753.174
20	CF20	021_105_6	1.972	1.094.693
21	CF21	021_105_7	1.89	349.781
22	CF22	021_105_8	1.935	487.492
23	CF23	021_106_1	1.894	492.124
24	CF24	021_106_2	1.991	948.554
25	CF25	021_106_3	1.918	322.539
26	CF26	021_106_4	1.936	545.155
27	CF27	021_106_5	1.992	633.167
28	CF28	021_106_6	1.529	133.494
29	CF29	021_106_7	1.966	524.529
30	CF30	021_106_8	1.614	226.264
31	CF31	021_106_9	1.965	699.431
32	CF32	021_107_1	1.847	838.912

33	CF33	021_107_2	1.927	894.189
34	CF34	021_108_1	1.829	412.221
35	CF35	021_108_2	1.91	633.997
36	CF36	021_108_3	1.983	964.341
37	CF37	021_108_4	1.964	971.093
38	CF38	021_108_5	1.894	615.469
39	CF39	021_109_1	2.017	1.424.137
40	CF40	021_109_2	1.826	472.271
41	CF41	021_109_3	2.013	1.693.155
42	CF42	021_109_4	1.9	565.426
43	CF43	021_109_6	1.877	420.428
44	CF44	021_109_7	1.99	872.181
45	CF45	021_109_8	1.949	950.613
46	CF46	acawa	1.985	1.185.385
47	CF47	arara_1	1.911	586.799
48	CF48	arara_2_	1.684	586.799
49	CF49	burbon_amarillo_1	2.015	1.761.616
50	CF50	burbon_amarillo_2	1.997	796.272
51	CF51	catimor_cifc	1.979	1.923.622
52	CF52	catuai_amarillo	1.933	545.942
53	CF53	catucaí_25l	2.026	1.249.172
54	CF54	gheisha	1.932	578.135
55	CF55	tipica	2.013	865.085

Anexo 2. Fotodocumentación del genotipaje de café registrado en SAGA

DÚPLEX: SSRCa019 / SSRCa023

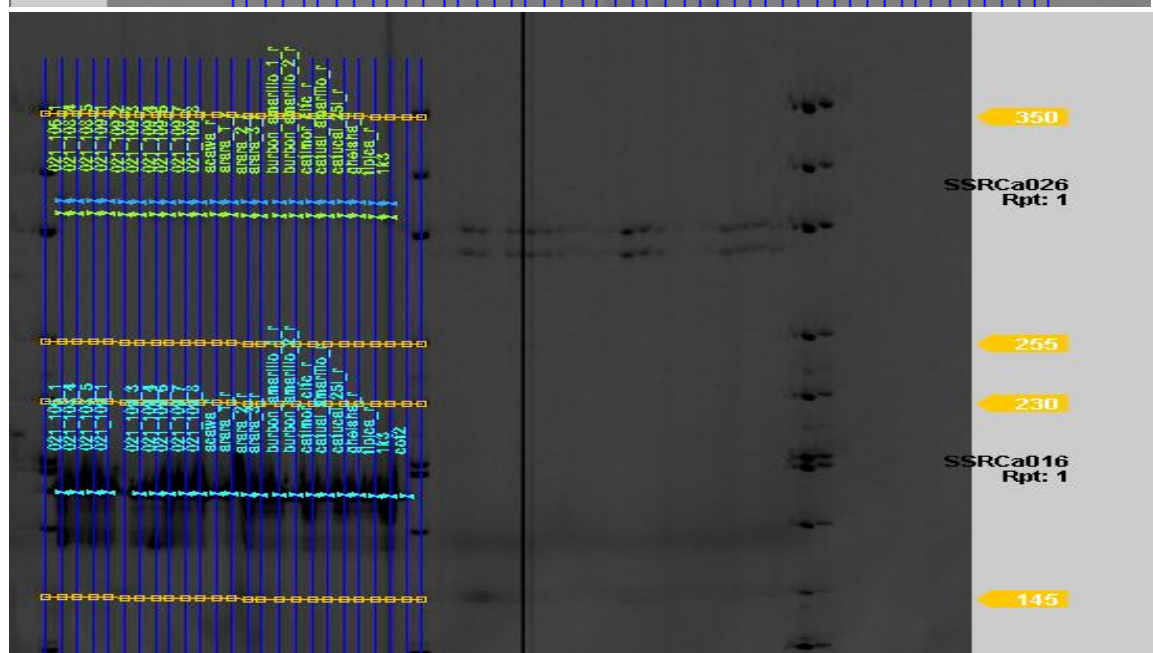
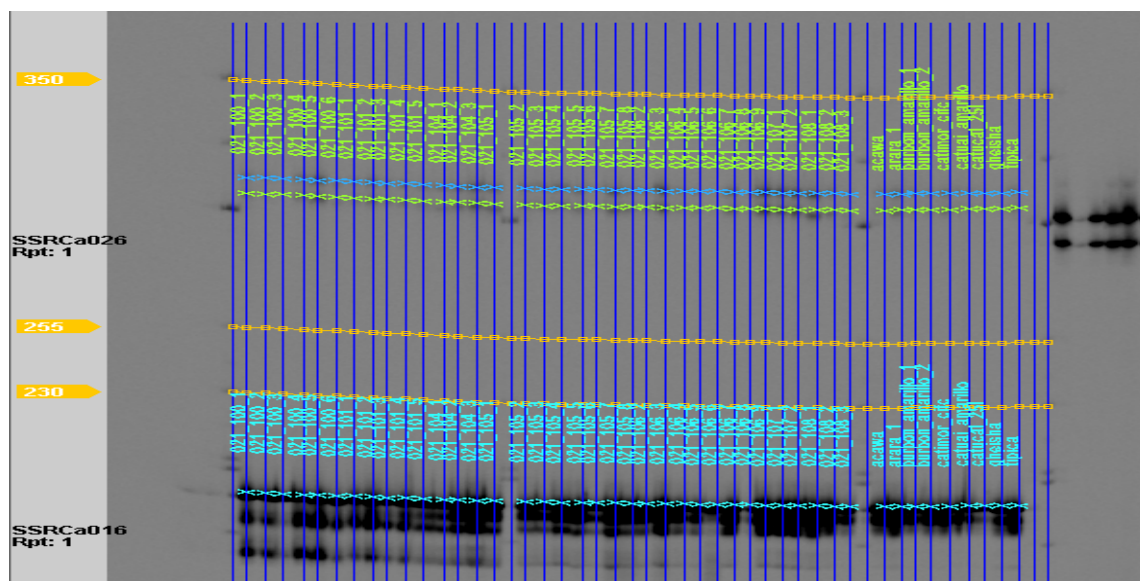


