Caracterización Molecular de Parientes Silvestres del Tomate Conservados en el banco de Germoplasma del INIA-Perú.

Molecular Characterization of Tomato Wild Relatives Conserved by INIA-Peru.

Vílchez Dioliza[1], Biondi Jorge[1], Fernández Elizabeth[1]*, Zorrilla Cinthya[2]

[1] Instituto Nacional de Innovación Agraria. Av. La Molina 1981, La Molina

[2] Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina

*E-mail: efernandezh@inia.gob.pe

INTRODUCCIÓN

Las especies de tomate son nativas del oeste de Sudamérica y están distribuidas a lo largo de la costa y los Andes desde Ecuador hasta el norte de Chile. Siendo el Perú el país que presenta la mayor cantidad de especies (11 especies). Los parientes silvestres de cultivares modernos de tomate son una fuente importante de genes de interés agronómico, como resistencia a factores de estrés bióticos y abióticos que vendrían a ser la base para el mejoramiento de especies cultivadas (Peralta *et al.* 2008). Sin embargo, existe poca evidencia de su utilización en programas de mejoramiento genético en el Perú. El Banco de Germoplasma del INIA cuenta con una colección de tomates silvestres donde se conservan 154 accesiones que incluyen a *S. corneliomulleri*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, S. *lycopersicum* var *ceraciforme*, S. *lycopersicum* var *lycopersicum*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*.

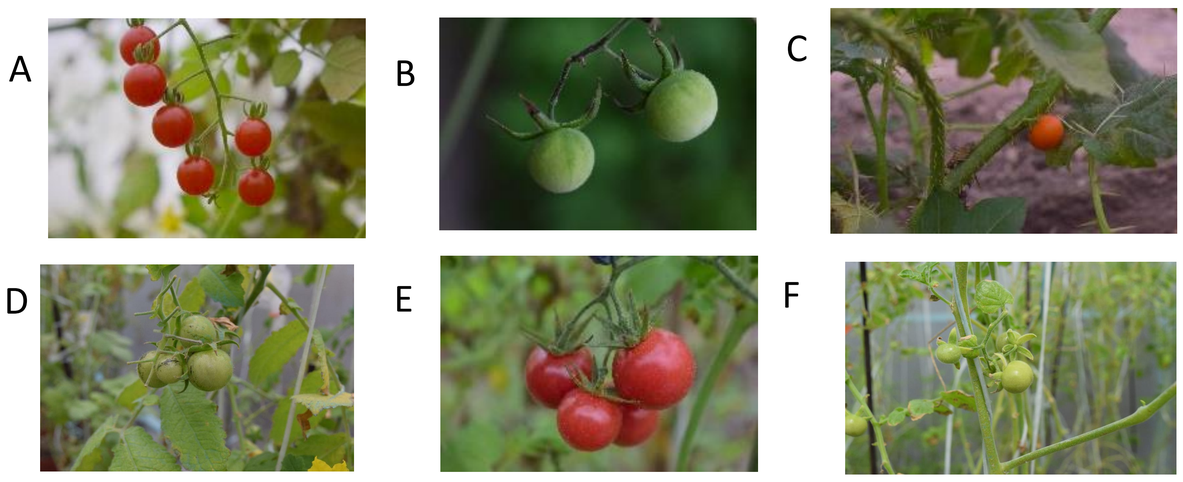

***Figura 1**. Fotografías de frutos de parientes silvestres del Tomate: A. S. pimpinellifolium, B. S. Chmielewskii. C. Otras Solanum. D. S. habrochaites. E. S. Lycopersicum var lycopersicum. F. S. pennellii.*

MATERIALES Y METODOS

Se colectó tejido foliar de 154 accesiones de tomates silvestres de la colección del INIA para extraer por el método CTAB moliendo el tejido en un homgenizador para luego realizar el protocolo de CTAB, obteniendo ADN de buena calidad.

