

# Mutagénesis inducida en plantas de *Solanum betaceum* Cav. mediante el uso de dietil sulfato (DES)

## Induced mutagenesis in *Solanum betaceum* Cav. plants by the use of diethyl sulphate (DES)

Tulio César Lagos-Burbano<sup>1</sup> ; Liz Katherine Lagos-Santander<sup>1</sup> ; David Esteban Duarte-Alvarado<sup>1\*</sup> ; Javier Garcia-Alzate<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Grupo de Investigación en Producción de Frutales Andinos GPFA. San Juan de Pasto - Nariño, Colombia; e-mail: tclagosb@udenar.edu.co; lklagoss@unal.edu.co; deduartea@unal.edu.co; javiergarcialzate@gmail.com  
\*autor de correspondencia: deduartea@unal.edu.co

**Cómo citar:** Lagos-Burbano, T.C.; Lagos-Santander, L.K.; Duarte-Alvarado, D.E.; Garcia-Alzate, J. 2022. Mutagénesis inducida en plantas de *Solanum betaceum* Cav. mediante el uso de dietil sulfato (DES). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 25(1):e1956. <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.1956>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

**Recibido:** mayo 13 de 2021

**Aceptado:** abril 19 de 2022

**Editado por:** Helber Adrián Arévalo Maldonado

### RESUMEN

La materia prima del fitomejoramiento es la variabilidad genética, que se presenta baja, en especies en proceso de domesticación, que no han sido sometidas a selección, como en *Solanum betaceum*. Una de las tecnologías para incrementar la variabilidad genética es la inducción de mutagénesis. El objetivo del estudio fue evaluar, a través de marcadores RAMs, las variaciones moleculares presentes en plántulas de *S. betaceum*, provenientes de semillas sometidas a diferentes concentraciones del agente mutante dietil sulfato (DES). Los loci polimórficos oscilaron entre 87,5 y 100 % y el número de alelos efectivos ( $N_e$ ), entre 1,0 y 1,99. Los loci más polimórficos se observaron en TG, AG, ACA y CGA, que mostraron una heterosis media insesgada entre 0,34 y 0,51, que permite establecer que estos marcadores sean útiles para obtener mayor discriminación entre mutantes en *S. betaceum*. Las distancias genéticas oscilaron entre 0,30 y 1,0. El 81,28 % de estos registros se dieron entre 0,60 y 0,90; esto revela bajo nivel de cambios, debido al DES. Estos pequeños cambios contribuyeron a enriquecer la variabilidad genética de la muestra tratada con DES. Los marcadores RAMs fueron útiles para detectar cambios entre plantas provenientes de semillas tratadas con DES y plantas normales. La variabilidad genética entre tratamientos

con DES fueron más altos que tratamientos sin DES. Las similitudes genéticas fueron bajas entre plantas tratadas y no tratadas y fueron altas, entre no tratadas. Los cambios producidos por DES fueron de baja magnitud; sin embargo, produjeron cambios en los niveles de variabilidad genética.

Palabras clave: Loci polimórficos; Heterosis insesgada; Microsatélites amplificados al azar; Mutagénesis; Tomate de árbol.

### ABSTRACT

The raw material for plant breeding is genetic variability, which is low in species in the process of domestication that have not been subjected to selection, as is the case with *Solanum betaceum*. One of the technologies to increase genetic variability is mutagenesis induction. The objective was to evaluate, through RAMs markers, the molecular variations present in *S. betaceum* seedlings from seeds previously subjected to different concentrations of the mutant agent diethyl sulfate (DES). The polymorphic loci ranged from 87.5 to 100%, number of effective alleles ( $N_e$ ) between 1.0 and 1.99. The most polymorphic loci were observed in TG, AG, ACA, and CGA, which showed a mean unbiased heterosis between 0.34 and 0.51

with an average of 0.44, which allows establishing that these markers are useful to obtain greater discrimination between mutants in *S. betaceum*. Genetic distances ranged from 0.30 to 1.0. The 81.28% of these records were between 0.60 and 0.90. This reveals a low level of changes due to DES. These small changes contribute to enriching the genetic variability of the DES-treated sample. The RAMs markers were useful for detecting changes between plants from DES treated seeds and normal plants. Genetic variability between DES treatments was higher than non-DES treatments. Genetic similarities were low between treated and untreated plants and were high among untreated plants. The changes produced by DES were of low magnitude, however, they produced changes in the levels of genetic variability.

Keywords: Mutagenesis; Polymorphic loci; Random amplified microsatellite; Tree tomato; Unbiased heterozygosity.

## INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol *Solanum betaceum* Cav. es una especie originaria de Sur América, donde se encuentran sus principales centros de distribución, como la zona Andina de Perú, Bolivia, norte de Argentina y sureste de Brasil (Díaz Granada *et al.* 2017). Es una alternativa de producción, que se ha generalizado, gradualmente, entre productores de clima frío y frío-moderado, en la región natural Andina de Colombia, siendo una especie, cuyo fruto posee características organolépticas aceptadas entre los consumidores de los mercados, tanto nacional como internacionales (Acosta-Quezada *et al.* 2016). Entre 2007 y 2018, en el país, se presentó un incremento del 26,5 % en el área cultivada de tomate de árbol, con una superficie cosechada en el 2018, de 10.161 ha, una producción de 174.230 t y rendimientos entre 15,5 y 20,2 t ha<sup>-1</sup> (Agronet, 2021).

Existe una escasa oferta de genotipos mejorados para la siembra en frutales de Colombia, como el tomate de árbol; es por eso, que los agricultores obtienen semilla tomando frutos de las plantas y los cultivos resultantes son fenotípicamente heterogéneos, además, genera en la especie pérdida de variabilidad genética, ya que, para procesos de selección, se debe partir de una base genética amplia (Lobo Arias, 2006; Lagos-Santander *et al.* 2013).