SSRCa020
Rpt: 1

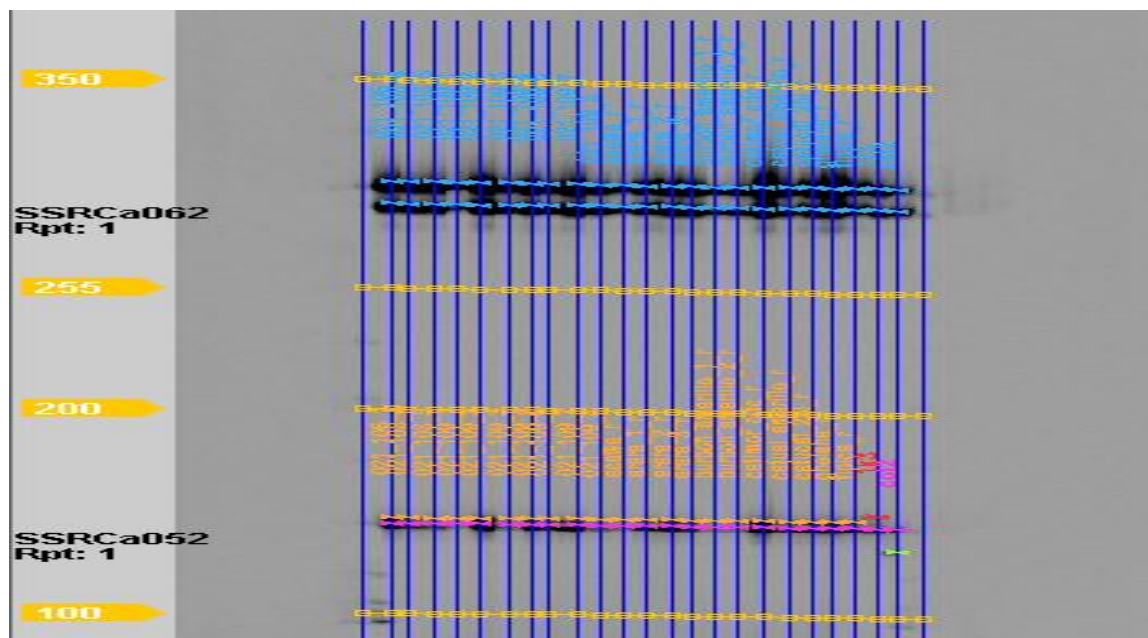
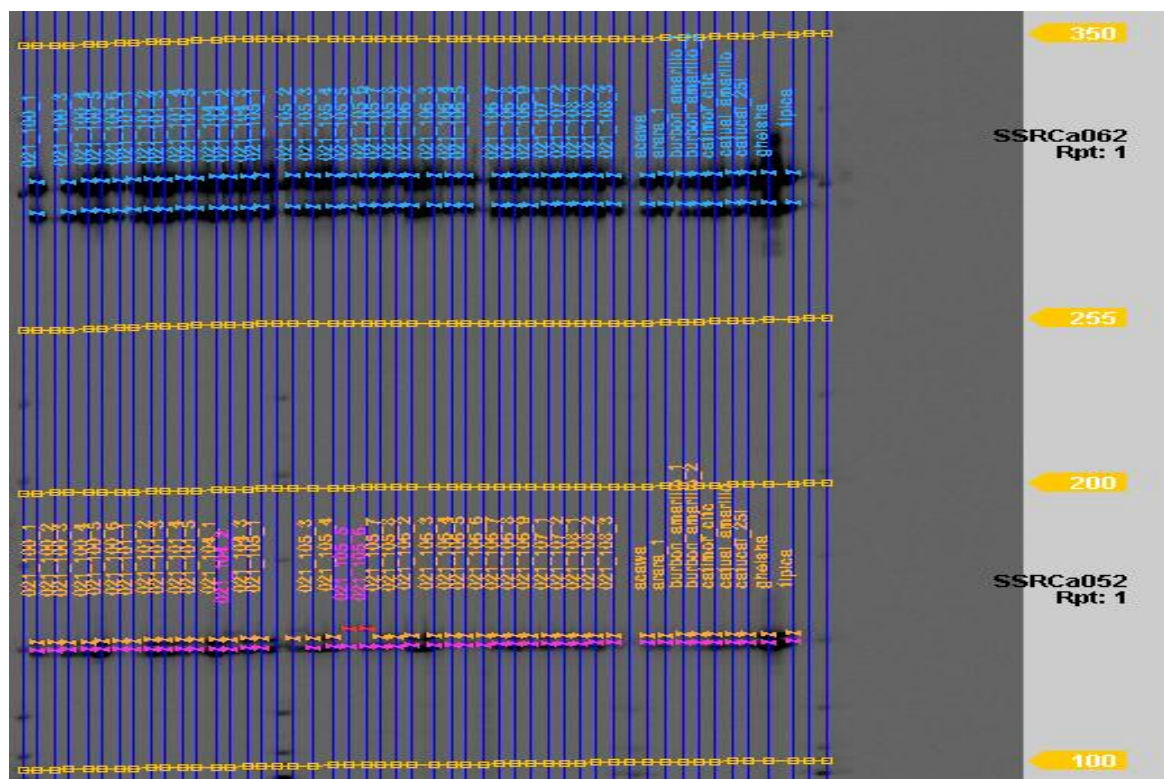
SSRCa020
Rpt: 2

SSRCa003
Rpt: 1

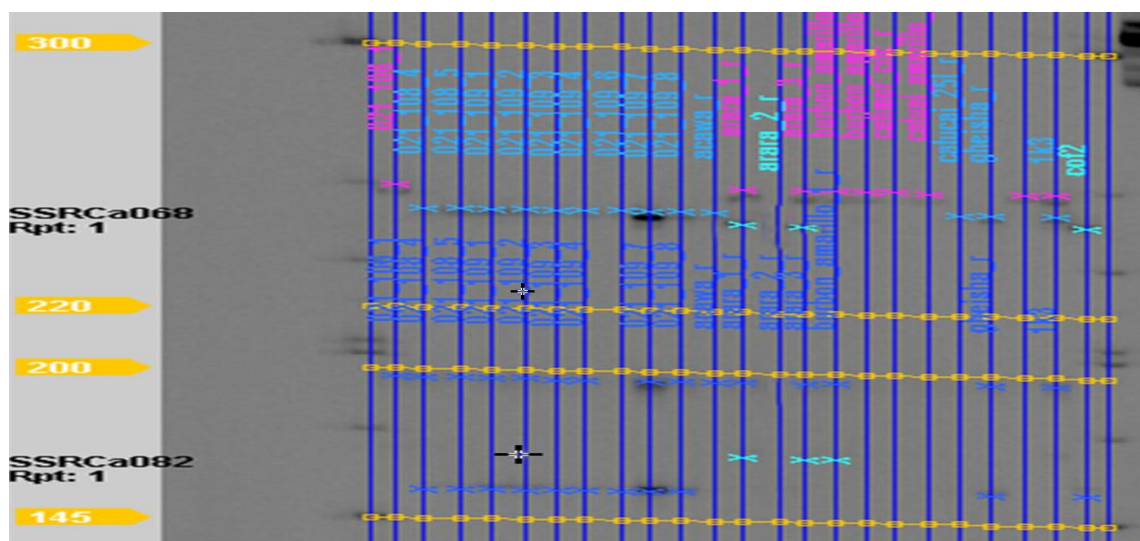
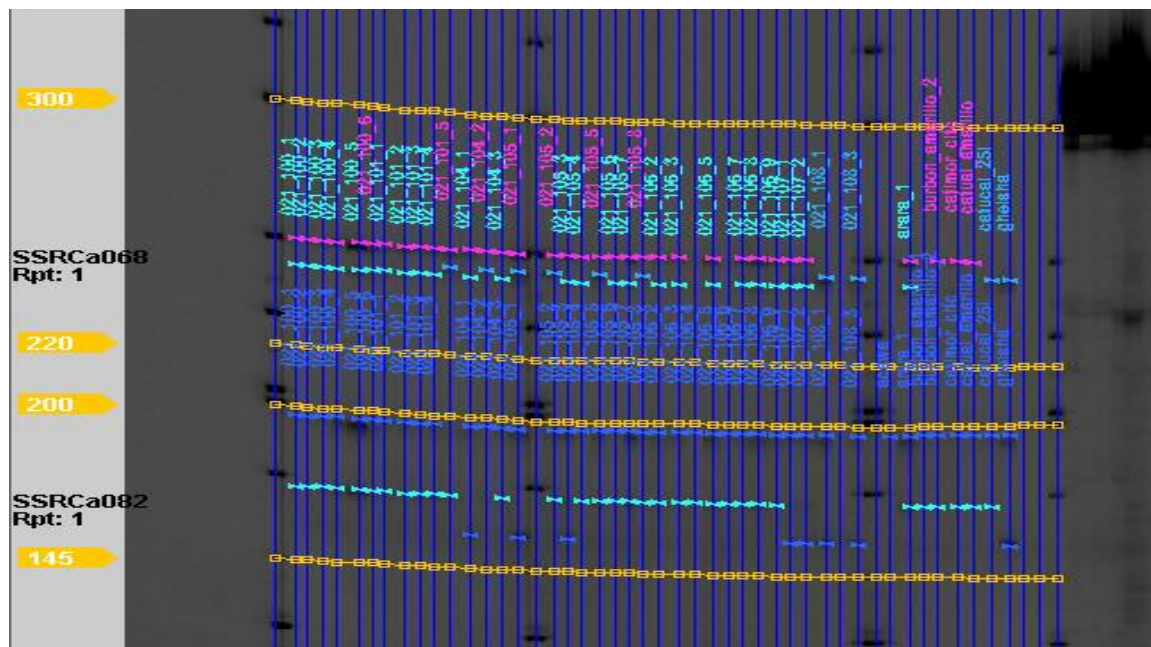
DÚPLEX: SSRCa016 / SSRCa026