La Digestión del ADN fue realizado con enzimas de restricción Pst I y Mse I incubando 3h a 37°C. La Ligación de adaptadores se realizó con T4 DNA Ligasa, incubando a t° ambiente toda la noche. La amplificación preselectiva se realizó con iniciadores Pst I -00 y Mse I -00. La amplificación selectiva se realizó con 4 combinaciones de iniciadores: 6-FAM PstI + AC- MseI + AGC; NED-PstI + AG- MseI + ACC; VIC-PstI + AG, - MseI + AGT; PET-PstI + CT - MseI + AGG. Los AFLP se corrieron en el analizador Genético ABI 3130XL agregando a cada reacción el marcador standard de peso molecular GenScan 600-LYZ.

La Matriz de Datos generada por el programa Genemapper fue usada para estimar la diversidad genética entre accesiones y entre especies. El análisis de agrupamiento fue realizado usando el algoritmo UPGMA con el software DARwin 6.0. Se realizó también el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el software ARLEQUIN, para estimar la contribución de la variación entre y dentro de la especie.

RESULTADOS

***Tabla 2** Combinación de Iniciadores y número de marcadores polimórficos*

Combinación	Inciciadores	Marcadores Polimorficos
PstI AC + Mse AGC	GAC TGC GTA CAT GCA G **AC 6-FAM**	73
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGC**	
PstI AG + Mse ACC	GAC TGC GTA CAT GCA G **AG NED**	91
	GTA GAG TCC TGA GTA A **ACC**	
PstI AG + Mse AGT	GAC TGC GTA CAT GCA G **AG VIC**	100
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGT**	
PstI CT + Mse AGG	GAC TGC GTA CAT GCA G **CT PET**	52
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGG**	

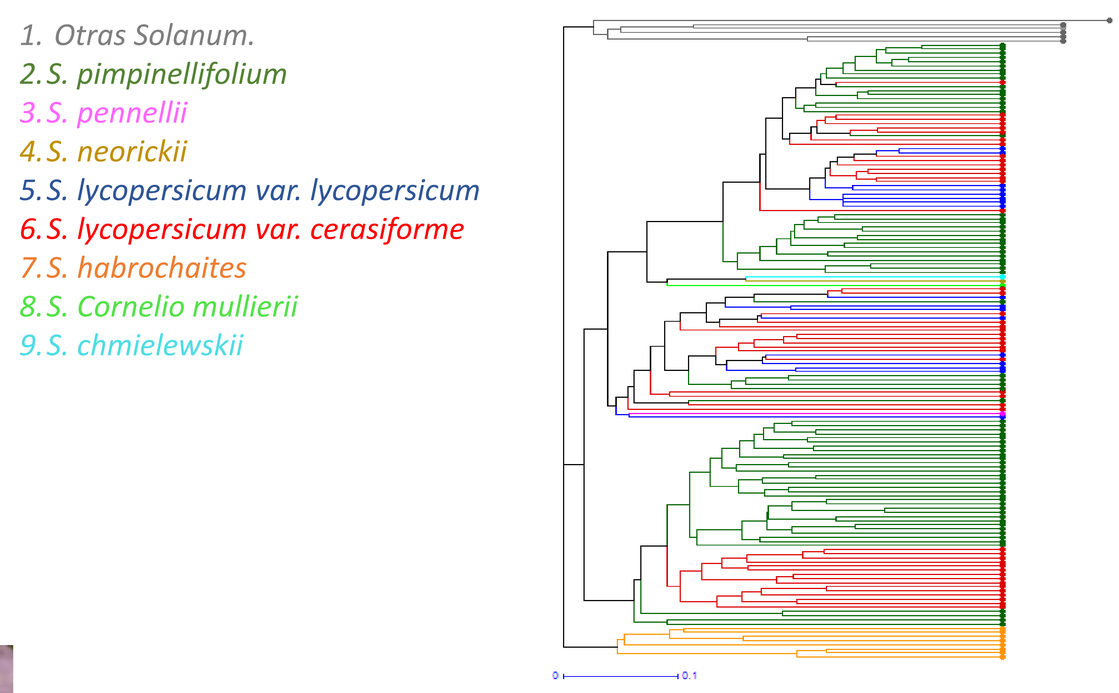

***Figura 2**. Dendrograma formado por 316 marcadores AFLP usando algoritmo UPGMA y el índice de Jaccard, con las 153 accesiones de tomate y sus parientes silvestre conservados en el INIA-Perú.*

