

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE LA COLECCIÓN COLOMBIANA DE LULO (*Solanum
quitoense* LAM) Y SEIS ESPECIES RELACIONADAS DE LA SECCIÓN
LASIOCARPA**

PAOLA ANDREA FORY SANCHEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
SEDE PALMIRA**

2005

**CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE LA COLECCIÓN COLOMBIANA DE LULO (*Solanum
quitoense* LAM) Y SEIS ESPECIES RELACIONADAS DE LA SECCIÓN
LASIOCARPA**

PAOLA ANDREA FORY SANCHEZ

Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster
en Ciencias, área de énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales

Director: **Inés Sánchez, Ph.D.**
CIAT-CORPOICA

Director Asociado: **Hernando Ramírez, Ph.D.**
Universidad Nacional de Palmira

Asesora: **Adriana Bohórquez**
Asistente de Investigación, CIAT

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
SEDE PALMIRA**

2005

“ La facultad y los jurados de tesis, no se hacen responsables de las ideas emitidas por el autor de la misma Artículo 24, Resolución 04, de 1974.

A mi madre, hermana y
abuelita por que son
lo que más quiero en
este mundo.

A mi padre por que sé
que desde el cielo
siempre he tenido su
apoyo.

Y a ese gran amor que
perdi por mis errores.

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Ines Sánchez por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Además por todo su apoyo, enseñanzas y formación.

Al Dr. Herando Ramírez por todo su colaboración en la revisión de este documento y ayudarme al máximo en la culminación del mismo.

Al Dr Mario Lobo y Clara Medina por todo su apoyo, enseñanzas y amabilidad que tuvieron conmigo.

Al Dr Joe Thome por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología.

A Adriana Bohórquez por todo su apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo y por ser aquella persona que siempre quiso lo mejor para mí (algo así como su hermanita).

A mi hermana (Nanda) por ser un ejemplo excepcional para mi vida en general.

Myriam Duque, Juan Mejía y a Jasón Rauscher por todo su aporte en la parte estadística.

A Diego por que siempre estuvo conmigo colaborandome al máximo y por todo el amor que recibí.

Al CIAT por darme la oportunidad de realizar mi tesis en sus instalaciones y por todo el apoyo logístico y humano que recibí.

Y a COLCIENCIAS por su apoyo financiero.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2. 1 Generalidades.....	5
2. 2 Origen y Distribución.....	5
2. 3 Descripción Taxonómica	8
2. 4 Descripción Botánica.....	9
2. 4 1 Biología Floral y Sistema Reproductivo.....	11
2. 4. 2 Citogenética.....	13
2. 5 Domesticación del Lulo.....	13
2. 6 Métodos de Propagación.....	14
2. 7 Plagas y Enfermedades.....	15
2. 8 Mejoramiento Genético en Lulo.....	17
2. 9 Estudios de Caracterización	19
2. 10 Caracterización Molecular mediante AFLP.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. OBJETIVOS	26

	Página
4. 1. Objetivo General.....	26
4. 2 Objetivos Específicos.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5. 1 Material Biológico.....	27
5. 2 Análisis Molecular.....	29
5. 2. 1 Extracción de ADN.....	29
5. 2. 2 Técnica de AFLP.....	30
5. 2. 2. 1 Digestión de ADN	30
5. 2. 2. 2 Ligación de adaptadores.....	31
5. 2. 2. 3 Amplificación selectiva (+1/+1)	32
5. 2. 2. 4 Amplificación selectiva (+3/+3)	34
5. 2. 2. 4 Selección de combinaciones.....	35
5. 2. 3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	35
5.2. 4 Tinción y revelado en geles de poliacrilamida.....	36
5. 3 Análisis Estadístico.....	37
5. 3. 1 Análisis de Similaridad.....	38
5. 4 Análisis de neighbor-joining	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Extracción y digestión del ADN.....	40
6.2 Marcadores Moleculares AFLP.....	41
6.3 Análisis de Similaridad.....	42
6. 3. 1 Variabilidad Intraespecífica	45

	Página
6. 3. 1 Análisis de los Agrupamientos.....	46
6. 3. 2 Variabilidad genética de la Colección Colombiana de Lulo.....	55
6. 4 Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)	57
6. 5 Análisis de neighbor-joining	60
7. CONCLUSIONES.....	65
8. PERSPECTIVAS	67
9. BLIBLIOGRAFÍA.....	.69
10 ANEXOS.....	74
11. LISTA DE ABREVIATURAS	78

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Area cosechada, producción y rendimiento del cultivo de lulo en Colombia	7
Tabla 2. Acciones y especies de lulo utilizadas en este estudio, provenientes de Centro de Investigación Corpoica, La Selva, en Rionegro, Antioquia.....	28
Tabla 3. Mezcla de reacción de la digestión del ADN.....	31
Tabla 4. Mezcla de reacción de la digestión/ligación.....	32
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación selectiva (+1/+1) de los productos de digestión/ligación.....	33
Tabla 6. Mezcla de reacción "Mix 1" para PCR (+3/+3).....	34
Tabla 7. Mezcla de reacción "Mix 2" para PCR (+3/+3).....	35
Tabla 8. Grupos obtenidos a un nivel de 0.55% en un dendograma de similaridad de Nei-Li (1978), utilizando el método de UPGMA con dos combinaciones para AFLP E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CTC.	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfología del cultivo de lulo. a) hoja; b) flor; c) fruto; d)corteza y pulpa.....	10
Figura 2. Daño producido en la raíz de lulo por el nemátodo <i>M. incognita</i>	17
Figura 3 Area de distribución de los materiales evaluados de la Colección Colombiana de lulo.	28
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de la extracción de ADN de algunas accesiones de lulo estudiadas.	40
Figura 5. Detalle de un gel de poliacrilamida mostrando patrones de bandas de Aflp (combinación de cebadores E-ACG/M-CAT), de algunas accesiones de lulo estudiadas. El marcador de peso molecular (M) corresponde a DNA ladder 10 pb (330 a 30 pb).....	41
Figura 6. Dendrograma de similaridad utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li (1979) producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP's. E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CT, empleando todas las accesiones de lulo estudiadas.....	43
Figura 7. Fragmento del Dendrograma de similaridad para <i>S pseudolulo</i> utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li (1979) producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.....	50
Figura 8. Fragmento del Dendrograma de similaridad para <i>S hirtum</i> utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li (1979) producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.,,.....	51
Figura 9 Fragmento del Dendrograma de similaridad para <i>S vestissimun</i> utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li (1979) producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.....	52
Figura 10 Fragmento del Dendrograma de similaridad para <i>S quitoense</i> utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li (1979) producto del	

análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.....53

Figura 11. Fragmento del Dendrograma de similaridad para algunas especies del género *solanum* empleadas como grupo de comparación, utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP..55

Figura 12. Gráfico tridimensional derivado del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de todas las accesiones evaluadas en este estudio (Vista frontal).....58

Figura 13. Gráfico tridimensional derivado del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de todas las accesiones evaluadas en este estudio (Vista desde arriba).....59

Figura 14. Dendrograma de similaridad construido mediante el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li, (1979) disponible en el PAUP 4.0. Los valores de 1000 réplicas del "bootstrap" están representados sobre las ramas.....61

RESUMEN

El Banco de germoplasma del Estado, custodiada por Corpoica, en Rionegro (Antioquía) conserva una colección de lulo (*Solanum quitoense* LAM) y especies relacionadas de la sección Lasiocarpa. En este trabajo se consideró esencial realizar un análisis de la diversidad genética a nivel molecular con AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) con 159 accesiones de lulo conservadas en el Banco. De las 30 combinaciones de oligonucleótidos evaluadas, se seleccionaron dos E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CTC, por su alto nivel de polimorfismo con un total de 206 y 170 bandas polimórficas respectivamente. El dendograma obtenido con el análisis de similaridad de Nei-Li (1979), mostró 11 agrupamientos. La mayoría de las accesiones observadas en las especies silvestres (*S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vesstissimun*, *S. pectinatum* y *S. stramonifolium*), mostraron índices de similaridad entre 75 y 98%; las especies cultivadas (*S. quitoense* y *S. sessiliflorum*); presentan índices de similaridad entre 84-100%. Con el coeficiente de similaridad analizado, se separaron las especies andinas (*S. quitoense*, *S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vesstissimun* y *S. pectinatum*) de las especies Amazónicas (*S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum*) de la sección Lasiocarpa. Al Interior de cada especie no hubo una separación clara por origen geográfico. El análisis de correspondencia múltiple corroboró lo observado en el análisis de similaridad. Para este estudio, tres dimensiones fueron suficientes para explicar la mayor parte de la variación entre las accesiones estudiadas. El análisis neighbor-joining" a través del algoritmo "vecino más próximo" ("neighbor-joining"), mostró valores de "bootstrap" (análisis de remuestreo) de 100%, lo que indica que el soporte de cada rama para las especies de la sección Lasiocarpa incluidas en este estudio se encuentra bien representado.

ABSTRACT

The Colombian National Genebank – managed by Corpoica and based in Rionegro, Antioquía – contains a collection of “lulo” (*Solanum quitoense* LAM) and other related species from the *Lasiocarpa* section. The objective of this investigation implied the molecular study of the genetic diversity of 159 accessions from this collection through the use AFLP analysis. Two primer combinations, E-ACG/M-CAT (with 206 polymorphic bands) and E-ACG-M-CTC (with 170 polymorphic bands), were chosen out of 30 evaluated combinations based on their high expression levels of polymorphism. The dendrogram obtained through the Nei-li (1979) similarity analysis produced 11 clusters. The majority of the wild accessions (*S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vesstissimun*, *S. pectinatum* y *S. stramonifolium*), presented similarity coefficients ranging from 75-98%, while the cultivated species (*S. quitoense* y *S. sessiliflorum*), showed similarity indexes established between 84-100%. Within each species, intra-specific separation could not be detected with regards to the geographic origin of the accession. An analysis of multiple correspondences, where three dimensions were sufficient to explain the genetic variation between clusters, confirmed the results observed through the similarity index analysis. The neighbor-joining analysis presented “bootstrap” values of 100%; a result that clearly indicates that the support of each cluster for the studied species is well represented.

INTRODUCCIÓN

Los recursos genéticos constituyen la base biológica para la seguridad alimentarla mundial y están formados por la diversidad del material genético que contienen las variedades tradicionales y los cultivares modernos, así como por las plantas silvestres afines a las cultivadas. Estos recursos son la materia prima más importante para la generación de nuevas variedades y el mayor aporte para la producción y la diversidad genética que emplean los agricultores. También conforman un depósito de adaptabilidad y estabilidad genética que sirve de salvaguardia ante el peligro potencial representado por los cambios medioambientales y económicos, y los patógenos, insectos y otras plagas nuevas o sus biotipos (FAO, 1996).

En Colombia, con la creación de Corpoica en 1993 se comenzó a implementar el Sistema Nacional de Bancos de Germoplasma en la cual se desarrollan actividades como regeneración e incremento de colecciones, mantenimiento de las mismas por diferentes sistemas de conservación (mediano y largo plazo), descripción básica de los materiales almacenados, documentación de inventarios y de valoración agregada por procesos de caracterización y premejoramiento varietal.

La mayor colección *ex situ* Colombiana de lulo (*S. quitoense*) y de especies relacionadas de la sección Lasiocarpa, se encuentra en el Banco de Germoplasma del Estado, custodiada por Corpoica, en el Centro Experimental “La Selva”, en Rionegro, Antioquia. Esta colección está siendo caracterizada con base en caracteres morfo-agronómicos (arquitectura de la planta, presencia o ausencia de pubescencia y espinas). Sin desconocer la importancia de estos marcadores, es necesario complementar su información con marcadores de tipo molecular que a diferencia de los morfoagronómicos no son influenciados por el ambiente (Morell *et al.*, 1995). Uno de los marcadores moleculares más utilizados para solucionar este tipo de problemas, son los AFLP (Vos *et al.*, 1995). Los cuales presentan algunas ventajas sobre otros marcadores moleculares como los RFLP`s, los RAPD`s, los SSRs o microsatélites, debido a que esta técnica permite evaluar un gran número de loci a la vez, permitiendo un alto cubrimiento del genoma, sin requerir el conocimiento previo de la secuencia de ADN. (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Desde su desarrollo y divulgación, los AFLP, han sido ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética en varias especies de la familia Solanaceae (*Solanum tuberosum* L. (papa), *Capsicum frutescens* L. (pimentón) y *Capsicum annum* L. (ají)) (Christian *et al.*, 1996; Saliba-Colombani *et al.*, 2000; Rodríguez, 2000; Acquadro *et al.*, 2002; Lanteri *et al.*, 2003 y Toquica *et al.*, 2003).

El estudio de la diversidad genética basada en los marcadores moleculares AFLP de la colección de lulo y especies relacionadas, será de gran ayuda para establecer estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, para esclarecer relaciones

filogenéticas y taxonómicas actualmente existentes y para dar soporte a programas de mejoramiento genético de lulo.

2. MARCO TEÓRICO

2. 1 Generalidades

S. quitoense conocido también, con el nombre de "naranjilla de quito" en el Ecuador, "Morella de quito" en el Perú y "Lulo" en Colombia (Morton, 1987); es una planta arbustiva que produce frutos de pulpa verde, ricos en minerales y vitamina C (Denis *et al.*, 1985). Debido a su valor nutritivo, sabor, color y usos en la agroindustria, el lulo es una de las frutas tropicales más apetecidas (fruta fresca, pulpa congelada) en los mercados nacionales e internacionales, con amplias perspectivas para la exportación a los mercados del Japón, Estados Unidos y Comunidad Europea (Lobo y Medina, 1999).

2. 2 Origen y Distribución

S. quitoense pertenece a la familia Solanaceae. Es originario de los bosques húmedos del subtrópico, en las vertientes oriental y occidental de la cordillera de los Andes entre 1.200 y 2.500 m.s.n.m, pertenecientes a Perú, Ecuador y Colombia (Lobo *et al.*, 1983; Heiser, 1985; Heiser & Anderson, 1999). También se encuentra en forma silvestre en Venezuela, Brasil, Costa Rica, Mesoamérica,

Polinesia y en algunos países asiáticos como China y Borneo (Whalen *et al.*, 1981). Fuera de las zonas similares a las del lugar de origen, el lulo es de difícil adaptación. En Norte América, por ejemplo, la planta llega hasta la florescencia en forma normal; pero el polen es estéril (Duran, 1988).

El lulo (*S. quitoense*), se adapta a temperaturas comprendidas entre 11 y 20°C, crece entre los 500 y los 2.500 m.s.n.m, desarrollándose en forma óptima entre los 1.800 y 2.500 m.s.n.m. La precipitación adecuada entre 1.500 y 3.000 mm anuales, requiere de alta humedad relativa cerca al 80% y de poca luminosidad, especialmente zonas de penumbra o sombreadas, de días cortos, a esta característica se le atribuye la infertilidad del polen en zonas templadas. *S. quitoense* variedad *quitoense* (sin espinas) se desarrolla mejor en alturas por debajo de los 2.000 m.s.n.m y el *S. quitoense* variedad *septentrional* (con espinas) se desarrolla bien en alturas superiores a los 2.000 m.s.n.m (Heiser & Anderson, 1999; Lobo y Medina, 2000).

En Colombia el cultivo de lulo se encuentra ampliamente distribuido en varias regiones del país. Según cifras del Ministerio de la Agricultura y Desarrollo Rural en 1998, el área cosechada fue de 4.868 hectáreas en 20 departamentos, de los cuales los más representativos se muestra en la tabla 1. No obstante, hay zonas en el país en donde el cultivo de lulo prácticamente ha desaparecido, debido a problemas fitosanitarios importantes causados por el pasador del fruto

(*Neoleucinodes elegantalis*), el moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.) y el nemátodo del nudo (*Meloidogyne incógnita* Kofoid & White),

Tabla 1. Área cosechada, producción y rendimiento del cultivo de lulo en Colombia.