Los factores más importantes en la producción de variabilidad en plantas son: la hibridación, la recombinación y la mutación (espontánea o inducida); sin embargo, la ocurrencia de las mutaciones de forma natural es demasiado baja para fines prácticos, por lo tanto, mutágenos físicos y químicos han probado ser útiles para incrementar las mutaciones y la variabilidad (Donini & Sonnino, 1998). Las mutaciones causan un cambio repentino en un carácter, el cual, es heredable y, por lo tanto, transmisible a la progenie, además de tener un gran potencial y servir como una aproximación complementaria en el mejoramiento de cultivos (Gandhi *et al.* 2014).

El dietil sulfato (DES) es ampliamente reportado como un agente químico capaz de causar alteraciones genéticas en distintas

especies. Bhagwat & Duncan (1997) utilizaron diferentes dosis de ácido de sodio, dietil sulfato y etilmetano sulfonato en ápices de banano *Musa* spp., cultivados *in vitro*, con el objetivo de evaluar su efectividad induciendo mutaciones; además de producir variantes tolerantes a *Fusarium oxysporum*, encontrando que los individuos expuestos a los diferentes tratamientos mostraron menos de 10 % de infección de *F. oxysporum*.

Para identificar la variabilidad generada, a través de la mutagénesis inducida en especies cultivadas, se conocen diferentes metodologías para el análisis de la composición genética, las cuales, permiten tomar decisiones en el manejo de los recursos genéticos de las plantas e identificar, de forma precisa, los individuos, aún en fases tempranas de desarrollo (Estrada Salazar *et al.* 2010). Dentro de las metodologías están los marcadores moleculares, que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, dentro de ellos, se pueden distinguir varios métodos, que difieren entre sí por su poder de resolución, es decir, el nivel de polimorfismo que puedan detectar (Muñoz Flórez *et al.* 2008).

Uno de los marcadores convencionales y de fácil aplicación son los microsatélites amplificados al azar-RAMs (por sus siglas en inglés), propuestos inicialmente por Zietkiewicz *et al.* (1994), para el estudio de la diversidad en plantas y en animales y combinan propiedades, tanto de los marcadores de amplificación aleatoria de ADN polimórfico- RAPDs (por sus siglas en inglés), como de secuencias simples repetidas o microsatélites- SSRs (por sus siglas en inglés). Los estudios de diversidad dirigidos con marcadores moleculares RAMs han mostrado ser viables y sus resultados confiables, en muchas especies, entre las cuales, se pueden mencionar a *Physalis peruviana* (Morillo Paz *et al.* 2011), *Guadua angustifolia* (Rugeles-Silva *et al.* 2012), *Musa* spp (Muñoz F. *et al.* 2012), *Prunus persica* (Morillo Coronado *et al.* 2014), *Prunus* sp (Ben Tamarzizt *et al.* 2015), *Physalis ixocarpa* (Delgado-Alvarado *et al.* 2018), entre otros.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar, a través de marcadores RAMs, las variaciones moleculares presentes en plántulas de *S. betaceum* provenientes de semillas, previamente sometidas a diferentes concentraciones del agente mutante dietil sulfato (DES).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Las semillas de tomate proceden de una planta cultivar Manzano, con 14 meses de establecida en campo, una variedad seleccionada por el agricultor; su fruto es de tamaño grande 120 a 200 g, color de pulpa y arilo de semilla naranja; contenido de sólidos solubles de 9,35 a 10,32 °Brix, contenido de jugo por fruto entre 26 a 31 mL y un rendimiento de 5,21 a 9,32 t ha<sup>-1</sup> (Lagos-Santander *et al.* 2013). Las semillas, se trataron con diferentes concentraciones y tiempos de incubación del agente mutagénico dietil sulfato (DES). Se utilizaron 25 semillas por repetición, con cuatro repeticiones, para un total de 100 semillas por tratamiento.

**Inducción de mutaciones.** En los laboratorios de Biología Molecular y de Cultivo de Tejidos Vegetales del Grupo de Investigación en

Producción de Frutales Andinos, GPFA, de la Universidad de Nariño, se desarrolló la fase de inducción de mutaciones. Las semillas de tomate de árbol, previamente desinfectadas y sumergidas en ácido giberélico, se secaron a temperatura ambiente y luego se sometieron a los tratamientos, que incluyeron 0,5, 1,0, 1,5 y 2 % de concentración de DES y se incubó durante 8 y 16 horas, a temperatura ambiente, con agitación suave. En total, se obtienen 10 tratamientos que corresponden a T1: 0 %<sub>DES</sub>-8h, T2: 0,5 %<sub>DES</sub>-8h, T3: 1 %<sub>DES</sub>-8h, T4: 1,5 %<sub>DES</sub>-8h, T5: 2 %<sub>DES</sub>-8h, T6: 0 %<sub>DES</sub>-16h, T7: 0,5 %<sub>DES</sub>-16h, T8: 1,0 %<sub>DES</sub>-16h, T9: 1,5 %<sub>DES</sub>-16h y T10: 2 %<sub>DES</sub>-16h.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la variación genética, se sembraron los tratamientos en medio de cultivo *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962).

**Extracción de ADN.** Tomando el ADN total de 50 plántulas de tomate por tratamiento a los 35 días después de la germinación (tratadas con DES y plantas no tratadas), se aisló con el kit extracción de ADN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). La cuantificación y la pureza de los ácidos nucleicos, se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific.

**Amplificación de marcadores RAMs.** Para evaluar la variabilidad genética producida por los tratamientos mutantes, se probaron seis cebadores RAMs, los cuales, corresponden a: AG (5'HBH(AG)<sub>7</sub>A 3'), CA (5'DBDA(CA)<sub>7</sub> 3'), TG (5'HVH(TG)<sub>7</sub>T 3'), ACA (5'BDB(ACA)<sub>5</sub> 3'), CCA (5'DDB(CCA)<sub>5</sub> 3') y CGA (5'DHB(CGA)<sub>5</sub> 3'), donde: H = A, T o C; B = G, T o C; V = G, A o C y D = G, A o T.

