

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí

Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación

**Preservación de la diversidad de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) del
cantón Bolívar (Manabí, Ecuador) en un banco de semillas conservadas en nitrógeno
líquido**

TESIS

Presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Byron Enrique Zevallos Bravo



Ciego de Ávila, Cuba

2014

Universidad Máximo Gómez Báez

Centro de Bioplantas



Preservación de la diversidad del tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) del cantón Bolívar (Manabí, Ecuador) en un banco de semillas conservadas en nitrógeno líquido

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Byron Enrique Zevallos Bravo

Tutores: Ing. José Carlos Lorenzo Feijoo Dr. C.

Ing. Marcos Edel Martínez Montero Dr. C.

Consultante: Prof. Dr. Florent Engelmann

Ciego de Ávila, Cuba

2014

CITACION CORRECTA

Sistema apellido-año

Pérez Alonso, Naivy Lisbet. 2013. Sistemas de inmersión temporal, elicitación y transformación genética en *Digitalis purpurea* L. [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas] Santa Clara, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las plantas. 97 p.

Sistema numérico

1. Pérez Alonso, Naivy Lisbet. Sistemas de inmersión temporal, elicitación y transformación genética en *Digitalis purpurea* L. [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas] Santa Clara, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las plantas, 2013. 97 p.

Dedicatoria

A mi hija Anita Victoria, razón de mi vida, regalo de Dios.

*A mi esposa Ana Luisa, apoyo fundamental, refugio seguro
en momentos convulsos, por su amor imperecedero.*

A mi madre linda, instrumento de Dios para darme la vida.

A Michelita y Rafo, por compartir sus vidas a mi lado.

A la memoria de mi padre y mamá Victoria, siempre conmigo.

Agradecimientos

Al Dr. José Carlos Lorenzo, Tutor, amigo y excelente ser humano, por su inmensa contribución a este trabajo y motivarme continuamente a mejorar, a su esposa Doris y su hijo Carlos Manuel.

Al Dr. Marcos Edel Martínez, Tutor y amigo, por su tiempo y conocimiento avanzado puesto a mi disposición, a su esposa Janet y sus hijos Marquito y Javier.

Un agradecimiento especial al Prof. Dr. Florent Engelman, “Institut de Recherche pour le Développement, France”, por su valiosa, continua y desinteresada asesoría a esta investigación, al Prof. Dr. Doménico Carputo y Prof. Dr. Riccardo Aversano, “University of Naples Federico II” y a la Prof. Dra. María-Teresa Scarano, “Institute of Plant Genetics (Research Division Portici), Italy” por el soporte científico-tecnológico en el análisis genético de las accesiones.

Al Centro de Bioplantas, a su Director, Dr. Oscar Concepción Laffitte, y a todo el personal científico técnico y de servicios.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL, a su Rector, Dr. Leonardo Félix López, por su apoyo incondicional y constante.

A la carrera de Ingeniería Agrícola de la ESPAM-MFL y sus estudiantes, por permitir mi ausencia reiterada.

Al Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas, a su Jefa, Dra. Lourdes Yabor, personal Técnico, Ing. Julia Martínez, Ing. Alitza Iglesias y Rene Ramos.

A mis amigas, Inaudis Cejas, Lelurfys Nápoles, Iris Capote, Yarianne Lezcano, Mariela Cid, siempre dispuestas a la palabra de motivación necesaria, al igual que a mis amigos Dres. Romelio, Carlitos, Barbarita, Justo, Ramón, Guillermo, Pulido, Raiza, Martha y Maritza.

A los ingenieros Patricio Espinoza y Manuel Zambrano, por su colaboración en la colecta, montaje y evaluación de la experimentación en campo.

A la Licenciada Katty Ormaza, del Laboratorio de Suelos de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, por su ayuda en la aplicación de las técnicas de análisis físico-químicos.

A Rene Carlos Rodríguez, Bárbara Valle y Ermis Yáñez, del Centro de Bioplantas, por su ayuda en la aplicación de las técnicas bioquímicas y moleculares de análisis.

A Sandra María Llanes, por la logística e impresión de este trabajo.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (SENESCYT), por la Beca asignada, lo que en definitiva, permitió el inicio y la culminación de este trabajo.

A los mencionados, y más aún a los no mencionados debido a mis lagunas mentales, MUCHAS GRACIAS.

SÍNTESIS

La presente investigación se inició a partir de la colecta y caracterización de la diversidad del tomate silvestre *Solanum pimpinellifolium* del cantón Bolívar (600 km² de extensión, provincia de Manabí en Ecuador). Se tuvo como antecedente que la crioconservación (almacenamiento a la temperatura del nitrógeno líquido, -196°C) es uno de los métodos más prometedores para la conservación a largo plazo de semillas ortodoxas. Se abordó el siguiente Objetivo General: Establecer un banco de semillas crioconservadas para la preservación de la diversidad del tomate silvestre *S. pimpinellifolium* del cantón Bolívar. Las principales conclusiones fueron: Se colectaron 63 accesiones con diferencias en cuanto a los indicadores de caracterización *ex situ*; la exposición de las semillas al nitrógeno líquido produjo variaciones en los indicadores bioquímicos en las plantas de tomate silvestre pero no se observaron diferencias entre las plantas derivadas de semillas crioconservadas y no crioconservadas a nivel fenotípico visible, así como cambios en la secuencia de ADN; la crioconservación de semillas de tomate silvestre no afectó el porcentaje de germinación respecto a las semillas almacenadas a 4°C, ni afectó la viabilidad de las semillas de los genotipos seleccionados por sus características contrastantes, en todos los casos las plántulas alcanzaron altos porcentajes de expansión de sus hojas cotiledonales. Por todo lo anterior: se establece que la crioconservación *ex situ* de semillas de la especie, asegura la estabilidad fenotípica de los caracteres botánicos principales y garantizará una estrategia complementaria para la preservación de la diversidad de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* a largo plazo en posibles programas de mejora y su reintroducción *in situ*.

ÍNDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Características del género <i>Solanum</i> sección <i>Lycopersicon</i>	6
2.1.1 Taxonomía, distribución y hábitats	6
2.1.2 Diversidad, genética y evolución del modo de reproducción	11
2.1.3 Importancia de las especies silvestres del cultivo de tomate	14
2.2 Conservación <i>ex situ</i> de semillas de las especies silvestres de tomate	16
2.2.1 Colecta	19
2.2.2 Caracterización	20
2.2.3 Almacenamiento	23
2.3 Conservación de los recursos fitogenéticos con énfasis en la crioconservación de semillas ortodoxas	25
2.4 Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación	27
3. MATERIALES Y METODOS	30
3.1 Colecta y caracterización de la diversidad del tomate silvestre (<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.) en el cantón Bolívar de la provincia de Manabí en Ecuador	31
3.1.1 Colecta y caracterización ambiental <i>in situ</i>	31
3.1.2 Caracterización <i>ex situ</i> de las accesiones	34
3.2 Influencia de la exposición de semillas de <i>S. pimpinellifolium</i> L. al nitrógeno líquido y su respuesta bioquímica, botánica y molecular	37
3.2.1 Caracterización bioquímica de plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas en etapas tempranas de la germinación.	37
3.2.2 Caracterización en etapas tempranas de la germinación del contenido de fenoles en plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas durante diferentes tiempos en nitrógeno líquido	43
3.2.3 Caracterización botánica en campo y molecular de plantas regeneradas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas	43
3.3 Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre	48

3.4 Comparación de las accesiones más representativas en cuanto al porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al nitrógeno líquido	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1 Colecta y caracterización de la diversidad del tomate silvestre (<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.) en el cantón Bolívar de la provincia de Manabí en Ecuador	50
4.1.1 Colecta y caracterización ambiental <i>in situ</i>	50
4.1.2 Caracterización <i>ex situ</i> de las accesiones	54
4.2 Influencia de la exposición de semillas de <i>S. pimpinellifolium</i> L. al nitrógeno líquido y su respuesta bioquímica, botánica y molecular	69
4.2.1 Caracterización bioquímica de plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas en etapas tempranas de la germinación	69
4.2.2 Caracterización en etapas tempranas de la germinación del contenido de fenoles en plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas durante diferentes tiempos en nitrógeno líquido	77
4.2.3 Caracterización botánica en campo y molecular de plantas regeneradas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas	82
4.3 Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre	87
4.4 Comparación de las accesiones más representativas en cuanto al porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al nitrógeno líquido	93
5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	100
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1. INTRODUCCION

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo y los principales países productores son China, India, Estados Unidos y Turquía. En el año 2012 el área de cultivo alcanzó 4,803.680 ha con un volumen de producción total de 211,021.843 t (FAOSTAT, 2012). Es una fuente rica en vitaminas A, B1, B2, B6, C, E y de diversos minerales, además de proteínas, carbohidratos, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido salicílico y fuente de licopeno (Jaramillo *et al.*, 2007).

Por su importancia existen programas de mejoramiento genético encaminados a incrementar la resistencia de la planta al estrés biótico y abiótico (Florido *et al.*, 2007; Álvarez-Hernández, 2009). Sin embargo, éstos programas requieren de la diversidad que existe en las accesiones no cultivadas pues durante su evolución, los parientes silvestres desarrollaron múltiples características que les permitieron sobrevivir en condiciones extremas (Hunter y Heywood, 2012). Además, el potencial del mejoramiento en tomate al utilizar solo germoplasma cultivado llegará a un tope donde las futuras iniciativas de fitomejoramiento utilizarán la diversidad disponible en las especies silvestres emparentadas (Bai y Lindhout, 2007; Menda *et al.*, 2013).

El género *Solanum* L. subsección *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. incluyen 17 especies entre las que se encuentran el tomate cultivado (*S. lycopersicum* L.) y la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* L. (Spooner *et al.*, 2005; Peralta *et al.*, 2006). Ambas especies son auto-compatibles y con frutos rojos, pero difieren en el tamaño del fruto y la forma de su hoja (Peralta y Spooner, 2000; Van der Knaap *et al.*, 2014). Esta última se ha utilizado como fuente de genes para el mejoramiento de importantes rasgos del tomate comercial (Juvik *et al.*, 1982; Rick y Chetelat, 1995; Mieslerova *et al.*, 2000; Zuriaga *et al.*, 2009;

Pratta *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012; Merk *et al.*, 2012; Mahuad *et al.*, 2013) por sus facilidades de hibridación con la especie *S. lycopersicum* (Rick, 1979).

La ubicación geográfica de la especie *S. pimpinellifolium* está restringida a las áreas costeras de Perú y Ecuador, y las accesiones ecuatorianas son las menos representadas en la base de datos a nivel internacional (Zuriaga *et al.*, 2009). Además, las poblaciones de esta especie se han reducido o presentan riesgos de extinción debido a la pérdida de hábitat por factores climáticos (Bioversity, 2006; Bauchet y Causse, 2012). Una amenaza adicional a tener en cuenta es el cambio global (Hunter y Heywood, 2012). Por lo anterior, se justifica la investigación ya que es indispensable establecer una estrategia complementaria para la preservación de la diversidad de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* a largo plazo.

En este sentido Ecuador figura a nivel mundial entre los cinco países con más alto grado de diversidad biológica (MAE, 2010). Sin embargo, las especies silvestres afines a las cultivadas han sido poco estudiadas y no consideradas de manera explícita en las políticas ambientales (Tapia *et al.*, 2008; Grijalva *et al.*, 2012). En el caso particular de Manabí, provincia costera localizada en el emplazamiento centro-noroeste del Ecuador continental, se considera un centro de agrobiodiversidad muy importante, donde varios de sus cantones (por ejemplo, el cantón Bolívar con 600 km² de extensión) presentan una alta vulnerabilidad al cambio climático (Cuesta *et al.*, 2006; COPISA, 2012).

El concepto de estrategia de conservación complementaria incluye una combinación de diferentes acciones que conducen al uso sostenible de la diversidad (Dulloo *et al.*, 2009). El principio considera el rango de opciones de conservación disponibles y aplica la combinación apropiada y específica (Hunter y Heywood, 2012).

Los dos principales enfoques (*ex situ* e *in situ*) son importantes (Hunter y Heywood, 2012). Mientras que la conservación *in situ* es esencial para generar nueva diversidad por procesos de selección natural, tiene desventajas para la conservación en cuanto a la posibilidad de usar estos recursos genéticos en el fitomejoramiento (Engels *et al.*, 2008; Maxted y Kell, 2009). Es importante respaldar la intervención *in situ* con una conservación complementaria *ex situ* en bancos de germoplasma como semilla, plantas vivas (en campo o en jardines botánicos), cultivo de tejidos o crioconservación (Hunter y Heywood, 2012). Todo conocimiento que se logre se enmarca en el alcance e integración necesaria con la fisiología de la conservación de las especies (Cooke *et al.*, 2013).

La crioconservación es uno de los métodos más prometedores para la conservación a largo plazo y una de sus ventajas es que requiere poco espacio, comparada con las colecciones *in vitro* o de campo (Reed *et al.*, 2001; Panis y Lambardi, 2006; Benson, 2008; Reed, 2008; Berjak *et al.*, 2011a; Khoury *et al.*, 2010). La crioconservación mediante la utilización de temperaturas ultra bajas, a través del nitrógeno líquido (NL, -196°C), inhibe la división celular y la mayoría de los procesos metabólicos y físicos (Ramírez y Salcedo, 2013). Además, es un método eficiente en términos de costos (Dulloo *et al.*, 2009).

Las semillas, como órgano reproductor por excelencia, pueden ser almacenadas por tiempos mayores a temperaturas ultra-bajas con el uso de la crioconservación (Pritchard y Dickie, 2003). Una predicción temprana realizada por Pritchard (1995), sugirió que la longevidad de la semilla a temperatura criogénica podría ser 175 veces mayor. Además, en el caso de las semillas de tomate tienen un alto valor científico ya que se consideran un “sistema modelo” por su estructura simple y tamaño (Hilhorst *et al.*, 1998; Pesaresi *et al.*, 2014), para estudiar la fisiología y bioquímica, incluyendo el análisis funcional durante el

ciclo celular del desarrollo, germinación y dormancia (Bino *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997; De Castro y Hilhorst, 2000; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

En ensayos preliminares, se comprobó que la semilla de *S. pimpinellifolium* sobrevive a la exposición al NL. Sin embargo, en el contexto de los bancos de germoplasma *ex situ*, los efectos de la crioconservación deben estudiarse durante todo el crecimiento y desarrollo de la planta, antes de convertir esta técnica en un método de rutina (Pritchard *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2011). Hasta donde se conoce, no se ha realizado trabajo semejante con la diversidad del tomate silvestre en el cantón Bolívar (provincia de Manabí, Ecuador), al considerar la vulnerabilidad de esos recursos genéticos y la necesidad de protegerlos.

De los antecedentes descritos y a partir de la hipótesis: “La conservación de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) en NL, es una alternativa que no afecta los caracteres botánicos principales de las accesiones conservadas”, en el presente trabajo experimental se abordó el siguiente Objetivo General:

Establecer un banco de semillas crioconservadas para la preservación de la diversidad del tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) del cantón Bolívar (Manabí, Ecuador).

A su vez como Objetivos Específicos se consideró:

1. Colectar y caracterizar la diversidad del tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) en el cantón Bolívar de la provincia de Manabí en Ecuador.
2. Determinar el efecto del nitrógeno líquido en plantas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) mediante indicadores bioquímicos, botánicos y molecular.
3. Determinar el efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.).

4. Comparar las accesiones más representativas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) en cuanto al porcentaje de plántulas que logren la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al nitrógeno líquido.

NOVEDAD CIENTÍFICA: Se demostró la diversidad del tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) existente en el cantón Bolívar de la provincia de Manabí en Ecuador. Se caracterizó su desarrollo *ex situ*. Se crioconservaron semillas y se evaluó el efecto de este procedimiento en indicadores bioquímicos, botánicos y moleculares.

VALOR PRÁCTICO: Se demostró que la conservación *ex situ* de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium* L.) en nitrógeno líquido, asegura la estabilidad fenotípica de los caracteres botánicos principales y garantiza la conservación del germoplasma. Esto permitirá disponer de los genotipos silvestres para posibles programas de mejora a largo plazo y su reintroducción *in situ*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características del género *Solanum* sección *Lycopersicon*

2.1.1 Taxonomía, distribución y hábitats

Desde que el tomate cultivado se introdujo en Europa en el Siglo XVI, los botánicos reconocieron la estrecha relación de esta especie con otras del género *Solanum*. De hecho, durante el siglo XVII se le conocía como *Solanum pomiferum* (Zuriaga *et al.*, 2009). El estadounidense Donovan Correll (Correll, 1958) el australiano David Symon (Symon, 1981) y dos célebres taxónomos de solanáceas, el estadounidense William D'Arcy (D'Arcy, 1991) y el argentino Armando Hunziker (Hunziker, 1979) coinciden con el genetista estadounidense Charles Rick (Rick, 1979; Rick y Holle, 1990), especializado en el tomate y sus especies silvestres relacionadas en reconocer a *Lycopersicon* como un género distinto de *Solanum*.

De esta manera, la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* constituye un “clado” monofilético que agrupa al tomate *S. lycopersicum* (especie cultivada), y a las especies espontáneas muy relacionadas con él, las cuales se conocen como tomates silvestres. El clado está constituido por 17 especies herbáceas. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre las especies no están del todo aclaradas (Peralta *et al.*, 2006, 2008; Spooner *et al.*, 2005).

La Tabla 1, provee la lista de todas las especies de tomates silvestres. Los tomates silvestres se agrupaban hasta hace un tiempo en el género *Lycopersicum*. Actualmente, ya incluidas en el género *Solanum*, continúa el descubrimiento y clasificación de nuevas especies de tomates, como por ejemplo *S. arcanum* y *S. huaylasense* en el 2005 (Peralta *et al.*, 2005, Robertson y Labate, 2007).

Tabla 1. Lista de la nueva nomenclatura de las especies de tomate y sus parientes silvestres (con equivalentes en el anterior género *Lycopersicom*), color de fruto, sistema de reproducción y distribución. (Peralta *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2003, 2005).