Departamento	Cosechada Ha	Producción Ton	Rendimiento Ton/ha
Huila	1,634	13,868	8.49
Valle del Cauca	646	3,824	5.92
Cauca	380	2,496	6.57
Caquetá	357	2,664	7.46
Nariño	273	1,636	5.99
Tolima	235	2,100	8.94
Cesar	220	1,525	6.93
Magdalena	225	1,081	4.80

o por razones de orden público como es el caso de Frontino y Dabeiba en Antioquia

En 1999, Colombia produjo 32.000 toneladas de fruta en 4.042 hectáreas que le representaron \$62.400 millones de pesos al productor en finca. Los costos de producción para una hectárea de lulo y una duración de 2 años, son de \$4.6 millones de pesos. Un kilo de lulo cuesta actualmente en el supermercado \$3.900 pesos y un kilo de puré o pulpa congelada de lulo colombiano costaba en Nueva York en 1997 \$ 3.30 dólares en contraste con \$1.36 dólares por el kilo de lulo ecuatoriano de menor calidad. A Estados Unidos entran anualmente unas 60 toneladas de lulo congelado a un precio que oscila entre \$2.20 y 3.30 dólares por

kilo. Los principales competidores de Colombia son Ecuador y Venezuela (Siesa, 2000).

2. 3 Descripción Taxonómica

La familia Solanaceae tiene 70 géneros y 2700 especies, la mayoría distribuidas a través de climas cálidos del Neotrópico. Se conocen 27 especies pertenecientes a siete géneros que tienen valor hortofrutícola, distribuidas en las regiones tropicales de América, África, Asia y Oceanía. El género *Solanum* es el más grande y extensamente distribuido de esta familia con 1.200 especies (Siesa, 2000).

De acuerdo con Whalen *et al.*, (1981), la sección *Lasiocarpa* comprende 13 especies: *Solanum candium* (Lindl); *Solanum felinum* (Whalen); *Solanum hirtum* (Vahl); *Solanum hyporhodium* (A. Braun y G Bouché); *Solanum lasiocarpum* (Dum); *Solanum pectinatum* (Dum); *Solanum pseudolulo* (Heiser); *S. quitoense* (Lam); *Solanum repandum* (Forst); *Solanum sessiliflorum* (Dum); *Solanum stramonifolium* (Jacq); *Solanum vestissimum* (Dum) y *Solanum stagnale* (Moric). Sin embargo, Heiser (1987) considera 12, debido a que las únicas especies de la sección *Lasiocarpa*, que se encuentran fuera del continente americano (*S. lasiocarpum* y *S. repandum*) corresponden a *Solanum ferox*.

Descripción taxonómica del lulo, Según Shulter & Cuatrecasas, 1958.

Reino:	Vegetal
Subreino:	Espermatofita
División :	Angiosperma
Subdivisión:	Dicotiledonea
Clase:	Semipétala
Subclase:	Pentacíclica
Orden:	Tubiflorales
Familia:	Solanaceae
Género :	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum quitoense</i>
Variedades botánicas	<i>quitoense</i> (tallos sin espinas) <i>septentrional</i> (tallos con espinas)

2. 4 Descripción Botánica

S. quitoense, puede llegar a alcanzar los 2.5 metros de altura, la corteza del tallo es de color gris. Las hojas están adheridas a las ramas por un peciolo pubescente y succulento, de aproximadamente 15 cm de largo, en la variedad *septentrional*, las nervaduras presentan espinas. Dependiendo de la temperatura las hojas pueden alcanzar hasta cerca de 1 metro de largo y 1 metro de ancho en su extensión, son de color verde oscuro con nervaduras de color púrpura en el haz y blancas o purpúreas en el envés (Figura 1a). Toda la planta excepto en el haz de las hojas, tiene pubescencia lanosa y todas sus partes son espinosas excepto las flores y el fruto. Las flores son de color blanco o lila claro, se agrupan en racimos en un peciolo corto que contiene hasta 10 flores justamente debajo y frente a las hojas (Figura 1b). El fruto es una baya globosa entre 4 y 6.5 cm de diámetro, cubierta de tricomas de color amarillo o en algunos casos marrones fáciles de desprender en

la cosecha (Figura 1c). La corteza del fruto es de color amarillo intenso cuando alcanza la madurez. La pulpa es de color verde oscuro, pegajosa, ácida con un pH entre 3.5 a 5.0 (Figura 1d). La planta tiene un ciclo biológico de tres a cuatro años en producción constante, iniciando fructificación a los 10-12 meses de edad, pudiéndose observar en una misma planta flores y frutos en diferentes tamaños y coloridos durante todo el año (Schulter y Cuatrecasas, 1958).

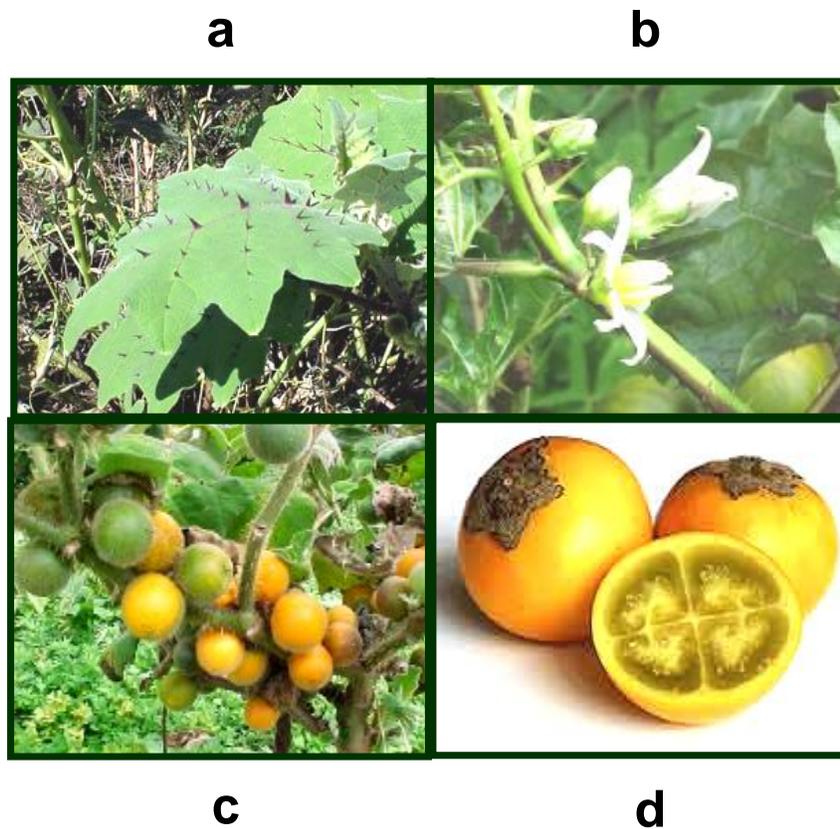


Figura 1. Morfología del cultivo de lulo. a) hoja; b) flor; c) fruto; d) corteza y pulpa.

2. 4. 1 Biología Floral y Sistema Reproductivo

La flor es pentámera porque tiene 5 pétalos y es perfecta por que sus partes son iguales (hermafrodita). El cáliz es gamosépalo, esta compuesto por 5 sépalos (más o menos la tercera parte en longitud de los pétalos), el cáliz alterna con los pétalos. El sépalo mide más o menos 2 cm de largo por 1 cm de ancho. El ápice del cáliz es agudo, los sépalos presentan pubescencias de color verde por el haz y lila por el envés. La cara superior del cáliz es verde amarillenta. Los pétalos son de color crema por el haz y morado por el envés y pubescentes (entre 2 y 3 cm de longitud y 1 a 2 cm de ancho). La parte apical de la corola presenta una ligera curvatura que asemeja a una cuchara. El androceo esta compuesto por 5 estambres de color amarillo, biseldados, con dehiscencia poricida y se encuentran alternados con los pétalos. El filamento del estambre y la antera son sésiles. El pistilo es de color amarillo, el ovario es de color amarillo, súpero con 4 lóculos, con múltiples rudimentos seminales, el estigma es verde, sostenido por un pistilo corto, medio o largo (brevistilia, isostilia y longistilia) y de color amarillo. El cojín floral puede tener hasta 30 flores y casi todas las flores del extremo del racimo son estériles debido al sistema sexual que presenta (andronoecia); el porcentaje de cuajamiento esta entre 16 y 20 % (Bernal et al., 1998).

En la familia Solanaceae, la andromonoecia la cual se define como un sistema sexual en la cual las plantas presentan conjuntamente flores hermafroditas y flores

femeninas estériles (de ahora en adelante flores estaminadas) en la misma planta,. Este sistema sexual es bien conocido en el subgénero *Leptostemonum*, se ha reportado en 13 de 22 secciones descritas (Whalen y Costich, 1986). Aunque todos los miembros del la sección *Lasiocarpa* son andromonoicos, el número de flores hermafroditas y flores estaminadas, varia considerablemente entre especies y dentro de la misma especie. Algunas especies caracterizadas como débilmente andromonoicas (por ejemplo, *S. hirtum* y *S. stramonifolium*), producen relativamente pocos flores estaminadas en contraste, con otras especies caracterizadas como fuertemente andromonoicas (por ejemplo, *S. quitoense* , *S. vestissimum*, *S. pectinatum* y *S. pseudolulo*), las cuales producen muchas flores estaminadas (Whalen *et al.* ,1981).

Miller & Diggle (2003, 2004), demostraron para 6 especies de la sección *Lasiocarpa* (*S.candidum*, *S. ferox*, *S. stramonifolium*, *S. pectinatum*, *S. pseudolulo* y *S. quitoense*) que la producción de las flores estaminadas es fenótipicamente plástica. Por lo tanto, la variación observada en la expresión de la andromonoecia entre las especies estudiadas puede ser el resultado de esta plasticidad. Igualmente demostraron que existe dimorfismo sexual entre las flores hermafroditas y las flores estaminadas, siendo de mayor tamaño las flores hermafroditas. Este hecho ha generado especulaciones acerca de la su función y quizás sus formas adaptativas. Anderson & Symon (1989), sugieren que las corolas más grandes de flores hermafroditas promueven la polinización cruzada (alógamas) de la especie, en contraste las flores estaminadas pueden representar

un ahorro del recurso substancial que se pueden invertir en la producción de la flor, crecimiento o mantenimiento vegetativo de la misma.

2. 4. 2 Citogenética

Todas las especies de la sección *Lasiocarpa* son diploides con un numero cromosómico de $2n=24$ (Bernardello *et al.*, 1994).

2. 5 Domesticación del Lulo

El lulo se encuentra en una etapa intermedia del proceso de domesticación. Lo anterior se fundamenta en el hecho de que la planta posee una serie de características correspondientes a individuos del complejo “maleza-silvestre” como son: Frutos con un elevado número de semillas, dispersión de semillas ineficiente, presencia de latencia en las semillas, antocianinas en diferentes órganos, espinas en tallos, pedúnculos, pecíolos y hojas, presencia de tricomas en los frutos y posición de las hojas hacia abajo para realizar mejor la fotosíntesis (Lobo y Medina, 1999; Lobo, 2000).

Heiser (1987), refiriéndose al proceso de domesticación, señala que *S. quitoense* fue introducido a Centro América y se ha establecido en Costa Rica. Posteriormente, Heiser (1993), indica que las plantas cultivadas actualmente

deben diferir poco de las encontradas por los españoles al llegar a América debido al poco trabajo de mejoramiento que se ha tenido con esta especie.

2. 6 Métodos de Propagación

La forma más común de multiplicación del cultivo de lulo es a través de semillas, también, se pueden propagar asexualmente mediante el empleo de estacas, técnica muy empleada por agricultores, la cual consiste en seleccionar estacas de 25 a 30 cm de longitud, que tengan 4 yemas, posteriormente se le quitan las hojas para evitar la transpiración para luego sembrarlas en camas de arena previamente tratadas. Sin embargo, este tipo de propagación presenta inconvenientes debido a que es muy susceptible a enfermedades fungosas (Morton, 1987). Una técnica alternativa para la propagación del lulo, es a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, utilizando meristemas. En Colombia esta técnica es utilizada en centros de investigación en la propagación de lulo, con mayores ventajas en comparación con los sistemas tradicionales de multiplicación, debido a que permiten un mayor control sobre la sanidad del material y por que han facilitado una rápida multiplicación masiva de este cultivo (Valencia y Fernández, 1998; Del Corral, 1998; Segovia, 2002).

2. 7 Plagas y Enfermedades

S. quitoense es afectado por diferentes plagas y enfermedades durante todas las etapas del desarrollo del cultivo. La incidencia de estos organismos esta influenciada en gran parte por el ambiente, esto implica estudios más complejos y específicos para cada condición climática (Tamayo, 2001; Carmona, 2003).

Entre las plagas más importantes que afectan el cultivo de lulo, se encuentran:

-El pasador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*) lepidóptero de la familia Pyralidae, que ataca el tallo y los frutos produciendo la muerte de la planta y la caída del fruto.

-La mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*) Westwood, este homóptero produce daño directo causado por los adultos e inmaduros al succionar la savia de la planta, daño indirecto por la formación de fumagina, la cual se forma al crecer el hongo *Cladosporium* sp y daño indirecto al transmitir virus. Este último daño es el mas importante ya que afecta el rendimiento del cultivo.

-El barrenador del tallo, lepidóptero de la familia Gelechiidae, afecta directamente la producción del cultivo, las larvas hacen galerías dentro de los tallos de la planta, alimentándose del parénquima. Si la infestación es baja, la plaga pasa

desapercibida. Sin embargo, cuando las larvas se presenta en tallos, la planta muestra inicialmente síntomas de marchitamiento reversible, pero cuando la infestación es severa la planta puede marchitarse por completo y morir (Carmona, 2003).

Entre las enfermedades causadas por hongos más importantes que afectan al cultivo de lulo (*S. quitoense*), están: La pudrición algodonosa (*S. sclerotiorum* Lib) y la de gota o tizón del lulo (*Phytophthora infestans* Mont), las cuales son las causantes de las mayores pérdidas económicas de los productores. *S. sclerotiorum*, ataca todas las partes de la planta, especialmente los tallos y las ramas. Este hongo del suelo se introduce por las raíces y se extiende mediante micelios o rizomas; cuando ataca la base del tallo la planta se marchita y muere. *P. infestans* se caracteriza por atacar las hojas, los tallos y los frutos (Tamayo, 2001). Sumado a lo anterior, el cultivo del lulo también se ve afectado por enfermedades ocasionadas por nemátodos, de los cuales, el más importante es *M. incognita*. Este nemátodo del nudo ataca las raíces produciendo numerosos engrosamientos y agallas, dando lugar a ataques secundarios de microorganismos (Figura 2) (Tamayo, 2001).



Figura 2. Daño producido en la raíz de lulo por el nemátodo *M. incognita*

2. 8 Mejoramiento Genético en Lulo

Los trabajos de mejoramiento genético son escasos, se conocen los híbridos obtenidos por el Dr. Heisser en la Universidad de Indiana USA y las hibridaciones hechas por Lobo y Navarro en el C.I. La Selva en Rionegro,

Según Torre y Camacho (1981), el cruce ínterespecífico entre *S. quitoense* y *S. sessiliflorum*, fue realizado por primera vez en Ecuador por Raúl Viteri, un granjero de finca, quien obtuvo un híbrido, que denominó “Puyo”. Este híbrido tiene características de ser vigoroso, altamente productivo y de semilla estéril, por lo cual debe ser propagado vegetativamente. Según Heiser (1993), la desventaja de este híbrido es que la fruta es demasiado pequeña y para aumentar su tamaño requiere la aplicación de la fitohormona 2.4-D. Posteriormente, Heiser en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Palora en Ecuador, basándose en la experiencia de Viteri, obtuvo un híbrido entre *S.*

quitoense y *S. sessiliflorum*, llamado "Palora". Este híbrido presenta un fruto más grande que el híbrido "Puyo", no requiere de la aplicación de la fitohormona 2.4-D y el jugo empieza a oxidarse 24 horas después de preparado, mucho más tarde que el jugo preparado con el híbrido "Puyo", sin embargo, el consumidor prefiere el híbrido "Puyo" por la coloración de la pulpa (Heiser, 1993).

En Colombia, se cuenta con un híbrido mejorado, llamado lulo "La Selva", que fue el resultado del un proceso de hibridación interespecífica entre *S. quitoense* Var septentrional. La F1 obtenida del cruzamiento, fue un híbrido con las siguientes características: Planta con muchas espinas, fruto muy pequeño de pulpa amarilla e insípida, hojas más pequeñas y vellosidades en el fruto. Para eliminar las espinas se realizaron 2 retrocruzamientos con *S. quitoense*, sin espinas procedente del Ecuador. El híbrido resultante tiene las siguientes características: Plantas sin espinas, frutos más grandes que los obtenidos en la F1, pero más pequeños que el lulo de castilla, tolerante a nemátodos, se puede sembrar a libre exposición, con buen comportamiento y mayor período vegetativo, la pulpa es de color verde apetecida en el mercado nacional en forma de fruta fresca, fruto de buen aroma y sabor, vellosidades en el fruto de fácil desprendimiento (Lobo, 2000).