Los perfiles de amplificación de la PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial de 95 °C, durante 5 minutos; 37 ciclos de desnaturalización, a 95 °C, por 30 segundos; hibridación: 50 °C (Primer AG), 41 °C (Primer CA), 55 °C (Primer TG), durante 45 segundos; 58 °C (Primer ACA), 61 °C (Primer CGA) y 55 °C (Primer CCA), durante 50 segundos. La extensión, se hizo a 72 °C, por 2 minutos y la extensión final, a 72 °C, durante 7 minutos. Para la amplificación, se utilizó un termociclador Multigene<sup>TM</sup> OptiMax (Labnet, USA). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis vertical, en geles de poliacrilamida, al 7,5 % y se construyó una matriz binaria de presencia y ausencia, donde 1 es presencia y 0 ausencia de bandas.

Se determinó el número de alelos polimórficos, la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada y el número de alelos por cebador. Para el análisis, se utilizó el complemento de Excel, GenAlex versión 6 (Peakall & Smouse, 2006). Dado que el cebador CCA fue 100 % monomórfico en las plantas evaluadas, no se incluyó en el análisis estadístico. Las estimaciones de similitud, se obtuvieron mediante el índice de Dice (1945) y la construcción de grupos y la generación del dendrograma, se realizó por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que permite buscar la distancia más pequeña en la matriz de distancias genéticas y agrupar las unidades que lo conforman, como una sola unidad taxonómica independiente (Hart, 1983), para los cuales,

se utilizó el programa Numerical Taxonomy System (NTSYSpc) version 2.02g (Rohlf, 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cinco cebadores RAMs analizados generaron 37 loci, de los cuales, siete se obtuvieron en CA y TG; cinco en AG; seis en ACA y 12 en CGA. Igualmente, se lograron 1.258 registros con 594 unos y 664 ceros; estos valores son inferiores a los encontrados en estudios que determinaron genotipos con mayor diversidad genética, como en mora (*Rubus glaucus*) (Morillo C. *et al.* 2005) y en cacao (*Theobroma cacao* L) (Morillo C. *et al.* 2014); sin embargo, los niveles de diversidad identificados se consideran aceptables, teniendo en cuenta que se utilizó la progenie de una sola planta. El número de alelos (*N<sub>a</sub>*) varió entre 1,86 y 2,0, con un promedio de  $1,97 \pm 0,97$  y el número de alelos efectivos (*N<sub>e</sub>*), entre 1,0 y 1,60, con una media de  $1,40 \pm 0,05$ , mientras que considerando todos los loci, el *N<sub>e</sub>* osciló entre 1,0 (CA5) y 1,99 (ACA1) (Tablas 1 y 2). Según lo reportado por Magallán Hernández *et al.* (2009), se presentan alelos raros dentro de la población evaluada, a causa de que el *N<sub>a</sub>* es mayor al *N<sub>e</sub>*; el número de alelos por locus polimórfico es la medida más directa de la diversidad y se refiere al número de estados variantes de un locus dentro del genoma, ya sean las formas alternativas de una proteína, el número de sitios dentro del genoma que pueden ser cortados con enzimas de restricción, o a la variación en el número de secuencias repetitivas en el ADN, entre otras.

A excepción de CCA, los loci identificados mostraron una naturaleza polimórfica. Solo CA presentó el 87,5 % de loci polimórficos; los demás obtuvieron el 100 %. El porcentaje de loci polimórficos en la población evaluada fue del 97,30. Los loci más polimórficos correspondieron a TG<sub>1</sub>, TG<sub>2</sub>, TG<sub>3</sub>, TG<sub>5</sub>, TG<sub>6</sub>, AG<sub>1</sub>, ACA<sub>1</sub>, AC<sub>2</sub>, ACA<sub>5</sub>, ACA<sub>6</sub>, CGA<sub>1</sub>, CGA<sub>3</sub>, CGA<sub>5</sub> y CGA<sub>6</sub>, que mostraron una diversidad génica o una heterosis media insesgada (*uh*), entre 0,34 y 0,51, con una media de 0,44 (Tabla 2), que permite establecer que estos marcadores son útiles para obtener una mayor discriminación entre los tratamientos mutantes en *Solanum betaceum*. En un estudio relacionado con marcadores codominantes, como los microsatélites (SSRs), en esta especie, los niveles del Índice de Contenido Polimórfico (PIC), para un mismo microsatélite, estuvieron en un rango de 0,08 y 0,51. Los resultados de este estudio revelan una reducida diversidad genética en las plantaciones de *S. betaceum*, en el Ecuador y constituyen un primer paso para determinar futuras acciones en el mejoramiento de este cultivo (Peñafiel L. *et al.* 2009), como puede ser la inducción de mutaciones en cultivares existentes.

En la tabla 2, se puede observar una síntesis de los parámetros de diversidad genética obtenidos con cinco marcadores RAMs, a través de los tratamientos mutantes en *S. betaceum*. Los valores de heterosis insesgada promedia (*uh*) y los índices de diferenciación genética (*F<sub>st</sub>*) indican altos niveles de variación en los tratamientos. Llama la atención el marcador CA, que presenta una moderada *uh*, pero un alto *F<sub>st</sub>*, lo cual, se debe a que de los 238 registros de presencias/ausencias que se presentó en la población muestreada, puede diferenciar entre aquellos que contienen unos loci de aquellos que no lo manifiestan. Así, en un grupo uno, están C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, que solo

presentan bandas en un 0,09 % de 136 registros y, en el otro, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>, que exhibieron bandas en un 97 % de 102 registros, a través de los 34 individuos evaluados.

Los demás marcadores muestran altos valores de variación genética, reflejados en altos valores de *uh* y *Fst*. Si se tiene en cuenta el criterio de Wright (1978), que indica que valores de *Fst* entre 0,05 y 0,15 muestran una diferenciación moderada, entre 0,15 y 0,25 alta y

Tabla 1. Parámetros de diversidad genética de los loci obtenidos con cinco marcadores RAMs en plántulas de *Solanum betaceum*, provenientes de semillas tratadas con dietil sulfato-DES.