Nombre Nuevo	Equivalente <i>Lycopersicon</i>	Color del fruto	Sistema de reproducción	Distribución
<i>Solanum</i> <i>lycopersicoides</i> Dunal	<i>Lycopersicon</i> <i>lycopersicoides</i> (Dunal in DC.) A. Child ex J.M.H. Shaw	Verde-amarillo al madurar, Negro cuando está maduro.	Autoincompatible Alógama	En sur de Perú a noroeste de Chile en laderas de los Andes sobre tierras secas, laderas rocosas, entre 2900-3600 m.
<i>Solanum sitiens</i> I.M. Johnst.	<i>Lycopersicom sitiens</i> (I.M. Jhonst) J.M.H. Shaw	Verde-amarillo al madurar, Negro cuando está maduro.	Autoincompatible Alógama	En las laderas andinas al noroeste de Chile entre 2350-3500 m en laderas pedregosas y quebradas secas.
<i>Solanum juglandifolium</i> Dunal	<i>Licopersicom ochranthum</i> (Dunal) J.M.H. Shaw	Verde a amarillo-verde.	Autoincompatible Alógama	Cordillera central y occidental de Colombia hasta el sur de Perú 1900-4100 m
<i>Solanum ochrantum</i> Dunal	<i>Licopersicom juglandifolium</i> (Dunal) J. M. H. Shaw	Verde a Amarillo-verde.	Autoincompatible Alógama	Planta de zonas abiertas y bordes de camino, claros del bosque, nororiente de Colombia al sur de Ecuador, 1200-3100 m
<i>Solanum pennellii</i> Correll	<i>Licopersicom pennellii</i> (Correll) D'Arce	Verde.	Normalmente Autoincompatible algunas autocompatibles	Norte de Perú a norte de Chile, en tierras áridas, rocosas y zonas arenosas desde 0-3000 m
<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp y D. Spooner	<i>Licopersicom hirsutum</i> Dunal	Verde con rayas verde oscuro.	Normalmente Autoincompatible	En variedad de tipos de bosque, desde pre-montano hasta secos en las laderas occidentales de los Andes, centro de Ecuador a centro de Perú, 500-2500 m.
<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal	Verde a verde blanquecino con franjas púrpura.	Autoincompatible Alógama	En la vertiente oeste de los Andes desde el departamento de Tacna en el sur de Perú hasta el Norte de Chile, en zonas muy áridas, planicies rocosas y desiertos costeros desde el nivel del mar hasta los 2000 m.
<i>Solanum huaylasense</i> Peralta y S. Knapp	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Típicamente verde con rayas verde oscuro.	Típicamente Autoincompatible Alógama	En las laderas rocosas del Callejón de Huaylas, a lo largo del río Santa en el departamento de Ancash, Perú y en la cuenca del Río Fortaleza en riberas adyacentes, desde 1700-3000 m.
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Por lo general verde a verde- blanco, a veces encendido de púrpura.	Típicamente Autoincompatible Alógama	En las formaciones de lomas y en ocasiones en los desiertos de la costa central de Perú al Norte de Chile, desde el nivel del mar hasta los 600 m. En ocasiones se produce una semana en los valles de los ríos costeros.

Tabla 1. Continuación

<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr. (1 raza geográfica: Misti nr. Arequipa)	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; también conocido como <i>L. glandulosum</i> C.F. Mul	Por lo general verde a verde- blanco, a veces rojo de color púrpura.	Típicamente Autoincompatible Alógama	Próximo a elevaciones altas en la vertiente oeste de los Andes desde el centro, hasta el Sur de Perú, a veces en las pendientes bajas en los bordes de los deslizamientos, hacia la parte Sur en una gama de especies; entre 400, 1000-3000 m de altitud.
<i>Solanum arcanum</i> Pera (4 razas geográficas: 'humifusum', lomas, Marafion, Chotar Yamaluc)	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Normalmente verde oscuro con rayas verdes.	Normalmente autoincompatible, alógama, raras, autocompatible autógamas, facultativos alógama	Zona Costera y en valles interandinos, Norte de Perú, entre 100 a 2500 m. Se produce en lomas, quebradas secas y laderas secas y rocosas.
<i>Solanum chmeilewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle) D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon chmeilewskii</i> C.M.Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle	Por lo general verde, con rayas verde oscuro.	Autocompatible, facultativa, alógamas.	Zona Andina alta y seca del Departamento de Apurimac, Sur de Perú hasta el Norte de Sorata en Bolivia, entre 2300-2880 m.
<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle	Normalmente verde oscuro con rayas verdes.	Autocompatible, altamente autógamas	Sur de Perú (Apurimac) hasta el Sur de Ecuador (Azuay), en valles interandinos secos entre 1950-2600 m. A menudo se encuentra sobre sitios rocosos y a orillas de los caminos.
<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Rojo	Autocompatible, autógamas, Facultativo alógamas	Al parecer nativo de las zonas costeras desde el centro de Ecuador hasta el centro de Chile entre 0-500 m.
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	Rojo	Autocompatible, autógamas, Facultativo alógamas	Se conocen formas cultivadas; en todo el mundo en una variedad de hábitats.
<i>Solanum cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Amarillo, naranja.	Autocompatible, exclusivamente autógamas	Endémica de las Islas Galápagos, en Ecuador, desde el nivel del mar hasta 500 m.
<i>Solanum galapagense</i> S.C. Darwin y Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Amarillo, naranja.	Autocompatible, exclusivamente autógamas	Endémica de las Islas Galápagos, islas occidentales y meridionales, mayoría en la costa de lava dentro de 1 m de marea alta dentro de los límites del agua de mar (muy tolerantes a la sal), ocasionalmente en el interior, las laderas del volcán en Isabela y Fernandina.

Los miembros de la sección *Lycopersicon* son plantas herbáceas, a pesar de que pueden presentar crecimiento secundario. En sus hábitats naturales se comportan como anuales debido a que las heladas o la sequía les causan la muerte tras completar su primera estación de crecimiento. En todas las especies el tallo es al inicio erecto, pero luego, debido al peso de sus ramas, las plantas se postran y hasta enraízan en los nudos que tocan el suelo. *S. lycopersicum*, *S. habrochaites*, *S. chilense* y algunas accesiones de *S. peruvianum* son robustas y pueden mantener el hábito de crecimiento erecto durante más tiempo hasta que alcanzan los 80-100 cm de altura (Sifres *et al.*, 2011). Todas las especies producen ramificaciones muy largas, las que en algunos casos, como en *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* pueden crecer hasta los 4 m de longitud. La pubescencia, una variable que caracteriza a todas estas especies, es abundante en *S. habrochaites* y *S. pennellii*. Otras variables, tales como la forma y el tamaño de las hojas, de la flor y el color del fruto, son muy diferentes entre las distintas especies de tomates silvestres (Peralta y Spooner, 2000).

Las hojas son imparipinadas, con dos a seis folíolos opuestos o sub-opuestos, sésiles o peciolados. Existe una gran variación inter e intraespecífica para el tipo de hoja: las hay pinnadas o bipinnadas, con folíolos primarios, secundarios o terciarios. La inflorescencia típica en estas especies es una cima con diferentes tipos de ramificaciones (Robertson y Labate, 2007). Las flores son amarillas y, como en las restantes solanáceas, con los sépalos soldados entre sí en su base y los pétalos unidos en toda su longitud. Asimismo, el tamaño y la forma de las flores varía entre las diferentes especies, desde grandes flores con forma de estrella hasta flores rotadas con estigmas muy excertos (Peralta *et al.*, 2008).

El ancestro más probable del tomate cultivado es el tomate cereza o cherry silvestre (identificado como *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*). El cual pertenece a la variedad botánica *cerasiforme*, llamado pajarito, de aliño, vagabundo o tipo cereza, considerado

como el precursor del tomate de mesa cultivado, corresponde a una "maleza" con frutos pequeños, de 1,5 a 3,0 cm de diámetro, originaria de la costa occidental y áreas montañosas de Perú (Peralta y Spooner, 2007). De su zona de origen migró a Mesoamérica y a México donde se presume fue domesticado por las poblaciones indígenas, dando origen a variedades de agricultor tipo cereza, mediante un proceso de domesticación y selección, realizado al comienzo por las comunidades aborígenes y con posterioridad por las comunidades locales (Robertson y Labate, 2007).

Los cerasiformes acompañaron al tomate como "maleza" a diversas partes del mundo. Este se encuentra más distribuido que las restantes especies de tomates silvestres, ya que habita en México, Colombia, Bolivia y otros países sudamericanos (Peralta y Spooner, 2007). El mismo crece silvestre en varias regiones tropicales o subtropicales de todo el mundo, o fue introducido. Los cambios evolutivos más importantes durante el proceso de domesticación han sido su reducción de la base genética y un incremento del tamaño del fruto (Warnock, 1991).

Los tomates silvestres se encuentran en una gran cantidad de hábitats, desde el nivel del mar hasta alturas de más de 3000 msnm, desde las áridas costas del Pacífico hasta las tierras altas húmedas de Los Andes. Se distribuyen solo por América, vegetando en los Andes sudamericanos desde el centro de Ecuador a través de Perú y hasta el norte de Chile y en las Islas Galápagos, donde crecen las especies endémicas *S. cheesmaniae* y *S. galapagaense* (Peralta y Spooner, 2000). Numerosos valles, formados por ríos que llevan sus aguas al Pacífico, caracterizan las laderas occidentales de Los Andes. Las poblaciones de tomates silvestres crecen a diferentes altitudes en esos valles estrechos, se encuentran aisladas entre sí por la geografía y están adaptadas a condiciones de suelo y microclimas muy particulares. Esta diversidad de hábitats contribuye a la gran variabilidad que se puede encontrar entre los tomates silvestres (Peralta y Spooner, 2007).

2.1.2 Diversidad genética y evolución del modo de reproducción

Las especies silvestres son variables por su genética, y representan fuentes para numerosos caracteres que han sido de utilidad en la mejora del tomate durante los últimos 70 años (Blanca *et al.*, 2012). Por ejemplo, la mayoría de los genes de resistencia de los cultivares comerciales proceden de especies silvestres relacionadas. Asimismo, se han identificado caracteres de interés para la mejora de la calidad del fruto o tolerancia/resistencia tanto a estrés biótico como abiótico (Labate y Robertson, 2012; Menda *et al.*, 2013). Un aspecto muy importante es el color del fruto y, en relación con él, se han encontrado niveles importantes de variabilidad en *S. lycopersicum* y en *S. pimpinellifolium* para el contenido de licopeno, β caroteno (Roselló y Nuez, 2002) y vitamina C (Juárez *et al.*, 2009). Sin embargo, el tomate cultivado posee una diversidad genética muy pequeña (Williams y St. Clair, 1993). Se calcula que los genomas de los cultivares de tomate contienen sólo 5% de la variación genética de sus parientes silvestres (Miller y Tanksley, 1990).

Según Jaramillo *et al.* (2007) el tomate es rico en licopeno, pigmento que le proporciona su característico color rojo, y que también se encuentra en la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), la zanahoria (*Daucus carota* L.), el albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y el pomelo (*Citrus* sp. L.); la diferencia es que el tomate tiene mayor proporción de este pigmento y proporciona el 90% del necesario para el organismo humano. El licopeno es el más potente de los antioxidantes, se ha demostrado que esta sustancia puede prevenir e incluso combatir el cáncer porque protege las células de los efectos de la oxidación (Ibitoye *et al.*, 2009).

Las especies silvestres de tomate se diferencian entre sí por su modo de reproducción. Hay especies autoincompatibles, es decir, que pese a ser hermafroditas no producen semillas

cuando son polinizadas con su propio polen y, por lo tanto, son alógamas (Miller y Tanksley, 1990). Por otro lado, hay especies que se autopolinizan y autofecundan, se dice que son autocompatibles y, por ende, autógamas. Entre ambos extremos, finalmente, hay especies que presentan poblaciones autoincompatibles y autocompatibles, y otras que son autoincompatibles, pero pueden dar una proporción de semillas por autofecundación (alógamas facultativas) (Chen y Tanksley, 2004).

El grado en que los estigmas se elongan por arriba de los estambres (variable que se denomina "excepción de los estigmas") es un determinante central en la posibilidad de polinización cruzada y, por ende, de la alogamia en estas especies. Las especies relacionadas con el tomate que son autoincompatibles obligadas o facultativas presentan flores con los estigmas muy excertos. En contraste, otras especies tales como el tomate cultivado, presentan los estigmas insertos lo que promueve la autopolinización (Mahuad *et al.*, 2013). Se ha observado que una región del genoma del tomate, un *QTL* (locus de un carácter cuantitativo), denominado se2.1 es responsable de una gran proporción de la variabilidad fenotípica observada para este carácter. Las mutaciones en este locus están involucradas en la evolución desde la alogamia hacia la autogamia en estas especies. La localización de este *QTL* en el genoma del tomate ha permitido concluir que se2.1 es un locus complejo que comprende por lo menos cinco genes muy ligados, uno que controla la longitud del estilo, tres que controlan el tamaño de los estambres y el último que gobierna la dehiscencia de las anteras. Este grupo de genes representaría los vestigios de un complejo ancestral de genes coadaptados que controlan el tipo de apareamiento en estas especies de *Solanum* (Chen y Tanksley, 2004; Ramirez-Villegas *et al.*, 2012).

Durante su evolución, los parientes silvestres del cultivo desarrollaron características que les han permitido sobrevivir en condiciones extremas. Por ejemplo, en las costas de las Islas

Galápagos existe un pariente silvestre que ha proporcionado genes al tomate cultivado para conferir tolerancia a la salinidad, por lo que las plantas pueden ser regadas con un tercio de agua de mar (Hoyt *et al.*, 1992; Ramirez-Villegas *et al.*, 2012). Además, la principal fuente de resistencia se encuentra en las plantas silvestres y han sido las más explotadas en el fitomejoramiento de los cultivos (Hoyt *et al.*, 1992; Ramanatha Rao y Hodgkin, 2002).

Es importante tener en cuenta que la heterogeneidad ambiental promueve la plasticidad fenotípica de las especies y esta última tiene relación directa con la estructura genética de las poblaciones (Keyghobadi *et al.*, 1999; Auld *et al.*, 2010) por lo que, en la medida que las frecuencias genéticas cambian, se manifiestan en el fenotipo en respuesta a las condiciones ambientales y tal variación se refleja en diferencias intra o interpoblacionales (Fordyce, 2006). Entonces, la diferenciación entre nichos ecológicos induce los procesos de especiación simpátrica y también a la extinción de las especies o variantes poblacionales que no logran adaptarse (Van Doorn *et al.*, 1998).

Respecto a la influencia del ambiente sobre la variación morfológica de variedades silvestres del tomate, Zuriaga *et al.* (2009) determinaron una alta correlación entre las variables climáticas y la divergencia genética de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* originarias de Perú y Ecuador. Sifres *et al.* (2011) reportan la diferenciación geográfica de *S. habrochaites* en su área de distribución, la cual comprende las regiones montañosas de Ecuador y Perú. Recientemente, Nakazato *et al.* (2011) demuestran en su estudio que los patrones de la evolución natural del tomate silvestre, incluyendo su historia demográfica, patrones de dispersión, divergencia interespecífica e hibridación, se encuentran muy relacionado con las características geográficas y ecológicas del lugar de origen.

2.1.3 Importancia de las especies silvestres del cultivo del tomate

Se puede definir a un pariente silvestre de una especie cultivada como una planta silvestre más o menos relacionada con un cultivo al que le puede aportar material genético pero que, a diferencia de la especie cultivada, no se ha domesticado (Heywood *et al.*, 2007). Como evidencia de la importancia de estos recursos para el mejoramiento de los cultivos realizado en las últimas décadas, Maxted y Kell (2009) señalan 91 artículos que indican la identificación y transferencia de caracteres útiles provenientes de 185 taxones de parientes silvestre a 29 especies cultivadas.

Aspectos agronómicos de importancia también son considerados, para resistencia a plagas (Eigenbrode *et al.*, 1993; Cortez-Madrigal, 2010), para la calidad nutritiva del fruto (Raffo *et al.*, 2006; Rosales *et al.*, 2006), vida útil del fruto (Pratta *et al.*, 2003), estrés salino (Shalata y Tal, 1998), sequía (Menda *et al.*, 2013) y aquellas causadas por virus del género begomovirus (Morales *et al.*, 2009; Vaca-Vaca *et al.*, 2012).

Un aspecto a tener en cuenta si se utilizan plantas silvestres, además de evaluar la resistencia a las plagas o la presencia de otra característica deseable, es conocer el efecto del patrón sobre la calidad de la fruta. Por ejemplo, se ha documentado que algunos patrones pueden influir en la calidad nutricional de las frutas (Martinez-Ballesta *et al.*, 2008) e incluso obtener la translocación de compuestos tóxicos, como ocurrió con los primeros injertos de tomate silvestre *Solanum* con *D. stramonium* (Kubota *et al.*, 2008). Se ha documentado que el efecto del patrón hacia el injerto puede incluso llegar al nivel genético (Zhang *et al.*, 2008).

Tal es la importancia de las especies silvestres de tomate que no existen variedades modernas sin que los parientes silvestres con características como la resistencia a

condiciones de frío extremo y la resistencia a las plagas y enfermedades no se hayan transferido de los parientes silvestres a las cultivadas (Hoyt *et al.*, 1992). Además, el conocimiento de la variación genética permitirá vislumbrar la respuesta evolutiva del tomate ante el inminente cambio climático (Mercer y Perales, 2010).

A través del tiempo, el mejoramiento genético del tomate ha debido suplementar la variabilidad genética del cultivo con varios genes provenientes de los tomates silvestres, con los que se encuentra muy relacionada. Las especies exóticas se han cruzado con el tomate cultivado como fuentes de genes de resistencia a enfermedades (Kasrawi y Mansour, 1994; Laugé *et al.*, 1998; Astua-Monge *et al.*, 2000; Midatharahally *et al.*, 2003; Lindhout, 2005), a nemátodos (Ammiraju *et al.*, 2003), e insectos (Liedl, 1995), a condiciones ambientales adversas (Shalata y Tal, 1998), así como, fuente de variabilidad para caracteres relacionados con la calidad y la maduración del fruto (Weller *et al.*, 1988; De Vicente y Tanksley, 1993; Bernacchi *et al.*, 1998; Lippman y Tanksley, 2001; Esquinas-Alcázar, 2005; Osborn *et al.*, 2007).