DÚPLEX: SSRCa052 / SSRCa062



DÚPLEX: SSRCa068 / SSRCa082



SSRCa088
Rpt: 1

021-108-1

027-188-3

029-189-23

021-109-45

021-109-38

1 + B1B1B
1 + B1B1B

1-800-818181

burbon_amba

Carbon

196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

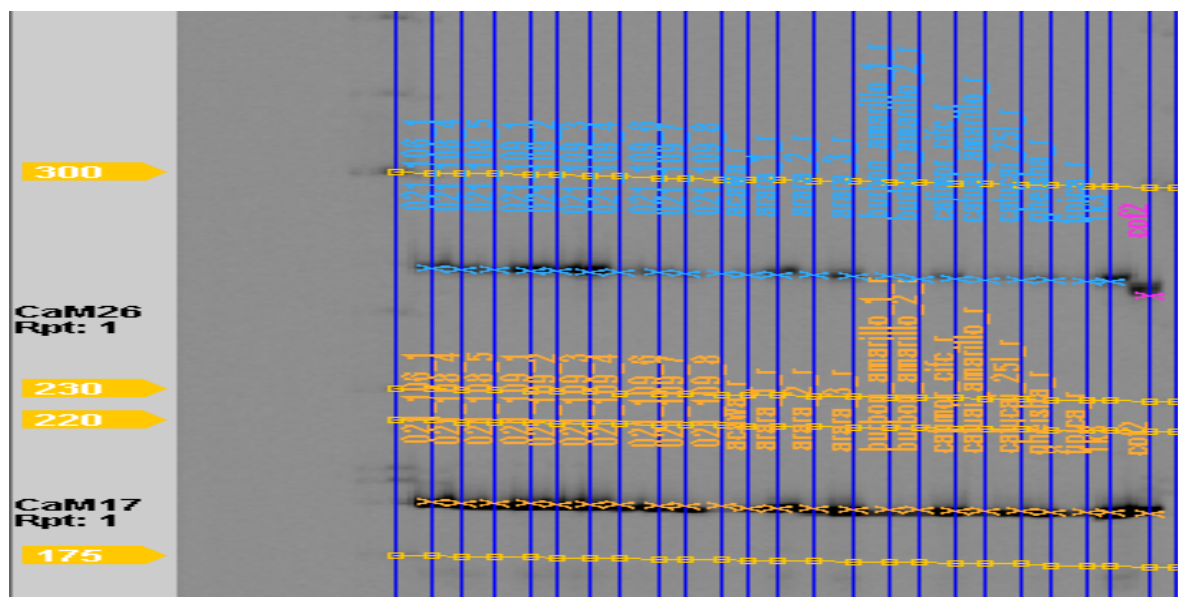
1. By the way, I'm not a fan of the "I'm not a doctor" disclaimer. It's a bit redundant, and it's a bit of a cliché. I think it's better to just say "I'm not a doctor" and move on.

1039-1-1039-1

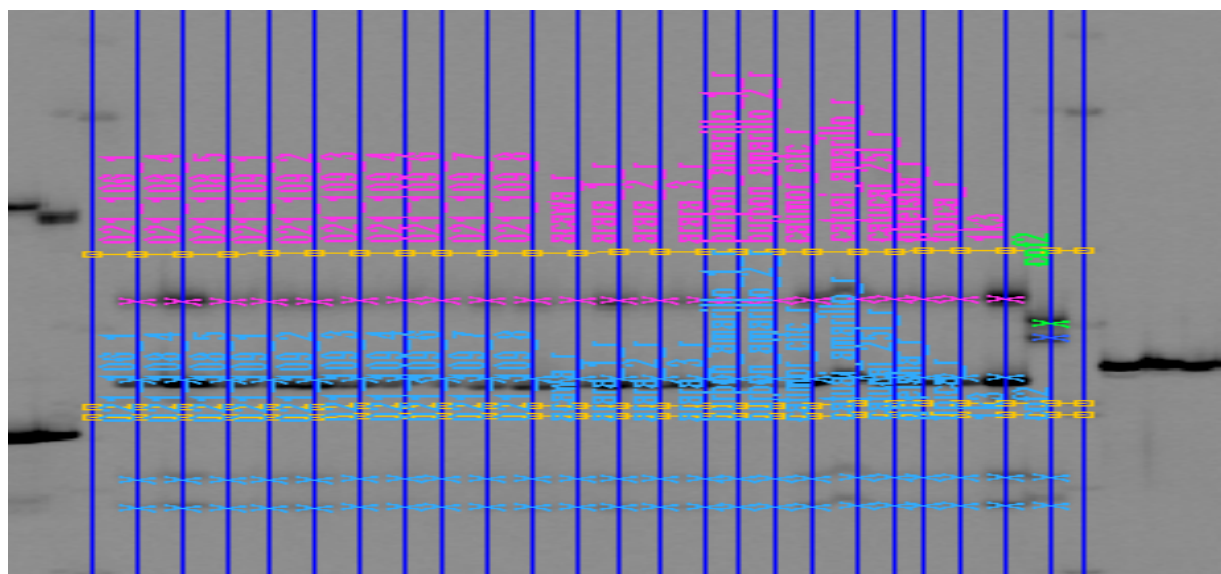
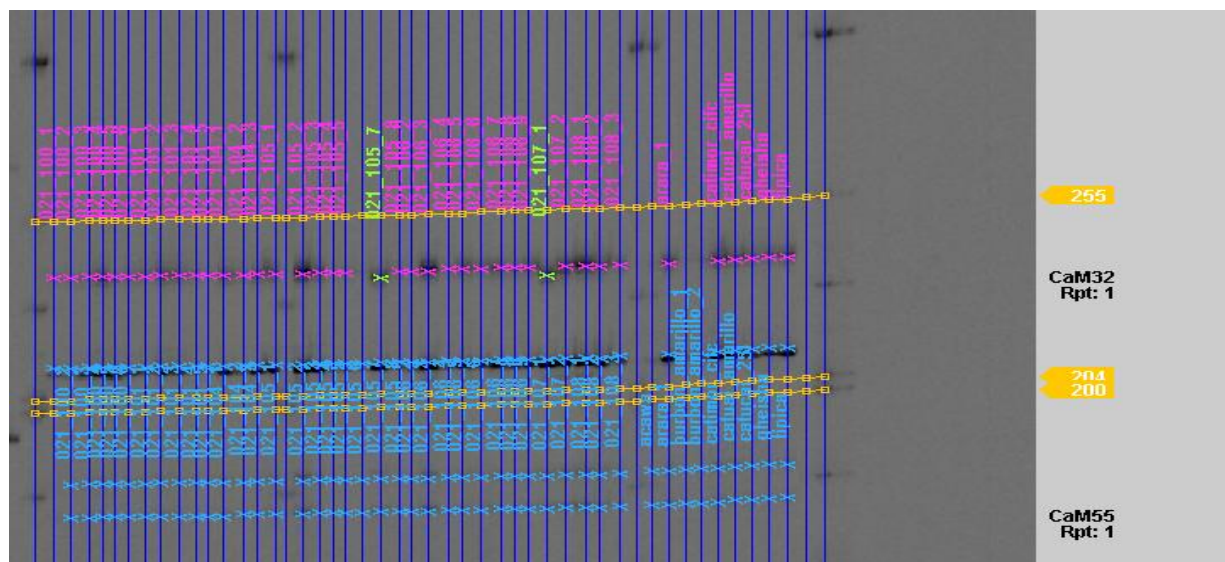
ACCEPTED MANUSCRIPT