Loci	P	q	Na	Ne	I	h	uh	Loci	p	q	Na	Ne	I	h	uh
CA1	0,06	0,94	2,00	1,13	0,22	0,11	0,11	ACA1	0,47	0,53	2,00	1,99	0,69	0,50	0,51
CA2	0,12	0,88	2,00	1,26	0,36	0,21	0,21	ACA2	0,68	0,32	2,00	1,78	0,63	0,44	0,45
CA3	0,15	0,85	2,00	1,34	0,42	0,25	0,26	ACA3	0,03	0,97	2,00	1,06	0,13	0,06	0,06
CA4	0,03	0,97	2,00	1,06	0,13	0,06	0,06	ACA4	0,09	0,91	2,00	1,19	0,3	0,16	0,17
CA5	1,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	ACA5	0,68	0,32	2,00	1,78	0,63	0,44	0,45
CA6	0,97	0,03	2,00	1,06	0,13	0,06	0,06	ACA6	0,68	0,32	2,00	1,78	0,63	0,44	0,45
CA7	0,94	0,06	2,00	1,13	0,22	0,11	0,11	CGA1	0,56	0,44	2,00	1,97	0,69	0,49	0,51
TG1	0,29	0,71	2,00	1,71	0,61	0,42	0,43	CGA2	0,09	0,91	2,00	1,19	0,30	0,16	0,17
TG2	0,74	0,27	2,00	1,64	0,58	0,39	0,40	CGA3	0,41	0,59	2,00	1,94	0,68	0,48	0,50
TG3	0,74	0,27	2,00	1,64	0,58	0,39	0,40	CGA4	0,06	0,94	2,00	1,13	0,22	0,11	0,11
TG4	0,12	0,88	2,00	1,26	0,36	0,21	0,21	CGA5	0,29	0,71	2,00	1,71	0,61	0,42	0,43
TG5	0,77	0,24	2,00	1,56	0,55	0,36	0,37	CGA6	0,79	0,21	2,00	1,49	0,51	0,33	0,34
TG6	0,79	0,21	2,00	1,49	0,51	0,33	0,34	CGA7	0,09	0,91	2,00	1,19	0,30	0,16	0,17
TG7	0,82	0,18	2,00	1,41	0,47	0,29	0,30	CGA8	0,03	0,97	2,00	1,06	0,13	0,06	0,06
AG1	0,44	0,56	2,00	1,97	0,69	0,49	0,51	CGA9	0,94	0,06	2,00	1,13	0,22	0,11	0,11
AG2	0,85	0,15	2,00	1,34	0,42	0,25	0,26	CGA10	0,03	0,97	2,00	1,06	0,13	0,06	0,06
AG3	0,85	0,15	2,00	1,34	0,42	0,25	0,26	CGA11	0,06	0,94	2,00	1,13	0,22	0,11	0,11
AG4	0,85	0,15	2,00	1,34	0,42	0,25	0,26	CGA12	0,12	0,88	2,00	1,26	0,36	0,21	0,21
AG5	0,85	0,15	2,00	1,34	0,42	0,25	0,26								

Na = número de alelos diferentes; Ne = número de alelos efectivos =  $1/(p^2+q^2)$ ; I = Índice de información de Shannon =  $-1*(p*\ln(p)+q*\ln(q))$ ; h = heterocigosidad =  $1 - (p^2 + q^2)$ ; uh = heterocigosidad incesgada =  $(N / (N-1)) * h$ ; %P = porcentaje de loci polimórficos ( $\%P = 1 - [(1/m)\sum p^2]$ ); p = frecuencia de banda presente y q = 1 - p. Fst = índice de diferenciación genética.

Tabla 2. Parámetros de diversidad genética obtenidos con cinco marcadores RAMs en plántulas de *Solanum betaceum*, provenientes de semillas tratadas con dietil sulfato-DES.

Macador	P	q	Na	Ne	I	h	uh	Fst	%P
CA	0,47	0,53	1,86	1,14	0,21	0,11	0,12	0,77	85,7
AG	0,77	0,23	2,00	1,46	0,47	0,30	0,31	0,29	100
TG	0,61	0,39	2,00	1,53	0,52	0,34	0,35	0,15	100
ACA	0,44	0,56	2,00	1,60	0,50	0,34	0,35	0,31	100
CGA	0,29	0,71	2,00	1,35	0,36	0,22	0,23	0,45	100
Media	0,51	0,49	1,97	1,40	0,40	0,25	0,26	0,40	0,62
DE	0,18	0,18	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,24	0,17

Na = número de alelos diferentes; Ne = número de alelos efectivos =  $1/(p^2+q^2)$ ; I = Índice de información de Shannon =  $-1*(p*\ln(p)+q*\ln(q))$ ; h = heterocigosidad =  $1 - (p^2 + q^2)$ ; uh = heterocigosidad incesgada =  $(N / (N-1)) * h$ ; %P = porcentaje de loci polimórficos ( $\%P = 1 - [(1/m)\sum p^2]$ ); p = frecuencia de banda presente y q = 1 - p. Fst = índice de diferenciación genética.

Tabla 3. Valores de similitud (diagonal y encima de la diagonal) y disimilitud (debajo de la diagonal) de Dice (1945), para las plantas de *Solanum betaceum*, obtenidas de semillas tratadas con dietil sulfato-DES y evaluadas con cinco marcadores del tipo RAMs