A nivel nacional, el lulo "La Selva" está comercializado en los almacenes de cadena. Sin embargo, las bayas son de menor tamaño y tienen problemas de rajamiento, debido a un gene dominante con expresividad incompleta, derivado del

parental silvestre *S. hirtum* lo cual limita su comercialización a nivel internacional (Siesa, 2000).

Actualmente los híbridos mejorados poseen características indeseables tales como el rajamiento y tamaño del fruto, coloración de la pulpa, heredadas de algunos de los parentales como consecuencia del cruce sexual. Con el avance de la biotecnología, posiblemente se podrían incorporar características deseables como por ejemplo; adaptación a plena exposición solar, resistencia a ciertas plagas y enfermedades, ausencia de espinas y frutos de buen tamaño en un solo material (Lobo, 2000).

2.9 Estudios de Caracterización

Las diferentes especies de la sección *Lasiocarpa*, exhiben una gran variedad de formas, colores, tamaños (características morfológicas), que las distinguen entre sí (Heiser, 1972; Whalen *et al.*, 1981; Lobo, 2000). Cualquier diferencia morfológica entre dos o más individuos sirve entonces como una "etiqueta" o "Marcador Morfológico" que se convertirá en un rasgo característico que se puede usar para la diferenciación de individuos dentro de una misma especie. Sin embargo, algunos de estos marcadores pueden estar afectados por el medio ambiente y en ocasiones existen materiales mal caracterizados, especialmente cuando se trata de fenotipos muy similares.

Se han realizado diferentes estudios basados en marcadores morfológicos, bioquímicos (isoenzimáticos), citogenéticos (cariotipos) y moleculares con las diferentes especies de la sección *Lasiocarpa* (Heiser, 1972, 1987, 1989; Whalen et al., 1981; Whalen & Caruso, 1983; Bernardello et al., 1994; Bruneau et al., 1995). Entre los estudios más importantes se destacan los siguientes: Heiser en 1972, basados en cruces entre las diferentes especies de la sección *Lasiocarpa* (*S. candium*; *S. felinum*; *S. hirtum*, *S. hyporhodium*, *S. lasiocarpum* *S. pectinatum*, *S. pseudolulo*; *S. quitoense*; *S. repandum*; *S. sessiliflorum*; *S. stramonifolium*; *S. vestissimum* y *S. tequilense*). Concluyó que *S. tequilense* (A. Gray), es la especie más relacionada a *S. quitoense*, basándose en 43 caracteres morfológicos. Así mismo propuso el esquema poligonal de cruzamiento de estas especies.

En 1983, Whalen & Caruso, con diferentes especies de la sección *Lasiocarpa* (*S. candium*; *S. hirtum*, *S. hyporhodium*, *S. lasiocarpum* *S. pectinatum*, *S. pseudolulo*; *S. quitoense*; *S. sessiliflorum*; *S. stramonifolium*; *S. vestissimum*). Realizaron un estudio de caracterización isoenzimática y lo relacionaron con la descripción morfológica de estas especies caracterizadas mediante 20 descriptores morfológicos. Encontraron que las relaciones de filogenia entre las taxa fueron similares tanto a nivel morfológico como isoenzimático, en forma independiente de las metodologías de análisis empleadas, tanto desde el punto de vista filogenético, como desde la clasificación fenética. Sin embargo se encontró que *S. vestissimum* a pesar de ser la especie con mayor variabilidad intraespecífica según los datos morfológicos, no evidenció polimorfismo isoenzimático.

Bernardello y colaboradores (1994), llevaron a cabo estudios a nivel cromosómico en todas las especies de la sección *Lasiocarpa*. Se concluyó que todas las especies tienen el mismo número de cromosomas ($2n=24$) e indicaron que la especiación en este grupo no fue acompañada por cambios en el número de cromosomas. Igualmente, señalaron que no hubo indicios de rearrreglos cromosómicos en los taxa estudiados, lo que sugiere que la diferenciación morfológica no siempre está asociada con divergencia cromosómica. En este trabajo no se logró trazar el origen de *S. quitoense* a partir de la información generada.

Posteriormente, se realizaron estudios filogenéticos de las diferentes especies de la sección *Lasiocarpa* (*S. candium*; *S. hirtum*, *S. lasiocarpum* *S. pectinatum*, *S. pseudolulo*; *S. quitoense*; *S. repandum*; *S. sessiliflorum*; *S. stramonifolium*; *S. vestissimum*) basados en patrones de restricción de ADN de cloroplasto los cuales fueron comparados con los estudios previos de caracterización morfológicos e isoenzimáticos (Whalen & Caruso, 1983). El análisis filogenético basado en los patrones de restricción de ADN de cloroplasto mostró claramente dos grupos, el primero incluía tres especies amazónicas y el segundo agrupaba las especies andinas y las dos especies asiáticas. La mayor correspondencia entre las tres categorías de datos (análisis morfológico, isoenzimático y patrones restricción de ADN de cloroplasto) se encontró entre los obtenidos a partir de los patrones de restricción de ADN de cloroplasto y los caracteres morfológicos. Estos resultados soportaron la hipótesis de que las dos especies asiáticas son taxa hermanas

aunque se hallan originado separadamente de los dos grupos suramericanos (andinos y amazónicos) (Bruneau *et al.*, 1995).

2. 9.1 Caracterización Molecular Mediante AFLP

El desarrollo de la biología molecular ha permitido obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, debido a que el factor de error generado por el ambiente no existe ya que la información esta tomada directamente del genoma de las plantas (Morell *et al.*, 1995). Además, se reconocen las diferencias genéticas entre individuos, al obtener un "perfil molecular" o "fingerprinting" característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas. Una ventaja adicional es la posibilidad de analizar loci únicos (regiones únicas en el genoma) o loci múltiples (regiones repetidas a través del genoma (Vos *et al.*, 1995; Ferreira y Grattapaglia,1998). Uno de estos marcadores son los AFLP, los cuales presentan algunas ventajas sobre otros marcadores moleculares como los RFLPs, los RAPDs y los SSRs, debido a que esta técnica combina la especificidad, la resolución y el poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de detección de polimorfismo por vía PCR sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad, este tipo de marcadores moleculares en varias especies de la familia Solanaceae para estudios de diversidad genética.

Rodríguez (2000), caracterizó 282 accesiones de *Capsicum* pertenecientes a la colección del Instituto SINCHI mediante la técnica de AFLP, de igual manera Toquita (2003), caracterizó 71 accesiones de *Capsicum* perteneciente al departamento de la Amazonia, ambos autores demuestran la utilidad de la técnica de los AFLP, no sólo para detectar la diversidad genética dentro de las especies de *Capsicum*, sino también para identificar individuos mal clasificados, igualmente detectaron patrones geográficos en la variación genética, información necesaria para desarrollar estrategias óptimas de conservación.

El análisis de la diversidad genética de 159 accesiones de la Colección Colombiana de lulo y especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*, contribuirá a optimizar la conservación *ex situ* del germoplasma de estas especies, aspecto fundamental para el desarrollo de estrategias de colección y conservación de los recursos fitogenéticos. Igualmente se podría esclarecer relaciones filogenéticas y taxonómicas actualmente existentes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aún cuando el lulo es considerado como una especie promisorio desde hace 70 años y ser Colombia parte del centro de origen, este cultivo no ha alcanzado el grado de desarrollo esperado, debido a la dificultad de obtener materiales mejorados con características deseables que puedan competir en el mercado, además, los esfuerzos de la investigación en fitomejoramiento se han canalizado a cultivos tradicionales relacionados con seguridad alimentaria y a cultivos industriales o generadores de divisas. Debido a estos inconvenientes, Colombia se ha visto en la necesidad de importar del Ecuador aproximadamente el 25% del volumen de lulo consumido por año para suplir los requerimientos nacionales. Lo anterior indica la necesidad de adelantar procesos de caracterización y evaluación de la colección colombiana de lulo (*S. quitoense*) y especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*, con el fin de brindar elementos indispensables en la implementación de un programa eficiente de mejoramiento de este cultivo para la obtención de materiales con características agronómicas deseables para la industria o como fruta fresca que suplan las necesidades de consumo nacional e internacional.

La caracterización y evaluación de la Colección Colombiana de Lulo actualmente se realiza mediante metodologías complementarias basadas en marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares, para conocer la composición genética de

los materiales. De los resultados que se obtengan se podrá deducir si hay necesidad de ampliar la base genética de la colección mediante acciones de colecta e introducción, esclarecer posibles relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de la sección *Lasiocarpa*. Por lo tanto, El objetivo general de este estudio se centra en caracterizar la diversidad genética de la Colección Colombiana de Lulo mediante la técnica molecular AFLP. Posteriormente estos resultados serán comparados y complementados con la caracterización morfológica que se adelanta en Corpoica "LA SELVA".

4. OBJETIVOS

4. 1 Objetivo General

Estimar el grado de diversidad genética de las accesiones de *S. quitoense* y seis (6) especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa* existentes en la Colección Colombiana de Lulo, custodiada por Corpoica “La Selva” en Rionegro Antioquia, utilizando marcadores moleculares AFLP.

4. 2 Objetivos Específicos:

- ü Estimar la variabilidad genética entre cada una de las especies utilizadas en este estudio.

- ü Analizar el grado de relación existente dentro de las diferentes accesiones que conforman las especies utilizadas en este estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura (CIAT), situado en el municipio de Palmira Departamento del Valle del Cauca.

5. 1 Material Biológico

El material vegetal utilizado proviene de la Colección Colombiana de lulo, ubicado en el Centro de Investigación Corpoica, La Selva, en Rionegro, Antioquia situada a 2120 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 17°C y una humedad relativa del 78% con precipitación anual de 1800 mm. Los sitios de colecta del germoplasma evaluado, la mayoría corresponden a Colombia (74 accesiones), específicamente al sur occidente Colombiano y a la sierra nevada de Sta Marta, también la colección cuenta con materiales traídos del Ecuador, Perú, Costa Rica, Venezuela, Brasil y del jardín botánico (Garden) en Inglaterra (Figura 3, anexo 1). Se analizaron 159 accesiones de la Colección Colombiana de Lulo. 135 corresponden a 7 especies de la sección *Lasiocarpa*; 14 accesiones son híbridas: 9 de origen ecuatoriano y 5 accesiones colombianas (uno es un híbrido interéspecífico natural y los 4 restantes son clones del híbrido "La Selva"). Como grupo de comparación se incluyeron 9 accesiones del mismo género (*Solanum*) que no pertenecen a la sección *Lasiocarpa*. El total de accesiones por especie se puede apreciar en la tabla 2 y sus respectivos datos de pasaporte se muestran en el anexo 1.

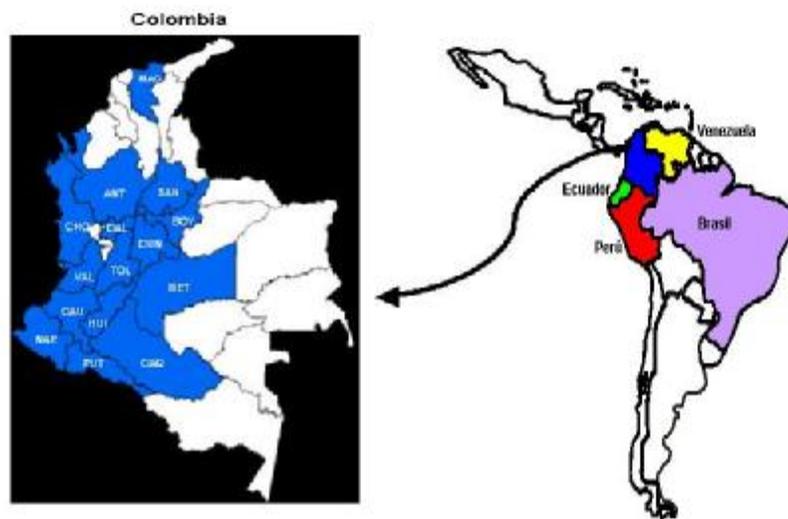


Figura 3. Area de distribución de los materiales evaluados de la Colección Colombiana de lulo.

Tabla 2. Accesiones y especies de lulo utilizadas en este estudio, provenientes de Centro de Investigación Corpoica, “La Selva”, en Rionegro, Antioquia.

Especies	# de accesiones / Especie
<i>S. quitoense</i>	74
<i>S. pseudolulo</i>	31
<i>S. hirtum</i>	7
<i>S. vestissimum</i>	7
<i>S. sessiliflorum</i>	11
<i>S. pectinatum</i>	5
<i>S. stramonifolium</i>	1
Híbridos (Ecuador)	9
Híbridos (Colombia)	4
Híbrido interespecífico natural	1
Grupo de comparación	9*
Total	159

* Grupo de comparación: *S. atropurpureum* (1); *S. jilo* (1); *S. capsicoide* (2); *S. mamosum* (2) *S. marginatum* (1) *S. sp* (2) En total son 7 especies del género *Solanum*, representadas en 9 accesiones.

5. 2 Análisis Molecular

5. 2. 1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se tomaron hojas jóvenes de cada una de las accesiones de lulo. La extracción de ADN se realizó con el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983) con algunas modificaciones, que se describen a continuación. Un gramo de tejido foliar de cada accesión fue macerado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco y homogeneizado en 1 ml de solución de extracción, previamente calentada a 65 °C, la cual contiene 100 mM del tampón Tris HCl (pH 8.0); 50 mM de EDTA (pH 8.0); 500 mM de NaCl; 1.25% de SDS y 0.38% de bisulfito de sodio. Las muestras se incubaron en baño María a 65 °C por 30 minutos, agitándolas cada 5 minutos. Para precipitar las proteínas se adicionó 0.4 ml de acetato de potasio 5M (pH 7.4) con agitación en frío por 30 minutos. La separación de las proteínas se realizó con centrifugado a 3.000 r.p.m. a 4° C durante 10 minutos. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 µl. Los ácidos nucleicos fueron precipitados toda la noche a -20° C al adicionar 1 volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 3.000 r.p.m. a 4 °C por 10 minutos y se descartó la fase acuosa. El precipitado resultante se lavó con 1 ml de etanol frío al 70%, se centrifugó a 3000 r.p.m durante 5 minutos y se secó a temperatura ambiente. Una vez seco el precipitado, se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1mM) y 1 µl de ARNasa (Ribonucleasa A (Type I-A) de Bovino, Sigma Chemical®) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

La calidad del ADN se verificó por medio de electroforesis, con geles de agarosa de 0.8% en solución tampón TBE 0.5X. Se corrieron 3 µl de ADN mezclados con 2 µl de tampón de corrida por muestra y se tiñó con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó con el equipo Horizontal Gel electrophoresis Apparatus, (Life Technologies™) a una carga de 100 w/cm² durante 30 minutos. La concentración del ADN se midió por fluorometría utilizando el DyNA Quant 200 Flurometer (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. 2. 2 Técnica de AFLP

Antes de empezar con la aplicación de la técnica de Aflp se realizó una prueba de digestión con la enzima de restricción *EcoRI* con el fin de determinar la calidad del ADN y la no presencia de inhibidores de enzimas en las muestras. La técnica de AFLP se realizó según el método de Vos *et al.*, (1995). En este estudio se utilizó el "kit " de Aflp Analysis System I (INVITROGEN™) con modificaciones, para ADN genómico de plantas como se describe a continuación.

5. 2. 2. 1 Digestión del ADN

En ADN previamente aislado fue digerido con dos enzimas de restricción, una de corte raro (*EcoR I*) y otra de corte frecuente (*Mse I*). La enzima *EcoR I* reconoce 6 pb, mientras que la enzima *Mse I* tiene lugar de reconocimiento cada 4 pb (Vos *et al.*, 1995). Es importante mencionar que al utilizar dos enzimas de restricción se generan más

fragmentos de ADN que al emplear una sola enzima. La mezcla de reacción de la digestión del ADN se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 3. Mezcla de reacción de la digestión del ADN

Componente	Volumen / Muestra
5x tampón de reacción*	2.5µl
ADN (250 ng en ≤ 7 µl)	≤7 µl
Enzimas <i>EcoR I / Mse I</i>	1 µl
Agua destilada estéril	Para 12.5µl
Volumen total	12.5 µl

- Contiene: 50 mM Tris-HCL (ph 7.5), 50 mM Mg-acetate, 250 mM k-acetate.