En el caso específico de la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, ésta se ha utilizado como fuente de genes para el mejoramiento de importantes rasgos del tomate comercial (Juvik *et al.*, 1982; Rick y Chetelat 1995; Mieslerova *et al.*, 2000; Zuriaga *et al.*, 2009; Pratta *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2012, Merk *et al.*, 2012; Mahuad *et al.*, 2013) debido a sus facilidades de hibridación con la especie *S. lycopersicum* (Rick, 1979). En este sentido: ambas especies son auto-compatibles y con frutos rojos, pero difieren en el tamaño del fruto y la forma de su hoja (Rick y Holle, 1990; Peralta y Spooner, 2000; van der Knaap *et al.*, 2014).

Los avances logrados en el conocimiento de la diversidad genética del tomate son considerables, sin embargo, es conocido también que la plasticidad fenotípica se manifiesta en respuesta a las condiciones ambientales. Respecto a la diversidad genética silvestre del

tomate en el cantón Bolívar de la Provincia de Manabí, no se tiene conocimiento de que datos similares se hayan publicado, esto contribuirá a conocer todo su potencial y la posibilidad de aprovecharlo en los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de nuevos cultivares.

2.2 Conservación *ex situ* de semillas de las especies silvestres de tomate

El conocimiento y la conservación de los cultivos silvestres es de suma importancia en la producción mundial de alimentos (Eigenbrode *et al.*, 1993). Desafortunadamente, las prácticas agrícolas de los últimos años, como el uso de herbicidas y otros productos químicos han llevado a una pérdida gradual de la diversidad biológica y las poblaciones de parientes silvestres de los cultivos se han agotado (Hoyt *et al.*, 1992; Álvarez-Hernández, 2009; Parra-Quijano *et al.*, 2011).

La evolución en nuestro conocimiento sobre la conservación y sus interrelaciones con el objetivo de alcanzar un desarrollo sostenible es importante en los últimos años. Esto se ha manifestado en gran medida con el surgimiento de una disciplina conocida como biología de la conservación, respuesta de la comunidad científica a la ola de cambio global que amenaza una gran fracción de la diversidad biológica mundial. El desarrollo del concepto de la biología de la conservación está muy relacionado con el de biodiversidad (Heywood e Iriondo, 2003).

En este sentido, también es necesario hacer referencia al alcance de una nueva ciencia conocida como ‘Fisiología de la Conservación’ la que ha sido revisada con esmero por los autores Cooke *et al.* (2013). Los mismos plantean que el término se usó por primera vez por Wikelski y Cooke (2006). Es decir, la ‘Fisiología de la Conservación’ es más que la suma de sus palabras integradoras aunque las palabras que lo componen son fuertes. Según Cooke *et al.* (2013) esta ciencia comprende la aplicación de la teoría fisiológica con sus

métodos y herramientas para elucidar y dirigir los problemas de la conservación hacia el objetivo de proveer un conocimiento mecánico, y de cómo la influencia de los factores ambientales y procesos de amenazas impactan en la respuesta fisiológicas y por lo tanto en las funciones ecológicas, existencia de la población y la supervivencia de las especies. En el caso específico de las plantas y que se corresponde con el alcance de esta investigación la “Fisiología de la Conservación” se relaciona con el conocimiento de las condiciones óptimas para la preservación *ex situ* de especies en peligro y con los protocolos de los bancos de semillas para su almacenamiento y regeneración.

Por otra parte, como se conoce la biodiversidad mundial disminuye a una velocidad sin precedentes. Durante el período 1996-2004, un total de 8321 especies vegetales se incorporaron a la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Además, ha aumentado en más del 60% el número de plantas consideradas en peligro crítico (Sarasan *et al.*, 2006). Estos datos resultan sin duda alarmantes y requieren medidas inmediatas de conservación para salvaguardar muchas de estas especies. Aunque la conservación de especies se aborda de un modo mucho más eficaz a través del manejo de las poblaciones silvestres y sus hábitats naturales (conservación *in situ*), las técnicas *ex situ* constituyen herramientas esenciales de conservación, cuya relevancia ha ganado reconocimiento internacional con su inclusión en el artículo 9 del Convenio sobre Diversidad Biológica y en el objetivo 8 de la Estrategia Global para la Conservación Vegetal.

El término germoplasma está formado por la raíz germen (“inicio” u “origen”) y plasma (“formación”), definido como todo material genético capaz de regenerar otra materia viva igual o similar a la original (Bacchetta *et al.*, 2008). El término germoplasma hace referencia a cualquier forma de vida, y puede referirse, en virtud de diferentes rangos

taxonómicos, a un género (ejemplo: germoplasma de *Olea*), a una especie (ejemplo germoplasma de *Olea europaea* L.) o a alguna categoría taxonómica de rango inferior, como subespecie o variedad (ejemplo: *O. europaea* L. var. *sylvestris*). La expresión recursos genéticos sustituye a menudo el concepto de germoplasma y se refiere según el contexto a un conjunto de especies o géneros (por ejemplo: recursos genéticos vegetales, recursos genéticos microbianos) que ofrecen una utilidad económica, ambiental o de otro tipo.

Desde el momento en que las sociedades humanas desarrollaron la agricultura, la conservación de semillas se convirtió en una actividad necesaria para mantener los ciclos de recolección y siembra. La idea de preservar semillas de diferentes especies de todo el mundo en infraestructuras capaces de garantizar su viabilidad a largo plazo surgió en los años 20 y 30 del Siglo XX y se destacó la propuesta del científico ruso Nicolai Ivanovitch Vavilov. Para lograr este objetivo, en casi 30 años se crearon y ordenaron enormes colecciones biológicas, conservado de este modo el germoplasma vegetal *ex situ* de forma sistemática, y se definieron algunos de los procedimientos básicos para la preservación de semillas (Koo *et al.*, 2004).

Los centros encargados de la conservación de la biodiversidad contenida en el germoplasma son denominados como bancos de germoplasma o bien bancos de semillas. En la literatura anglosajona se utiliza el término *seedbanks* (bancos de semillas) o también en sentido amplio *genebanks* (bancos de genes), que pueden incluir colecciones vivas, cultivos *in vitro* o bancos de ADN. Las muestras de material recolectado que se introducen en los bancos de germoplasma para su conservación reciben el nombre de accesiones (también, aunque menos generalizado, muestras o entradas). Cada accesión representa la entrada en el banco de un lote de germoplasma relativo a una única recolección, para una

unidad taxonómica determinada y una población biológica definida, identificada así de modo inequívoco (Bacchetta *et al.*, 2008).

Es importante subrayar que hasta hace pocos años los bancos de germoplasma centraban su interés casi en la conservación de las variedades agronómicas. De hecho, el 90% de todas las accesiones presentes en la actualidad en bancos de semillas está representado por especies de interés alimentario, muchas de ellas variedades de alimentos básicos como trigo, maíz, arroz, alubias y sorgo, que a una escala mundial se cultivan de forma intensiva y que en conjunto tienen gran importancia económica (Esquinas-Alcázar, 2005). La actual profusión de bancos de semillas con vocación de preservar plantas silvestres raras o en riesgo de extinción es consecuencia de los acuerdos y obligaciones adoptados tras la Cumbre de la Tierra, celebrada en Río de Janeiro en 1992 para evitar la pérdida de diversidad biológica y quedó materializado en el Convenio de Diversidad Biológica.

2.2.1 Colecta

Por lo general, las prioridades para coleccionar germoplasma se determinan según la especie y/o la región geográfica, y las principales razones para coleccionar son las siguientes (Gold *et al.*, 2004): 1) Rescatar la especie objetivo porque está en peligro de erosión genética o de extinción (colecta de rescate). 2) Necesidad de usarla en el fitomejoramiento, el cultivo, el manejo de tierras (colecta para uso inmediato). 3) Llenar vacíos en colecciones *ex situ*, como cuando faltan taxones o genotipos, o si se ha recolectado poco germoplasma de la especie objetivo en ciertas zonas (colecta para uso futuro). 4) Conocer mejor la especie objetivo (colecta para investigación). 5) Porque se presenta la oportunidad de coleccionar germoplasma con características muy particulares o se encontró en circunstancias inusuales (colecta de oportunidad).

En este sentido, para priorizar las especies con fines de conservación de semillas se pueden usar criterios biológicos, ecológicos, o por el grado de amenaza por factores antrópicos de una población o flora de un área determinada, interés científico y accesibilidad (Engels *et al.*, 1995). Precisamente las especies silvestres relacionadas con los cultivos requieren una urgente colección *ex situ* para una disponibilidad a largo plazo (Parra-Quijano *et al.*, 2011; Ramirez-Villegas *et al.*, 2012). Por ejemplo, en toda América del Sur las poblaciones de tomate silvestre se han reducido debido a la cría de cabras en las tierras altas y a la pérdida de hábitat (Bioversity, 2006; Ramirez-Villegas *et al.*, 2012).

En el caso de la especie silvestre *S. pimpinellifolium* es indispensable una estrategia de colecta para la preservación de la diversidad a largo plazo. La ubicación geográfica de esta especie está restringida a las áreas costeras de Perú y Ecuador, y las accesiones ecuatorianas son las menos representadas en la base de datos a nivel internacional (Pratta *et al.*, 2011). Aunque, en la última década se han realizado algunas expediciones de colecta por el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV, España), de conjunto con la Universidad Nacional de Loja (Ecuador), la Universidad Nacional de Piura (Perú), la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Perú), y el Parque Nacional de Galapagos (Ecuador) (Zuriaga *et al.*, 2009). Sin embargo, estas han sido insuficientes porque sus poblaciones están reducidas o presentan riesgos de extinción debido a la pérdida de hábitat por factores climáticos y no se ha cubierto todo el rango de su distribución (Bioversity, 2006; Bauchet y Causse, 2012). Una amenaza adicional a tener en cuenta es el cambio global (Hunter y Heywood, 2012).

2.2.2 Caracterización

Para una correcta caracterización se deben definir descriptores (rasgos de la variedad) que sean útiles y fáciles de determinar. En general se diferencian dos tipos de descriptores, los

cualitativos y los cuantitativos. Los cuantitativos son aquellos que se pueden medir: por ejemplo el diámetro o la masa de los frutos y la altura que alcanza la planta en su madurez. Los cualitativos son aquellos que responden a factores, que no podemos medir directamente, pero sí los podemos apreciar: es el caso del color o del sabor de los frutos, por ejemplo (Roselló y Soriano, 2009).

La utilización de las diferencias fenotípicas como marcadores en el análisis genético aplicado a la mejora vegetal se remonta a las primeras décadas de la Genética como ciencia. Los marcadores morfológicos controlados por un sólo locus pueden usarse como marcadores genéticos si su expresión es temprana, reproducible en cualquier ambiente y están muy ligados con un carácter de interés económico (Vázquez *et al.*, 2000).

En estudios de diversidad, la elección de los caracteres juega un papel importante, puesto que algunos pueden ser más variables entre individuos y, por tanto, más discriminantes. Por ello, punto de partida es la utilización de los descriptores editados por el *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI). Entre otros, podemos encontrar los descriptores de tomate (IPGRI, 1996) los que permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos, por lo general son caracteres muy heredables, que pueden detectarse a simple vista y se expresan en todos los ambientes.

Sin embargo, los marcadores de ADN representan un avance cuantitativo ya que pueden acceder a un rango de variabilidad mucho mayor, que abarca tanto las regiones codificantes como las que no lo son. La mejora cualitativa y cuantitativa aportada por los marcadores de ADN ha sido crucial para que se hayan convertido en una herramienta muy potente para el análisis genético y sus aplicaciones (García-Mas *et al.*, 2000).

Posteriormente, la disponibilidad de información de secuencias permitió desarrollar otros tipos de marcadores más específicos, los más empleados han sido los microsatélites o SSRs

(“Simple Sequence Repeats”). El nivel de polimorfismo de estos marcadores es el más alto cuando se compara con el resto de marcadores y su principal inconveniente reside en la dificultad para obtenerlos puesto que es necesario conocer las secuencias flanqueantes para poder diseñar los cebadores para su amplificación (Kalia *et al.*, 2011). Estos marcadores han sido muy utilizados en estudios de diversidad en gran cantidad de especies cultivadas, incluido el tomate.

La diversidad genética del germoplasma de tomate (*Solanum L.* sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *ex situ* en las colecciones cubanas mediante el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), evidenció un bajo porcentaje de polimorfismo, lo que indica una alta homología entre la sección *Lycopersicon* del género *Solanum*, además de cuatro grupos de diversidad, el primer grupo se conformó con las accesiones de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*, debido a su alto grado de homología y los otros por las accesiones de *S. peruvianum*, *S. pennellii* y *S. habrochaites*, las más distantes del tomate cultivado (Florido *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Pacheco (2011), para determinar la distribución geográfica de la variabilidad morfológica intraespecífica de *Lycopersicon esculentum* Mill. (*Solanaceae*) en el estado de Oaxaca, demostró la diferenciación de 10 grupos morfológicos y seis grupos ecológicos diferentes. Así, la variabilidad morfológica evaluada en tomate presentó una relación directa con la variación ecológica de los sitios de origen de la colecta. Similar variabilidad morfológica fue establecida con anterioridad por Lobo y Medina (2001) al señalar el potencial para introgresar genes a materiales de frutos grandes. Por otra parte, Ashrafuzzaman *et al.* (2010) confirmaron diferencias morfológicas basadas en descriptores e indicaron el potencial genético de sus colecciones evaluadas.

Terzopoulos y Bebeli (2008) en una caracterización molecular para evaluar la diversidad genética en cultivares de tomate de diferente procedencia, determinaron la existencia de dos grupos de similitudes, los tomates criollos y los cultivares comerciales en el primero, debido a que tienen un gran número de genes introgresados de especies silvestres de *S. lycopersicum* y el otro grupo conformado por los híbridos de cherry y las accesiones de *S. pimpinellifolium*.

Las caracterizaciones de tipo morfológico y molecular realizadas a colecciones establecidas de tomate silvestre confirman la variabilidad genética de la especie, motivada en parte a su adaptación a las diferentes condiciones ambientales y establecen también la posibilidad de usar esa variabilidad para el mejoramiento genético de la especie. Además, el conocimiento de la variación genética permitirá vislumbrar la respuesta evolutiva del tomate ante el inminente cambio climático (Mercer y Perales, 2010).

2.2.3 Almacenamiento

La conservación de los recursos fitogenéticos se categoriza en dos grandes grupos, *in situ* y *ex situ* (en campo, *in vitro* a mediano plazo y la crioconservación). La conservación *in situ* consiste en la conservación de las especies en su medio natural, lo cual reviste una gran importancia pues permite la progresión de procesos de evolución (Benson, 2008). De acuerdo con Frankel *et al.* (1995) la conservación *in situ* es el método que preserva la información biológica sobre la diversidad genética en su contexto. Hunter y Heywood (2012) definen como *ex situ* a la conservación de muestras representativas de las especies o cultivos que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas.

La conservación en campo se realiza en especies estériles, semillas que no pueden ser conservadas durante largos períodos de tiempo, en especies de reproducción vegetativa para

el mantenimiento de clones y en aquellas que tardan en producir semilla. Necesita grandes extensiones de superficie, coste de mantenimiento elevado y riesgo de pérdidas por ataque de plagas y enfermedades, anomalías climáticas u otros accidentes naturales (Gallardo, 2012).

Diferentes métodos de conservación *in vitro* se han desarrollado y empleado para el almacenamiento a corto o mediano plazo (Engelmann, 1991) y su objetivo es reducir el crecimiento e incrementar los intervalos entre los subcultivos. Esta técnica permite altas tasas de multiplicación, plantas sanas, reduce los requerimientos de espacio y costo. Adicionalmente, en cada subcultivo existe el riesgo potencial de pérdida por contaminación, más importante aún, pérdida de la integridad genética del material debido a variación somaclonal (Scowcroft, 1984).

Entre los métodos de conservación *ex situ*, el almacenamiento de semillas se ha mostrado como el más eficaz (Plucknett *et al.*, 1987). Las semillas son en general pequeñas, poseen constituciones genéticas diferentes y de forma natural son capaces de mantenerse viables durante largos períodos de tiempo. Además, si se mantienen con un bajo contenido en humedad y a bajas temperaturas, entonces en teoría se incrementa el período de conservación a cientos o miles de años (Roberts, 1973). Las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma son un recurso vital e irreemplazable, una herencia que se debe conservar para proveer opciones a la agricultura en el futuro (Berjak *et al.*, 2011b).

Por lo anterior se ha estudiado la posibilidad de utilizar la crioconservación como alternativa a los métodos tradicionales de almacenamiento de semillas. Éstas se almacenan a temperaturas inferiores a -130°C , con mayor frecuencia mediante su inmersión en NL (-196°C) (Stanwood, 1985).

2.3 Conservación de los recursos fitogenéticos con énfasis en la crioconservación de semillas ortodoxas

Las semillas de muchas especies se pueden secar y mantener en condiciones viables a temperaturas bajo cero y con escasa humedad durante muchos años. Es la forma más conveniente de conservación a largo plazo de muchas especies vegetales que tienen semillas llamadas ortodoxas (Roberts, 1973).

Las semillas ortodoxas se han definido como semillas cuyo período de viabilidad aumenta de manera logarítmica al reducir su temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad. Contienen 5% o menos de humedad (valores con una humedad relativa en equilibrio de 10-15% a 20°C) y se pueden almacenar a bajas temperaturas por largos períodos de tiempo (Roberts, 1973).