Se obtuvieron 316 marcadores AFLP con alto índice de polimorfismo, con las cuatro combinaciones utilizadas (cuadro 1) las cuales fueron altamente informativas. En el dendrograma observamos los agrupamientos en los que se diferencias por especie, *S. habrochaites* se agrupan solas, las otras *Solanum* son diferentes al resto de especies, S. *pimpinelifolium* forman grupos separados pero sólo de esa especie, *S. lycopersicum* var *cerasiforme* y var *lycopersicum* son parecidas entre sí como también observamos en el AMOVA (Tabla 2) que la mayoría de especies son diferentes entre si a excepción de estas dos variedades.

***Tabla 2.** Análisis de Distancias (Fst) de la colección de Tomates silvestres del INIA*

	SOL	PIM	PEN	NEO	LYC	CER	HAB	COR	CHM
SOL	0.00								
PIM	0.22646	0.00							
PEN	0.18125	0.16452	0.00						
NEO	0.26542	0.1458	1.00	0.00					
LYC	0.27454	0.13376	0.14309	0.17503	0.00				
CER	0.21267	0.07956	0.06981	0.14143	0.03485	0.00			
HAB	0.25596	0.23639	0.15746	0.12482	0.29701	0.24853	0.00		
COR	0.3081	0.18602	1.00	1.00	0.19668	0.19504	0.19737	0.00	
CHM	0.29189	0.17037	1.00	1.00	0.21977	0.20567	0.13475	1.00	0.00

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que los marcadores utilizados son útiles para la diferenciación de accesiones a nivel de especie según el análisis de agrupamiento y el análisis de distancias. El Banco Nacional de Germoplasma del INIA conserva 8 especies de tomate y sus parientes silvestres de las 11 que existen en el mundo. Según el AMOVA las variedades de *S. lycopersium* presentan alta similaridad genética entre ellas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es posible gracias al Proyecto PNIA 103_PI, financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lima, Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Peralta, I., Spooner, D., Knapp, S. 2008** *Taxonomy of Wild Tomatoes and their Relatives* (*Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicom; Solanaceae*) Systematic Botany Monographs Volume 84. The America Society of Plant Taxonomist.
- **Spooner, D., Peralta, I., Knapp S. 2005** *Comparison of AFLP with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes* [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) *Wettst.* AFLPs and tomato phylogeny TAXON 54(1).
- **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijams, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995**. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.* Nucl. Acids Res. 23: 4407 – 4414.

Caracterización Molecular de Parientes Silvestres del Tomate Conservados en el banco de Germoplasma del INIA-Perú.

Vílchez Dioliza[1], Biondi Jorge[1], Fernández Elizabeth[1]*, Zorrilla Cinthya[2]

[1] Instituto Nacional de Innovación Agraria. Av. La Molina 1981, La Molina

[2] Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina

*E-mail: efernandezh@inia.gob.pe

INTRODUCCIÓN

Las especies de tomate son nativas del oeste de Sudamérica y están distribuidas a lo largo de la costa y los Andes desde Ecuador hasta el norte de Chile. Siendo el Perú el país que presenta la mayor cantidad de especies (11 especies). Los parientes silvestres de cultivares modernos de tomate son una fuente importante de genes de interés agronómico, como resistencia a factores de estrés bióticos y abióticos que vendrían a ser la base para el mejoramiento de especies cultivadas (Peralta *et al.* 2008). Sin embargo, existe poca evidencia de su utilización en programas de mejoramiento genético en el Perú. El Banco de Germoplasma del INIA cuenta con una colección de tomates silvestres donde se conservan 154 accesiones que incluyen a *S. corneliomulleri*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, S. *lycopersicum* var *ceraciforme*, S. *lycopersicum* var *lycopersicum*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. pimpinellifolium*.