La reacción se incubó durante dos horas a 37°C en baño María, luego las muestras se incubaron a 70°C por 15 minutos con el fin de inactivar las enzimas de restricción. Inmediatamente, las muestras fueron colocadas en hielo.

5. 2. 2. 2 Ligación de Adaptadores

A la digestión anterior se le agregaron los siguientes componentes para llevar a cabo la ligación de adaptadores complementarios a los cortes de cada una de las enzimas de restricción (Tabla 3).

Tabla 4. Mezcla de reacción de la digestión/ligación.

Componente	Volumen / Muestra
Digestión anterior	12.5µl
Solución de ligación*	12 µl
Ligasa T4 de ADN(1U)**	0.5 µl
Volumen total	25 µl

* Contiene adaptadores *EcoR* I / *Mse* I, 0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCL (ph 7.5), 10 mM Mg-acetate, 50 mM k-acetate.

** Contiene 1 Unit/µl, 10 mM Tris-HCL (ph 7.5), 1 mM DTT, 50, mM KCL. 50% glicerol (v/v).

La reacción fue incubada a 20°C ±2°C por 2 horas en baño María. Finalizada la incubación, se realizó una dilución 1:10 de la mezcla digestión / ligación con solución tampón TE (10Mm, Tris-HCL(pH 8.0), 0.1 nM EDTA), tomando 2 µl y 18 µl respectivamente.

5. 2. 2. 3 Amplificación Selectiva (+1/+1)

Para la amplificación selectiva (+1/+1) se utilizaron tubos eppendorf para PCR de 0.2 ml y se les adicionaron los componentes mencionados en la tabla 4.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación selectiva (+1/+1) de los productos de digestión/ligación.

Componente	Volumen / Muestra
ADN dilución 1:10	2.5 μ l
Pre-amp. Primer Mix*	20 μ l
Tampón PCR 10X con MgCl ₂ **	2.5 μ l
Taq DNA polymerasa (1u/ μ l)	0.1 μ l
Volumen total	25.1 μ l

* Contiene los cebadores para los extremos generados por la enzima de restricción *EcoRI* con un nucleótido selectivo A y cebadores para *MseI* con un nucleótido selectivo C.

** Contiene 200 mM, Tris-HCL(pH 8.4), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl a una concentración 1.5 mM.

Todas las reacciones de amplificación llevadas a cabo en este estudio se realizaron en termociclador MJ Research Inc. Programable Controller (PTC-100). El perfil de temperatura utilizado para el PCR +1/+1 fue el siguiente: 94°C 30 segundos, 56°C por 60 segundos y 72°C 60 segundos durante 20 ciclos. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Finalizada la amplificación, se realizó una dilución 1:50 del PCR +1/+1 con solución tampón TE (10Mm, Tris-HCL(pH 8.0), 0.1 nM EDTA), tomando 1 μ l y 49 μ l respectivamente.

5. 2. 2. 4 Amplificación Selectiva (+3/+3)

5. 2. 2. 4 .1 Selección de Combinaciones

El "kit" de AFLP utilizado en este estudio permite utilizar 64 combinaciones posibles de cebadores con tres (3) nucleótidos seleccionantes tanto para *EcoR* I como para *Mse* I. Según trabajos previos, para estudios de diversidad genética es suficiente utilizar dos (2) combinaciones de cebadores de AFLP, ya que se obtiene la misma información genética que con un número mayor de dos combinaciones de cebadores (Caicedo *et al.*, 1999; Tovar, 2001), por lo tanto, para este estudio se realizó un ensayo con 30 combinaciones de cebadores en 15 individuos escogidos al azar. Se eligieron las dos (2) mejores combinaciones, por presentar buena resolución de bandas, buen nivel de polimorfismo y buena reproducibilidad. Para cada combinación de cebadores se realizaron dos mezclas denominadas "Mix 1" (Tabla 5) y Mix 2" (Tabla 6).

Tabla 6. Mezcla de reacción "Mix 1" para PCR (+3/+3).

Componente	Volumen / Muestra
Cebador <i>EcoR</i> I	0.5µl
Cebador <i>Mse</i> I	4.5 µl
Volumen total	5 µl

Tabla 7. Mezcla de reacción “Mix 2” para PCR (+3/+3).

Componente	Volumen / Muestra
10X PCR Tampón + Mg	2 µl
Taq ADN polymerasa (5u/µl)	0.1 µl
Agua destilada estéril	7.9 µl
Volumen total	10 µl

La reacción de PCR final contiene 5µl del PCR +1/+1 diluido 1: 50, 5µl de la mezcla “Mix 1” y 10 µl de la mezcla “Mix 2”. El programa utilizado para las amplificaciones fue el siguiente: 1 ciclo de 94°C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C 60 segundos. Durante 12 ciclos, la temperatura de alineamiento descendió 0.7 en cada ciclo. Por último durante 23 ciclos de 94°C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C 60 segundos.

5. 2. 3 Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

Los productos de la amplificación selectiva (3+3) fueron separados con un equipo de electroforesis vertical Sequi-Gen[®] GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, (BIO-RAD) en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y urea 5M, con un espesor de 0.4 mm, siguiendo el protocolo sugerido por Promega (1998) con algunas modificaciones, que se describen a continuación. Inicialmente el vidrio y la cámara de electroforesis se limpiaron tres veces con etanol absoluto. El vidrio fue recubierto con una solución que contiene 3 µl de Bind Silane, (Amersham Pharmacia Biotech) y 1 ml de solución de ácido acético glacial y etanol absoluto, para que el gel se adhiriera al vidrio. La cámara fue recubierta con 350 µl de Repel Silane (Amersham Pharmacia Biotech), para que el gel no se adhiriera a esta parte. Una vez armado el equipo de electroforesis según las instrucciones del fabricante

se adicionó una solución que contenía 110 ml de poliacrilamida al 6%, 600 μ l de persulfato de amonio al 10% y 120 μ l de Temed, dejando polimerizar por una hora y media. Al cabo de este tiempo se ensambló la cámara de electroforesis en su totalidad al colocarle los electrodos y se sirvió caliente (55°C) el tampón de corrida TBE 0.5 X, el cual permite la separación del ADN. Luego se colocó el peine de dientes de tiburón para formar los pozos y se adicionaron 3 μ l de la solución de tampón de carga. Para realizar la precorrida del gel a 120 W/cm² se utilizó una fuente de poder Power Pac 3000 (BIO-RAD) hasta que la temperatura alcanzara 50°C. Simultáneamente, a cada una de las reacciones de amplificación se les agregó 5 μ l de solución tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25% en agua desnaturalizada por cuatro minutos a 94°C y colocadas en hielo hasta el momento de servir la muestra en el gel. Terminada la precorrida, se sirvieron 3 μ l de cada muestra de ADN en cada uno de los pozos. Para identificar el tamaño de los productos de PCR se utilizó un patrón de peso molecular DNA ladder 10 pb (Invitrogen™) que tiene un rango de lectura de 330 a 30 pb. Estos productos fueron separados a 100 W/cm² por una hora y media aproximadamente.

5. 2. 4 Tinción y revelado de geles de poliacrilamida.

La tinción y el revelado de los geles de poliacrilamida se hizo basándose en los protocolos de Bassam *et al.*, (1991) con algunas modificaciones que se describen a continuación. Al finalizar la electroforesis, el aparato fue desmontado, el vidrio con el gel adherido se separó de la cámara y se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante 20 minutos para la fijación del ADN. Luego se retiró el exceso de ácido lavando tres veces con agua deionizada durante dos minutos cada vez. Luego se colocó el gel en una

solución que contiene nitrato de plata (1g/l) y formaldehído al 0.056% por 30 minutos, para el proceso de tinción. Inmediatamente se lavó el gel con agua deionizada durante 6 segundos. Posteriormente se revelaron los productos del PCR con una solución que contiene: carbonato de sodio (30 g/l), formaldehído al 0.056% y tiosulfato de sodio (2 mg/l) a 14°C, hasta la visualización de las bandas. Para detener la reacción de la solución reveladora, el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% durante cinco minutos y finalmente se lavó con agua deionizada.

La lectura de las bandas se realizó con un transiluminador tomando como guía el patrón de peso molecular incluido en los geles. Se leyeron las bandas con mejor resolución y se enumeraron consecutivamente empezando desde el primer individuo del primer carril. Una vez hecha la lectura de las bandas, cada gel fue escaneado para almacenar su patrón de bandas..

5.3 Análisis Estadístico

A partir de la lectura de las bandas obtenidas con cada pareja de cebadores se construyó una matriz de presencia o ausencia de alelos (1 y 0) con la que se realizó el análisis de similaridad.

5. 3. 1 Análisis de Similaridad

La similaridad genética entre todas las accesiones se estimó calculando el coeficiente de similaridad de Nei-Li (1979), también conocido como similaridad de DICE (1945), cuya fórmula es:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

Donde:

S_{ij} = Similaridad entre el individuo i y j .

a = Número de bandas compartidas por los individuos i y j .

b = Número de bandas presentes en i pero ausente en j .

c = Número de bandas presentes en j pero ausente en i .

La matriz de similaridad se construyó con el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2000) utilizando el subprograma Simqual y el coeficiente de Dice, L. R. (1945). Los coeficientes de similaridad fueron a su vez introducidos en el subprograma SAHN para construir dendrogramas usando el método de unión media aritmética no ponderada "UPGMA"

Adicionalmente, se realizó un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM), con el procedimiento "Corresp" del programa estadístico SAS (SAS Institute, 1989), este análisis es una técnica descriptiva de análisis multivariado, que pretende encontrar estructuras en la población bajo estudio, en términos de variables e individuos representados en un espacio tridimensional. Este análisis tiene la ventaja de evaluar datos no métricos y relaciones no lineales.

5. 4 Analisis de Neighbor-Joining

El análisis de “neighbor-joining”, (vecino más próximo) se realizó a través del programa PAUP 4.0 implementado por David L. Swofford con la finalidad de determinar el intervalo de confianza de los nodos del respectivo árbol “vecino más próximo” (distancia). También se determinó la máxima verosimilitud mediante el análisis de remuestreos “bootstrap”, con 1.000 replicas, también disponible en el programa PAUP 4.0.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo de investigación a nivel molecular de la colección colombiana de lulo utilizando la técnica de AFLP. Los resultados incluyen, el análisis de similaridad de Nei-Li, el de correspondencia múltiple (ACM) y el de “neighbor-joining”. Adicionalmente, los resultados son contrastados con diferentes estudios morfológicos, isoenzimáticos, cariotípicos y moleculares realizados por otros investigadores con algunas especies de la sección *Lasiocarpa* (Heiser, 1972, 1987, 1989; Whalen *et al.*, 1981; Whalen y Caruso, 1983; Bernardello *et al.*, 1994; Bruneau *et al.*, 1995), con el fin de tener una base para el entendimiento de la estructura genética de los materiales evaluados.

6.1 Extracción y digestión del ADN

Con el método de extracción Dellaporta *et al.* (1983), se obtuvieron ADNs de buena calidad y concentración (Figura 4). El rendimiento promedio del ADN total estuvo entre 20 a 150 ng por mg de tejido, el cual fue suficiente para el análisis molecular con la técnica de AFLP. Adicionalmente, la prueba de digestión con una de las enzimas de restricción (*EcoR* I) empleadas en la técnica, corroboró la buena calidad de los ADNs extraídos (Datos no mostrados).

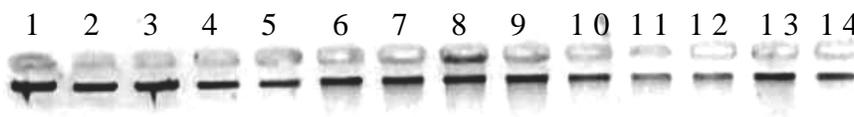


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% mostrando la calidad del ADN extraído de algunas accesiones de lulo incluidas en este estudio.

6.2 Marcadores Moleculares AFLP

De las 30 combinaciones de cebadores evaluadas en este estudio, se seleccionaron las combinaciones E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CTC, con un total de 206 y 170 bandas polimórficas, respectivamente. El rango de lectura se realizó entre 50-400 pb, (Figura 5). Los ensayos preliminares mostraron que la técnica de los AFLP es altamente polimórfica y reproducible, confiriendo un alto grado de confiabilidad. Resultados similares han sido observados por otros investigadores empleando esta técnica con otras especies de la familia Solanaceae; (Christian *et al.* (1996); Saliba-Colombani *et al.* (2000); Acquadro *et al.* (2002), Lanteri *et al.* (2003) y Toquica *et al.* (2003).

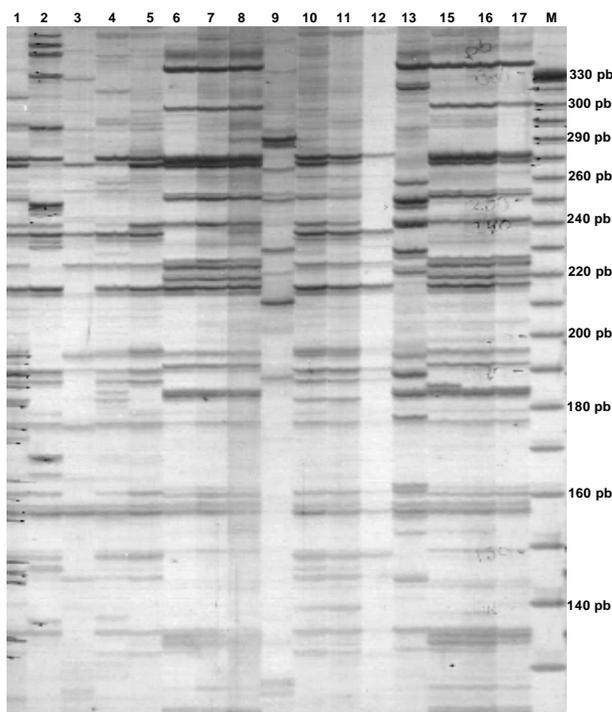


Figura 5. Detalle de un gel de poliacrilamida mostrando los patrones de bandas de Aflp (combinación de cebadores E-ACG/M-CAT), de algunas accesiones de lulo estudiadas. El marcador de peso molecular (M) corresponde a DNA ladder 10 pb (330 a 30 pb).

6.3 Análisis de Similitud

El análisis de similitud obtenido a partir del coeficiente de Nei-Li (1979), calculado para los datos de ambas combinaciones de cebadores, mostró mayor número de sitios muestreados en el genoma que los obtenidos al utilizar cada una de las combinaciones en forma independiente. Los resultados obtenidos fueron más confiables y corroboraron la capacidad que tienen los AFLP para mostrar un gran polimorfismo entre las especies y accesiones estudiadas (Figura 6). En general, hay varios aspectos importantes de destacar que surgen de acuerdo a la estructura presentada por este análisis:

Las 7 especies de comparación llamadas así, debido a que estas no pertenecen a la sección *Lasiocarpa*, fueron las más alejadas de las especies de la sección *lasiocarpa*, a un nivel de similitud que osciló entre 12 al 28%. Lo que indica que se encuentran genéticamente lejanas de la sección *Lasiocarpa* a excepción de *S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum* las cuales se ubicaron en un punto intermedio entre los dos grupos que conformaron las especies de comparación a un nivel del 25% de similitud.

Se observó mayor polimorfismo en las especies silvestres que en las cultivadas. Así por ejemplo, *S. hirtum* y *S. pseudolulo* mostraron el mayor polimorfismo entre sus individuos, con índices de similitud que oscilaron entre 0.76 a 0.98 y entre 0.77 a 0.96 respectivamente. En contraste con *S. quitoense* el cual presentó índices de similitud entre 0.9 a 1, al igual que *S. sessiliflorum* especie cultivada en el Amazonas con índices de similitud entre 0.85 a 0.98.