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos indican que la crioconservación puede ser utilizada en semillas ortodoxas de numerosas plantas cultivadas (Stanwood y Roos, 1979; Stanwood, 1980; Stanwood y Bass, 1981), forestales (Ahuja, 1986; Jørgensen, 1990; Pita *et al.*, 1997, 1998), medicinales (Decruse *et al.*, 1999), leguminosas (Cardoso *et al.*, 2000), o de flora silvestre (Iriondo *et al.*, 1992; Touchel y Dixon, 1993, 1994; González-Benito *et al.*, 1998). Además es un método eficiente en términos de costos para la conservación a largo plazo y que requiere muy poco mantenimiento (Dulloo *et al.*, 2009). La crioconservación se muestra como una de las alternativas más prometedoras para la conservación de semillas a largo plazo, sobre todo en los países en vías de desarrollo, por su simplicidad y eficiencia, así como por sus bajos costos (Engelmann, 2004).

Entre otras semillas de cultivos importantes, las de tomate están consideradas semillas ortodoxas a la hora de proceder a su forma de conservación. Ellas toleran la desecación lo

que hace que se puedan conservar a muy bajas temperaturas y tolerar la exposición a NL (Stanwood y Bass, 1981; Stanwood, 1985).

Las semillas ortodoxas no suelen requerir un enfriamiento gradual. Sin embargo, cuando el contenido de humedad de las semillas es alto puede resultar necesario una desecación previa de las mismas, ya que el contenido de humedad de las semillas es uno de los factores más importantes para controlar la respuesta de la semilla a la exposición a NL (Vertucci y Roos, 1993). En este sentido se ha demostrado que las semillas de numerosas especies silvestres tras la recolección presentan contenidos de humedad entre 4 y 12% con respecto a la masa fresca y pueden ser almacenadas en NL, sin necesidad de desecación previa ni de un enfriamiento gradual (Iriondo *et al.*, 1992; Iriondo, 2001). La descongelación de las semillas crioconservadas se lleva a cabo colocándolas a temperatura ambiente al sacarlas de los tanques de crioconservación. En estas circunstancias se evita la necesidad de llevar a cabo controles de viabilidad, responsables de una disminución significativa del número de semillas almacenadas, y se soslayan los riesgos de cambio genético asociados a los procesos de multiplicación.

Otras ventajas de las técnicas de crioconservación son la ausencia de controles de temperatura y humedad durante el almacenamiento, la inexistencia de daños por parásitos y patógenos y, en teoría, una viabilidad indefinida. Por ello, los bancos de crioconservación de semillas ortodoxas constituyen una alternativa interesante a los bancos de semillas convencionales, sobre todo para muestras de las que no se dispone gran cantidad de semilla y de las que no es factible realizar nuevas recolecciones (Stanwood, 1985; Iriondo, 2001).

En estudios realizados por Walters *et al.* (2004), en semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), se evidenció que la escala de tiempo para los cambios biológicos a temperaturas criogénicas provee información en la eficiencia de los tratamientos de preservación y

mecanismos de actividad biológica a temperaturas ultra-bajas. Estos autores predicen escalas de tiempo en el orden de cientos o miles de años de conservación bajo estas temperaturas; en estas semillas el daño por formación de hielo es considerado improbable.

En base a la ecuación de viabilidad, los estimados de longevidad de las semillas a -18°C fueron cerca de 46-70 años, lo que representa 74 años menos que a las temperaturas criogénicas. Esto permite que se pueda mantener en NL una sub-muestra de cualquier accesión de las que se almacenan en condiciones clásicas en los bancos de germoplasma (Pritchard *et al.*, 2009; Engelmann, 2010).

En este sentido, el mecanismo que permite a los organismos tolerantes a la desecación como es el caso de las semillas ortodoxas y que son capaces de sobrevivir a casi una completa eliminación del agua celular por largos períodos de tiempo se denomina estado vítreo según Burke (1986). Este autor propuso que el citoplasma de las semillas desecadas puede entrar en ese estado como un mecanismo de defensa. El estado vítreo se define como metaestable amorfo que asemeja un material sólido pero quebradizo y retiene las propiedades físicas y de desorden del estado líquido (Benson, 2008). Es decir, el estado vítreo se considera un líquido muy viscoso, y esta alta viscosidad ha mostrado que detiene la difusión molecular y disminuye la probabilidad de una reacción química (Walters, 2004).

2.4 Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación.

A nivel mundial existen varios centros donde se preservan en colecciones crioconservadas, semillas de especies en riesgo de erosión genética de la región. La conservación de material vegetal y en particular las semillas con el empleo del NL, puede conducir a la realización de investigaciones destinadas a estudios biofísicos, bioquímicos, morfo-agronómicos y de estabilidad genética y molecular a las temperaturas ultra-bajas en el contexto de la “Criobionómica” (para estudiar su efecto sobre el genoma y la estabilidad genética de las

plantas) y la reintroducción al ambiente de organismos provenientes de germoplasma crioconservado (Harding, 2004).

Las técnicas de crioconservación existen para más de 100 especies vegetales; el empleo de NL para la conservación a largo plazo expone al tejido a estrés físico, químico y fisiológico, lo que puede causar daños por las temperaturas ultra bajas (Harding, 2004). El estado fisiológico del germoplasma antes de ser conservado tiene implicaciones importantes para la estabilidad y viabilidad a largo plazo (Benson, 2008). Además, los parámetros físicos y bioquímicos del material vegetal tienen un efecto en su capacidad para almacenarse por largo tiempo (Reed *et al.*, 2001).

Aunque los efectos sobre el genoma son poco conocidos, se plantea que en plantas regeneradas de material procedente del cultivo *in vitro* y crioconservadas, cualquier acumulación de ADN polimórfico está inducido como resultado de un proceso completo de cultivo-crioconservación-regeneración y no de la crioconservación *per se* (Harding y Benson, 2001).

El análisis de la integridad genética de las plantas procedentes de materiales crioconservados, para determinar si son estables después de la crioconservación puede realizarse a nivel fenotípico, histológico, citológico, bioquímico y molecular; y existen diferentes técnicas de análisis. Por lo que, en los últimos años los científicos que se dedican al estudio de las diferentes técnicas de crioconservación, sustentan sus resultados con el empleo de las *Omics* (Benson, 2008).

Comprender cómo y por qué el germoplasma sobrevive o no en condiciones congeladas, se emplea como provecho de la crioconservación de plantas (Benson, 2008); por ejemplo, las yemas dormantes y los tejidos aclimatados al frío, sufren cambios estacionales en su

metabolismo, esta es una estrategia que se explota en la crioconservación (Sakai, 2004; Towill y Ellis, 2008).

La simulación de la aclimatización a temperaturas frías y templadas, en germoplasma de plantas tropicales también le confiere tolerancia al NL (Chang y Reed, 2000; Sakai, 2004). Entender los complejos mecanismos que permiten la supervivencia a las bajas temperaturas en la naturaleza, puede asistir al reconocimiento del estado criogénico. Con este fin, los avances en bioinformática y tecnologías moleculares (Morrison *et al.*, 2006; Rubin *et al.*, 2006; Keurentjes *et al.*, 2008) juegan un importante papel en las investigaciones que conducen al empleo de las *Omics* en la respuesta del estrés (Thomashow, 1998; Xin, 2001; Sung *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2004; Gray y Heath, 2005; Hannah *et al.*, 2005; Renaut *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2006; Renaut *et al.*, 2006; Van Buskirk y Thomashow, 2006).

Se ha trabajado mucho en las diferentes técnicas de conservación del germoplasma de plantas, lo que incluye semillas de tomate. Sin embargo, no existen referencias sobre la colecta y caracterización del germoplasma de *S. pimpinellifolium* en el cantón Bolívar en la provincia de Manabí en Ecuador. Tampoco se han realizado estudios post-crioconservación de las semillas de esta especie, temas que se abordan en la presente investigación. Tales estudios son importantes antes de establecer la crioconservación de semillas de *S. pimpinellifolium* como una técnica de rutina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades de los experimentos y tratamiento estadístico de los datos

La investigación se realizó a partir de enero del 2011 y consistió en: colecta de las accesiones y caracterización ambiental *in situ*; caracterización *ex situ* de las accesiones en condiciones de campo, realizada en el área experimental de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí y determinaciones analíticas en condiciones de laboratorio realizadas en el laboratorio de suelo y en el laboratorio de bioquímica, de la antes mencionada Institución. El esquema general de la investigación aparece en la Figura 1.

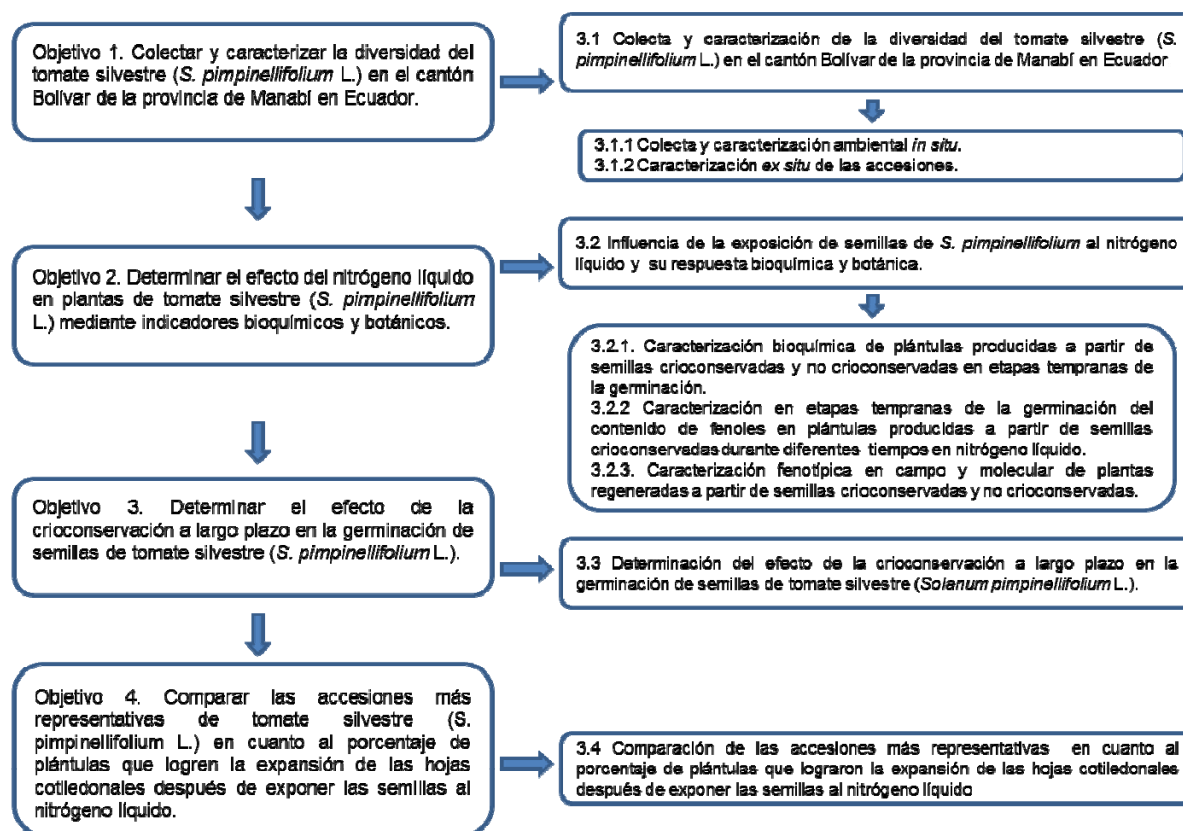


Figura 1. Esquema general de la investigación realizada.

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el SPSS (Versión 11.5 para Windows, SPSS Inc.). En el caso de la colecta *in situ* se aplicó estadística descriptiva mediante el cálculo de las frecuencias relativas de accesiones presentes en cada una de las categorías de la variable analizada (acápites 3.1.1, 4.11). Para la caracterización *ex situ* se utilizó la prueba chi-cuadrado (χ^2) para probar si existía el mismo número de accesiones ($p=0,05$); (acápites 3.1.2, 4.1.2). Se realizó además un análisis jerárquico de clúster con las variables cuantitativas, lo que generó un dendograma con los agrupamientos promedios (entre grupos). Para los experimentos de los acápites 3.2, 3.3, 3.4, 4.2, 4.3 y 4.4, se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se realizaron ANOVA para las variables que mostraron distribución normal y homogeneidad de las varianzas, para la separación de las medias se utilizaron las pruebas t-test y Tukey ($p \leq 0.05$). En los acápites 3.2.1 y 4.2.1, además de la prueba t-test, se empleó la fórmula del coeficiente de variación (Desviación típica/Promedio)* 100, para determinar los efectos de la crioconservación: a mayor CV, mayor diferencia entre las dos medias comparadas.

3.1 Colecta y caracterización de la diversidad del tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) en el cantón Bolívar (provincia de Manabí, Ecuador)

3.1.1 Colecta y caracterización ambiental *in situ*

El cantón Bolívar está ubicado en la parte centro noreste de la provincia de Manabí, Ecuador, limita al este con el cantón Pichincha, al sur con los cantones Portoviejo y Junín y al norte con los cantones Tosagua y Chone. Su extensión es cerca de 600 km². La población estimada del cantón es de 45 000 habitantes, su cabecera cantonal cuenta con alrededor de 25 000 habitantes (Figura 2).

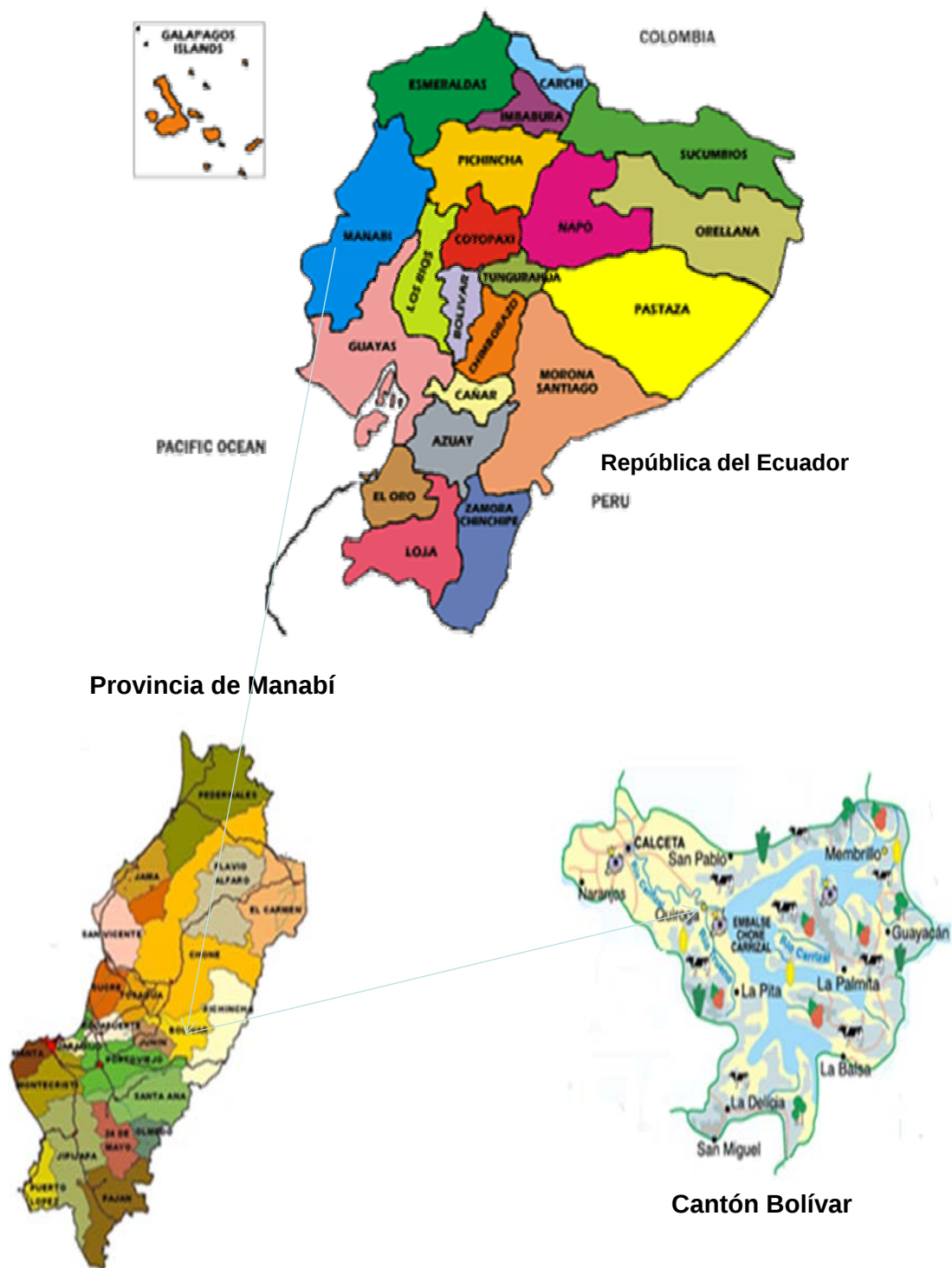


Figura 1. Mapa de área de distribución de *Solanum pimpinellifolium* en Ecuador.

En cada lugar de colecta se cosecharon semillas de una planta sana y se aplicaron ocho descriptores esenciales discriminantes de caracterización del sitio y medio ambiente propuestos por el *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1996) de necesaria disponibilidad para cualquier acceso e importantes para la interpretación de los resultados (Pacheco, 2011), y fueron los siguientes:

- ☐ Drenaje del suelo: 3: Escasamente drenado, 5: Moderadamente drenado, 7: Bien drenado. Adaptado de FAO (1990).
- ☐ Textura del suelo, determinado por análisis en correspondencia a cada fracción fina de suelo. Adaptado de FAO (1990).
- ☐ Disponibilidad de agua: 1: Lluvioso, 2: Bajo riego, 3: Inundado, 4: Orilla del río, 5: Costa del mar, 6: Otro.
- ☐ pH, valor real a una profundidad de 16-30 cm a un lado de la accesión.
- ☐ Pedregosidad: Clase 0: Sin piedras o con muy pocas, Clase 1: Moderadamente pedregoso, Clase 2: Pedregoso, Clase 3: Muy pedregoso, Clase 4: Excesivamente pedregoso, Clase 5: Terreno ripioso.
- ☐ Salinidad: 1: 160 mg·L⁻¹ de sales disueltas, 2: 160-240 mg·L⁻¹, 3: 241-480 mg·L⁻¹, 4: >480 mg·L⁻¹. (HM digital, mod. Com-100).
- ☐ Color del suelo: 1: Blanco, 2: Rojo, 3: Rojizo amarillento, 4: Rojo amarillento, 5: Marrón, 6: Amarronado, 7: Marrón rojizo, 8: Marrón, 9: Amarillo, 10: Amarillo rojizo, 11: Verde grisáceo, 12: Gris, 13: Grisáceo, 14: Negro azulado, 15: Negro.
- ☐ Conductividad: Método conductimétrico (*Water quality tester* EC/TDS/TEMP. HM digital, mod. Com-100).