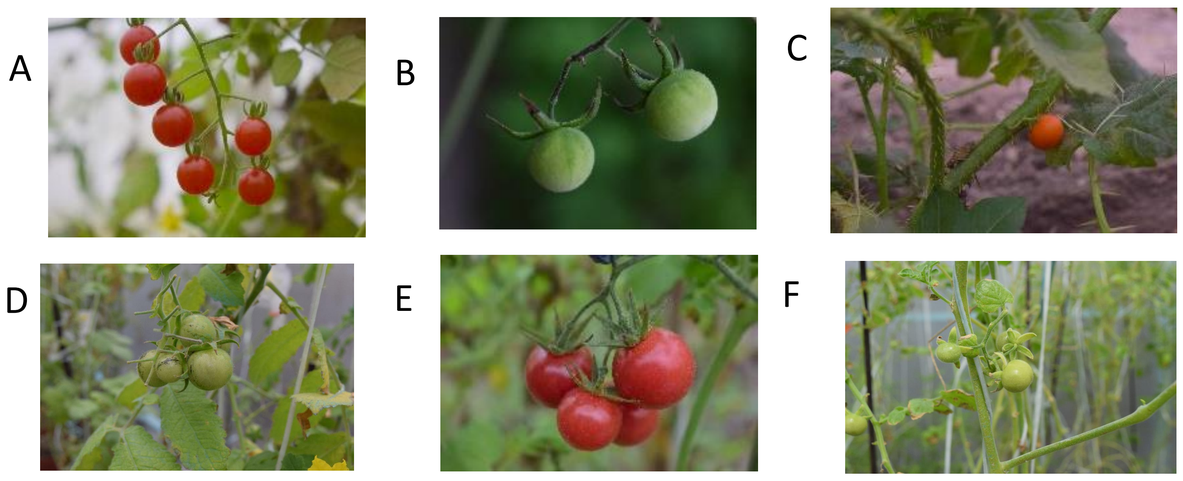

***Figura 1**. Fotografías de frutos de parientes silvestres del Tomate: A. S. pimpinellifolium, B. S. Chmielewskii. C. Otras Solanum. D. S. habrochaites. E. S. Lycopersicum var lycopersicum. F. S. pennellii.*

MATERIALES Y METODOS

Se colectó tejido foliar de 154 accesiones de tomates silvestres de la colección del INIA para extraer por el método CTAB moliendo el tejido en un homgenizador para luego realizar el protocolo de CTAB, obteniendo ADN de buena calidad.

La Digestión del ADN fue realizado con enzimas de restricción Pst I y Mse I incubando 3h a 37°C. La Ligación de adaptadores se realizó con T4 DNA Ligasa, incubando a t° ambiente toda la noche. La amplificación preselectiva se realizó con iniciadores Pst I -00 y Mse I -00. La amplificación selectiva se realizó con 4 combinaciones de iniciadores: 6-FAM PstI + AC- MseI + AGC; NED-PstI + AG- MseI + ACC; VIC-PstI + AG, - MseI + AGT; PET-PstI + CT - MseI + AGG. Los AFLP se corrieron en el analizador Genético ABI 3130XL agregando a cada reacción el marcador standard de peso molecular GenScan 600-LYZ.

La Matriz de Datos generada por el programa Genemapper fue usada para estimar la diversidad genética entre accesiones y entre especies. El análisis de agrupamiento fue realizado usando el algoritmo UPGMA con el software DARwin 6.0. Se realizó también el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el software ARLEQUIN, para estimar la contribución de la variación entre y dentro de la especie.

RESULTADOS

***Tabla 1** Combinación de Iniciadores y número de marcadores polimórficos*

Combinación	Inciciadores	Marcadores Polimorficos
PstI AC + Mse AGC	GAC TGC GTA CAT GCA G **AC 6-FAM**	73
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGC**	
PstI AG + Mse ACC	GAC TGC GTA CAT GCA G **AG NED**	91
	GTA GAG TCC TGA GTA A **ACC**	
PstI AG + Mse AGT	GAC TGC GTA CAT GCA G **AG VIC**	100
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGT**	
PstI CT + Mse AGG	GAC TGC GTA CAT GCA G **CT PET**	52
	GTA GAG TCC TGA GTA A **AGG**	

1. *Otras Solanum.*
2. *S. pimpinellifolium*
3. *S. pennellii*
4. *S. neorickii*
5. *S. lycopersicum var. lycopersicum*
6. *S. lycopersicum var. cerasiforme*
7. *S. habrochaites*
8. *S. Cornelio mullierii*
9. *S. chmielewskii*