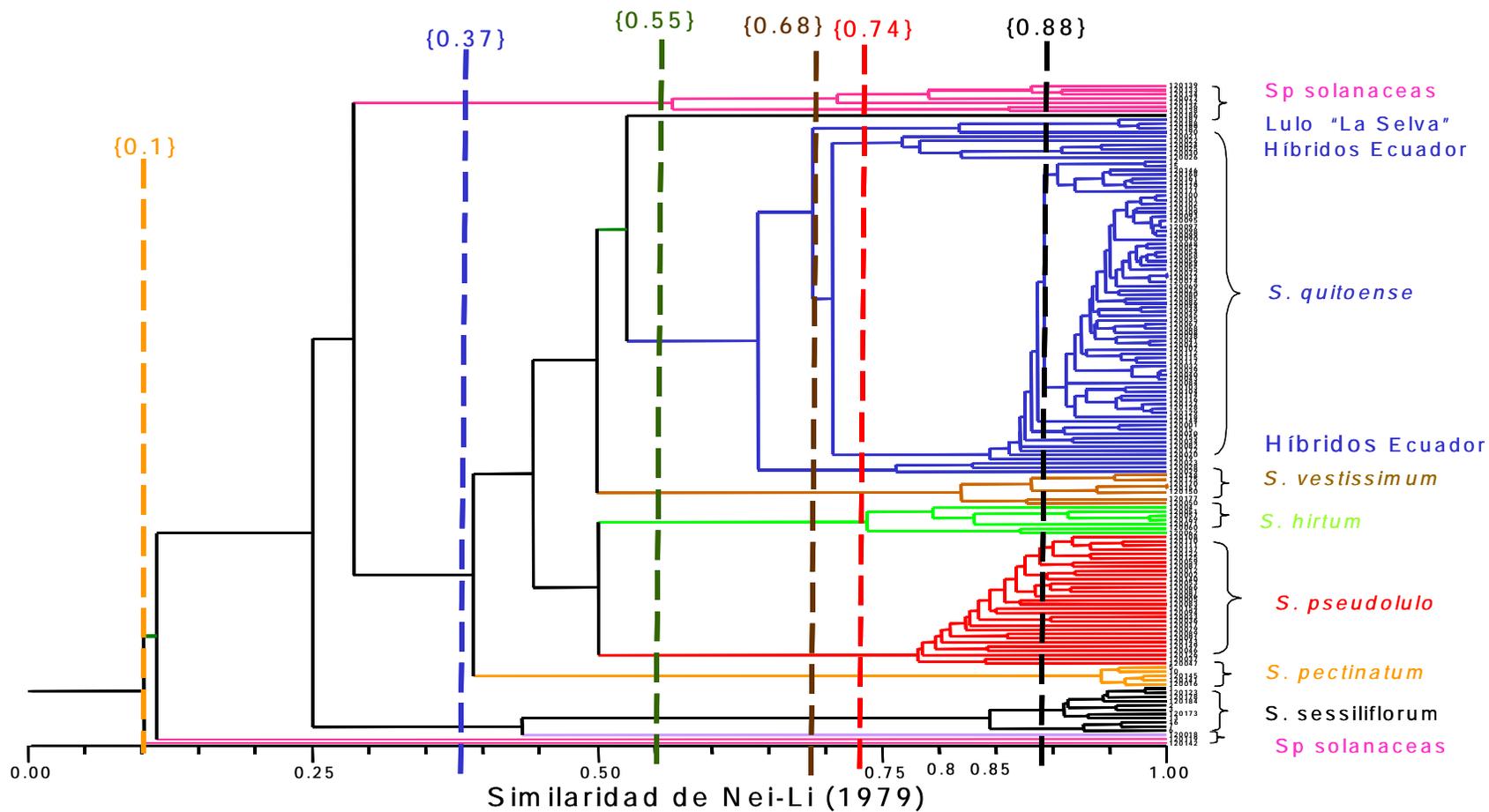


Figura 6. Dendrograma de similaridad utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP's. E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CT, empleando todas las accesiones de lulo incluidas en este estudio.

También se observó una separación marcada entre las siete especies de la sección *Lasiocarpa* estudiadas, esto es entendido debido a que cada una de estas especies posee una composición genética diferente, lo que le otorga una identidad propia. Estos resultados son consistentes con estudios realizados en las especies de la sección *Lasiocarpa* mediante análisis cladístico de caracteres morfológicos (Heiser, 1972; Whalen *et al.* 1981), análisis isoenzimático (Whalen y Caruso, 1983; Bruneau *et al.* 1995) y cariotípico (Bernardello *et al.* 1994).

En el dendrograma de similaridad de Nei-Li mostrado en la figura 6, se visualiza una separación marcada entre las especies andinas (*S. quitoense*, *S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vestissimum* y *S. pectinatum*) y las amazónicas (*S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum*) de la sección *Lasiocarpa*. Resultado similar fue encontrado por Bruneau *et al.* (1995). Los autores encontraron (desde el punto filogenético) dos grupos, basados en patrones de restricción de ADN de cloroplasto y comparados con los estudios de caracterización morfológico e isoenzimático realizados previamente por diferentes autores (Whalen & Caruso, 1983). El primer grupo lo conformaban las especies andinas (*S. quitoense*, *S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vestissimum* y *S. pectinatum*) y el segundo grupo incluía tres especies amazónicas (*S. stramonifolium*, *S. sessiliflorum* y *Solanum albidum* (Dunal) (no incluido en este estudio)

Otro aspecto importante de destacar es la cercana relación entre los clones “La Selva” a *S. quitoense*, con índices de similaridad entre 0.72 a 0.74 respectivamente. Esto puede deberse a los sucesivos retrocruzamientos a partir del híbrido “la Selva” con el padre (*S. quitoense*) para la obtención de frutos más grandes y sin rajamiento característica

heredada del padre (Bernal *et al.* 1996, Valencia y Fernández, 1998). Razón por la cual se esperaría que el híbrido “La Selva” se asemeje más genéticamente a *S. quitoense* que a *S. hirtum*, siendo este último el otro parental de este cruce interespecífico.

6. 3. 1 Variabilidad intraespecífica

En cuanto a la variabilidad intraespecífica, es importante mencionar que el análisis no detectó una separación clara por origen geográfico para ninguna de las especies evaluadas, Esto se puede atribuir a que, en primer lugar se está trabajando con accesiones conservadas en el banco y no se ha hecho un muestreo específico para análisis de poblaciones representativas de las diferentes regiones agroecológicas y edafoclimáticas de la zona de distribución de las especies y segundo, en Colombia los agricultores de lulo se han desplazado con el cultivo de un sitio a otro, llevándose consigo el material de interés. De igual manera, agentes dispersadores de polen y semillas como aves, viento, insectos entre otros, pueden haber contribuido con esta causa (M. Lobo, comunicación personal).

Vale la pena resaltar que el análisis no mostró separación alguna entre las dos variedades de *S. quitoense* (variedad *quitoense* y *septentrional*). En contraste, con los rasgos observados (fenotipo) a nivel morfológico como ausencia o presencia de espinas y pubescencia (Gracia y Garcia, 1985). Esto se puede atribuir en parte, a que los marcadores moleculares no son afectados por el medio ambiente. Sin embargo, para estudiar mas a fondo esta característica, se debería evaluar progenies que provengan de

padres con espinas y padres sin espinas y el marcador más recomendado para este tipo de estudios sería los microsatites.

También, es importante anotar, que los resultados de los AFLP, permitieron identificar duplicados (2) en las muestras evaluadas, Por ejemplo, tanto la accesión 120072 como la 120073 clasificadas como *S. quitoense* resultaron ser idénticas. Caso similar, se presentó con las accesiones 120170 y la 120151 clasificadas como *S. vestissimun*. Este resultado, es de gran importancia debido a que tener duplicados en los bancos de germoplasma reduce la eficiencia de manejo del banco e incrementa los costos de manutención, regeneración, caracterización y documentación.

6. 3. 1 Análisis de los Agrupamientos

Como se puede apreciar en el dendrograma de similaridad de Nei-Li (Figura 6), a un nivel de similaridad del 55% se pueden distinguir 11 grupos (Tabla 8). Es importante anotar, que este trabajo se orientó a caracterizar los materiales de lulo existentes en el banco de germoplasma de Corpoica “la Selva”, por lo anterior, existieron caracterizaciones de una sola especie con una o dos accesiones y otras con más de 30 accesiones por especie, esto implica analizar los resultados con cautela, debido al sesgo introducido por el muestreo. También, es importante mencionar que la colección del banco de germoplasma de lulo, no es representativa toda la zona de distribución de cada unas de las especies involucradas en este estudio.

Grupos 1 y 2. Lo conforman las especies de *Solanum atropopureum* y *Solanum jilo* se separan del grupo a un nivel de similaridad del 11 y 12%, respectivamente (Figura 6), dichas especies no pertenecen a la sección *Lasiocarpa*. Mientras que *S.*

Tabla 8. Grupos obtenidos a un nivel de similaridad Nei-Li (1978), del 55%, utilizando el método de UPGMA con dos combinaciones para AFLP E-ACG/M-CAT y E-ACG/M-CTC.

Grupo	# Individuos	Especies/híbridos
1	1	<i>S. atropopureum</i>
2	1	<i>S. jilo</i>
3	1	<i>S. stramonifolium</i>
4	11	<i>S. sessiliflorum</i>
5	5	<i>S. pectinatum</i>
6	31	<i>S. pseudolulo</i>
7	7	<i>S. hirtum</i>
8	7	<i>S. vestissimum</i>
	9	Híbridos (Heiser)
9	74	<i>S. quitoense</i>
	4	Clones "La Selva"
10	1	Híbrido(natural)
	2	<i>S. capsicoide</i>
	1	<i>S. mamosum</i> S.
11	1	<i>marginatum</i>
	2	<i>S. ornamental</i>
	1	<i>S. sp</i>

atropopureum es silvestre originario de Colombia, *S. jilo* es cultivado originario de Brasil, este último es un tipo de berenjena popular en los mercados brasileiros, se vende como acompañante de platos típicos en la región (M. Lobo, comunicación personal).

El grupo 3. Incluye a *S. stramonifolium* especie amazónica de la sección *Lasiocarpa*, es silvestre originaria de las tierras bajas de la Amazonía, se caracteriza porque sus frutos son pequeños, pero es del agrado de los habitantes de la región por su sabor y aroma. En la parte occidental del área de origen, la planta generalmente carece de espinas (Whalen

& Heiser 1981). Es importante mencionar que a un nivel de similaridad del 25% esta especie se une a las especies andinas de la sección *Lasiocarpa* (Figura 6).

El grupo 4. Conformado por 11 accesiones correspondientes a *S. sessiliflorum* especie amazónica cultivada de la sección *Lasiocarpa*. A un nivel de similaridad del 90% (Figura 6) se observa gran homogeneidad entre sus individuos, a pesar de que algunas accesiones provengan de diferentes países como: Perú, Costa Rica y Colombia, el análisis no mostró ninguna distinción. Por otro lado, al igual que con el grupo anterior este grupo también se unió a las especies andinas a un nivel similaridad del 25% (Figura 6).

S. sessiliflorum, es cultivada en el Amazonas, generalmente es conocido como cocona o lulo amazónico (Heiser, 1972,1993). La variación morfológica en cuanto al tamaño y forma del fruto es muy notoria, la mayoría de las plantas carecen de espinas. La variedad silvestre (*S. sessiliflorum* var. *georgicum*) difiere la variedad cultivada (*S. sessiliflorum* var. *topiro*) en la posición de las espinas y en el tamaño reducido de su fruto (Whalen & Heiser 1981; Bernal *et al.*, 1983; Heiser,1985; Heiser, 1993). Diferentes cruces interespecíficos entre *S. quitoense* y *S. sessiliflorum* han sido posibles (Torre y Camacho, 1981; Heiser, 1993)

El grupo 5. Lo conforman 5 accesiones de *S. pectinatum*, especie andina de la sección *Lasiocarpa*, se encuentra principalmente por debajo de los 1.000 m.s.m.s en el Oriente y Sur de Colombia, Ecuador y Perú (Whalen & Heiser 1981; Heiser, 1985). Se puede observar, que a un nivel de similaridad del 40% esta especie es la mas alejada de las especies andinas de la sección *Lasiocarpa* (Figura 6).

Resultado similar fue encontrado por Walen & Heiser (1981), mediante la caracterización morfológica e isoenzimática, quienes clasifican aparte a *S. pectinatum* de las otras especies de la sección Lasiocarpa por la cobertura de pelos largos y simples. Los frutos de *S. pectinatum* son grandes y glabras en la madurez con agradable sabor, el jugo es muy similar al jugo de *S. quitoense* (especie cultivada). Sin embargo, un análisis bioquímico reportó altos contenido de alcaloides en éstos frutos. No obstante, muchas solanáceas pueden presentar gran cantidad de alcaloides pero a medida que maduran estos pueden desaparecer o contener bajas concentraciones no tóxicas para el consumo humano (Heiser, 1985)

El grupo 6. Incluye 31 accesiones de *S. pseudolulo* especie andina de la sección Lasiocarpa. A un nivel de similaridad del 78%, se observó un alto polimorfismo entre sus individuos, resultado esperado debido a que esta especie es silvestre (Figura 7).

Esta especie es endémica de Colombia entre los 500-2000 m.s.m.s en las cordilleras oriental y central. Los frutos son de tamaño mediano y glabras en la madurez. Sin embargo el sabor es insípido. En cruces ínterespecíficos la especie puede ser exitosa cuando se utiliza como progenitor femenino y puede ser útil como puente genético entre otras especies de la sección Lasiocarpa (Whalen *et al.*, 1981).

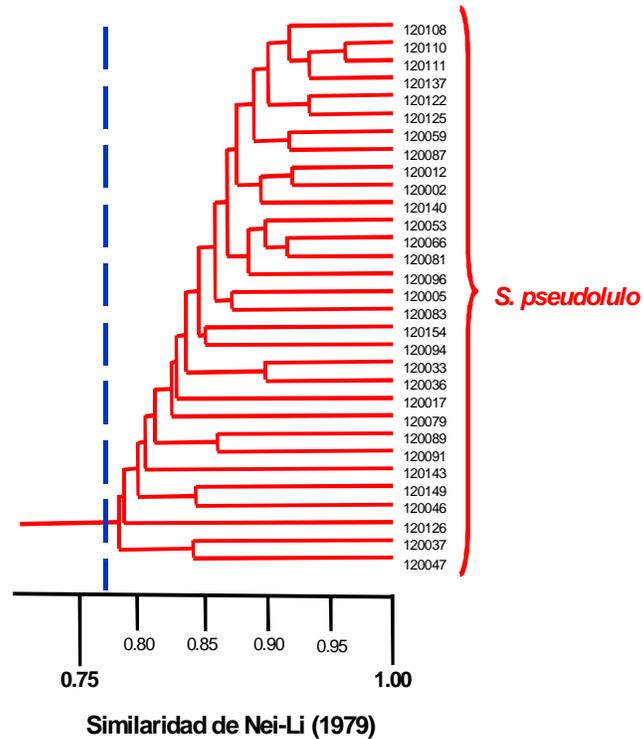


Figura 7. Fragmento del Dendrograma de similaridad para *S. pseudolulo* utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.

El grupo 7. Está conformado por 7 accesiones de *S. hirtum* especie andina de la sección Lasiocarpa. A un nivel de similaridad del 50% esta especie se une con *S. pseudolulo* (Figura 5). Adicionalmente esta especie fue la que mostró mayor polimorfismo entre los individuos de las especies de la sección Lasiocarpa (75 al 98%) (Figura 8).

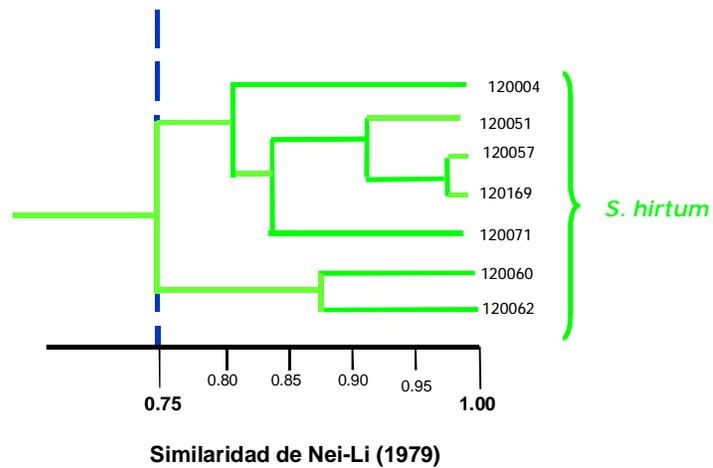


Figura 8 Fragmento del Dendrograma de similitud para *S. hirtum* utilizando el método de UPGMA con los valores de similitud de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.

S. hirtum, se encuentra ampliamente distribuida desde México hasta el norte de Colombia y Venezuela. Se caracteriza por ser resistente a nemátodos y se cruza fácilmente con *S. quitoense* cuando se usa como progenitor femenino (Bernal *et al.*, 1983). Fue utilizada como parental del híbrido “La Selva”.