T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,9	0,6	0,9	0,7	0,7
2	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,7	0,6	0,8	0,9	0,5	0,9	0,8	0,8
3	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>1,0</b>	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,8	0,7	0,6	0,8	0,9	0,6	0,9	0,8	0,7
4	0,3	0,3	0,3	<b>1,0</b>	0,9	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,3	0,6	0,6	0,5
5	0,3	0,2	0,3	0,1	<b>1,0</b>	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,4	0,7	0,6	0,5
6	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	<b>1,0</b>	0,9	0,9	0,9	0,7	0,8	0,8	0,9	0,5	0,8	0,8	0,7
7	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	<b>1,0</b>	1,0	0,9	0,7	0,7	0,8	0,9	0,6	0,8	0,7	0,7
8	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,0	<b>1,0</b>	0,9	0,7	0,8	0,8	0,9	0,5	0,8	0,8	0,7
9	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	<b>1,0</b>	0,7	0,7	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7
10	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	<b>1,0</b>	0,9	0,8	0,7	0,3	0,6	0,6	0,5
11	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	<b>1,0</b>	0,9	0,6	0,3	0,6	0,5	0,4
12	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	<b>1,0</b>	0,8	0,5	0,7	0,7	0,6
13	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	<b>1,0</b>	0,6	0,9	0,8	0,7
14	0,4	0,5	0,4	0,7	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4	0,7	0,7	0,5	0,5	<b>1,0</b>	0,6	0,6	0,6
15	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,1	0,4	<b>1,0</b>	0,7	0,7
16	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3	<b>1,0</b>	0,9
17	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,6	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	<b>1,0</b>
18	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2
19	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,3
20	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,3
21	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,3
22	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,5	0,1	0,2	0,3
23	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,7	0,3	0,4	0,5
24	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2
25	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5
26	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,5
27	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,4
28	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,4
29	0,3	0,3	0,2	0,5	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,5
30	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,4
31	0,1	0,1	0,0	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,5	0,1	0,2	0,3
32	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	0,5	0,1	0,2	0,3
33	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6
34	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,7	0,6	0,5	0,6
T	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	0,8	0,7	0,9	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4

Continuación tabla 3.

2	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	1,0	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4
3	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,3	0,3
4	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6
5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,8	0,7	0,8	0,5	0,5
6	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,4	0,4
7	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0,7	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4
8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,4	0,4
9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,7	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,5	0,5
10	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,5	0,5
11	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6
12	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,5
13	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4
14	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,3	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,3	0,3
15	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,9	0,9	0,4	0,4
16	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,9	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8	0,5	0,5
17	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5	0,8	0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,7	0,7	0,4	0,4
18	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,3	0,3
19	0,1	1,0	1,0	1,0	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,3	0,3
20	0,1	0,0	1,0	1,0	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,3	0,3
21	0,1	0,0	0,0	1,0	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,3	0,3
22	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0	0,9	1,0	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4
23	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	1,0	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,8	0,5	0,5
24	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	1,0	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,4	0,4
25	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	1,0	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6	0,7	0,7	0,4	0,4
26	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	1,0	0,9	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4
27	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	1,0	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8	0,4	0,4
28	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,0	0,1	1,0	0,9	0,8	0,8	0,8	0,4	0,4
29	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	1,0	0,8	0,8	0,8	0,3	0,3
30	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	1,0	0,8	0,8	0,5	0,5
31	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,0	1,0	0,4	0,4
32	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	1,0	0,4	0,4
33	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	1,0	1,0
34	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,0	1,0

T= tratamiento; T1(0-8h) = 1, 2, 3; T2(0,5-8h) = 4, 5; T3(1-8h) = 6, ..., 9; T4(1,5-8h) = 10, 11, 12; T5(2-8h) = 13, 14, ..., 17; T6(0-16h)= 18, 19, 20, 21; T7(0,5-16h)= 22, 23, 24; T8(1,0-16h)= 25, ..., 29; T9(1,5-16h)= 31, 32, 32; T10(2,0-16h)= 33, 34.

mayor a 0,25 muy alta, demuestra que existieron cambios entre los grupos de plantas tratadas y no tratadas, tal como se verá más adelante. En la tabla 3, se muestran los valores de similitud (diagonal y encima de la diagonal) y disimilitud (debajo de la diagonal), de Dice (1945), obtenidos por los diferentes tratamientos de DES. Las observaciones 1, 2 y 3 fueron blancos (0 %<sub>DES-8 h</sub>), al igual que 18,

19, 20 y 21 (0 %<sub>DES-16 h</sub>). Las observaciones 4 y 5 correspondieron a T2 (0,5 %<sub>DES-8 h</sub>), de 6 a 9 a T3 (1 %<sub>DES-8 h</sub>), 10, 11 y 12 a T4 (1,5 %<sub>DES-8 h</sub>), 13 a 17 a T5 (2 %<sub>DES-8 h</sub>), 22 y 24 a T7 (0,5 %<sub>DES-16 h</sub>), 25 a 29 a T8 (1,0 %<sub>DES-16 h</sub>), 31 y 32 a T9 (1,5 %<sub>DES-16 h</sub>), 33 y 34 a T10 (2 %<sub>DES-16 h</sub>).

Tabla 4. Proporción de la presencia de bandas con los cinco cebadores RAMs en cada uno de los tratamientos de dietil sulfato-DES, en *Solanum betaceum*.

T	CA	TG	AG	ACA	CGA	T	CA	TG	AG	ACA	CGA
1	0,43	0,86	1,00	0,67	0,33	18	0,43	0,86	1,00	0,67	0,00
2	0,43	0,86	1,00	0,67	0,08	19	0,43	0,86	1,00	0,67	0,50
3	0,43	0,86	1,00	0,67	0,50	20	0,43	0,86	1,00	0,67	0,50
4	0,43	0,00	1,00	0,33	0,17	21	0,43	0,86	1,00	0,67	0,50
5	0,43	0,29	1,00	0,17	0,17	22	0,43	0,71	1,00	0,67	0,33
6	0,43	0,71	0,80	0,33	0,33	23	0,43	0,00	1,00	0,67	0,33
7	0,43	0,71	0,80	0,33	0,42	24	0,43	0,71	1,00	0,67	0,17
8	0,43	0,71	0,80	0,33	0,33	25	0,86	0,29	0,80	0,50	0,25
9	0,43	0,71	0,80	0,33	0,17	26	0,86	0,86	0,80	0,00	0,42
10	0,43	0,00	0,80	0,83	0,25	27	0,71	0,86	0,80	0,17	0,17
11	0,43	0,00	0,80	0,33	0,25	28	0,71	0,86	0,80	0,17	0,42
12	0,43	0,43	0,80	0,50	0,25	29	0,14	0,71	0,80	0,17	0,42
13	0,43	0,71	1,00	0,50	0,33	30	0,43	0,86	0,80	0,00	0,17
14	0,57	0,71	0,00	0,17	0,67	31	0,43	0,86	0,80	0,67	0,33
15	0,43	0,71	1,00	0,50	0,42	32	0,43	0,86	1,00	0,50	0,33
16	0,43	0,71	0,00	0,67	0,17	33	0,43	0,00	0,00	0,00	0,08
17	0,43	0,71	0,00	0,67	0,00	34	0,43	0,00	0,00	0,00	0,08

Los valores de similitud que están por encima de la diagonal (Tabla 3) tienen un total de  $34t(34-1)/2 = 561$  registros, sobre este conjunto de datos, tal como lo muestran los parámetros de diversidad genética (Tablas 1 y 2). Como se dijo anteriormente, las plantas evaluadas surgen de semillas tomadas de una sola planta al azar de un cultivo de tomate de árbol var. Manzano, sometidas a diferentes concentraciones de DES; de ahí, que los valores de similitud permiten establecer los cambios y las diferencias entre plantas tratadas y no tratadas.