1000

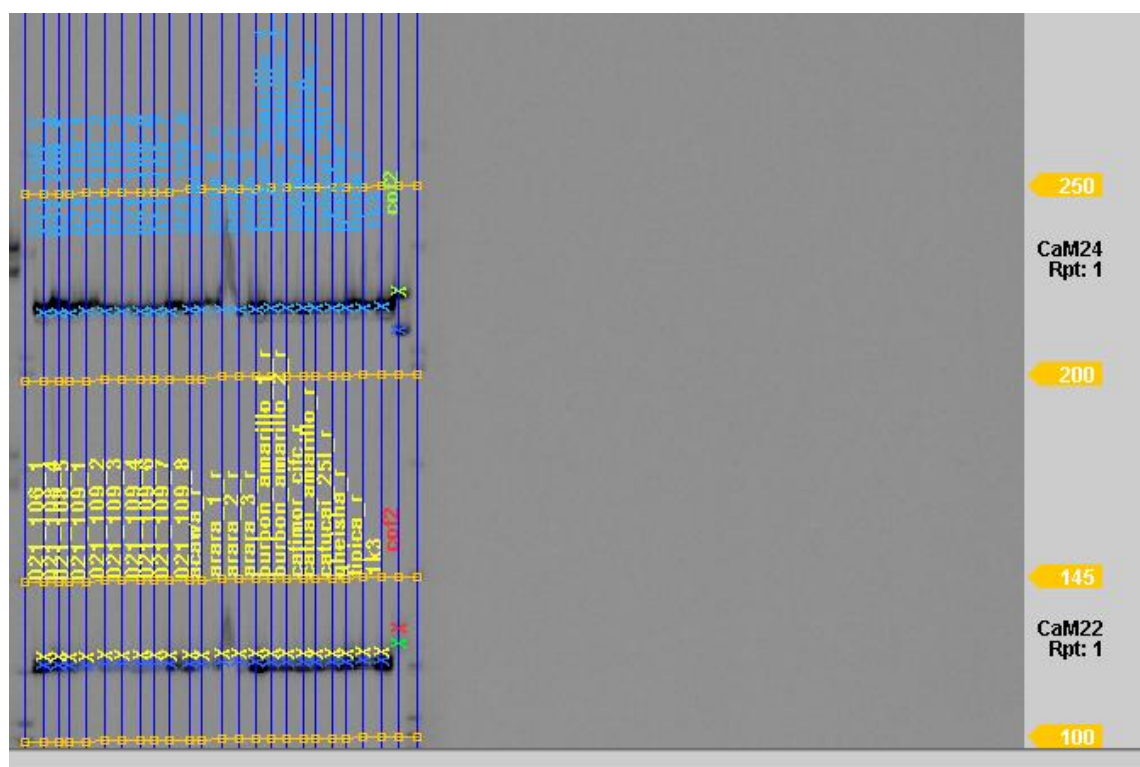
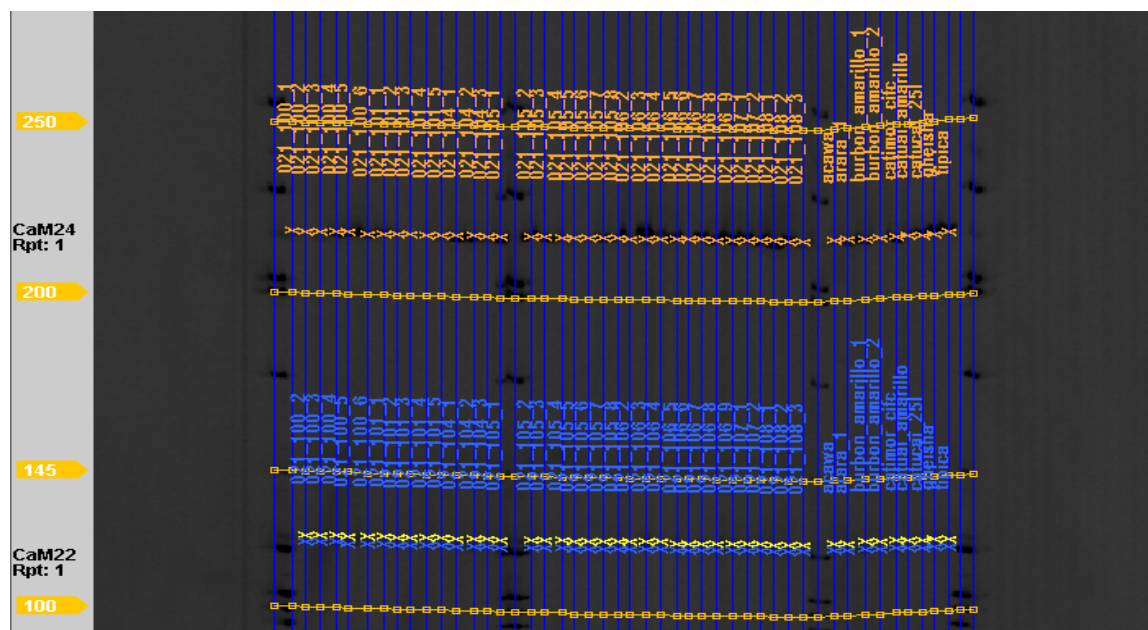
Estación Experimental Santa Catalina
Dirección: Panamericana Sur Km 1, sector Cutuglagua,
 cantón Mejía, Pichincha.
Teléfono: +593 - 3076002
www.iniap.gob.ec

[illegible]

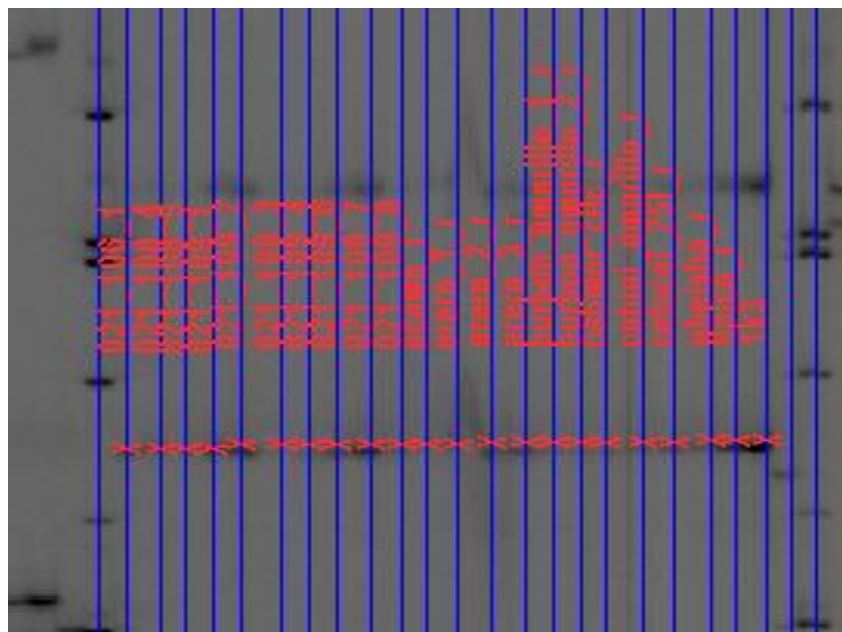
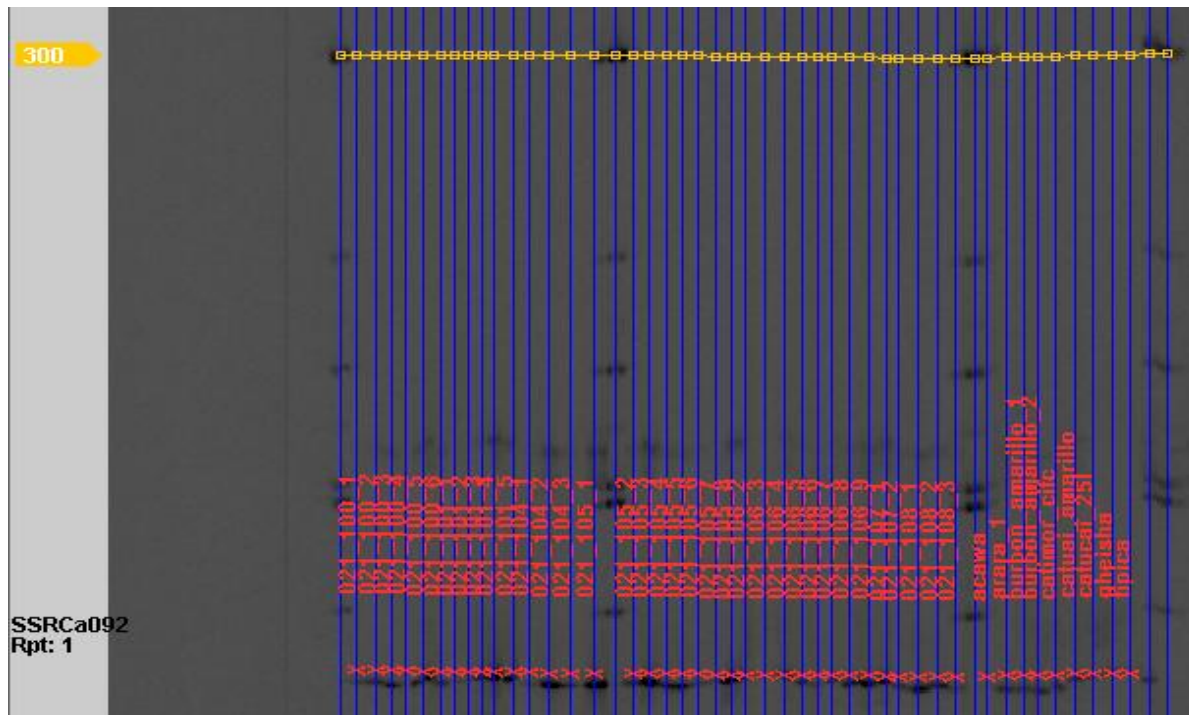
DÚPLEX: CaM32/ CaM55