El grupo 8. Presenta 7 accesiones de *S. vestissimum*, especie silvestre andina de la sección *Lasiocarpa*, conocido como lulo de la tierra baja (Heiser, 1985). Es importante notar que el análisis detectó duplicados en la colección de lulo, uno de estos casos se puede observar en las accesiones 120170 y 120151 (Figura 9), las cuales resultaron ser la misma accesión.

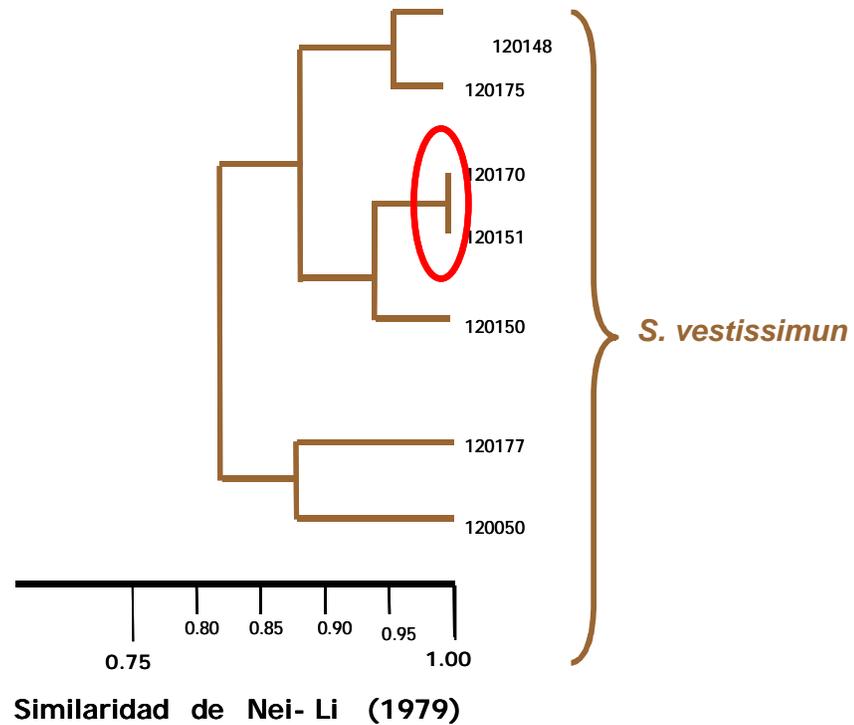


Figura 9 Fragmento del Dendrograma de similaridad para *S. vestissimum* utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP

S. vestissimum, generalmente se encuentra desde la cordillera central de Colombia hasta la costa de Venezuela entre 1.500-2.200 m.s.m.s. Los frutos son grandes pero se encuentran recubiertos por gran cantidad de tricomas cortos y rígidos (Bernal *et al.*, 1983; Heiser, 1985).

El grupo 9. Incluyó las 74 accesiones de *S. quitoense*, especie andina cultivada más conocida de la sección *Lasiocarpa*, 9 híbridos de Heiser y los 4 clones “La Selva”. Como se puede apreciar en la Figura 10.

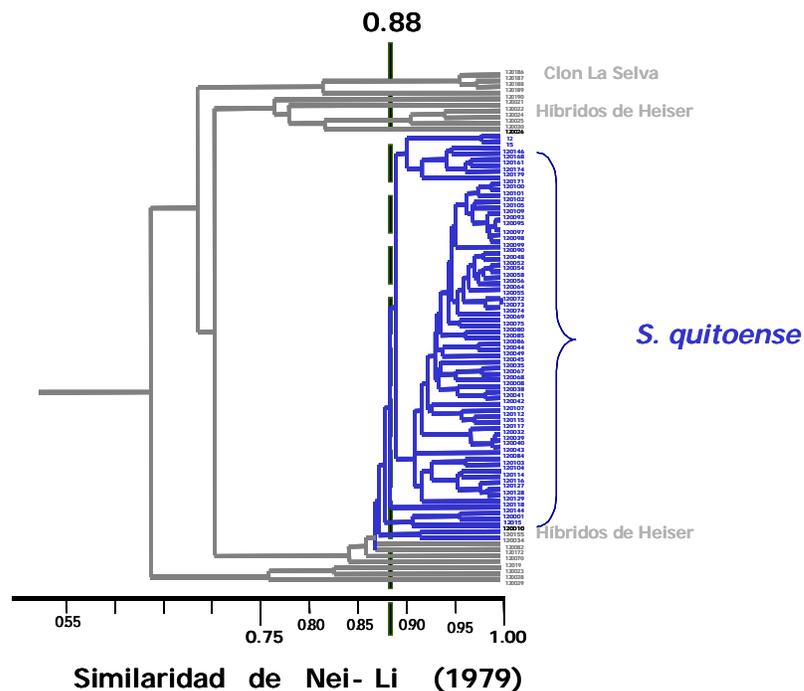


Figura 10 Fragmento del Dendrograma de similaridad para *S. quitoense*, Híbridos de Heiser y clones “La Selva” utilizando el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li producto del análisis de los datos de las dos combinaciones usadas en los AFLP.

Los híbridos “La Selva”, se unen a la especie cultivada (*S. quitoense*) a un nivel de similaridad del 68%, este resultado puede ser explicado debido a que estos clones partieron de un híbrido interespecífico entre *S. quitoense* variedad septentrional colectado en Costa Rica con *S. hirtum* proveniente de Venezuela. Con el fin de eliminar las espinas del híbrido, se hicieron dos retrocruzamientos con *S. quitoense*. Este clon se caracteriza por ausencia de espinas, resistencia a la raza 2 del nemátodo *M. incognita*, mayor adaptabilidad a condiciones de plena exposición solar, frutos de buena calidad y menor oxidación en el jugo. Sin embargo los frutos son pequeños y presentan rajamiento al madurar (Bernal *et al.*, 1998).

Los híbridos de Heiser (Ecuador) se separaron en dos grupos, uno de ellos se une a las accesiones de *S. quitoense* a un nivel de similaridad del 71% y el segundo se aleja de estas accesiones a un nivel de similaridad del 64% (Figura 10). Al analizar los datos de pasaporte se podría pensar que la separación de estos híbridos se pudo deber al grado de hibridación, debido a que los híbridos que más se acercaron a la especie cultivada, presentaron características de domesticación como buen sabor, olor, pulpa verde y pocas semillas, mientras que el otro grupo, se caracterizó por presentar espinas, fruto pequeño, pulpa anaranjada y muchas semillas. Desafortunadamente, los datos de pasaporte de estos materiales están incompletos; solamente se conoce que fueron cruzados con *S. baeza* que es el mismo *S. quitoense* var *quitoense* con especies de la sección *Lasiocarpa*.

Así mismo, en la figura 10 se observa que la mayoría de las accesiones pertenecientes a *S. quitoense* presentaron alta similaridad entre sus individuos (88 y el 100%). Sin embargo, accesiones como 120019, 120170, 1200172 entre otras, fueron las más distantes dentro de este subgrupo, este resultado es promisorio debido a que estas accesiones pueden ser tenidas en cuenta, para aumentar un poco la base genética de esta especie cultivada. Estos resultados, concuerdan con los reportados por Heiser (1972) y Whalen *et al.*, (1981), quienes afirmaron una mínima variabilidad en especie cultivada.

El grupo 10. Incluyó a un híbrido interespecífico natural donde solo se conoce que *S. hirtum* es uno de los padres. Este híbrido, fue incorporado en este estudio debido a que

presenta características deseables tales como frutos grandes, vigor y resistencia a enfermedades (M. Lobo, comunicación personal).

El grupo 11. contiene 7 accesiones que al igual que con los grupos 1 y 2 no pertenecen a la sección *Lasiocarpa*, estos materiales son: *S. capsiciodeo* accesiones (120139 y 120077), *S. mammosum* (120132), *S. margintum* (120136) y *Solanum*. sp (120133, 120134 y 120136). (Figura 11).

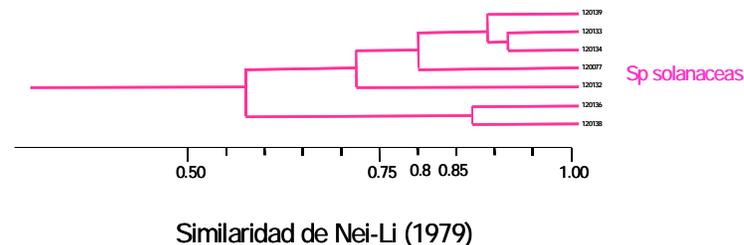


Figura 11 Fragmento del Dendrograma de similaridad mostrando algunas especies del género *solanum*, empleadas como grupo de comparación.

6. 3. 2 Variabilidad genética de *S. quitoense* presente en la Colección

Colombiana de Lulo

El conocimiento de los mecanismos reproductivos de las especies de la sección *Lasiocarpa* y su biología floral (que incluye la apertura de las flores-antesis, dehiscencia de anteras, viabilidad del polen y receptividad del estigma), determina fundamentalmente la estructura genética estas especies. Según trabajos de Whalen & Costich (1986); Miller & Diggle (2003) y Diggle & Miller (2004), todas las especies de la sección *Lasiocarpa* presentan andromonoecia. Sin embargo, el grado de andromonoecia puede variar entre especies y dentro de la misma especie (plasticidad). Por lo tanto, estos conocimientos

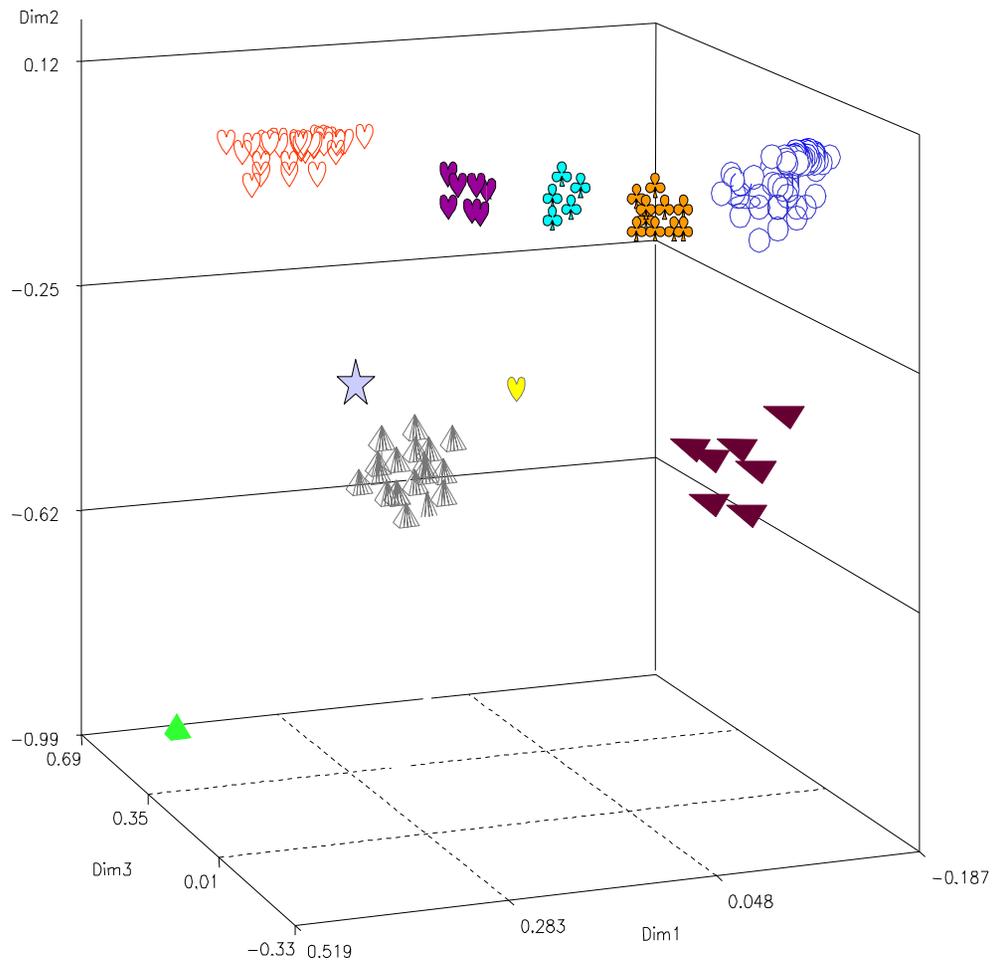
aportarán criterios para entender la variabilidad presentada por estas especies tanto en condiciones naturales como de cultivo.

Según trabajos de Bernal *et al.*, Las especies de la sección *Lasiocarpa* son alógamas. Para el caso de *S. quitoense*, se hubiera esperado que su base genética fuera más amplia a la observada (0.88 –1.00% de similaridad), por ser Colombia uno de los sitios de origen y de diversificación de la especie, también, por que esta especie se encuentra en un proceso intermedio de domesticación (presenta algunas características de silvestre), Sin embargo, este hecho puede ser explicado debido a que la mayoría de las accesiones de *S. quitoense*, se colectaron en fincas del Sur occidente Colombiano en los departamentos del Valle de Cauca, Cauca, Nariño y Putumayo y la forma de propagación de estos materiales fue por medio de estacas, en otras palabras, las plantas propagadas vegetativamente reproducen, toda la información genética de la planta progenitora (M. García, comunicación personal). Por consiguiente las accesiones evaluadas de *S. quitoense*, no son representativas de toda la zona de distribución de la especie. Por lo tanto, es preciso aprovechar el germoplasma existente en los diferentes acervos genéticos intraespecíficos e Inter-específicos, Heiser (1989), presumen que *S. quitoense* puede hibridarse con otras especies de la sección *Lasiocarpa* como *S. pectinatum*, *S. pseudolulo*, *S. sessiliflorum*, *S. straminifolium*, *S. hirtum* y *S. vesstisimum*. En algunos casos (*S. quitoense* x *S. sessiliflorum*) el porcentajes de hibridación fue superior al 50%, lo que indica que *S. quitoense* puede cruzarse inclusive con especies Amazonicas. También es necesario, para el enriquecimiento de la base genética de *S. quitoense* colectar en otras regiones donde la especie se ha difundido.

6. 4 Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM)

Este análisis es una técnica descriptiva de análisis multivariado que permite en forma gráfica visualizar las relaciones existentes entre grupos de individuos. Una característica que resalta de este análisis es que a diferencia del análisis de similaridad que da igual peso a todas las bandas, el ACM le da más peso a las bandas únicas, este análisis corroboró gran parte lo observado en el análisis de similaridad. Para este estudio, tres dimensiones explicaron la mayor parte de la variación entre las accesiones estudiadas. Además, la estructura se visualiza mejor en un espacio tridimensional como se puede apreciar en la figura 12.

En la Figura 13 (Vista desde arriba) se puede observar más evidente la distribución de las siete especies de la sección *Lasiocarpa* en forma de grupos discretos en un espacio tridimensional. En la primera dimensión se diferencia claramente la separación de *S. sesiliflorum* y *S. straminifolium* de las especie de comparacion. En la segunda dimensión establece una diferencia marcada de todas las especies andinas de la sección *Lasiocarpa* y en la tercera dimensión se puede observar la separación entre la agrupación de *S. quitoense*. Los Clones “La Selva” y los híbridos del Ecuador y las especies utilizadas como grupo de comparación



- S. quitoense*
- S. pseudolulo*
- S. hirtum*
- S. pectinatum*
- S. vestissimum*
- S. sessiliflorum*
- S. stramonifolium*

Figura 12 Gráfico tridimensional derivado del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de todas las accesiones evaluadas en este estudio (Vista frontal).