Los valores de distancia (Tabla 3) y la proporción de la presencia de bandas con los cinco cebadores RAMs en cada uno de los tratamientos DES en *Solanum betaceum* (Tabla 4), reflejan los cambios en las frecuencias de los loci identificados entre plantas tratadas y no tratadas. En las observaciones no tratadas (1, 2, 3, 18, 19, 20 y 21), los marcadores se manifestaron con las mismas proporciones, a excepción del marcador CGA, que cambia sus proporciones en las observaciones 1, 2 y 18. Estas variaciones, se deben al sistema de reproducción mixta que tiene la especie (Ramírez & Kallarackal, 2019), que permite manifestar algunos niveles de variación en progenies de una sola planta.

Es claro que muchos de los tratamientos con DES son semejantes a los tratamientos no tratados, pero con variaciones en los niveles de similitud; por ejemplo, las distancias genéticas o disimilitudes (debajo de la diagonal) (Tabla 3) son más grandes en concentraciones de 2 % de DES, por 8 y 16 horas, aunque las distancias son de diferente magnitud, que oscilan entre 0,4 y 0,9, confirma que existieron cambios de diferente magnitud entre plantas tratadas y no tratadas e incremento de la variabilidad genética, aunque con pequeños

cambios, que dieron como resultado una mayor frecuencia de distancias entre 0,1 a 0,4. Cambios similares observaron Mudibu *et al.* (2011), en plantas de soya, tratadas con rayos Gamma.

En el dendrograma de la figura 1, se muestran las relaciones genéticas entre los tratamientos DES de *Solanum betaceum*, construido con base en el coeficiente de similitud de Dice (1945) y el método de agrupamiento UPGMA, obtenido de cinco cebadores RAMs. A una similitud de 0,70, se identificaron tres grupos: en el grupo 1 (G1), se ubicaron el 70,6 % de la población analizada; en el grupo 2 (G2), el 20,6 % y en el grupo 3 (G3), el 5,9 %. La observación 14, que corresponde a T5 (2 %<sub>DES</sub>, 8 h), no se ubicó en ningún grupo. Esta planta, se caracterizó por no producir bandas en el marcador AG y reducir la proporción de presencia de bandas en TG y CGA. Algo similar ocurrió en el G3, con las observaciones 33 y 34 del T5 (2 %<sub>DES</sub>, 16 h), pero con la diferencia que no manifestaron bandas en los tres marcadores antes mencionados (Tablas 4 y 5). La similitud de estas tres observaciones respecto a las no tratadas oscila entre 0,3 y 0,6 (Tabla 3), lo cual, confirma el efecto del DES en el cambio de las frecuencias de los marcadores utilizados en esta investigación. En términos generales, la variación entre las 34 observaciones evaluadas es alta, pero las distancias genéticas moderadamente pequeñas, tal como se encontraron en soya tratada con rayos Gamma (Mudibu *et al.* 2011). De hecho, la heterosis total es relativamente alta (50 %), para la progenie de una planta, cuyas muestras tratadas presentan similitudes altas, que van entre 0,90 y 1,0.

El análisis genético de los tres grupos formados (Figura 1) indica que el porcentaje de loci polimórficos en el G1 fue de 70,27 %;