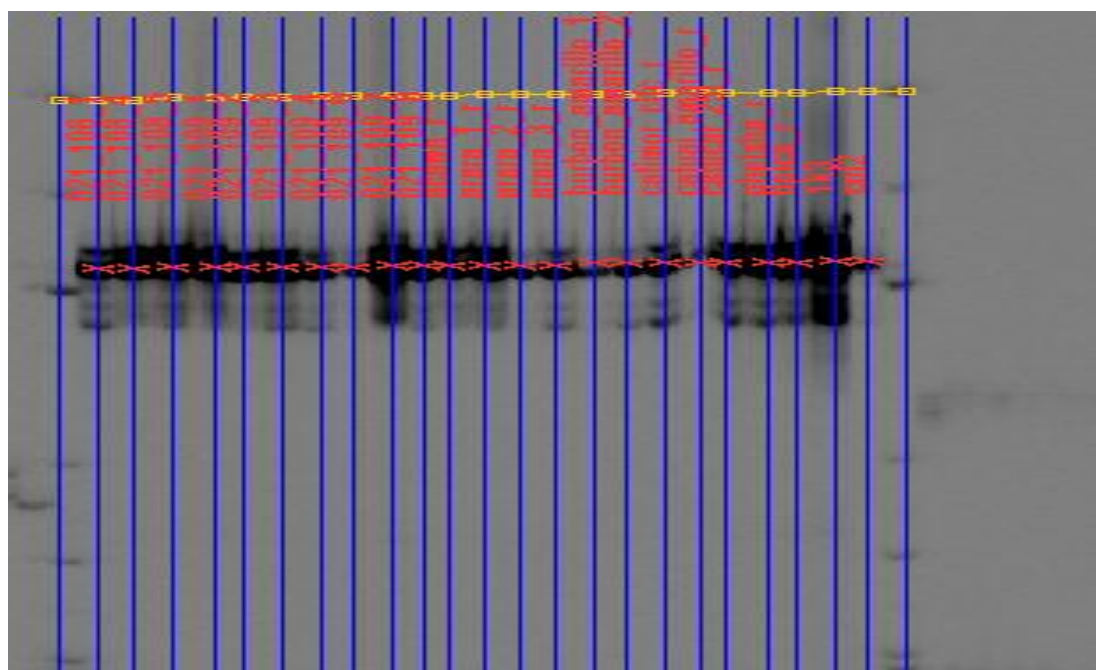
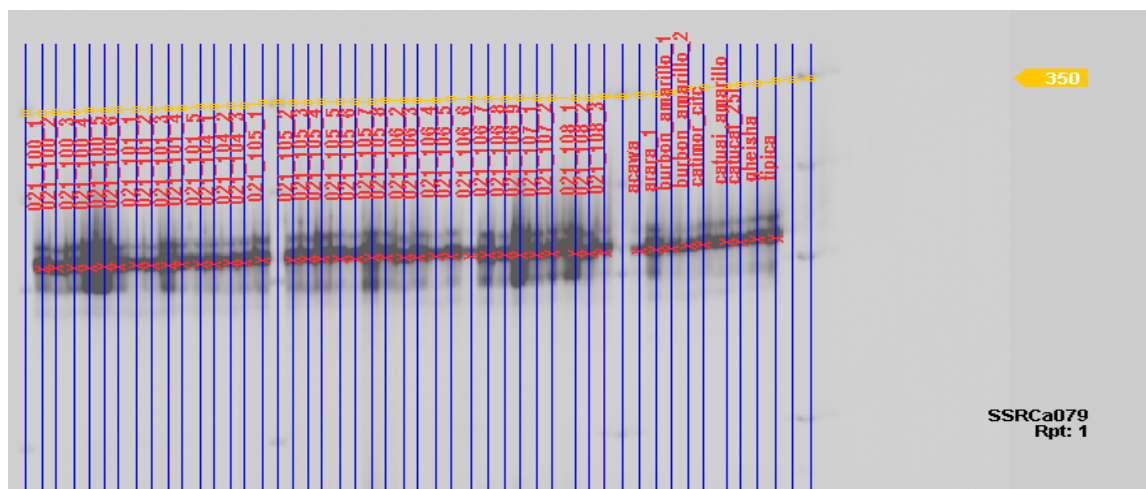
DÚPLEX: CaM22/ CaM24