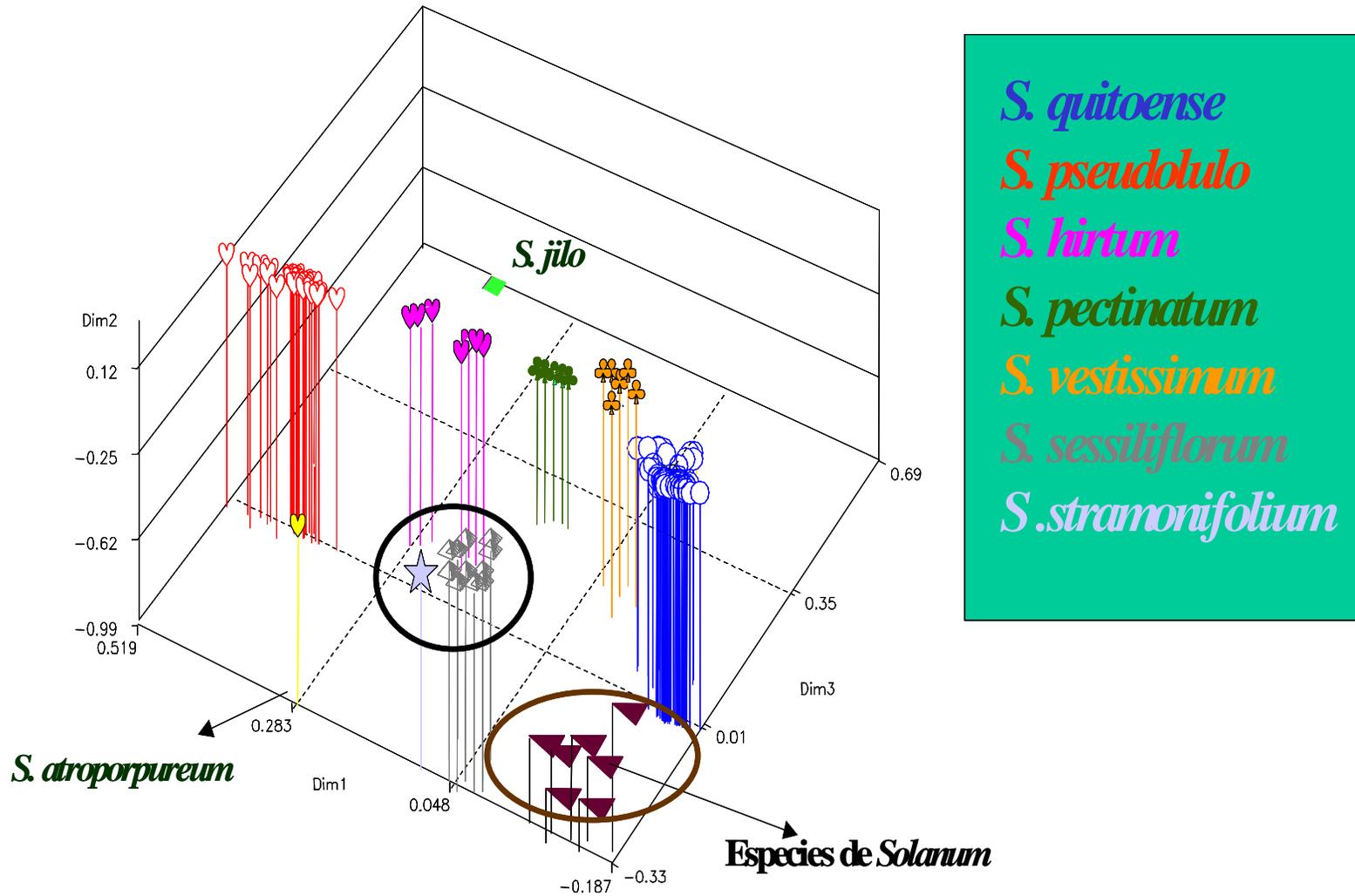


Figura 13 Gráfico tridimensional derivado del análisis de correspondencia múltiple (ACM) de todas las accesiones evaluadas en este estudio (Vista desde arriba).

6. 5 Análisis de Neighbor-Joining

De las 159 accesiones analizadas en los marcadores moleculares con los AFLP, se excluyeron del análisis aquellas accesiones no informativas que pudieran de una u otra forma sesgar el resultado. *S. jillo* fue la especie utilizada para enraizar el árbol siguiendo el criterio de “grupo externo” (“out grup”). Adicionalmente, los nodos del respectivo árbol, fueron evaluados a través de “bootstrap” con 1.000 réplicas para distancia y verosimilitud. Es importante, mencionar que el árbol generado a través del análisis del “vecino más próximo” obtenido a partir de la matriz de similaridad de Nei-Li (1979), no se muestra debido a que revela una estructura muy similar a la obtenida con el análisis de similaridad de Nei-Li. Sin embargo, los valores del “bootstrap” (análisis de remuestreo) se encuentran representados sobre las ramas del árbol de similaridad usando el método de unión media aritmética no ponderada “UPGMA” disponible igualmente en el programa PAUP 4.0 (Figura 14).

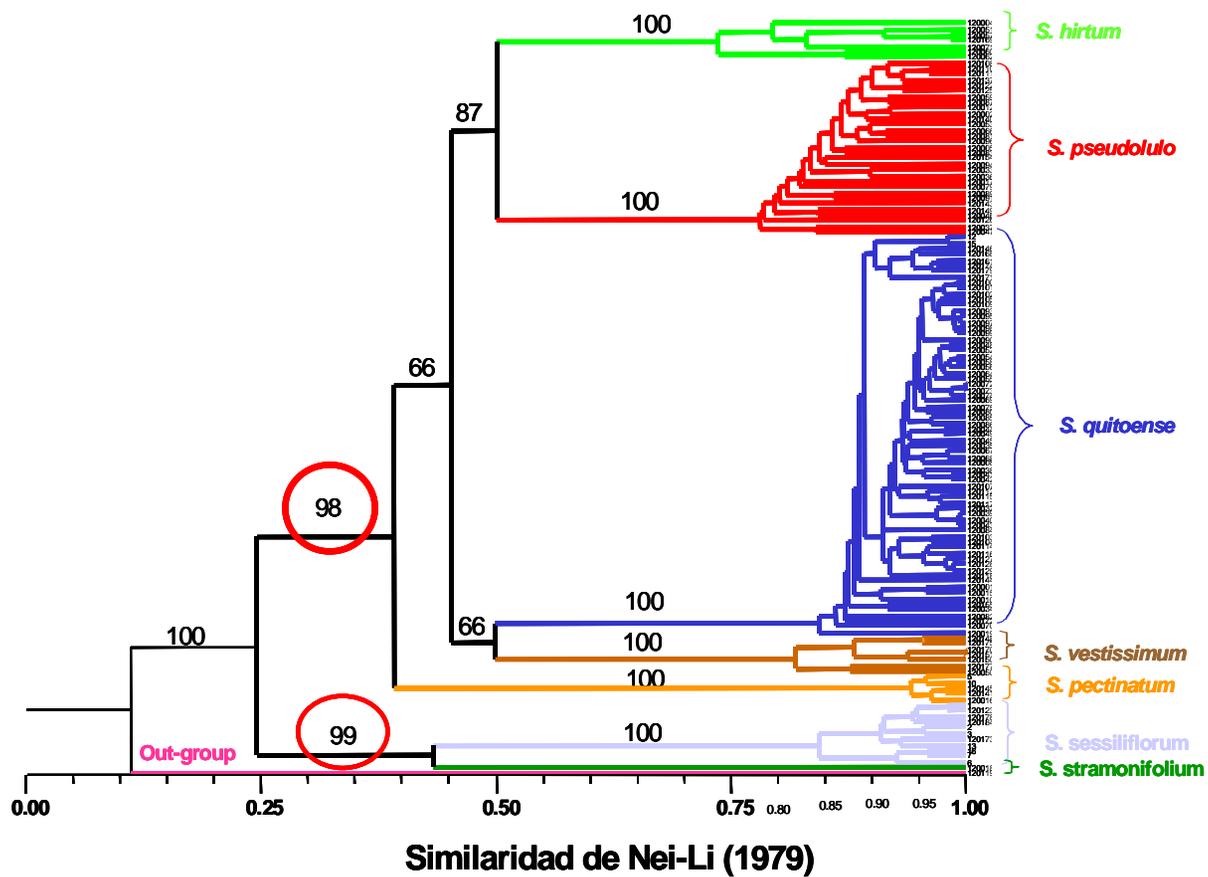


Figura 14 Dendrograma de similaridad construido mediante el método de UPGMA con los valores de similaridad de Nei-Li, disponible en el PAUP 4.0. Los valores de 1000 réplicas del “bootstrap” están representados sobre las ramas.

Varios puntos de discusión surgen de acuerdo de acuerdo a la estructura presentada en la figura 13:

- Un aspecto importante que sobresale de este análisis es el hecho de que las 7 especies estudiadas de la sección *Lasiocarpa*, presentan valores de “bootstrap” de 100%, lo que indica que el soporte de cada rama para cada una de las especies se encuentra bien representado.
- En general la estructura representada en la figura 14, es congruente con la caracterización morfológica e isoenzimática realizada por Whalen *et al* (1981) y Whalen & Caruso (1983), respectivamente. Sin embargo, no concuerda con el estudio realizado por Bruneau *et al* (1995). Estas discrepancias entre estos dos estudios pueden residir principalmente en el tipo de ADN analizado. Mientras que Bruneau *et al* (1995) emplearon ADNcp, una estructura altamente conservada, el cual se utiliza para obtener información más precisa acerca de la historia evolutiva de las especies utilizadas, en este estudio, se empleó ADN nuclear una estructura relativamente más dinámica que puede enmascarar procesos evolutivos, debido a que se pueden reflejar eventos de recombinación y flujo de genes. .
- El grupo formado por todas las especies andinas de la sección *Lasiocarpa*, presenta tres subgrupos. El primer sub-grupo conformado por *S. hirtum* y *S*

pseudolulo, la cual se encuentra soportado por una rama muy fuerte (87%), lo hace suponer que estas dos especies se encuentran muy relacionadas entre sí. Resultado similar fue encontrado por diferentes estudios filogenéticos realizados por Whalen *et al* (1981) y Whalen & Caruso (1983). El segundo subgrupo lo conforman *S. quitoense*, y *S. vestissimum* con un valor de “bootstrap” de 66%. Por ultimo, un tercer subgrupo que lo conformó *S. pectinatum*.

- Es importante, mencionar que *S. pectinatum* no esta incluida en el análisis morfológico realizado por Whalen *et al.*, (1981). Debido a que esta especie no poseía tricomas sobre los tallos, característica común de todos los miembros de la sección Lasiocarpa, lo cual contrasta con los trabajos de Whalen & Caruso (1983) y Bruneau *et al* (1995), que incluyen a esta especie. Cabe destacar que en el análisis isoenzimático realizado por Whalen & Caruso (1983), los autores encontraron que *S. pectinatum* esta muy relacionada con *S. quitoense*, hipótesis soportada por previos estudios con flavonoides, Sin embargo, en el análisis combinado (Morfologico, isoenzimático y ADN de cloroplasto) realizado por Bruneau *et al* (1995), no encuentran tal relación.

- Otro grupo importante que resalta de este análisis es el conformado por las especies amazónicas (*S. sessiliflorum* y *S. stramonifolium*) con un valor de “bootstrap” de 99%,

7. CONCLUSIONES

- El análisis permitió detectar una importante diversidad entre las especies de la sección *Lasiocarpa* (Silvestres) evaluadas, resultado de gran importancia para la valoración de los recursos genéticos, dada la posibilidad de su utilización en el mejoramiento de especies cultivadas.
- Tanto el análisis de similaridad de Nei- Li como el análisis de correspondencia múltiple mostraron claramente la separación entre las especies Andinas (*S. quitoense*, *S. hirtum*, *S. pseudolulo*, *S. vestissimum* y *S. pectinatum*) de las Amazónicas (*S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum*). Resultado similar fue encontrado por Bruneau *et al.* (1995).
- Al interior de *S. quitoense* (Cultivada), se evidenció una tasa de similaridad de Nei entre 85 y 100%, por lo cual se hace necesario ampliar su base genética.
- El análisis no permitió discriminar entre las dos variedades de *S. quitoense* (variedad quitoense y septentrional). Es necesario para futuros estudios el empleo de marcadores moleculares de tipo codominante (microsatélites), que permitan ampliar y profundizar si realmente existe esta discriminación entre estas dos variedades. Las accesiones de *S. quitoense* 120072 y 120073 y 120170 y la 120151 de *S. vestissimum* presentaron altas tasas de

similaridad (88% -100%) con las dos combinaciones de AFLP analizadas, lo que sugiere la presencia de duplicados.

- El análisis de correspondencia múltiple (ACM) corroboró lo observado en el análisis de similaridad de Nei-Li, para este estudio, tres dimensiones (Eje X, Y y Z), fueron suficientes para explicar la mayor parte de la variación entre las accesiones estudiadas.
- El análisis de neighbor-Joining mostró valores de “bootstrap” (análisis de remuestreo) de 100%, lo que indica que el soporte de cada rama para las especies estudiadas de la sección *Lasiocarpa* se encuentra bien representado.

8. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionaron un primer acercamiento a la caracterización molecular de 159 accesiones de la Colección Colombiana de lulo. Sin embargo es necesario ampliar y profundizar los estudios a nivel de este grupo de especies. El empleo de marcadores moleculares de tipo codominante como los microsatélites o estudios de secuenciación de genes de cloroplasto, podrían revelar nuevas visiones acerca de las relaciones filogenéticas dentro de este grupo, es recomendable que estos estudios sean continuos para dar mayor confiabilidad a los resultados. Es necesario para futuros estudios, ampliar el número de accesiones en aquellas especies silvestres de la sección *Lasiocarpa* que no fué posible incluir en este estudio.

Es necesario disponer de una información descriptiva del material, debidamente organizada, para conocer qué existe almacenado y sus características. Sin esta información los mejoradores no podrían hacer uso de este material y estaríamos conservando por conservar. Además una información detallada también nos permitiría conocer si las nuevas accesiones que van entrando se encuentran conservadas en el banco, de no ser así, se estaría ocupando espacio, desperdiciando dinero y recursos para la conservación de otros materiales que pueden ser de interés para el mejorador.

Es necesario complementar los estudios de caracterización (morfo-agronómicos y molecular) de la Colección Colombiana de Lulo, para así lograr establecer estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, dilucidar relaciones filogenéticas y taxonómicas actualmente existentes. También, se podrá dar soporte a programas de mejoramiento genético y así poder contar en un futuro cercano con materiales promisorios que suplan las necesidades de consumo nacional e internacional.

9 BIBLIOGRAFÍA

- ACQUADRO, A., PORTIS, E & LANTERI, S. 2002. Development of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) using Microsatellite-Amplified Fragment Length Polimorphism (M-AFLP). *Capsicum and Eggplant Newsletter* 21: 25-28.
- ANDERSON, G. J., AND D. E. SYMON. 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43: 204–219.
- BASSAM, B., CAETANO- ANOLLES, G & GRESSHOFF, P. 1991. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- BERNAL, J., LOBO, M Y LONDOÑO, M. 1998. Documento de presentación del material “Lulo La Selva”. Corpoica. Rionegro, junio de 1998. 77p.
- BERNAL, J., CORDOBA, O., FRANCO, G., LONDOÑO, M., RODRIGUEZ, J Y GUEVARA N. 1996. Cultivo de Lulo (*Solanum quitoense*). En; Memorias 1r Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales, Octubre 11- 11 del 1996. P 61-79.
- BERNARDELLO, L., M; HEISER, C & PIAZZANO, M. 1994. Karyotypic studies in *Solanum* section of *Lasiocarpa* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 81:95-103.
- BRUNEAU, A., DICKSON, E & KNAPP, S. 1995. Congruence of chloroplast the DNA restriction site characters with morphological and isozyme data in *Solanum* sect *Lasiocarpa*. *Canadian Journal of Botany* 73:1151-1167.
- CAICEDO, A., GAITAN, E., DUQUE, M., TORO, O., DEBOUCK, D & TOHME, J. 1999. AFLP Fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and Related Wild Species from South America. *Crop Science* 39:1497-1507.
- CARMONA, R. 2003. El Cultivo del Lulo (*Solanum quitoense* Lam). En; Memorias Curso de Actualización Manejo del Cultivo de Lulo. Chía, 28 de Noviembre de 2003. P 65.
- CHRISTIAN, W., BACHEM RUGTER, V., DE BRUIJN, S., VREUGDENHIL, D., ZABEAU, M & VISSER, R. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* 9: 745.
- DEL CORRAL, A. 1998. Propagación *in vitro* del Lulo “La Selva” en: Memorias En; Memorias del 2r Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de

Desarrollo Tecnológico de Frutales. Manizales, Agosto 12 al 14 del 1998. P 179-181.

DIGGLE P & MILLER, J. 2004. Architectural effects mimic floral sexual dimorphism *In Solanum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 91: 2030–2040..

DELLAPORTA, S., WOOD, J & HICKS, J. 1993 *Plant Molecular Biology Report* . 1:19-21.