3.1.2 Caracterización *ex situ* de las accesiones

Esta actividad se realizó bajo condiciones de campo establecidas como topografía plana; buen drenaje; pH 6,6; textura franco-arcillosa (FAO, 1990) y 15 m sobre el nivel del mar. Se compararon 63 accesiones colectadas. Se establecieron tres repeticiones de 30 plantas cada una. Dentro de cada repetición, las accesiones se distribuyeron al azar en un marco de siembra de hilera simple con un distanciamiento de 150 cm x 150 cm. Se aplicó riego superficial por surcos en tres momentos diferentes, en el trasplante de las plantas desde el semillero, a los 7 y 21 d, las posteriores exigencias hídricas del cultivo fueron satisfechas por la pluviosidad imperante (410 mm). Se seleccionaron 41 descriptores de caracterización para el tomate, específicamente, de la planta, inflorescencia y fruto, susceptibilidad a estrés biótico y abiótico, propuestos por el *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI, 1996), y fueron los siguientes:

- ☐ Tipo de crecimiento de la planta: 1: Enana, 2: Determinado, 3: Semideterminado, 4: Indeterminado.
- ☐ Longitud de la enredadera (cm), medida en 10 plantas seleccionadas al azar, desde el suelo hasta la punta del tallo más largo de la planta.
- ☐ Tamaño de la planta: 3: Pequeña, 5: Intermedia, 7: Grande.
- ☐ Densidad del follaje: 3: Escasa, 5: Intermedia, 7: Densa.
- ☐ Longitud del entrenudo del tallo: 3: Corto, 5: Intermedio, 7: Largo.
- ☐ Densidad de la pubescencia del tallo: 3: Escasa, 5: Intermedia, 7: Densa.
- ☐ Posición de la hoja: 3: Semierecta, 5: Horizontal, 7: Inclínada (colgante).
- ☐ Color de la corola: 1: Blanco, 2: Amarillo, 3: Anaranjado, 4: Otro.
- ☐ Coloración de las venas: 1: Venas oscuras, 2: Normales (claras).

- ☐ Tipo de corola: 1: Cerrada, 2: Abierta.
- ☐ Grado de disección de la hoja: 3: Bajo, 5: Intermedio, 7: Alto.
- ☐ Tipo de hoja: 1: Enana, 2: Tipo de hoja de papa, 3: Estándar, 4: *Peruvianum*, 5: *Pimpinellifolium*, 6: *Hirsutum*, 7: Otro.
- ☐ Longitud del pétalo (mm), promedio de 10 pétalos de diferentes flores de diferentes plantas.
- ☐ Color exterior del fruto no maduro: 1: Blanco verdusco, 3: Verde claro, 5: Verde, 7: Verde oscuro, 9: Verde muy oscuro.
- ☐ Longitud del sépalo (mm), promedio de 10 sépalos de diferentes flores de diferentes plantas.
- ☐ Número de frutos por inflorescencia, evaluado en el segundo racimo.
- ☐ Rayas verdes en el fruto (hombros): 0: Ausente (madurez uniforme), 1: Presente (hombros o parte superior del fruto, alrededor del cáliz es verde mientras que la zona del pistilo es roja).
- ☐ Uniformidad de madurez: 3: Escasa, 5: Intermedia, 7: Buena.
- ☐ Pubescencia del fruto: 3: Escasa, 5: Intermedia, 7: Densa.
- ☐ Tamaño del fruto: 3: Pequeño, 5: Mediano, 7: Grande.
- ☐ Masa del fruto (g), masa promedio de 10 frutos tomados al azar.
- ☐ Forma predominante del fruto: 1: Achatado, 2: Ligeramente achatado, 3: Redondeado, 4: Redondo-alargado, 5: Cordiforme, 6: Cilíndrico, 7: Piriforme, 8: Elipsoide, 9: Otro.
- ☐ Longitud del fruto maduro (mm), medido desde el tallo hasta el ápice del fruto.
- ☐ Homogeneidad del tamaño del fruto: 3: Poca, 5: Intermedia, 7: Mucha.

- ☐ Ancho del fruto maduro (mm), medido en la parte transversal más ancha del fruto.
- ☐ Intensidad del color del fruto: 3: Poca, 5: Intermedia, 7: Mucha.
- ☐ Forma del hombro del fruto: 1: Aplanada, 3: Ligeramente hundida, 5: Moderadamente hundida, 7: Muy hundida.
- ☐ Color del fruto maduro: 1: Verde, 2: Amarillo, 3: Naranja, 4: Rosado, 5: Rojo, 6: Otro.
- ☐ Forma secundaria del fruto: 1: Achatado, 2: Ligeramente achatado, 3: Redondeado, 4: Redondo-alargado, 5: Cordiforme, 6: Cilíndrico, 7: Piriforme, 8: Elipsoide, 9: Otro.
- ☐ Longitud del pedicelo (mm), medida desde la capa de la abscisión hasta el cáliz. (promedio de 10 pedicelos de diferentes plantas).
- ☐ Grosor del pericarpio (mm), medido en la sección ecuatorial del fruto.
- ☐ Intensidad del color del pericarpio: 3: Poca, 5: Intermedia, 7: Mucha.
- ☐ Tamaño del corazón del fruto (mm), medido en la parte más ancha del corazón de 10 frutos escogidos al azar, cortados transversalmente.
- ☐ Color de la carne del pericarpio: 1: Verde, 2: Amarillo, 3: Naranja, 4: Rosado, 5: Rojo, 6: Otro.
- ☐ Forma del corte transversal del fruto: 1: Redondo, 2: Angular, 3: Irregular.
- ☐ Número de lóculos del fruto, registro de 10 frutos.
- ☐ Sólidos solubles, medido en unidades Brix (porcentaje de sólidos), de cuatro muestras de zumo compuesto de cinco frutos.
- ☐ Acidez del fruto, medida a partir de dos muestras de zumo compuesto de cinco frutos.

- Susceptibilidad al estrés por hongos (*Phytophthora* spp): 1: Muy baja o sin signos visibles de susceptibilidad, 3: Baja, 5: Intermedia, 7: Alta, 9: Muy alta.
- Susceptibilidad al estrés por sequía: 1: Muy baja o sin signos visibles de susceptibilidad, 3: Baja, 5: Intermedia, 7: Alta, 9: Muy alta.
- Susceptibilidad al estrés por insectos (*Prodiptosis longifila*): 1: Muy baja o sin signos visibles de susceptibilidad, 3: Baja, 5: Intermedia, 7: Alta, 9: Muy alta. El descriptor de tomate (IPGRI, 1996) orienta a evaluar especies de insectos entre las cuales no aparece esta especie, el criterio para evaluarla fue que *P. longifila* es considerada la principal plaga del tomate en Ecuador (Valarezo *et al.*, 2003).

3.2 Influencia de la exposición de semillas de *S. pimpinellifolium* L. al nitrógeno líquido y su respuesta bioquímica, botánica y molecular

3.2.1 Caracterización bioquímica de plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas en etapas tempranas de la germinación

Con el objetivo de realizar una caracterización bioquímica de las plántulas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*) se seleccionó la accesión 56 a partir del agrupamiento promedio entre grupos y además se correspondía con las características propias de la especie en estudio. Se colectó a los 0° 55' 32,7'' de Latitud Sur y 80° 02' 47,5'' de Longitud Oeste, a 95 m sobre el nivel del mar, en la localidad de Zapote, cantón Bolívar, provincia de Manabí, Ecuador, en condiciones de densidad poblacional baja, la anatomía floral se correspondía con la de una planta autógama, 20% de pendiente del suelo, drenaje moderado, 65,8 mg·L⁻¹ de sales solubles y pH 7,0. El suelo era de coloración negro, textura franco (FAO, 1990) con presencia de piedras aisladas.

Después de coleccionar *in situ* las semillas de la accesión constituida por una planta, se sembraron y cultivaron hasta la cosecha en el área experimental de la Escuela Politécnica de Manabí, bajo las condiciones establecidas en el epígrafe 3.1.2, actividad realizada para incrementar la disponibilidad de semillas. La cosecha se realizó cuando los frutos evidenciaron síntomas de maduración fisiológica, las semillas se lavaron con agua corriente y más tarde se secaron al ambiente colocadas sobre papel filtro Whatman No.1 por un periodo de tiempo de 4 h, luego las semillas se colocan en un recipiente cerrado con un gel de sílice con indicador naranja tipo *Sinchen* (China) durante 20 h (cantidad relativa volumen desecante/volumen semilla, 3:1) (Sungcome *et al.* 2013). Posteriormente se almacenaron durante 4 meses a 4°C en la oscuridad, en recipientes cerrados con hermeticidad (crioviales de 5 mL) en un ambiente controlado y constante. En estas condiciones, para los experimentos se usaron semillas con $6,3 \pm 1,4\%$ de humedad, determinado en base a la masa fresca y mediante su secado a 130°C en un horno (mecánico de convección por gravedad, Osaw Industrial Products Pvt. Ltd) durante 1,5 h (ISTA, 2005).

La mitad de las semillas se colocaron en crioviales (volumen: 2 mL; 50 semillas por criovial) y se sumergieron en NL por 14 d. La otra mitad de las semillas permaneció en las mismas condiciones descritas con anterioridad y considerada como tratamiento testigo.

La recuperación de las semillas del NL se realizó con el cuidado de no dispersarlas luego de abrir los crioviales, y se colocaron sobre bandejas para su descongelación hasta alcanzar la temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 20 min, de acuerdo con Stanwood y Bass (1981), este último procedimiento se aplicó también a las semillas del tratamiento testigo. De cada tratamiento se seleccionaron semillas de forma aleatoria para efectuar las siguientes etapas de experimentación.

Las semillas (tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento) se colocaron sobre tres capas de papel de filtro Whatman No.1 en placas de Petri (Ø: 100 mm) con 15 mL de agua destilada durante 7 d (oscuridad, $27\pm 1^{\circ}\text{C}$). Se evaluaron el porcentaje de germinación (7 d después de la siembra), la conversión en plántulas (17 d después de la siembra, expansión total de hojas cotiledonales) y su masa fresca (17 d después de la siembra).

Técnicas y procedimientos de análisis bioquímico

Los análisis bioquímicos de las plántulas se ejecutaron a los 17 d de la siembra en ambos tratamientos. Cada determinación bioquímica se realizó a partir de tres muestras independientes de 100 mg cada una, de cada órgano analizado (raíz, tallo y hoja) con un total de 90 en cada momento experimental. Las muestras se maceraron en NL. Las técnicas y procedimientos se describen a continuación:

- Contenido de clorofilas: Las clorofilas *a*, *b* y totales (*a+b*) fueron determinadas en las hojas y tallos. Las extracciones se realizaron en un buffer acuoso de acetona al 80% que contenía 2,5 mM de fosfato de sodio pH 7,8 para evitar la conversión de clorofilas a feofitina (Porra *et al.*, 1989). Se realizaron las siguientes modificaciones: Las muestras congeladas fueron maceradas en un mortero con NL hasta obtener un polvo fino, se pesó 0,1 g de material vegetal macerado y se le adicionó 500 μL del buffer. La suspensión resultante se centrifugó a $12000\times g$ durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se colectó para las mediciones directas a longitudes de onda de 664 nm y 647 nm. La concentración de clorofilas *a*, *b* y (*a+b*) se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones: $[\text{Chl } a (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})] = 12,25 A^{664} - 2,55 A^{647}$; $[\text{Chl } b (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})] = 20,31 A^{647} - 4,91 A^{664}$; $[\text{Chl } (a+b) (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})] = 17,76 A^{647} + 7,34 A^{664}$ (Porra, 2002). Para las mediciones de absorbancia (*A*) se usó un

espectrofotómetro *Pharmacia Bio Spectrophotometer*. Los resultados se expresan como ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca).

- Contenido de malondialdehído y otros aldehídos según (Heath y Packer, 1968), en este caso se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (v/v) en ácido tricloroacético 20% y las muestras se mantuvieron en un baño termostático a 100°C durante 25 min. Luego de enfriarlas en hielo, se centrifugaron a 1000×g por 10 min. Se midió el sobrenadante en un espectrofotómetro UV visible *Pharmacia LKB-Ultrospec III* (A 455 nm, A 532 nm). La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído y a 455 nm para otros aldehídos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa fresca.

- Contenido de fenoles (ligados a la pared celular, solubles y total), se determinaron según la técnica descrita por Gurr *et al.* (1992); 0,1 g de material vegetal se maceró en NL y luego se adicionó 0,5 mL de metanol, las muestras se agitaron en un vortex y se centrifugaron a 12000×g durante 15 min. El precipitado se sometió a dos ciclos de extracción con metanol, 250 μL cada uno hasta completar 1.0 mL de extracto, el sobrenadante se colectó y se consideró como la reacción para los fenoles solubles. El precipitado se incubó con 0,25 mL de NaOH 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 16 h a 70°C, se adicionó 0,25 mL de HCl (2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12000×g durante 15 min. El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a la pared celular. Para cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20 μL del sobrenadante se mezclaron con 980 μL de agua destilada. Se adicionaron 100 μL del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, las muestras se incubaron durante 5 min. Se adicionó 600 μL de una solución de NaOH (1 M) saturada con NaCO_3 ,

transcurridos 60 min, se determinó la absorbancia 725 nm con espectrofotómetro UV visible *Pharmacia LKB-Ultroespec III*. La concentración de fenoles se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca, referidos a una curva patrón de ácido clorogénico con coeficiente de extinción $\epsilon=0,0044 (\mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm})^{-1}$. Los resultados se expresan en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa fresca.

- Contenido de proteínas: se siguió el protocolo de Bradford, (1976); las muestras (0,1 g) se maceraron en NL. La extracción se realizó con solución amortiguadora tris-HCl (0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7,0). El extracto (0,1 mL) se mezcló con 1,0 mL de reactivo de Bradford. Se evaluó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa fresca, referido a una curva patrón de albúmina de suero bovino.

- Actividad enzimática Peroxidasa: La extracción de la enzima Peroxidasa (POD), se realizó de acuerdo a Wang y Jiang (2007) con algunas modificaciones. Se tomaron 0,25 g de material vegetal macerado en nitrógeno líquido y se le añadió 2 mL de buffer de extracción que contenía 50 mM buffer fosfato de potasio, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0,1% Triton X-100 (v/v), 1% Polivinilpirrolidona (PVP), 1 mM ditioneitol (DTT) y 1mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) pH 7,8. Se centrifugó a 15 000×g durante 20 min. El sobrenadante fue colectado para las mediciones directas en el espectrofotómetro, mediante el método descrito por Kochhar *et al.* (1979). La actividad peroxidasa fue determinada a 470 nm en una reacción enzimática durante 5 min tomando valores cada 10 s en un bioespectrofotómetro UV visible *Pharmacia LKB-Ultroespec III*. El medio de ensayo contenía buffer fosfato de potasio (10 mM pH= 7), guayacol (100 mM) y peróxido de hidrógeno (13 mM) para un volumen final de 1 mL. La actividad Peroxidasa se expresó en U·mg de proteína (las proteínas se determinaron de

acuerdo a Bradford (1976). Una unidad de Peroxidasa se define como la cantidad de enzima capaz de provocar un cambio en una unidad de absorbancia en 1 min.

- **Determinación de la actividad enzimática de Superóxido Dismutasa:** La enzima Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) fue ensayada por el método de oxidoreducción del citocromo c usando xantina/xantina oxidasa como fuente de radicales superóxido. El medio de ensayo para 1 mL de mezcla de reacción contenía 50 mM de buffer fosfato de potasio ajustado con KOH a pH 7,6; 0,1 mM EDTA; 0,01 mM citocromo c; 0,05 mM de xantina y 0,03 unidades de xantina oxidasa (EC 1.1.3.22 Sigma Aldrich) para 80 μ L de extracto enzimático crudo (McCord y Fridovich, 1969). La reacción fue iniciada con la adición de xantina oxidasa y monitoreada durante 3 min a intervalos de 10 s, diluyendo las muestras en los casos necesarios. Se preparó una mezcla patrón como blanco, y otra sin el extracto para cuantificar la reacción no inhibida por SOD (determinación de la velocidad de reducción del citocromo c). Una unidad de actividad SOD es definida como la cantidad de enzima capaz de causar el 50% inhibición de la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm con un coeficiente de extinción molar de $21,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. El resultado de la actividad volumétrica de SOD se expresa en $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de medio de ensayo. Los resultados de actividad se expresan también en función de la masa fresca utilizada para la extracción ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ masa fresca) y en función de la concentración de proteínas solubles totales como actividad específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteínas).

3.2.2 Caracterización en etapas tempranas de la germinación del contenido de fenoles en plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas durante diferentes tiempos en nitrógeno líquido

En concordancia con el epígrafe anterior, semillas de la accesión 56 que se encontraban almacenadas durante 4 meses a 4°C en la oscuridad, en recipientes cerrados con hermeticidad (crioviales de 5 mL) en un ambiente controlado y constante, se colocaron en crioviales (volumen: 2 mL; 50 semillas por criovial) y se sumergieron en NL por diferentes tiempos (7, 14, 21 y 28 d) con el objetivo de caracterizar en etapas tempranas de la germinación el contenido de fenoles (fenoles ligados a la pared, fenoles solubles y fenoles totales) en plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas. La recuperación de las semillas del NL se ejecutó de acuerdo con Stanwood y Bass (1981), según metodología que se detalla en el epígrafe 3.2.1. Las semillas del tratamiento testigo (sin inmersión en NL) una vez que alcanzaron la temperatura ambiente, se colocaron a germinar directamente.