SSRCa092



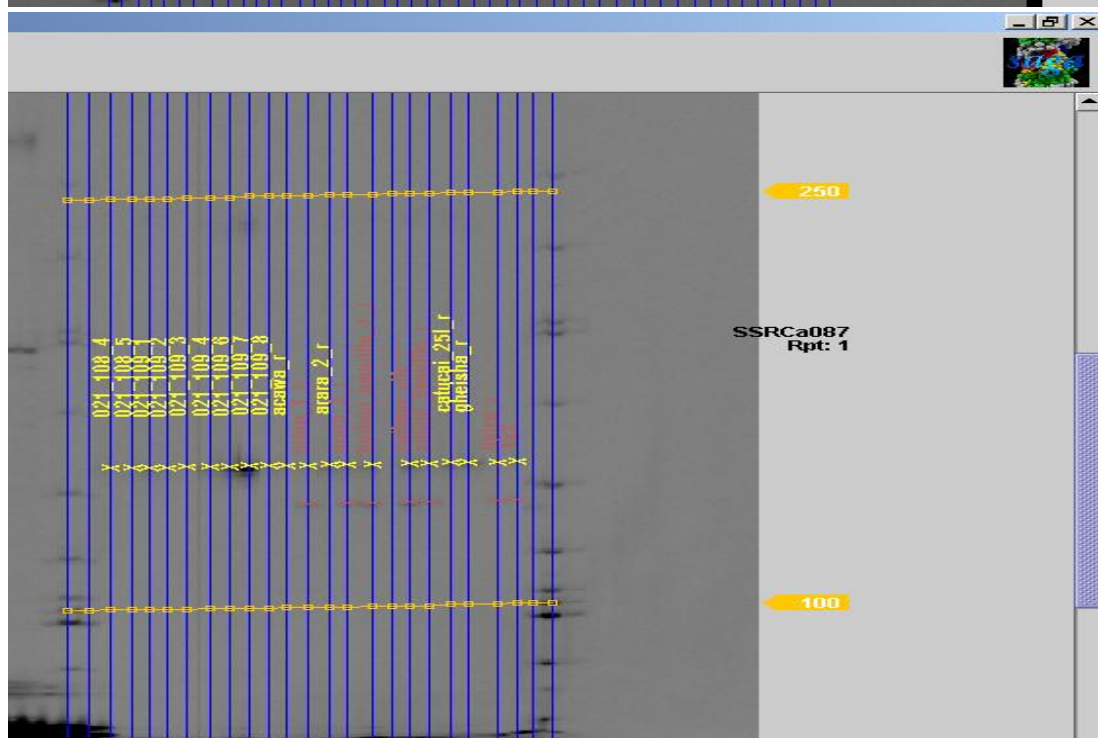
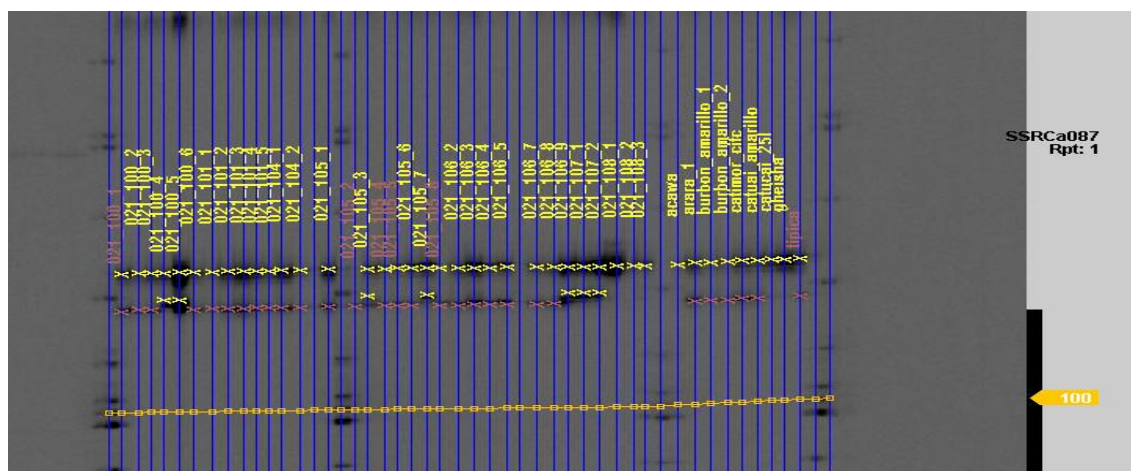
SSRCa079



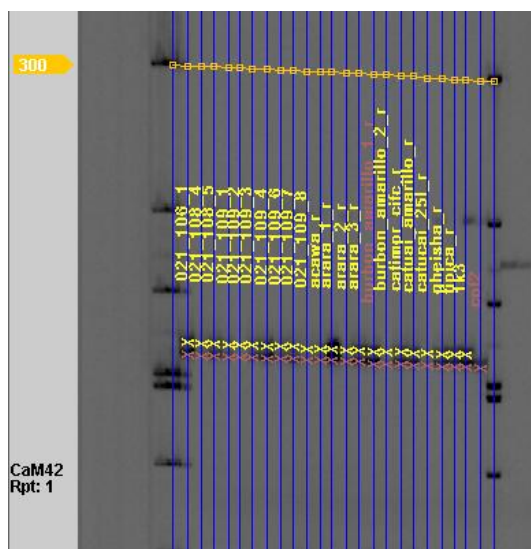
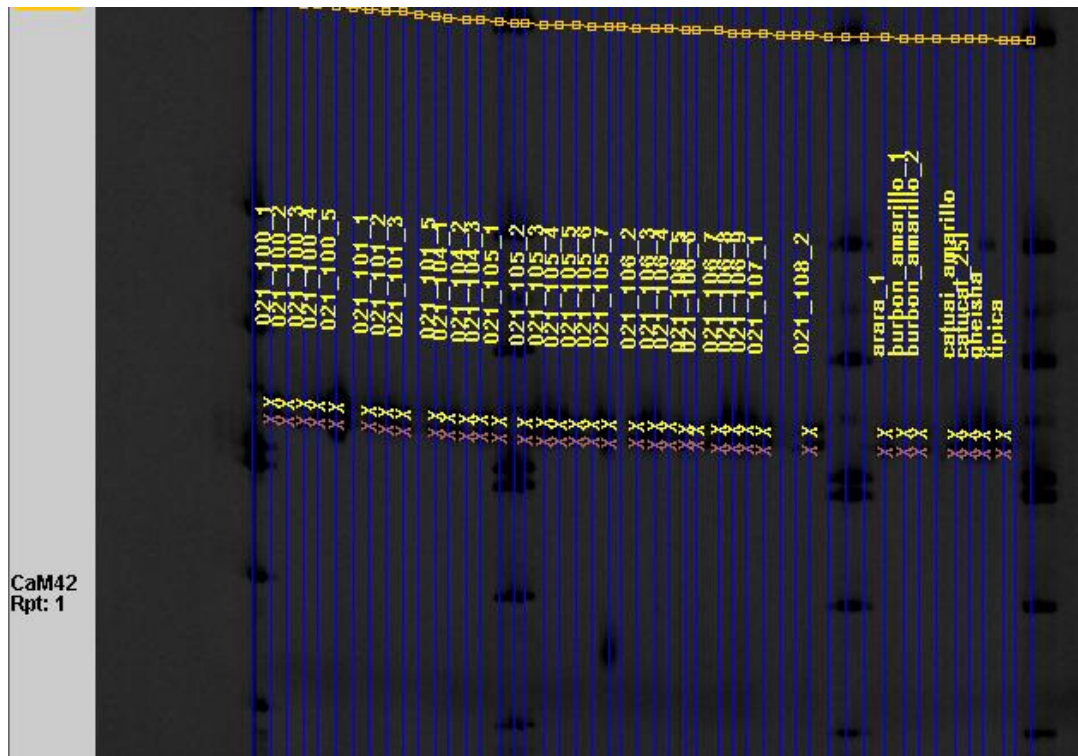
CaM16
Rpt: 1

CaM16
Rpt: 1

SSRCa087

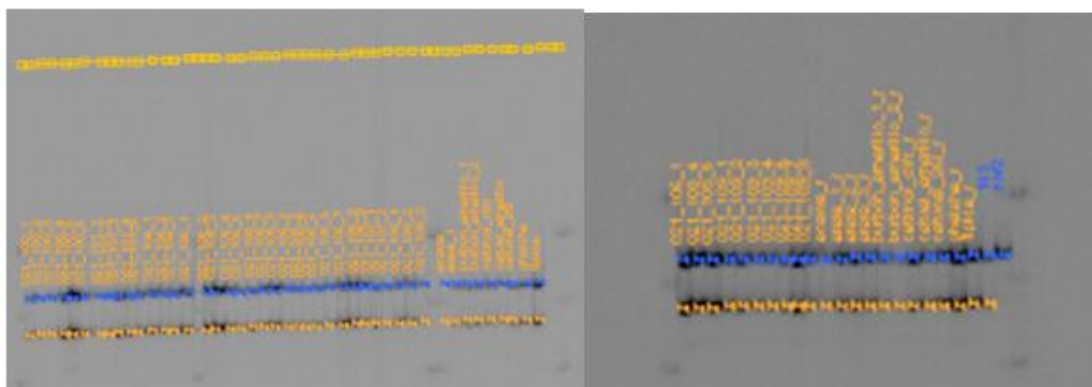


CAM 42

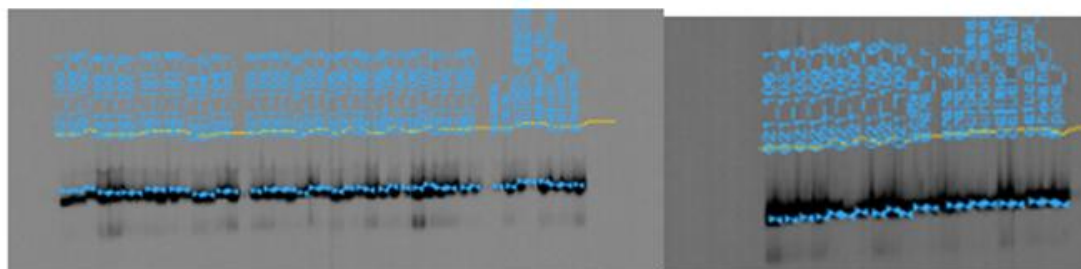


[illegible]