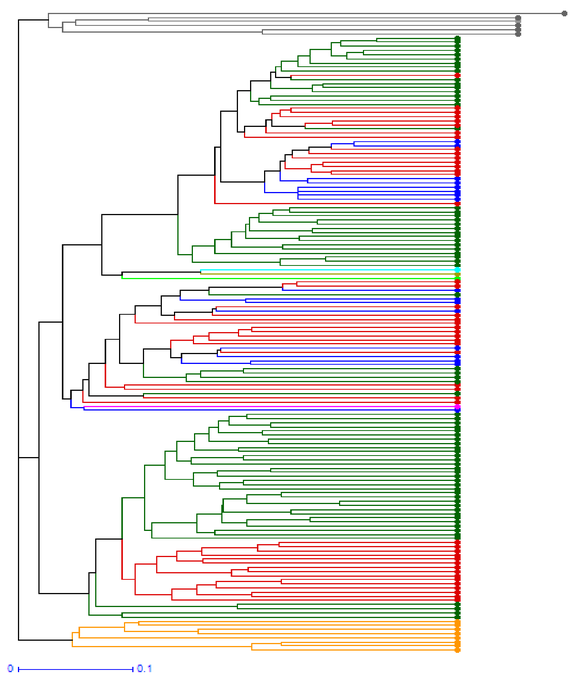

***Figura 2**. Dendrograma formado por 316 marcadores AFLP usando algoritmo UPGMA y el índice de Jaccard, con las 153 accesiones de tomate y sus parientes silvestre conservados en el INIA-Perú.*

Se obtuvieron 316 marcadores AFLP con alto índice de polimorfismo, con las cuatro combinaciones utilizadas (tabla 1) las cuales fueron altamente informativas. En el dendrograma observamos los agrupamientos en los que se diferencias por especie, *S. habrochaites* se agrupan solas, las otras *Solanum* son diferentes al resto de especies, S. *pimpinelifolium* forman grupos separados pero sólo de esa especie, *S. lycopersicum* var *cerasiforme* y var *lycopersicum* son parecidas entre sí como también observamos en el AMOVA (tabla 2) que la mayoría de especies son diferentes entre si a excepción de estas dos variedades.

***Tabla 2.** Análisis de Distancias (Fst) de la colección de Tomates silvestres del INIA*

	SOL	PIM	PEN	NEO	LYC	CER	HAB	COR	CHM
SOL	0.00								
PIM	0.22646	0.00							
PEN	0.18125	0.16452	0.00						
NEO	0.26542	0.1458	1.00	0.00					
LYC	0.27454	0.13376	0.14309	0.17503	0.00				
CER	0.21267	0.07956	0.06981	0.14143	**0.03485**	0.00			
HAB	0.25596	0.23639	0.15746	0.12482	0.29701	0.24853	0.00		
COR	0.3081	0.18602	1.00	1.00	0.19668	0.19504	0.19737	0.00	
CHM	0.29189	0.17037	1.00	1.00	0.21977	0.20567	0.13475	1.00	0.00

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que los marcadores utilizados son útiles para la diferenciación de accesiones a nivel de especie según el análisis de agrupamiento y el análisis de distancias. El Banco Nacional de Germoplasma del INIA conserva 8 especies de tomate y sus parientes silvestres de las 11 que existen en el mundo. Según el AMOVA las variedades de *S. lycopersium* presentan alta similaridad genética entre ellas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es posible gracias al Proyecto PNIA 103_PI, financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lima, Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Peralta, I., Spooner, D., Knapp, S. 2008** *Taxonomy of Wild Tomatoes and their Relatives* (*Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicom; Solanaceae*) Systematic Botany Monographs Volume 84. The America Society of Plant Taxonomist.
- **Spooner, D., Peralta, I., Knapp S. 2005** *Comparison of AFLP with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes* [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) *Wettst.* AFLPs and tomato phylogeny TAXON 54(1).
- **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijams, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995**. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.* Nucl. Acids Res. 23: 4407 – 4414.