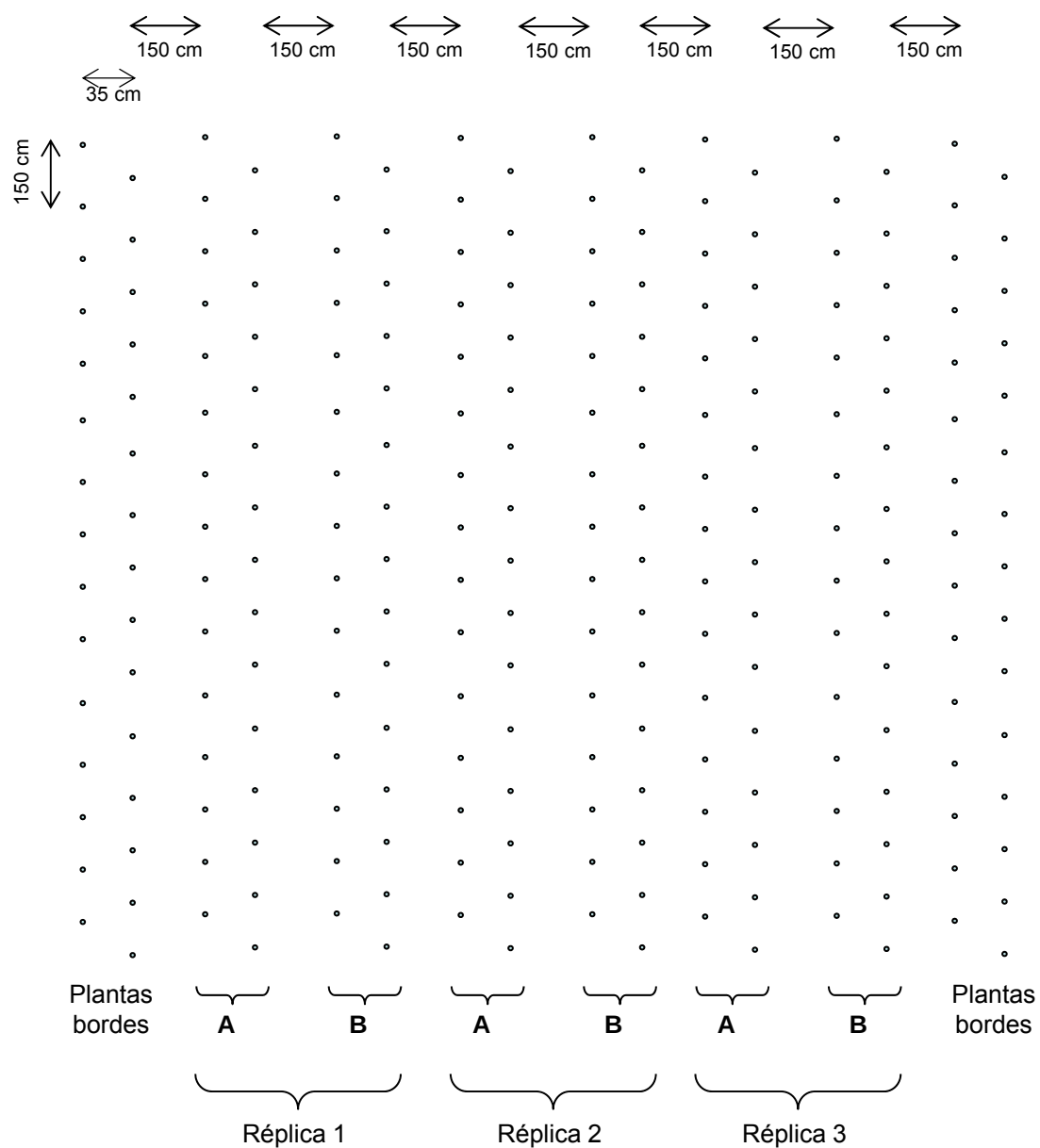
Las semillas (tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento) se colocaron sobre tres capas de papel de filtro Whatman No.1 en placas de Petri (Ø: 100 mm) con 15 mL de agua destilada durante 7 d (oscuridad, $27 \pm 1^\circ\text{C}$). Las determinaciones bioquímicas se ejecutaron con el uso de tres muestras independientes de 100 mg cada una, de cada órgano analizado (raíz, tallo y hoja). Las muestras se maceraron con NL y los contenidos de fenoles se determinaron de acuerdo con Gurr *et al.* (1992), según metodología que se detalla en el epígrafe 3.2.1.1.

3.2.3 Caracterización botánica en campo y molecular de plantas regeneradas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas

Con el objetivo de realizar la caracterización botánica en campo y molecular de plantas regeneradas a partir de semillas crioconservadas, se establecieron dos tratamientos: semillas

crioconservadas y no crioconservadas. Se utilizaron semillas de la accesión 56. Para el primer tratamiento, se colocaron las semillas en crioviales (volumen: 2 mL; 50 semillas por criovial) y se sumergieron en NL durante 28 d. Las semillas del tratamiento testigo (sin inmersión en NL) permanecieron a 4°C en la oscuridad hasta el inicio de la experimentación. La recuperación de las semillas del NL se ejecutó de acuerdo a Stanwood y Bass (1981) según metodología que se detalla en el epígrafe 3.2.1. Para cada tratamiento, las semillas se seleccionaron de forma aleatoria y se realizaron las etapas de caracterización fenotípica en campo y su evaluación molecular. Los análisis morfológicos de la primera y la segunda generación de plantas crecidas en el campo (tres repeticiones de 30 plantas cada una) se desarrollaron de acuerdo a las condiciones y con el diseño experimental mostrado en la Figura 3. Las semillas germinaron primero en un semillero y se trasplantaron al campo a los 25 d posteriores, tal cual lo sugieren los instructivos técnicos del cultivo y cumpliendo parámetros de crecimiento. No se aplicaron fertilizantes ni pesticidas. La caracterización botánica se ejecutó a los 120 d del crecimiento de las plantas mediante el uso de los descriptores definidos (IPGRI, 1996).

Para evaluar la estabilidad genética de la segunda generación de plantas germinadas a partir de las muestras crioconservadas y testigo, se seleccionaron cinco semillas de forma aleatoria en diferentes plantas por cada tratamiento. Las semillas se colocaron sobre tres capas de papel de filtro Whatman No. 1 en placas de Petri (Ø: 9 cm). Los papeles de filtro se humedecieron con 15 mL de agua destilada y las semillas germinaron en la oscuridad a 25°C. El ADN de 10 plántulas (cinco de plantas crioconservadas y cinco testigos) se extrajo de hojas jóvenes ya desarrolladas. De cada planta, el ADN se obtuvo con un *DNeasy Plant mini kit* (Qiagen, Valencia, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del ADN se chequearon mediante geles de electroforesis y análisis espectrofotométricos.



A: Plantas procedentes de semillas no crioconservadas.

B: Plantas procedentes de semillas crioconservadas.

Figura 3. Diseño experimental implementado en campo. Topografía plana; buen drenaje, pH = 6,6; textura franco-arcilloso (FAO,1990) y 15 m sobre el nivel del mar. Los puntos simbolizan las plantas de tomate silvestre (accesión 56).

En la tecnología de la repetición de secuencia única (SSR) se emplearon 12 marcadores para diez plantas de la segunda generación (cinco plantas derivadas de semillas crioconservadas y cinco plantas de semillas no crioconservadas, testigo). Los mismos fueron escogidos por su alto polimorfismo y la pequeña talla de sus productos de PCR (Tabla 2): LE 20592, LE21085, LE EF1Aa y LELE25 de los 44 grupos descritos por Smulders *et al.*(1997); LE at002, LE aat002, LE aat007, LE caa001, LE ct001, LE ctt001, LE ga003, LE ta003, LE tat015 y LE tat002 de los 129 descritos por He *et al.* (2003). La optimización de las temperaturas de hibridación y la concentración de MgCl₂ para cada par de cebadores se produjo mediante gradiente de PCR.

La reacción de PCR en 10 µL de volumen final consistió de 1×PCR del tampón de reacción, 0,2 µmol·L⁻¹ de cada dNTP, 2,0 mmol·L⁻¹ de MgCl₂, 0,3 µmol·L⁻¹ por cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (*Life Technologies*, Carlsbad, USA) y 30 ng de ADN genómico. Las amplificaciones se desarrollaron en un sistema *Mastercycler*[®] ep (*Eppendorf AG*, Hamburg, Alemania) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94°C, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 45 s, 45-57°C por 45 s, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación se separaron primero en un gel con 2% de agarosa ultra pura para chequear los productos del PCR. Los análisis de SSR basados en fluorescencia de electroforesis capilar se condujeron en un ABI PRISM[®] 3130 *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Los cebadores en sentido de la secuencia se etiquetaron con FAM (azul) o HEX (verde), y el estandar *GenScanTM* 500 ROX TM (rojo) se empleó como un estándar interno de talla (*Applied Biosystems*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos primarios de la secuenciación se analizaron con el software *Peak Scanner* (*Applied Biosystems*, versión 1,0) para estimar la talla de la variante.

Tabla 2. Descripción de los 12 marcadores SSR usados para evaluar la integridad del genoma de *Solanum pimpinellifolium* L. formados a partir de plantas de semillas no crioconservadas y crioconservadas. Se indica para cada marcador, el nombre, las secuencias directa y reversa de los cebadores, la secuencia repetida, la talla esperada y la temperatura de hibridación.

Marcador SSR	Secuencia de los cebadores (5' a 3')	Secuencia reversa	Talla (pb)	Hibridación T°C
LE 20592	Fw_CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG Rv_ACTTTAACTTTATTATTGCCACG	(tat) ₁₅₋₁ (tgt) ₄	166	50
LE21085	Fw_CATTTTATCATTTATTTGTGTCTTG Rv_ACAAAAAAAGGTGACGATACA	(ta) ₂ (tat) ₉₋₁	104	45
LE aat002	Fw_GCGAAGAAGATGAGTCTAGAGCATAG Rv_CTCTCTCCCATGAGTCTCTCTCTC	(aat) ₁₂	106	54
LE aat007	Fw_CAACAGCATAGTGGAGGAGG Rv_TACATTCTCTCTCTCTCCCATGAG	(aat) ₁₂	100	50
LE caa001	Fw_AGAAGGCGTGAGAGGCAAC Rv_CTTAGCACTTGATGTTGATTGG	(caa) ₇	105	50
LE ct001	Fw_TCCAATTTCAGTAAGGACCCCTC Rv_CCGAAAACCTTTGCTACAGAGTAGA	(ct) ₁₂	111	54
LE ctt001	Fw_CCTCTCTTCACCTCTTTACAATTTC Rv_CACTGGTCATTAAGTCTACAGCC	(ctt) ₉	101	57
LE ga003	Fw_TTCGGTTTATTCTGCCAACC Rv_GCCTGTAGGATTTTCGCCTA	(ga) ₂₀	241	50
LELE25	Fw_TTCTTCCGTATGAGTGAGT Rv_CTCTATTACTTATTATTATCG	(ta) ₁₃₋₁	225	51
LE ta003	Fw_GCTCTGTCCTTACAAATGATACCTCC Rv_CAATGCTGGGACAGAAGATTTAATG	(ta) ₉	111	52
LE ta015	Fw_ATATGCATGGACAAATCTTGAGGG Rv_CTCGCGCATCAAATTAATGTATCAG	(ta) ₁₅	107	50
LE tat002	Fw_ACGCTTGGCTGCCTCGGA Rv_AACTTTATTATTGCCACGTAGTCATGA	(tat) ₁₂	196	52

3.3 Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre

Con el objetivo de determinar el efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*), se empleó un diseño bifactorial: un factor fue la forma de almacenamiento de las semillas: semillas almacenadas a 4°C (testigo) y semillas crioconservadas. El otro factor fue el tiempo de almacenamiento (0, 6, 12, 18 y 24 meses). Las condiciones experimentales de selección, almacenamiento y recuperación de las semillas son las descritas con anterioridad en el epígrafe 3.2.1. Se realizaron tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento y se evaluó la germinación a los 7 d de la siembra.

3.4 Comparación de las accesiones más representativas en cuanto al porcentaje de germinación y de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al nitrógeno líquido

Para un correcto resguardo de la diversidad genética de las accesiones colectadas, es necesario tomar las consideraciones de los acápites anteriores para determinar el efecto de la crioconservación en las diferentes accesiones de tomate silvestre, con marcado interés para el mejoramiento. En este sentido un aspecto contrastante fue en cuanto a la uniformidad en la madurez del fruto. De esta manera se seleccionaron semillas pertenecientes a: cinco accesiones con escasa, cinco con intermedia y otras cinco con buena uniformidad en la madurez (con un total de 15 accesiones). Las cuales a su vez se correspondían con los tres grupos con marcadas diferencias fenotípicas procedentes del análisis jerárquico de clusters que se generó con los agrupamientos promedios de las variables cuantitativas evaluadas *ex situ*.

Se establecieron dos tratamientos: semillas crioconservadas (18 meses de inmersión en NL) y no crioconservadas (testigo). Las condiciones experimentales de selección, almacenamiento y recuperación de las semillas son las descritas con anterioridad en el epígrafe 3.2.1.

En este sentido, para las 15 accesiones contrastantes primero las semillas se colocan en un recipiente cerrado con un gel de sílice con indicador naranja tipo *Sinchen* (China) durante 20 h (cantidad relativa volumen desecante/volumen semilla, 3:1) de secado (Sungcome *et al.* 2013). Posteriormente, se determina el contenido de humedad de las semillas en base a la masa fresca y mediante su secado a 130°C en un horno (mecánico de convección por gravedad, *Osaw Industrial Products Pvt. Ltd*) durante 2 h (ISTA, 2005) hasta que no existieran diferencias significativas entre las mismas para su almacenamiento en NL. Se tomó como valor límite el de la accesión 56 ya determinado en el acápite 3.2.1 que era de $6,3 \pm 1,4\%$. Se realizaron tres repeticiones de 50 semillas por tratamiento y se determinó la germinación a los 7 d posterior al NL; y de éstas el porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales se determinó después de 17 d de sembradas las semillas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Colecta y caracterización de la diversidad del tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) en el cantón Bolívar (provincia de Manabí, Ecuador)

4.1.1 Colecta y caracterización ambiental *in situ*

Se colectaron 63 accesiones de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*). Los datos de la latitud, longitud, altitud, textura del suelo, drenaje, disponibilidad de agua, pH, conductividad eléctrica, salinidad, color del suelo y pedregosidad aparecen en el Anexo 1.

El análisis de la distribución de frecuencias de la variable drenaje del suelo permite establecer que el 96,8% de las accesiones fueron colectadas en sitios considerados como moderadamente drenados, para los otros niveles de la variable se evidenciaron pocas accesiones en ellas (1,6%), Figura 4A. Para la variable textura del suelo se estableció que el 50,8% de las accesiones fueron colectadas en suelos con textura franco arenosa, seguida con el 20,6% y 19,0% de accesiones ubicadas en suelos con características de textura franco y franco limoso, respectivamente, los otros niveles de la variable mostraron porcentajes menores (Figura 4B). Con respecto a la variable disponibilidad de agua, la distribución de frecuencias permitió establecer que el 54,0% de las accesiones se encontraban en condiciones secas, un 28,6% bajo riego y un 17,4% a orillas del río, en los otros niveles de la categoría no se encontraron accesiones (Figura 4C). Para la variable pH del suelo, se estableció que el 38,1% de las accesiones se encontraron en suelos con características fuertemente ácidas, un 23,8% en suelos moderadamente ácidos a ligeramente ácidos y un 38,1% en suelos con características neutras a ligeramente alcalinas (Figura 4D).