BA-48-21O-f



BA-124-12K-f



Anexo 3. Matriz de datos del genotipaje de 55 muestras de café de la UNESUM con 27 marcadores

	SSR1	SSR2	SSR3	SSR4	SSR5	SSR6	SSR7	SSR8	SSR9	SSR10	SSR11	SSR12	SSR13	SSR14	SSR15	SSR16	SSR17	SSR18	SSR19	SSR20	SSR21	SSR22	SSR23	SSR24	SSR25	SSR26	SSR27	SSR28	SSR29	SSR30	SSR31	SSR32	SSR33	SSR34	SSR35	SSR36	SSR37	SSR38	SSR39	SSR40	SSR41	SSR42	SSR43	SSR44	SSR45	SSR46	SSR47	SSR48	SSR49	SSR50	SSR51	SSR52	SSR53	SSR54	SSR55	SSR56	SSR57	SSR58	SSR59	SSR60	SSR61	SSR62	SSR63	SSR64	SSR65	SSR66	SSR67	SSR68	SSR69	SSR70	SSR71	SSR72	SSR73	SSR74	SSR75	SSR76	SSR77	SSR78	SSR79	SSR80	SSR81	SSR82	SSR83	SSR84	SSR85	SSR86	SSR87	SSR88	SSR89	SSR90	SSR91	SSR92	SSR93	SSR94	SSR95	SSR96	SSR97	SSR98	SSR99	SSR100	SSR101	SSR102	SSR103	SSR104	SSR105	SSR106	SSR107	SSR108	SSR109	SSR110	SSR111	SSR112	SSR113	SSR114	SSR115	SSR116	SSR117	SSR118	SSR119	SSR120	SSR121	SSR122	SSR123	SSR124	SSR125	SSR126	SSR127	SSR128	SSR129	SSR130	SSR131	SSR132	SSR133	SSR134	SSR135	SSR136	SSR137	SSR138	SSR139	SSR140	SSR141	SSR142	SSR143	SSR144	SSR145	SSR146	SSR147	SSR148	SSR149	SSR150	SSR151	SSR152	SSR153	SSR154	SSR155	SSR156	SSR157	SSR158	SSR159	SSR160	SSR161	SSR162	SSR163	SSR164	SSR165	SSR166	SSR167	SSR168	SSR169	SSR170	SSR171	SSR172	SSR173	SSR174	SSR175	SSR176	SSR177	SSR178	SSR179	SSR180	SSR181	SSR182	SSR183	SSR184	SSR185	SSR186	SSR187	SSR188	SSR189	SSR190	SSR191	SSR192	SSR193	SSR194	SSR195	SSR196	SSR197	SSR198	SSR199	SSR200	SSR201	SSR202	SSR203	SSR204	SSR205	SSR206	SSR207	SSR208	SSR209	SSR210	SSR211	SSR212	SSR213	SSR214	SSR215	SSR216	SSR217	SSR218	SSR219	SSR220	SSR221	SSR222	SSR223	SSR224	SSR225	SSR226	SSR227	SSR228	SSR229	SSR230	SSR231	SSR232	SSR233	SSR234	SSR235	SSR236	SSR237	SSR238	SSR239	SSR240	SSR241	SSR242	SSR243	SSR244	SSR245	SSR246	SSR247	SSR248	SSR249	SSR250	SSR251	SSR252	SSR253	SSR254	SSR255	SSR256	SSR257	SSR258	SSR259	SSR260	SSR261	SSR262	SSR263	SSR264	SSR265	SSR266	SSR267	SSR268	SSR269	SSR270	SSR271	SSR272	SSR273	SSR274	SSR275	SSR276	SSR277	SSR278	SSR279	SSR280	SSR281	SSR282	SSR283	SSR284	SSR285	SSR286	SSR287	SSR288	SSR289	SSR290	SSR291	SSR292	SSR293	SSR294	SSR295	SSR296	SSR297	SSR298	SSR299	SSR300	SSR301	SSR302	SSR303	SSR304	SSR305	SSR306	SSR307	SSR308	SSR309	SSR310	SSR311	SSR312	SSR313	SSR314	SSR315	SSR316	SSR317	SSR318	SSR319	SSR320	SSR321	SSR322	SSR323	SSR324	SSR325	SSR326	SSR327	SSR328	SSR329	SSR330	SSR331	SSR332	SSR333	SSR334	SSR335	SSR336	SSR337	SSR338	SSR339	SSR340	SSR341	SSR342	SSR343	SSR344	SSR345	SSR346	SSR347	SSR348	SSR349	SSR350	SSR351	SSR352	SSR353	SSR354	SSR355	SSR356	SSR357	SSR358	SSR359	SSR360	SSR361	SSR362	SSR363	SSR364	SSR365	SSR366	SSR367	SSR368	SSR369	SSR370	SSR371	SSR372	SSR373	SSR374	SSR375	SSR376	SSR377	SSR378	SSR379	SSR380	SSR381	SSR382	SSR383	SSR384	SSR385	SSR386	SSR387	SSR388	SSR389	SSR390	SSR391	SSR392	SSR393	SSR394	SSR395	SSR396	SSR397	SSR398	SSR399	SSR400	SSR401	SSR402	SSR403	SSR404	SSR405	SSR406	SSR407	SSR408	SSR409	SSR410	SSR411	SSR412	SSR413	SSR414	SSR415	SSR416	SSR417	SSR418	SSR419	SSR420	SSR421	SSR422	SSR423	SSR424	SSR425	SSR426	SSR427	SSR428	SSR429	SSR430	SSR431	SSR432	SSR433	SSR434	SSR435	SSR436	SSR437	SSR438	SSR439	SSR440	SSR441	SSR442	SSR443	SSR444	SSR445	SSR446	SSR447	SSR448	SSR449	SSR450	SSR451	SSR452	SSR453	SSR454	SSR455	SSR456	SSR457	SSR458	SSR459	SSR460	SSR461	SSR462	SSR463	SSR464	SSR465	SSR466	SSR467	SSR468	SSR469	SSR470	SSR471	SSR472	SSR473	SSR474	SSR475	SSR476	SSR477	SSR478	SSR479	SSR480	SSR481	SSR482	SSR483	SSR484	SSR485	SSR486	SSR487	SSR488	SSR489	SSR490	SSR491	SSR492	SSR493	SSR494	SSR495	SSR496	SSR497	SSR498	SSR499	SSR500	SSR501	SSR502	SSR503	SSR504	SSR505	SSR506	SSR507	SSR508	SSR509	SSR510	SSR511	SSR512	SSR513	SSR514	SSR515	SSR516	SSR517	SSR518	SSR519	SSR520	SSR521	SSR522	SSR523	SSR524	SSR525	SSR526	SSR527	SSR528	SSR529	SSR530	SSR531	SSR532	SSR533	SSR534	SSR535	SSR536	SSR537	SSR538	SSR539	SSR540	SSR541	SSR542	SSR543	SSR544	SSR545	SSR546	SSR547	SSR548	SSR549	SSR550	SSR551	SSR552	SSR553	SSR554	SSR555	SSR556	SSR557	SSR558	SSR559	SSR560	SSR561	SSR562	SSR563	SSR564	SSR565	SSR566	SSR567	SSR568	SSR569	SSR570	SSR571	SSR572	SSR573	SSR574	SSR575	SSR576	SSR577	SSR578	SSR579	SSR580	SSR581	SSR582	SSR583	SSR584	SSR585	SSR586	SSR587	SSR588	SSR589	SSR590	SSR591	SSR592	SSR593	SSR594	SSR595	SSR596	SSR597	SSR598	SSR599	SSR600	SSR601	SSR602	SSR603	SSR604	SSR605	SSR606	SSR607	SSR608	SSR609	SSR610	SSR611	SSR612	SSR613	SSR614	SSR615	SSR616	SSR617	SSR618	SSR619	SSR620	