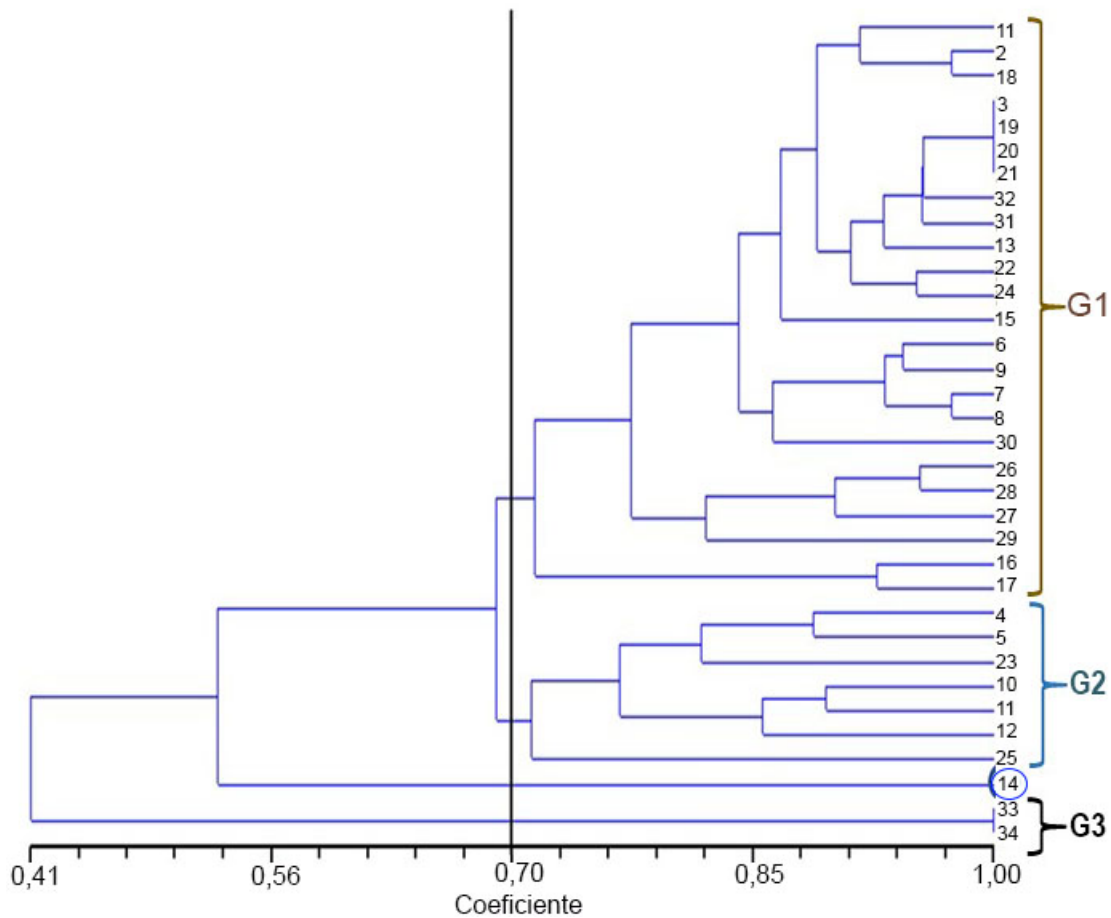


Figura 1. Dendrograma de las relaciones genéticas entre los tratamientos de dietil sulfato-DES de *Solanum betaceum*, construido con base en el coeficiente de similitud de Dice (1945) y el método de agrupamiento UPGMA, obtenido de cinco cebadores RAMs.

Tabla 5. Parámetros de diversidad genética obtenidos con cinco marcadores RAMs en plántulas de *Solanum betaceum*, provenientes de semillas tratadas con dietil sulfato-DES.

Grupos	%T	%P	Ne	I	h	uh	Nei (1973)
G1	70,60	70,27	1,29	0,29	0,18	0,19	D <sub>1-2</sub> 0,15
G2	20,60	45,95	1,27	0,24	0,16	0,18	D <sub>1-3</sub> 0,45
G3	5,90	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	D <sub>2-3</sub> 0,24
Media		38,74	1,19	0,18	0,11	0,13	
DE		20,60	0,03	0,024	0,02	0,02	

%T = tamaño del grupo respecto a la población en porcentaje; %P = porcentaje de loci polimórficos ( $\%P = 1 - [(1/m)\sum p^2]$ ); Ne = número de alelos efectivos =  $1/(p^2 + q^2)$ ; I = Índice de información de Shannon =  $-1 * (p * \ln(p) + q * \ln(q))$ ; h = heterocigosidad =  $1 - (p^2 + q^2)$ ; uh = heterocigosidad insesgada =  $(N / (N-1))$ ; D.= distancias genéticas insesgadas.

en el G2 de 45,95 % y de cero, en el G3. El índice de heterosis insesgada (uh) fue alta para los grupos dos y tres, con valores de 0,19 y 0,18, en su orden. El grupo 3 presentó una alta homogeneidad, con un uh de cero; es de aclarar que en el G1 se encuentran todos los controles (0 %<sub>DES</sub>-8 h y 0 %<sub>DES</sub>-1 h). Este grupo presenta una distancia baja con G1, moderada alta con G2 y moderada con G3. El número de alelos efectivos (Ne) en los tres grupos es similar y oscila entre uno y 1,3 (Tabla 5). Se comprueba que los cambios producidos por el agente DES fueron de baja magnitud; sin embargo, produjeron cambios en los niveles de variación genética, tal como lo indican los altos niveles de los parámetros de diversidad

genética y el porcentaje de loci polimórficos. Es necesario, comprobar, en la siguiente generación de esta población mutante, si existen diferencias a nivel fenotípico. Al respecto, Prina *et al.* (2010) indican que en la generación mutante (M2), se deben identificar los cambios causados por los agentes mutantes y es necesario iniciar, en esta fase, el proceso de selección.

Basado en los resultados obtenidos, se puede concluir que los marcadores RAMs fueron útiles para detectar cambios entre plantas provenientes de semillas tratadas con el agente mutagénico dietil sulfato (DES). Los niveles de variación genética entre los



tratamientos con DES fueron más altos que los tratamientos sin DES. Las similitudes de Dice fueron bajas entre plantas tratadas y no tratadas y fueron altas entre plantas no tratadas. Los cambios producidos por el agente mutante DES fueron de baja magnitud; sin embargo, produjeron cambios en los niveles de variación genética en la población estudiada.

**Agradecimientos.** Al sistema de investigaciones de la Vicerrectoría de Investigaciones e Interacción Social (VIIS), de la Universidad de Nariño, por haber financiado esta investigación. Conflicto de intereses: el manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe de conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. Financiación: esta investigación fue financiada por el Sistema de Investigaciones de la Vicerrectoría de Investigaciones e Interacción Social de la Universidad de Nariño.