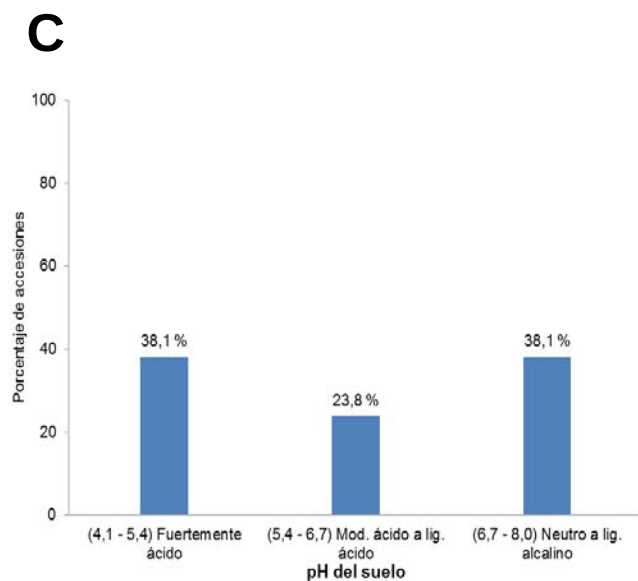
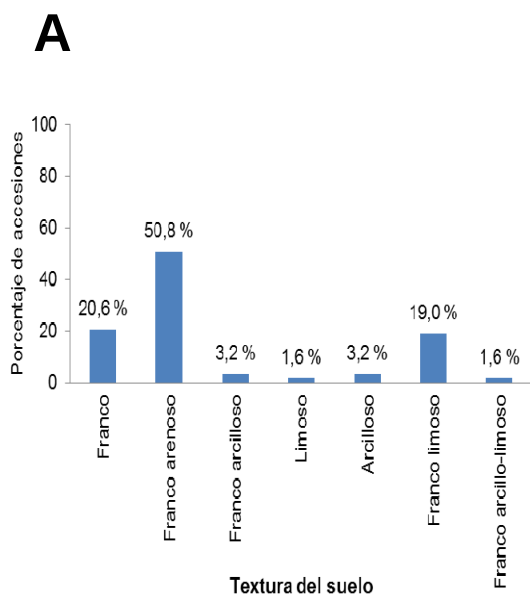
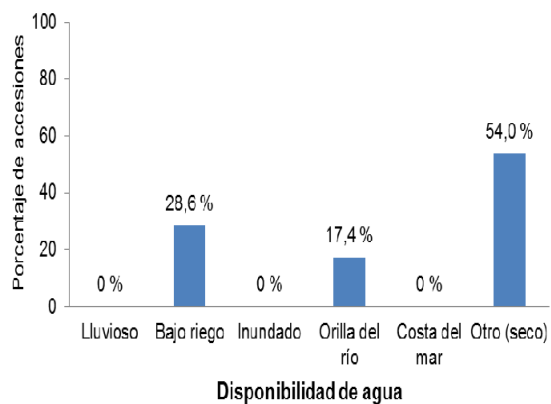
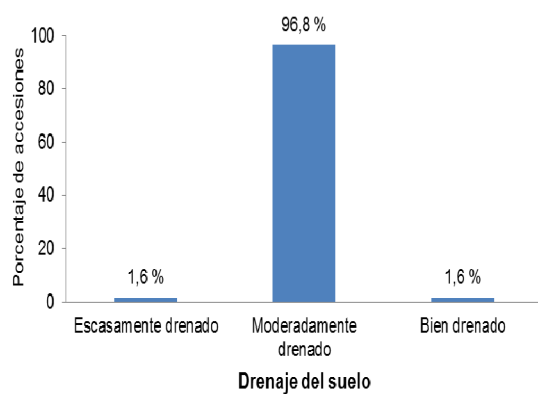
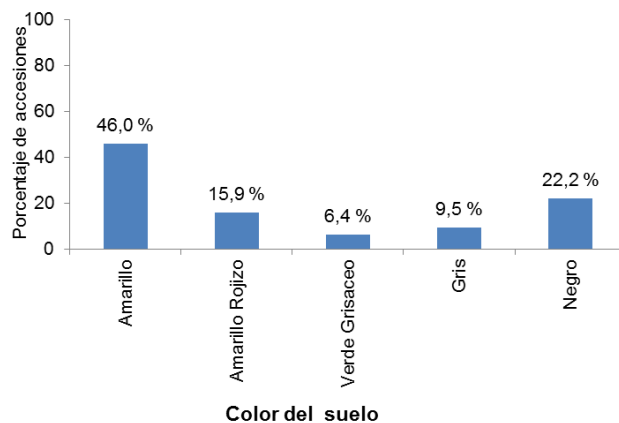
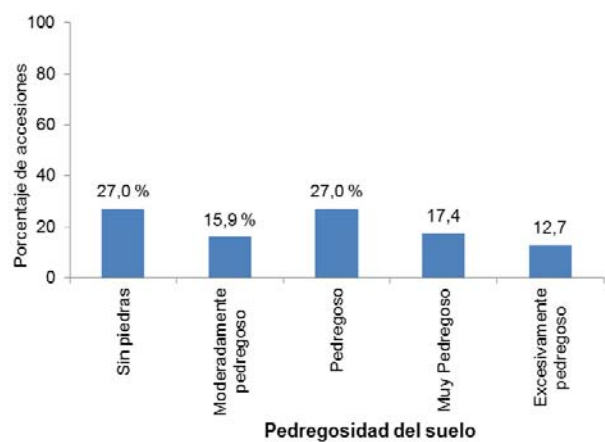


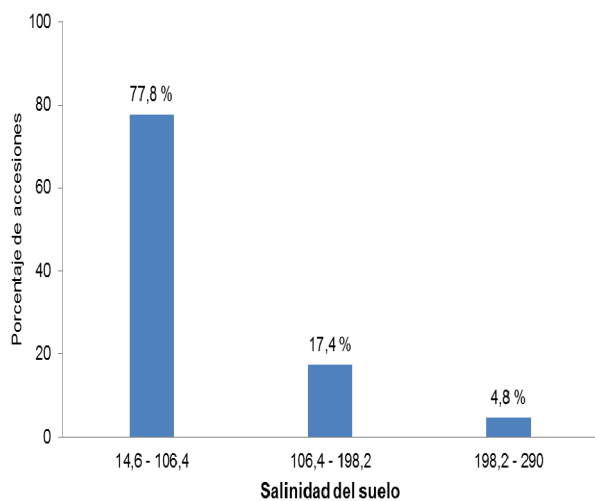
Figura 4. Características de los diferentes sitios de colecta. A: Drenaje del suelo. B: Textura del suelo. C: Disponibilidad de agua. D: pH del suelo.

Para la variable pedregosidad del suelo, la distribución de frecuencias permitió establecer que el 27,0% de las accesiones se colectaron en suelos pedregosos, similar situación a lo ocurrido en suelos sin piedras, los porcentajes de accesiones colectadas en los otros niveles establecidos en la categoría, fluctuaron entre 17,4% y 12,7% (Figura 5A). Con respecto a la variable salinidad del suelo, los sitios de colecta evidenciaron en su mayoría (77,8%) niveles bajos de salinidad con rangos entre 14,6 y 106,4 mg·L⁻¹ (Figura 5B). La distribución de frecuencias para la variable color de suelo, estableció que un 46,0% de las accesiones se encontraron en suelos con coloración amarillo, 22,2% en suelos negros, 15,9% en suelos amarillo rojizo y el resto de accesiones en menores porcentajes en los otros dos niveles establecidos en la categoría (Figura 5C). En cuanto a la variable conductividad eléctrica del suelo, los sitios de colecta evidenciaron en su mayoría (77,8%) conductividad eléctrica baja, entre 31,7 y 213,1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figura 5D).

La variación de las condiciones edafoclimáticas imperantes en los sitios de colecta podría determinar la alta variabilidad morfológica establecida en esta investigación. Pacheco (2011) estableció que existe una relación directa de la variabilidad morfológica evaluada en tomate (*S. lycopersicum*) y determinada por las diferencias ecológicas de los sitios de la colecta, además, refiere que la variación está definida por la altitud, tipo de vegetación, tipo de suelo, temperatura (mínima absoluta, mínima promedio y media anual) y la precipitación anual. Por lo tanto, concluye que la variación ecológica del estado de Oaxaca se correlaciona significativamente con la variación morfológica de las poblaciones caracterizadas de tomate silvestre y cultivado, e infiere que continúa el proceso evolutivo del tomate, ya que es posible encontrar variantes silvestres y con cierto grado de domesticación.

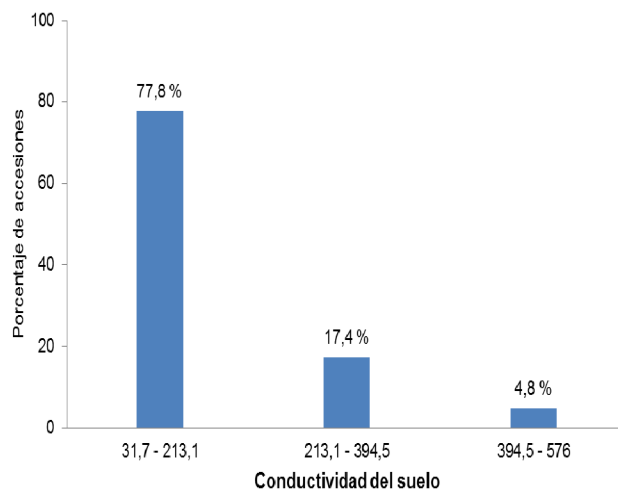


A



B

C



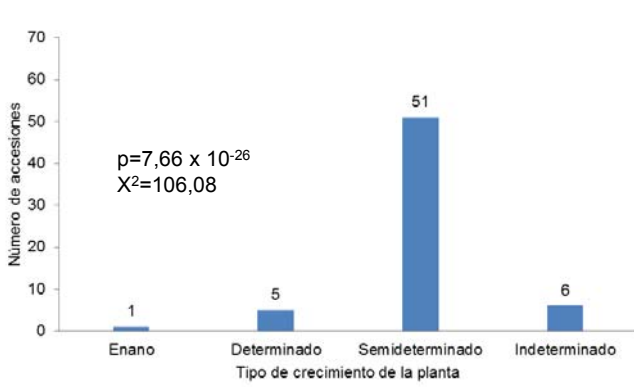
D

Figura 5. Características de los diferentes sitios de colecta. A: Pedregosidad del suelo. B: Salinidad del suelo. C: Color del suelo. D: Conductividad eléctrica del suelo.

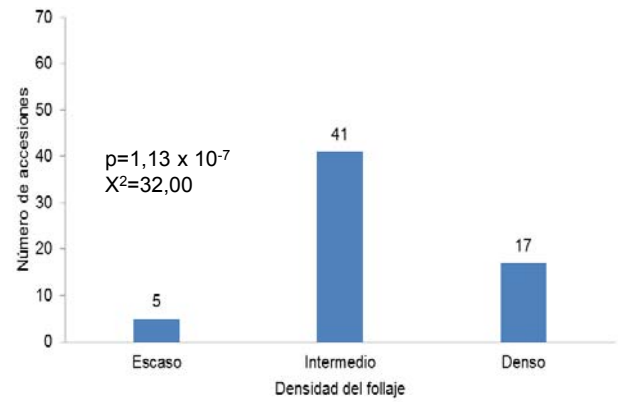
Recientemente, Nakazato *et al.* (2011) demuestran en su estudio que los patrones de la evolución natural del tomate silvestre, incluyendo su historia demográfica, patrones de dispersión, divergencia interespecífica e hibridación, se encuentran muy relacionados con las características geográficas y ecológicas del lugar de origen. Según Zuriaga *et al.* (2009) la especie *S. pimpinellifolium* muestra una gran diferenciación entre los materiales colectados y procedentes de Perú y Ecuador. En el caso de las entradas ecuatorianas se observa una fuerte estructuración geográfica, mientras que las accesiones peruanas la diferenciación entre las distintas zonas geográficas es pequeña. Estas diferencias genéticas podrían estar relacionadas con las diversas condiciones climáticas y ecológicas que hemos observado entre ambos países. La costa peruana muestra unas características climáticas muy uniformes, mientras que en Ecuador se observa una gran variación climática y ecológica. Por otro lado, los datos de variabilidad y heterocigosidad señalan el norte de Perú como la posible región el origen de esta especie. De ser así, las poblaciones de Ecuador y del sur de Perú serían fruto de migraciones posteriores.

4.1.2 Caracterización *ex situ* de las accesiones

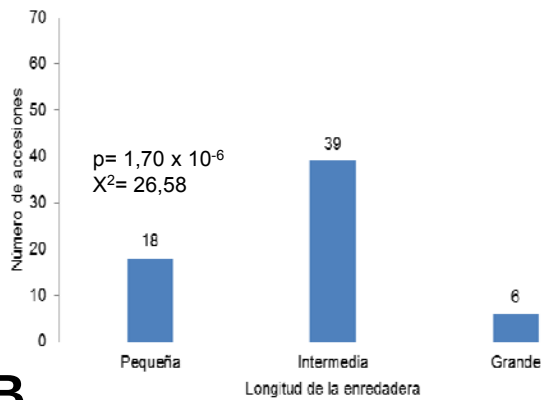
Las 63 accesiones de tomate silvestre colectadas, se sembraron y cultivaron hasta la cosecha en el área experimental de Manabí. Los datos aparecen en el Anexo 2. Para las variables, tipo de crecimiento de la planta, longitud de la enredadera, tamaño de la planta, densidad del follaje y longitud del entrenudo del tallo, el análisis de los resultados mostró diferencias estadísticas significativas entre las accesiones. Predominaron las plantas de tipo de crecimiento semideterminado (Figura 6A), con longitud de enredadera intermedia (Figura 6B), tamaño de planta intermedio (Figura 6C), densidad de follaje intermedio (Figura 6D) y una longitud del entrenudo del tallo corto (Figura 6E). La variable densidad de pubescencia del tallo no evidenció predominio de alguna categoría y por lo tanto no hubo diferencias estadísticas entre el número de accesiones en cada categoría (Figura 6F).



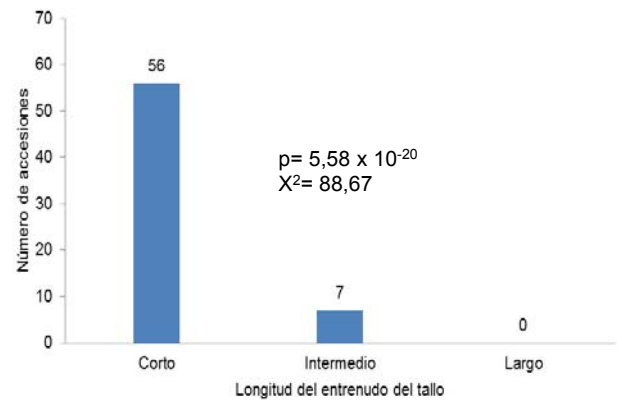
A



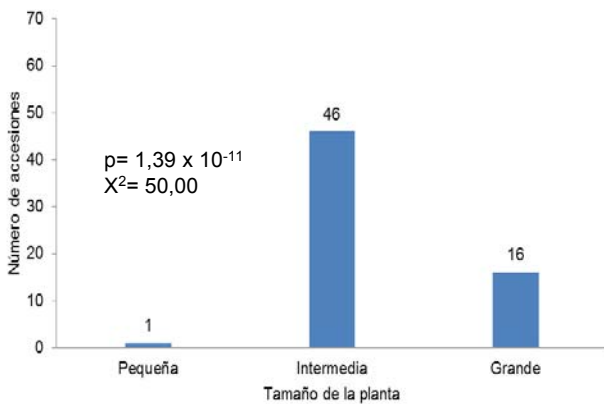
D



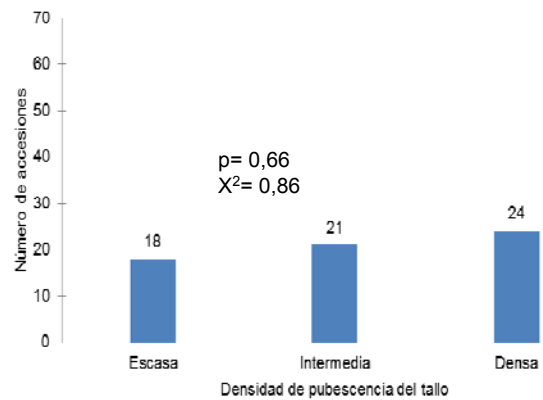
B



E



C



F

Figura 6. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Tipo de crecimiento de la planta. B: longitud de la enredadera. C: Tamaño de la planta. D: Densidad del follaje. E: Longitud del entrenudo del tallo. F: Densidad de pubescencia del tallo.

Las variables posición de la hoja, color de la corola, coloración de las venas, tipo de corola y tipo de hoja, mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al número de accesiones en cada categoría, y se establecieron características fenotípicas como plantas con hojas horizontales (Figura 7A), prevalencia absoluta en la coloración amarilla en los pétalos (Figura 7B), coloración normal (claras) en las nervaduras (Figura 7C), tipo de corola abierta (Figura 7D), tipo de hoja *pimpinellifolium* (Figura 7E). Para la variable grado de disección de la hoja (Figura 7F), no se determinaron diferencias estadísticas y las accesiones se ubicaron con relativa igualdad en todas las categorías establecidas.

El análisis de los resultados para la longitud del pétalo, color exterior del fruto no maduro, longitud del sépalo, número de frutos por inflorescencia, rayas verdes en el fruto y uniformidad de la madurez, permitió establecer diferencias estadísticas significativas en el número de accesiones en cada categoría establecida. Para las variables descritas, predominaron plantas con una longitud de pétalo de entre 7 y 9 mm (Figura 8A), con una coloración blanco verdusco en los frutos no maduros (Figura 8B), longitud de sépalo entre 2,0 y 4,3 mm (Figura 8C), de 4,6 a 6,3 frutos por inflorescencia (Figura 8D), rayas verdes en el fruto (Figura 8E) y uniformidad de madurez intermedia (Figura 8F). Para las variables, pubescencia del fruto, tamaño del fruto, masa del fruto, forma predominante del fruto, longitud del fruto y homogeneidad del tamaño del fruto se determinaron diferencias estadísticas significativas. Existieron diferencias en la distribución del número de accesiones en las categorías establecidas, esto permitió establecer características fenotípicas tales como frutos con pubescencias escasas (Figura 9A), tamaño del fruto de mediano a pequeño (Figura 9B), frutos con masa promedio entre 1,8 y 3,5 g (Figura 9C), de forma

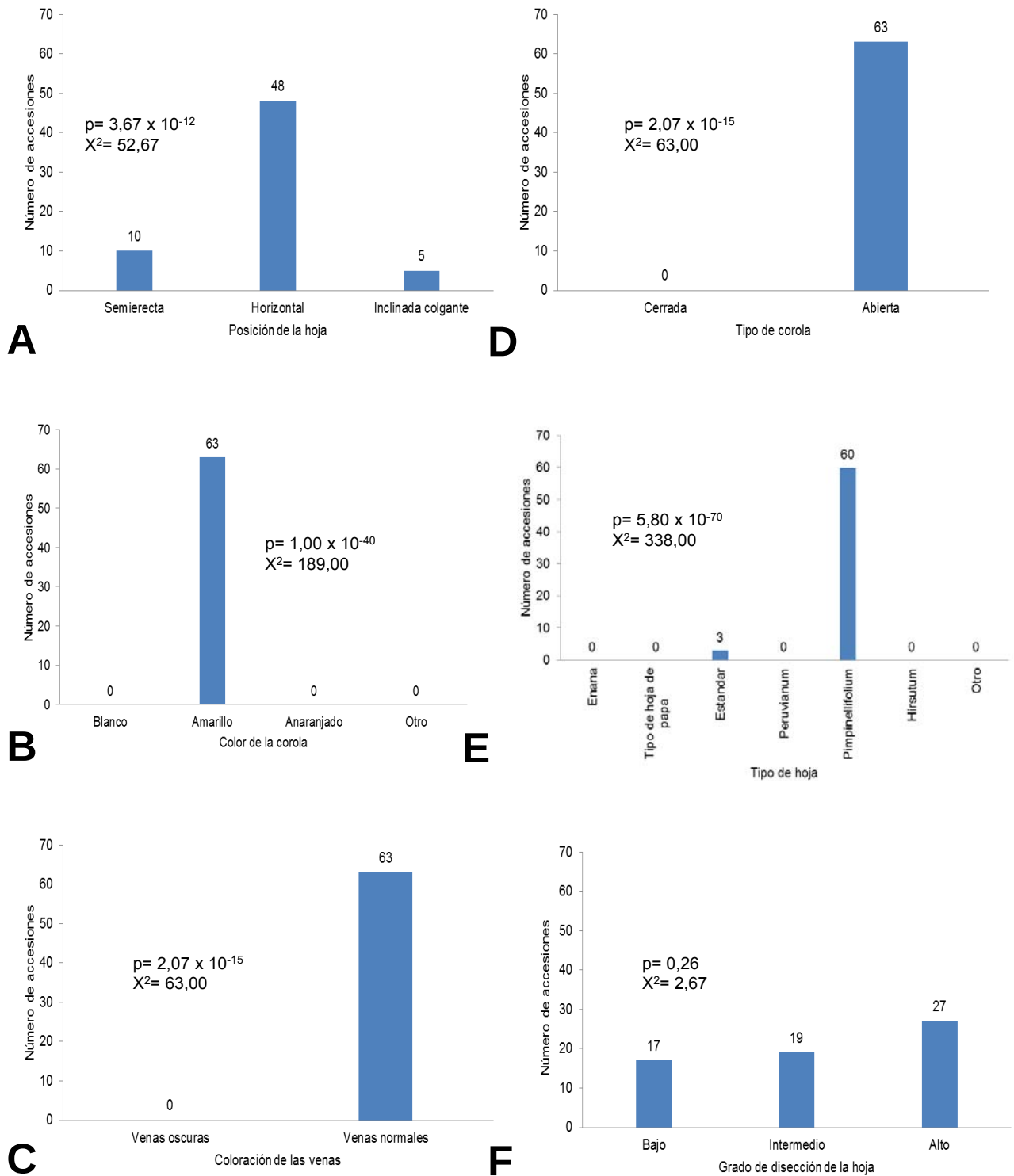


Figura 7. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Posición de la hoja. B: Color de la corola. C: Coloración de las venas. D: Tipo de corola. E: Tipo de hoja. F: Grado de disección de la hoja.