DENIS, F., HERNER, R & CAMACHO, S. 1985. Naranjilla: a potencial cash Crop for the Small farmer in Latin América. *Acta Horticultura. International Society for Horticultural Science*. 475-481.

DURAN, S. 1988. Cultivo del lulo. Secretaria de Agricultura de Antioquia. Medellín 55-61.

FAO. 1996. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura: Plan de acción mundial e informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia. 10p.

FERREIRA, M Y GRATTAPAGLIA, D.1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEM, Documento 20. Brasilia D. F. 220p.

GARCIA, E. Y GARCIA, M. 1985 Colección y establecimiento de un banco de germoplasma en lulo, *Solanum quitoense* Lam y especies relacionadas con el sur occidente Colombiano, Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 103 pp.

HEISER, C. 1972. The relationships of the naranjilla (*Solanum quitoense*) and their relatives. *Biotropica* 4:77-84.

HEISER, C. 1985. Ethnobotany of the Naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. *Economic Botany* 39:4-11.

HEISER, C. 1987. Origins of *Solanum lasiocarpum* and *S. repandum*. *American Journal of Botany* 74:1045-1048.

HEISER, C. 1989. Artificial hybrids in *Solanum* Sect.Lasiocarpa. *Systematic Botany* 14:3-6.

HEISER, C. 1993. The naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hibrid. Gen conservation and Explotation. Edited by J. P. Gustafson et al., Plunum Press, Nueva York.. 29-34

HEISER C & ANDERSON, G. 1999. "New" Solanums. *In*: Perspectives on New Crops and New Uses (Janick, J.edit.)ASHS Press, Alexandri, VA, USA. P. 379-384.

LANTERI, S., ACQUADRO, A., QUAGLIOTTI, L & PORTIS, E. 2003. RAPD and AFLP assessment of genetic variation among and within populations of a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in North-West Italy. Genetic Resources and Crop Evolution: 50: 723-735.

LOBO M., GIRARD, E., JARAMILLO J Y JARAMILLO, G. 1983. El cultivo del lulo o naranjilla. ICA Informa 17: 10-21.

LOBO M Y MEDINA, C. 1999. Lulo o naranjilla (*Solanum quitoense*) frutal andino con potencial de desarrollo. Corpoica, Documento de trabajo.

LOBO, M. 2000. Papel de la variabilidad genética en el desarrollo de los frutales andinos como alternativa productiva. *En*; Memorias 3r Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. Manizales, Noviembre 15 al 17 del 2000.P. 27-36.

LOBO, M Y MEDINA, C. 2000. Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *In*: Caracterizacao de frutas nativas da América Latina. FUNEP. Edicao comemorativa do 30° Aniversario da Sociedade Brasileira de Fruticultura. P. 41-43.

NEI, -LI. 1979. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 76: 5269-5273.

MILLER, J. S & DIGGLE P. 2003. Diversification of andromonoecy in *Solanum* section Lasiocarpa (Solanaceae): the roles of phenotypic plasticity and architecture. American Journal of Botany 90: 707–715.

MORELL, M., PEAKALL, R., APPELS, R., PRESTON, L & LLOYD, H. 1995. ADN profiling techniques for plant variety identification. Aust. J. Exp. Agric. 35:807-819.

MORTON, J. 1987. In: Frutis of warm climates. [on línea] available in: el http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/naranjilla_ars_el.html

PROMEGA. 1998. Technical manual. Silver sequence TM DNA sequencing system. Promega Corporation. Madinson. p. 1-19.

RODRÍGUEZ, M. E. 2000. Caracterización Molecular por AFLPs de germoplasma de *Capsicum* spp. Colectado en la Amazonía Colombiana. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 81 p.

ROLPH, F. 1993. NTSYS, PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02j. Exeter Publ., Setauket, TY.

SALIBA-COLOMBANI, V., CAUSSE, M., GERVAIS, L & PHILOUZE, J. 2000. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Génome* 43: 29-40.

SAS Institute. 1989. SAS/SAT users guide. 6th ed. SAS Institute. Cary, CN.

SCHULTER, H & CUATRECASAS, J. 1958. Note on the lulo. Harvard University, Botanical Museum Leaflet. 16: 97-105.

SEGOVIA, V. 2002. Optimización de la regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) orientada a la transformación genética de plantas. Tesis de Maestría. Universidad Internacional de Andalucía. España. 74 p.

SISTEMA DE INFORMACIÓN ESTRATÉGICA PARA EL SECTOR AGROALIMENTARIO, 2000 (SIESA). Lulo; Información básica por producto.

TAMAYO, P. 2001. Principales enfermedades del tomate de árbol. la mora y el lulo en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Regional 4, Centro de Investigación "La Selva" Rionegro. Antioquia. Boletín Técnico 12, 44 p.

TOQUICA, S., RODRÍGUEZ, F., MARTÍNEZ., DUKE, M & TOHME, J. 2003. Molecular Characterization by Aflp of *Capsicum* Germplasm from the Amazon Department in Colombia, Characterization by Aflp of *Capsicum*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 639-647.

TORRE, R & CAMACHO, S. 1981. Campesino Fitomejorador de Naranjilla. Carta de frutales. No 14. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Quito Ecuador.

TOVAR, E. 2001. Caracterización de la diversidad genética de la colección núcleo de *Phaseolus Greenman* mediante el uso de Aflp's. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. D. C. 162 p.

VALENCIA, O Y FERNÁNDEZ, R. 1998 Memorias. Ajuste de protocolo para medios de cultivo de frutales de clima frío, Mora (*Rubus glucus*), Lulo (*Solanum quitoense*) y Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). En; Memorias del 2º Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. Manizales, Agosto 12 al 14 del 1998. P 171-177.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T & HORNES M. 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*. 23:4407-4414.

WHALEN M, D., COSTICH, D & HEISER, C. 1981. Taxonomy of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. *Gentes Herbarum* 12: 41-129.

WHALEN, M & CARUSO, E. 1983. Phylogeny in *Solanum* sect. *Lasiocarpa* (Solanaceae): congruence of morphological and molecular data. *Systematic Botany* 8:369-380.

WOLF, L. 1976. El cultivo del lulo o naranjilla In: Seminario de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Medellín.

WHALEN, M. & COSTICH, D 1986. Andromonoecy in *Solanum*. In W. G. D'Arcy [ed.], *Solanaceae: biology and systematics*, 284–302. Columbia University Press, New York, New York, USA.

10 ANEXOS

DATOS DE PASAPORTE DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Accesión	Especie	Est Biológico	Localidad	País	Colector/Fuente
120001	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado			Botanical Garden
120002	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Cartago, Turrialpa	Costa Rica	Botanical Garden
120003	<i>S. ferox</i>	Arvence			Botanical Garden
120004	<i>S. hirtum</i>	Cultivado			Botanical Garden
120005	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Cartago, Turrialpa	Costa Rica	CATIE
120008	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado			Botanical Garden
120010	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado			
120012	<i>S. pseudolulo</i>	Cultivado			
120013	<i>S. ferox</i>	Cultivado			Botanical Garden
120015	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado			Botanical Garden
120016	<i>S. pectinatum</i>	Arvence			Botanical Garden
120017	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence			
120018	<i>S. stramonifolium</i>	Arvence		Perú	Botanical Garden
120019	<i>S. quitoense</i>	Arvence	Buenos Aires	Brasil	CATIE
120021	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120022	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120023	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120024	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120025	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120026	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120027	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120028	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120029	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120030	Híbrido	Cultivado		Ecuador	Heiser. C.
120032	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Sta Marta	Colombia	
120033	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence		Ecuador	Heiser. C.
120034	<i>S. quitoense</i> Var. sep	Arvence	Rionegro, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120035	<i>S. quitoense</i> Var. sep	Arvence	Rionegro, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120036	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence		Ecuador	Heiser. C.
120037	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence			
120038	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Sonson, Antioquia	Colombia	López. L.
120039	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Magdalena	Colombia	López. L.
120040	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120041	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Palmira, Valle	Colombia	García. M.
120042	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Palmira, Valle	Colombia	García. M.
120043	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Palmira, Valle	Colombia	García. M.
120044	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Pasto, Nariño	Colombia	García. M.
120045	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Sibundoy,	Colombia	García. M.
120046	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence			
120047	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120048	<i>S. quitoense</i> Var. Quit	Cultivado	Buenaventura, Valle	Colombia	García. M.
120049	<i>S. quitoense</i> Var. Quit	Cultivado	Antioquia	Colombia	Navarro. G.
120050	<i>S. vestissimum</i>	Cultivado	Antioquia	Colombia	Rivera. L.
120051	<i>S. hirtum</i>	Arvence		Venezuela	Heiser. C.

Accesión	Especie	Est Biológico	Localidad	País	Colector/Fuente
120052	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Popayán, Cauca	Colombia	García. M.
120054	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Arvence	Guatapé, Antioquia	Colombia	Mediana. C.
120055	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Huila	Colombia	Álvarez. L.
120056	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Santa Rosa, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120057	<i>S. hirtum</i>	Arvence	Rionegro, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120058	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Urrao, Antioquia	Colombia	Vélez. J.
120059	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Antioquia	Colombia	
120060	<i>S. hirtum</i>	Arvence	Caracas	Venezuela	Heiser. C.
120062	<i>S. hirtum</i>	Arvence	Caracas	Venezuela	Heiser. C.
120064	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Rionegro, Antioquia	Colombia	Ceballos. L.
120066	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	El Carmen, Choco	Colombia	
120067	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Antioquia	Colombia	
120068	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	San Cose	Costa Rica	Heiser. C.
120069	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Marinilla, Antioquia	Colombia	Rivera. A.
120071	<i>S. hirtum</i>	Arvence	Aguadas, Santander	Colombia	Lobo. M.
120072	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Arvence	Villa de Leiva, Boyacá	Colombia	Lobo. M.
120073	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Represa del Peñol	Colombia	Gomez. L.
120074	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Ciénaga Magdalena	Colombia	López, F.
120075	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Santiago, Putumayo	Colombia	López. L.
120077	<i>S. capsicoide</i>	Cultivado	Armenia, Quindío	Colombia	López. F.
120079	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Yarumal, Antioquia	Colombia	Berna. J.
120080	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Charara, Santander	Colombia	
120081	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Villa Maria, Caldas	Colombia	Bernal. J.
120082	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Yarumal, Antioquia	Colombia	Bernal. J.
120083	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Cunday, Tolima	Colombia	López. L.
120084	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Cúcuta	Colombia	
120085	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Palmira, Valle	Colombia	García. M.
120086	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Sibundoy, Putumayo	Colombia	García. M.
120087	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Sibundoy, Putumayo	Colombia	García. M.
120089	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Pasto, Nariño	Colombia	García. M.
120090	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Pasto, Nariño	Colombia	García. M.
120091	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Pance Cali, Valle	Colombia	García. M.
120093	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120094	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120095	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120096	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120097	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120098	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120099	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120100	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Palmira, Valle	Colombia	García. M.
120101	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Timba, Cauca	Colombia	García. M.
120102	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Timba, Cauca	Colombia	García. M.
120103	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Timba, Cauca	Colombia	García. M.
120104	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Timba, Cauca	Colombia	García. M.
120105	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Cali, Valle	Colombia	García. M.

Accesión	Especie	Est Biológico	Localidad	País	Colector/Fuente
120109	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Jamundi, Valle	Colombia	García. M.
120110	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Belmira, Antioquia	Colombia	López. L.
120111	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Antioquia	Colombia	Mediana. C.
120112	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Antioquia	Colombia	Mediana. C.
120114	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Neira, Caldas	Colombia	Álvarez. L.
120115	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	San José, Huila	Colombia	Álvarez. L.
120116	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Florencia, Caquetá	Colombia	Zapata. L.
120117	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	S. Bernardo, Cundinamarca	Colombia	Correa. R.
120118	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	S. Bernardo, Cundinamarca	Colombia	Correa. R.
120119	<i>S. jilo</i>	Cultivado	Riío de Janeiro	Brasil	Mediana. C.
120122	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Rionegro, Antioquia	Colombia	Arango, J.
120123	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Choco		
120125	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120126	<i>S. pseudolulo</i>				
120127	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	S. Occidente del País	Colombia	
120128	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Huila	Colombia	Bernal. J.
120129	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado	Chia, Cundinamarca	Colombia	
120132	<i>S. mamosum</i>	Arvence	Chigorodo	Colombia	
120133	<i>S. ornamental</i>	Arvence	Dovio, Valle	Colombia	García. M.
120134	<i>S. ornamental</i>	Arvence	San Pedro, Valle	Colombia	García. M.
120136	<i>S. marginatum</i>	Arvence	Bogota, Cundinamarca	Colombia	
120137	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Buenaventura, Valle	Colombia	
120138	<i>S. sp</i>	Arvence	Cocho	Colombia	Ríos. D.
120139	<i>S. capsicoide</i>	Arvence	Caldas	Colombia	
120140	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Zona Cafetera		
120141	<i>S. pectinatum</i>	Arvence	Meta	Colombia	
120142	<i>S. atroporpureum</i>	Arvence			
120143	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Medellín, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120144	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Rionegro, Antioquia	Colombia	
120145	<i>S. pectinatum</i>	Arvence		Colombia	Vélez. J.
120146	<i>S. quitoense</i> Var. sept	Cultivado			
120148	<i>S. vestissimum</i>	Arvence	Murillo, Tolima	Colombia	Mediana. C.
120149	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Medellín, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120150	<i>S. vestissimum</i>	Cultivado	Caldas	Colombia	Álvarez. L.
120151	<i>S. vestissimum</i>	Arvence	Envigado, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120154	<i>S. pseudolulo</i>	Arvence	Medellín, Antioquia	Colombia	Lobo. M.
120155	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Antioquia	Colombia	Reyes. C.
120161	<i>S. quitoense</i> Var. quit	Cultivado	Silvania, Cundinamarca	Colombia	Bernal, J
120168	<i>S. quitoense</i>	Cultivado	Sibundoy, Putumayo	Colombia	García. M.
120169	<i>S. hirtum</i>	Arvence	Sta Fe de Antioquia	Colombia	
120170	<i>S. vestissimum</i>	Arvence	El Retiro, Antioquia	Colombia	
120171	<i>S. quitoense</i>	Cultivado	Macanal, Boyacá	Colombia	Lobo. M.
120172	<i>S. quitoense</i>	Cultivado	Sn/José de Alban, Nariño	Colombia	
120173	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado		Costa Rica	
120174	<i>S. quitoense</i>	Cultivado		Costa Rica	CATIE

Accesión	Especie	Est Biológico	Localidad	País	Colector/Fuente
120175	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Planada, Tolima	Colombia	Rozo. J.
120177	<i>S. vestissimum</i>	Arvence	Caldas	Colombia	Lobo. M.
120178	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Urrao, Antioquia	Colombia	
120179	<i>S. quitoense</i>	Cultivado		Costa Rica	CATIE
120184	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado		Perú	
120186	Híbrido	Arvence		Colombia	Lobo. M.
120187	Híbrido	Cultivado		Colombia	Lobo. M.
120188	Híbrido	Cultivado		Colombia	Lobo. M.
120189	Híbrido	Cultivado		Colombia	Lobo. M.
120190	Híbrido	Cultivado		Colombia	Lobo. M.
1	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Puerto Inírida	Colombia	Rodríguez. F.
2	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Puerto Inírida	Colombia	Rodríguez. F.
3	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Puerto Inírida	Colombia	Rodríguez. F.
5	<i>S. pectinatum</i>	Arvence	Vichada	Colombia	Rodríguez. F.
6	<i>S. quitoense</i>	Cultivado	Vichada	Colombia	Rodríguez. F.
7	<i>S. quitoense</i>	Cultivado		Colombia	Rodríguez. F.
10	<i>S. pectinatum</i>	Arvence		Colombia	Rodríguez. F.
12	<i>S. quitoense</i>	Cultivado		Colombia	Rodríguez. F.
13	<i>S. sessiliflorum</i>	Cultivado	Choco	Colombia	Sánchez. I.
15	<i>S. quitoense</i>	Cultivado		Colombia	Sánchez. I.

11 Lista de abreviaturas

- ACM = Análisis de correspondencia múltiple.
- AFLP = Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados.
- LSSRs = microsatélites.
- Neighbor-Joining = Vecino más próximo.
- PAUP 4.0= Phylogenetic Analysis Using Parsimony.
- PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.
- RFLP`s = Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.
- RAPD`s = Polimorfismo de ADN amplificado al azar.