## REFERENCIAS

- ACOSTA-QUEZADA, P.G.; RIOFRÍO-CUENCA, T.; ROJAS, J.; VILANOVA, S.; PLAZAS, M.; PROHENS, J. 2016. Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*. 199:216-223. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.045>
- BEN TAMARZIZT, H.; BEN MUSTAPHA, S.; BARAKET, G.; ABDALLAH, D.; SALHI-HANNACHI, A. 2015. Assessment of genetic diversity and relationships among wild and cultivated Tunisian plums (*Prunus* spp) using random amplified microsatellite polymorphism markers. *Genetics and Molecular Research*. 14(1):1942-1956. <https://doi.org/10.4238/2015.march.20.4>
- BHAGWAT, B.; DUNCAN, E.J. 1997. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Scientia Horticulturae*. 73(1):11-22. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00141-6)
- DELGADO-ALVARADO, E.A.; ALMARAZ-ABARCA, N.; ESCAMIROSA-TINOCO, C.; URIBE-SOTO, J.N.; ÁVILA-REYES, J.; TORRES-RICARIO, R.; CHAÍDEZ-AYALA, A.I. 2018. Potential of random amplified microsatellites (RAMS) to typify and discriminate varieties of *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(5):396-403. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i5.1684>
- DÍAZ GRANADA, L.; CANTO SÁENZ, M.; ALEGRE ORIHUELA, J.; CAMERENA MAYTA, F.; JULCA OTINIANO, A. 2017. Sostenibilidad social de los subsistemas productivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav) en el Cantón Guachapala, Provincia de Azuay – Ecuador. *Ecología Aplicada*. 16(2):99-104. <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v16i2.1013>
- DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26(3):297-302. <https://doi.org/10.2307/1932409>
- DONINI, P.; SONNINO, A. 1998. Induced mutation in plant breeding: Current status and future outlook. En: Jain, S.M.; Brar, D.S.; Ahloowalia, B.S. (eds). *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. current plant science and biotechnology in Agriculture*. Vol. 32. Springer. p.255-291.
- ESTRADA SALAZAR, E.I.; VALLEJO CABRERA, F.A.; RAMÍREZ, H.; ESPITIA CAMACHO, M.M. 2010. *Genética Vegetal*. Universidad Nacional de Colombia (Palmira). 460p.
- GANDHI, E.S.; SRI DEVI, A.; MULLAINATHAN, L. 2014. The effect of ethyl methane sulphonate and diethyl sulphate on chilli (*Capsicum annuum* L.) in M1 generation. *International Letters of Natural Sciences*. 10:18-23. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.10.18>
- HART, G. 1983. The Occurrence of Multiple UPGMA Phenograms. En: Felsenstein, J. (ed). *Numerical taxonomy*. NATO ASI Series. Vol. 1. Springer (Berlin, Heidelberg). p.254-258. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-69024-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-69024-2_30)
- LAGOS-SANTANDER, L.; VALLEJO, F.A.; LAGOS-BURBANO, T.C.; DUARTE-ALVARADO, D.E. 2013. Correlaciones genotípicas, fenotípicas y ambientales, y análisis de sendero en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt.). *Acta Agronómica*. 62(3):215-222.
- LOBO ARIAS, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*. 7(2):40-54. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol7\\_num2\\_art:68](https://doi.org/10.21930/rcta.vol7_num2_art:68)
- MAGALLÁN HERNÁNDEZ, D.; MARTÍNEZ, M.; HERNÁNDEZ SANDOVAL, L.; KEN OYAMA, Y. 2009. Estructura genética de poblaciones de *Eriocaulon Bilobatum* (Eriocaulaceae): una especie amenazada de humedales temporales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 85:81-88.
- MORILLO C., A.C.; MORILLO C., Y.; MUÑOZ F, F.J.; VÁSQUEZ A., H.A.; ZAMORANO, A. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios rams de la colección de mora, *Rubus* spp., de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Acta Agronómica*. 54(2):15-24.
- MORILLO C., Y.; MORILLO C., A.C.; MUÑOZ F, J.E.; BALLESTEROS P., W.; GONZÁLEZ, A. 2014. Molecular characterization of 93 genotypes of cocoa (*Theobroma cacao*

- L.) with random amplified microsatellites RAMs. *Agronomía Colombiana*. 32(3):315-325.  
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.46879>
16. MORILLO CORONADO, A.C.; MORILLO CORONADO, Y.; PINZÓN SANDOVAL, E.H. 2014. Caracterización con RAMs de la colección de durazno (*Prunus persica* L. Batsch) existente en la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. *Acta Agronómica*. 63(4):367-376.
  17. MORILLO PAZ, A.T.; VILLOTA CERÓN, D.E.; LAGOS-BURBANO, T.C.; ORDÓÑEZ JURADO, H.R. 2011. Caracterización morfológica y molecular de 18 introducciones de uchuva *Physalis peruviana* L. de la colección de la Universidad de Nariño. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 64(2):6043-6053.
  18. MUDIBU, J.; NKONGOLO, K.K.C.; MEHES-SMITH, M.; KALONJI-MBUYI, A. 2011. Genetic analysis of a soybean genetic pool using ISSR marker: effect of gamma radiation on genetic variability. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*. 5(3):235-245.  
<http://dx.doi.org/10.3923/ijpb.2011.235.245>
  19. MUÑOZ F, J.E.; LOBO A., M.; MEDINA, C.I.; CAICEDO ARANA, Á.; MORILLO CORONADO, Y. 2012. Caracterización molecular de genotipos de plátano del Banco de Germoplasma de Corpoica Palmira, con uso de marcadores RAMs. *Acta Agronómica*. 61(5):28-29.
  20. MUÑOZ FLÓREZ, J.E.; MORILLO CORONADO, A.C.; MORILLO CORONADO, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*. 57(4):219-226.
  21. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
  22. NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70(12):3321-3326.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
  23. PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6(1):288-295.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
  24. PEÑAFIEL L., N.; ARAHANA B., V.S.; TORRES P, M DE L. 2009. Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatélites. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 1(1):69-74.  
<https://doi.org/10.18272/aci.v1i1.13>
  25. PRINA, L.; LANDAU, A.; PACHECO, M.G.; HOPP, H. 2010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. Parte II: Métodos para generar y analizar diversidad, Capítulo 4. En: Levitus G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. (Eds). *Biocología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología ArgenBio (Argentina). p.217-228.
  26. RAMÍREZ, F.; KALLARACKAL, J. 2019. Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*. 248:206-215.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.019>
  27. RED DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN DEL SECTOR AGROPECUARIO, AGRONET. 2021. Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo. Estadísticas agrícolas: tomate de árbol. Disponible desde Internet en:  
<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (con acceso 03/04/2021)
  28. ROHLF, F.J. 1988. NTSYSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2: getting started guide. Applied Biostatistics Inc (New York). 43p.
  29. RUGELES-SILVA, P.A.; POSSO-TERRANOVA, A.M.; LONDOÑO, X.; BARRERA-MARÍN, M.; MUÑOZ-FLÓREZ, J.E. 2012. Caracterización molecular de *Guadua angustifolia* Kunth mediante marcadores moleculares RAMs. *Acta Agronómica*. 61(4):325-330.
  30. WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. Vol 4. University of Chicago Press (Chicago). 590p.
  31. ZIETKIEWICZ E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*. 20(2):176-183.  
<https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>