SSR621	SSR622	SSR623	SSR624	SSR625	SSR626	SSR627	SSR628	SSR629	SSR630	SSR631	SSR632	SSR633	SSR634	SSR635	SSR636	SSR637	SSR638	SSR639	SSR640	SSR641	SSR642	SSR643	SSR644	SSR645	SSR646	SSR647	SSR648	SSR649	SSR650	SSR651	SSR652	SSR653	SSR654	SSR655	SSR656	SSR657	SSR658	SSR659	SSR660	SSR661	SSR662	SSR663	SSR664	SSR665	SSR666	SSR667	SSR668	SSR669	SSR670	SSR671	SSR672	SSR673	SSR674	SSR675	SSR676	SSR677	SSR678	SSR679	SSR680	SSR681	SSR682	SSR683	SSR684	SSR685	SSR686	SSR687	SSR688	SSR689	SSR690	SSR691	SSR692	SSR693	SSR694	SSR695	SSR696	SSR697	SSR698	SSR699	SSR700	SSR701	SSR702	SSR703	SSR704	SSR705	SSR706	SSR707	SSR708	SSR709	SSR710	SSR711	SSR712	SSR713	SSR714	SSR715	SSR716	SSR717	SSR718	SSR719	SSR720	SSR721	SSR722	SSR723	SSR724	SSR725	SSR726	SSR727	SSR728	SSR729	SSR730	SSR731	SSR732	SSR733	SSR734	SSR735	SSR736	SSR737	SSR738	SSR739	SSR740	SSR741	SSR742	SSR743	SSR744	SSR745	SSR746	SSR747	SSR748	SSR749	SSR750	SSR751	SSR752	SSR753	SSR754	SSR755	SSR756	SSR757	SSR758	SSR759	SSR760	SSR761	SSR762	SSR763	SSR764	SSR765	SSR766	SSR767	SSR768	SSR769	SSR770	SSR771	SSR772	SSR773	SSR774	SSR775	SSR776	SSR777	SSR778	SSR779	SSR780	SSR781	SSR782	SSR783	SSR784	SSR785	SSR786	SSR787	SSR788	SSR789	SSR790	SSR791	SSR792	SSR793	SSR794	SSR795	SSR796	SSR797	SSR798	SSR799	SSR800	SSR801	SSR802	SSR803	SSR804	SSR805	SSR806	SSR807	SSR808	SSR809	SSR810	SSR811	SSR812	SSR813	SSR814	SSR815	SSR816	SSR817	SSR818	SSR819	SSR820	SSR821	SSR822	SSR823	SSR824	SSR825	SSR826	SSR827	SSR828	SSR829	SSR830	SSR831	SSR832	SSR833	SSR834	SSR835	SSR836	SSR837	SSR838	SSR839	SSR840	SSR841	SSR842	SSR843	SSR844	SSR845	SSR846	SSR847	SSR848	SSR849	SSR850	SSR851	SSR852	SSR853	SSR854	SSR855	SSR856	SSR857	SSR858	SSR859	SSR860	SSR861	SSR862	SSR863	SSR864	SSR865	SSR866	SSR867	SSR868	SSR869	SSR870	SSR871	SSR872	SSR873	SSR874	SSR875	SSR876	SSR877	SSR878	SSR879	SSR880	SSR881	SSR882	SSR883	SSR884	SSR885	SSR886	SSR887	SSR888	SSR889	SSR890	SSR891	SSR892	SSR893	SSR894	SSR895	SSR896	SSR897	SSR898	SSR899	SSR900	SSR901	SSR902	SSR903	SSR904	SSR905	SSR906	SSR907	SSR908	SSR909	SSR910	SSR911	SSR912	SSR913	SSR914	SSR915	SSR916	SSR917	SSR918	SSR919	SSR920	SSR921	SSR922	SSR923	SSR924	SSR925	SSR926	SSR927	SSR928	SSR929	SSR930	SSR931	SSR932	SSR933	SSR934	SSR935	SSR936	SSR937	SSR938	SSR939	SSR940	SSR941	SSR942	SSR943	SSR944	SSR945	SSR946	SSR947	SSR948	SSR949	SSR950	SSR951	SSR952	SSR953	SSR954	SSR955	SSR956	SSR957	SSR958	SSR959	SSR960	SSR961	SSR962	SSR963	SSR964	SSR965	SSR966	SSR967	SSR968	SSR969	SSR970	SSR971	SSR972	SSR973	SSR974	SSR975	SSR976	SSR977	SSR978	SSR979	SSR980	SSR981	SSR982	SSR983	SSR984	SSR985	SSR986	SSR987	SSR988	SSR989	SSR990	SSR991	SSR992	SSR993	SSR994	SSR995	SSR996	SSR997	SSR998	SSR999	SSR1000	SSR1001	SSR1002	SSR1003	SSR1004	SSR1005	SSR1006	SSR1007	SSR1008	SSR1009	SSR1010	SSR1011	SSR1012	SSR1013	SSR1014	SSR1015	SSR1016	SSR1017	SSR1018	SSR1019	SSR1020	SSR1021	SSR1022	SSR1023	SSR1024	SSR1025	SSR1026	SSR1027	SSR1028	SSR1029	SSR1030	SSR1031	SSR1032	SSR1033	SSR1034	SSR1035	SSR1036	SSR1037	SSR1038	SSR1039	SSR1040	SSR1041	SSR1042	SSR1043	SSR1044	SSR1045	SSR1046	SSR1047	SSR1048	SSR1049	SSR1050	SSR1051	SSR1052	SSR1053	SSR1054	SSR1055	SSR1056	SSR1057	SSR1058	SSR1059	SSR1060	SSR1061	SSR1062	SSR1063	SSR1064	SSR1065	SSR1066	SSR1067	SSR1068	SSR1069	SSR1070	SSR1071	SSR1072	SSR1073	SSR1074	SSR1075	SSR1076	SSR1077	SSR1078	SSR1079	SSR1080	SSR1081	SSR1082	SSR1083	SSR1084	SSR1085	SSR1086	SSR1087	SSR1088	SSR1089	SSR1090	SSR1091	SSR1092	SSR1093	SSR1094	SSR1095	SSR1096	SSR1097	SSR1098	SSR1099	SSR1100	SSR1101	SSR1102	SSR1103	SSR1104	SSR1105	SSR1106	SSR1107	SSR1108	SSR1109	SSR1110	SSR1111	SSR1112	SSR1113	SSR1114	SSR1115	SSR1116	SSR1117	SSR1118	SSR1119	SSR1120	SSR1121	SSR1122	SSR1123	SSR1124	SSR1125	SSR1126	SSR1127	SSR1128	SSR1129	SSR1130	SSR1131	SSR1132	SSR1133	SSR1134	SSR1135	SSR1136	SSR1137	SSR1138	SSR1139	SSR1140	SSR1141	SSR1142	SSR1143	SSR1144	SSR1145	SSR1146	SSR1147	SSR1148	SSR1149	SSR1150	SSR1151	SSR1152	SSR1153	SSR1154	SSR1155	SSR1156	SSR1157	SSR1158	SSR1159	SSR1160	SSR1161	SSR1162	SSR1163	SSR1164	SSR1165	SSR1166	SSR1167	SSR1168	SSR1169	SSR1170	SSR1171	SSR1172	SSR1173	SSR1174	SSR1175	SSR1176	SSR1177	SSR1178	SSR1179	SSR1180	SSR1181	SSR1182	SSR1183	SSR1184	SSR1185	SSR1186	SSR1187	SSR1188	SSR1189	SSR1190	SSR1191	SSR1192	SSR1193	SSR1194	SSR1195	SSR1196	SSR1197	SSR1198	SSR1199	SSR1200	SSR1201	SSR1202	SSR1203	SSR1204	SSR1205
--	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------