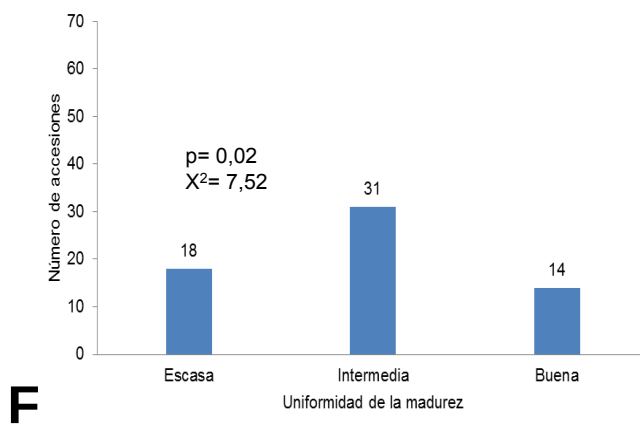
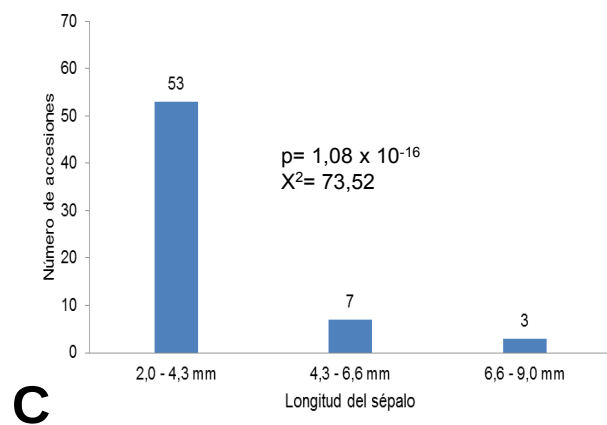
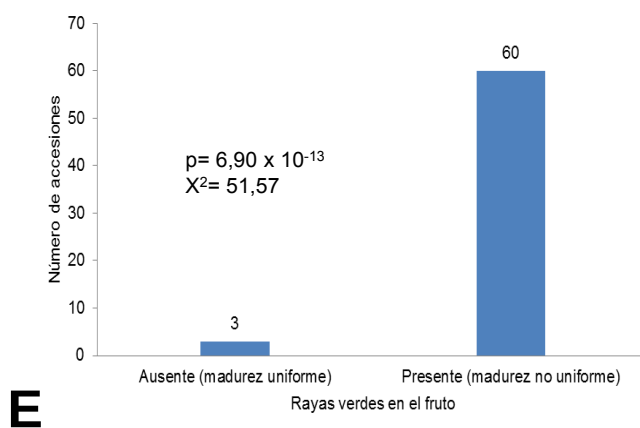
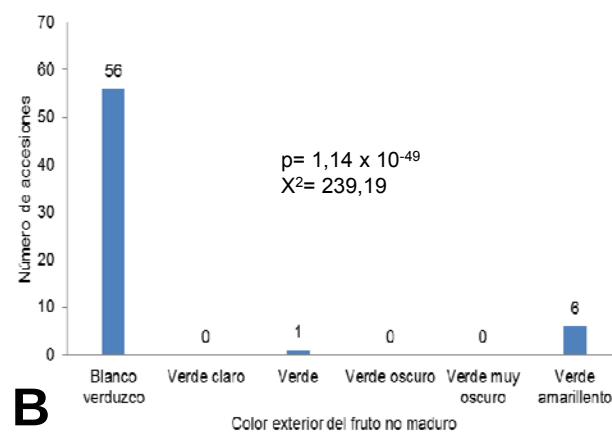
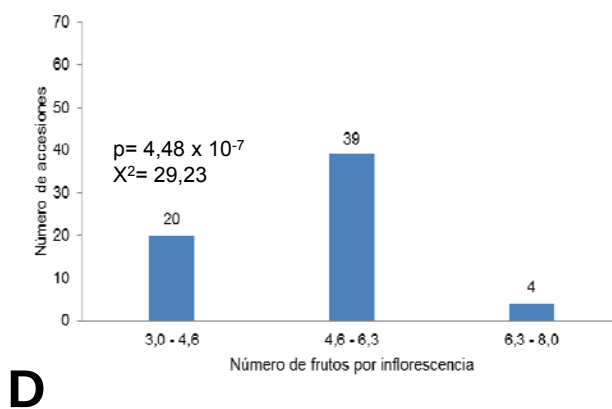
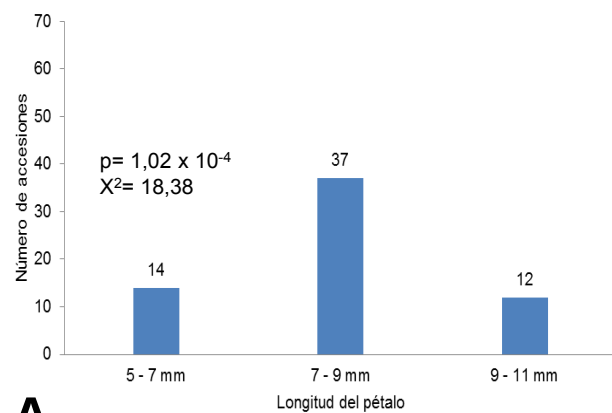


Figura 8. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Longitud del pétalo. B: Color exterior del fruto no maduro. C: Longitud del sépalo. D: Número de frutos por inflorescencia. E: Rayas verdes en el fruto. F: Uniformidad de la madurez.

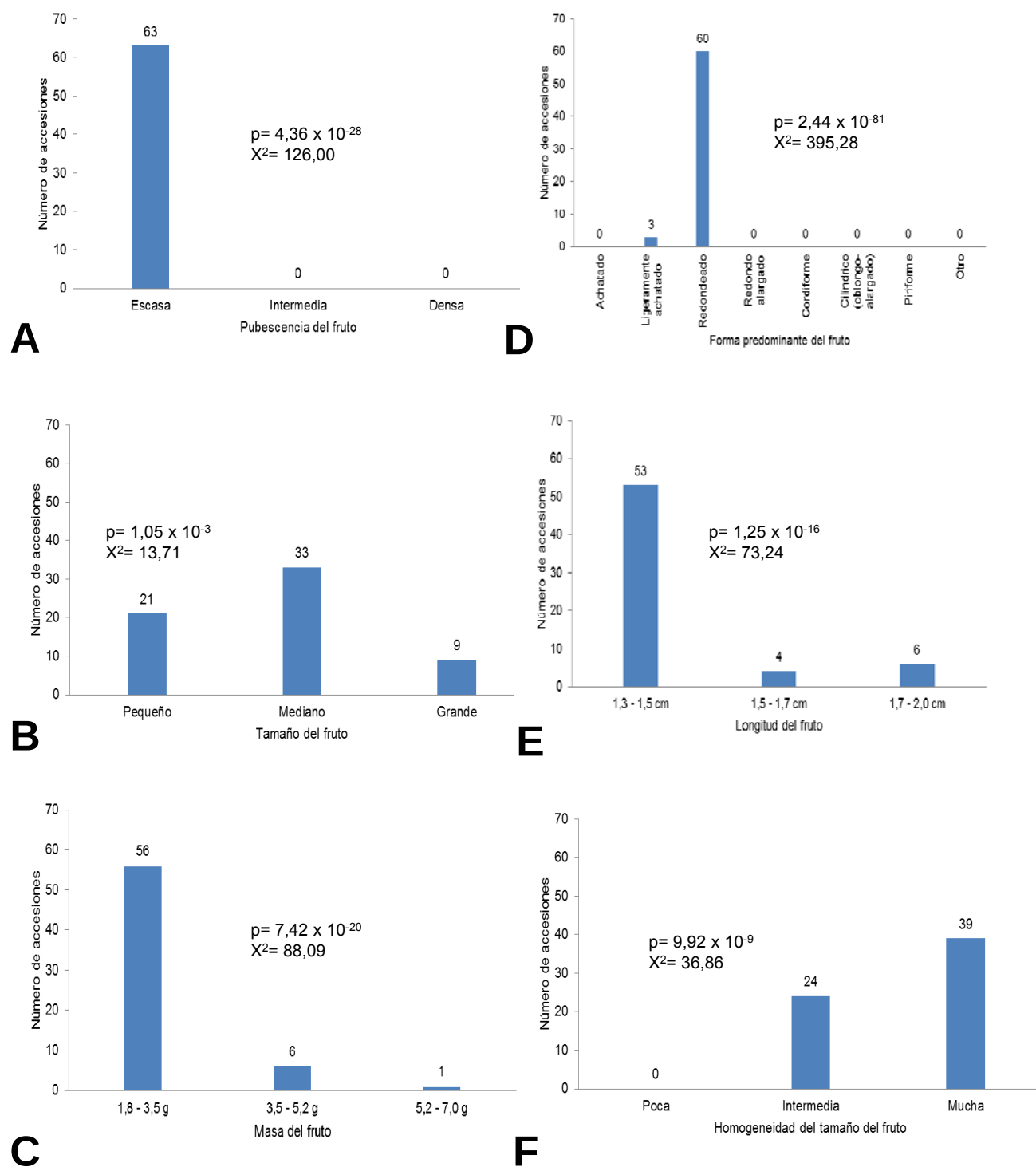


Figura 9. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Pubescencia del fruto. B: Tamaño del fruto. C: Masa del fruto. D: Forma predominante del fruto. E: Longitud del fruto. F: Homogeneidad del tamaño del fruto.

redondeado (Figura 9D), longitudes de entre 1,3 y 1,5 cm (Figura 9E) y una homogeneidad del tamaño del fruto de mucha a intermedia (Figura 9F).

El análisis de los resultados para las variables ancho del fruto, intensidad del color del fruto, forma del hombro del fruto, color del fruto maduro, forma secundaria del fruto y longitud del pedicelo, mostraron diferencias estadísticas significativas en el número de accesiones en cada categoría establecida para el efecto, para las variables descritas predominaron plantas con un ancho de fruto de 1,3 a 1,6 cm (Figura 10A), con mucha intensidad en el color del fruto (Figura 10B), hombro del fruto aplanado (Figura 10C), frutos maduros de color rojo (Figura 10D), con forma secundaria del fruto algo achatado (Figura 10E) y con longitudes del pedicelo de entre 6,6 y 8,3 mm (Figura 10F).

Para el grosor del pericarpio, intensidad del color del pericarpio, tamaño del corazón del fruto, color de la carne del pericarpio, forma del corte transversal del fruto y número de lóculos del fruto, se determinaron diferencias estadísticas significativas. La distribución de las accesiones en las categorías no fue homogénea, esto permitió establecer características fenológicas tales como grosor del pericarpio entre 1,0 y 1,5 mm (Figura 11A), intensidad del color del pericarpio intermedio (Figura 11B), tamaño del corazón del fruto entre 4,0 y 6,0 mm (Figura 11C), color de la carne del pericarpio roja (Figura 11D), forma del corte transversal del fruto redondo (Figura 11E) y número de lóculos del fruto de 2,0 a 2,3 promedio (Figura 11F).

El análisis de los resultados para las variables sólidos solubles, acidez del fruto, susceptibilidad al estrés por hongo (*Phytophthora* spp.), susceptibilidad al estrés por sequía y susceptibilidad al estrés por insecto (*P. longifila*), mostró diferencias estadísticas significativas en el número de accesiones en cada categoría establecida. Con respecto a las variables observadas predominaron frutos con 7,8 y 9,8 de grados Brix (Figura 12A), frutos ácidos (Figura 12B), muy baja susceptibilidad al estrés provocado por hongo (*Phytophthora* spp.) (Figura 12C), sequía (Figura 12D) e insecto (*P. longifila*) (Figura 12E).

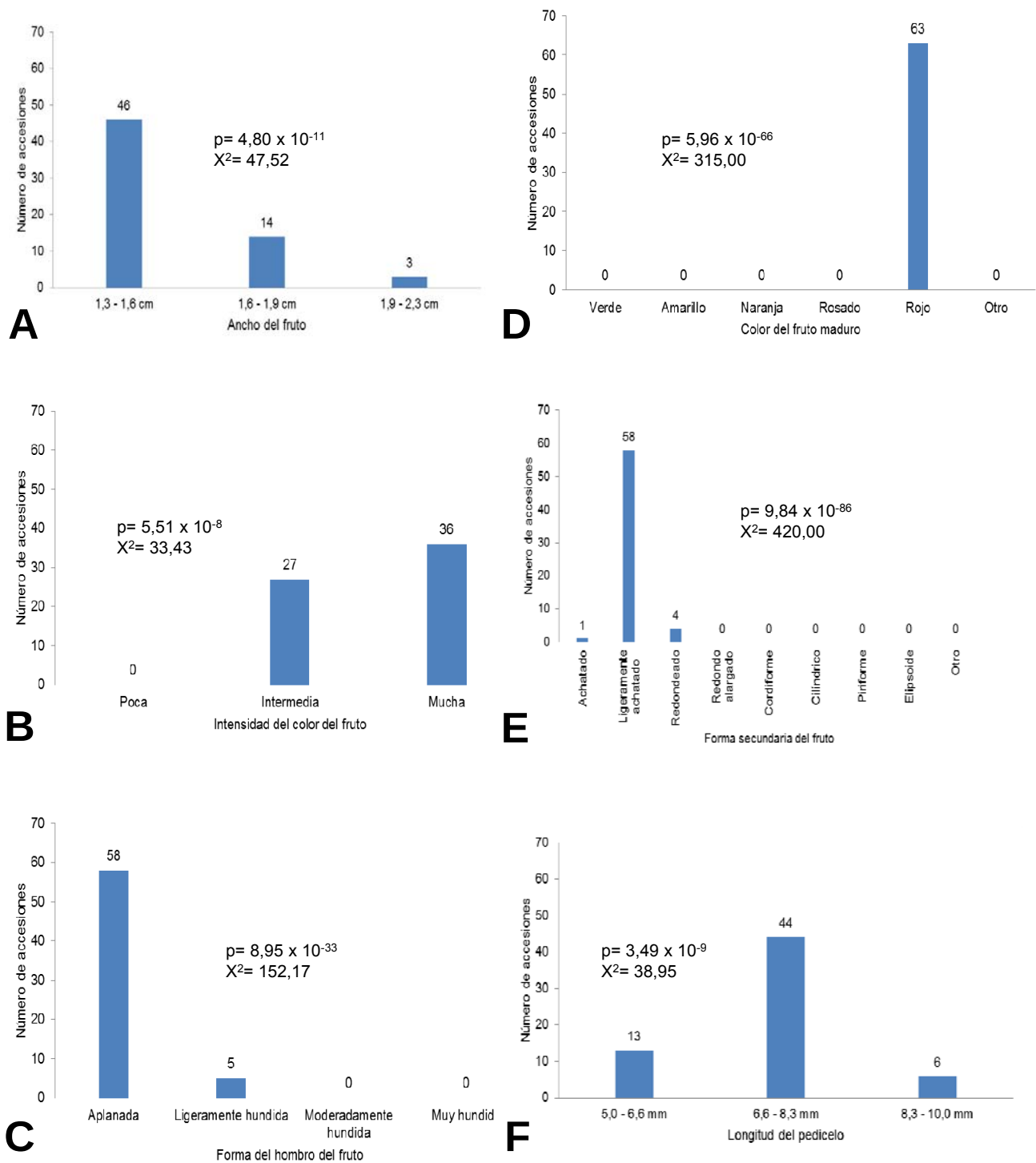


Figura 10. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Ancho del fruto. B: Intensidad del color del fruto. C: Forma del hombro del fruto. D: Color del fruto maduro. E: Forma secundaria del fruto. F: Longitud del pedicelo.

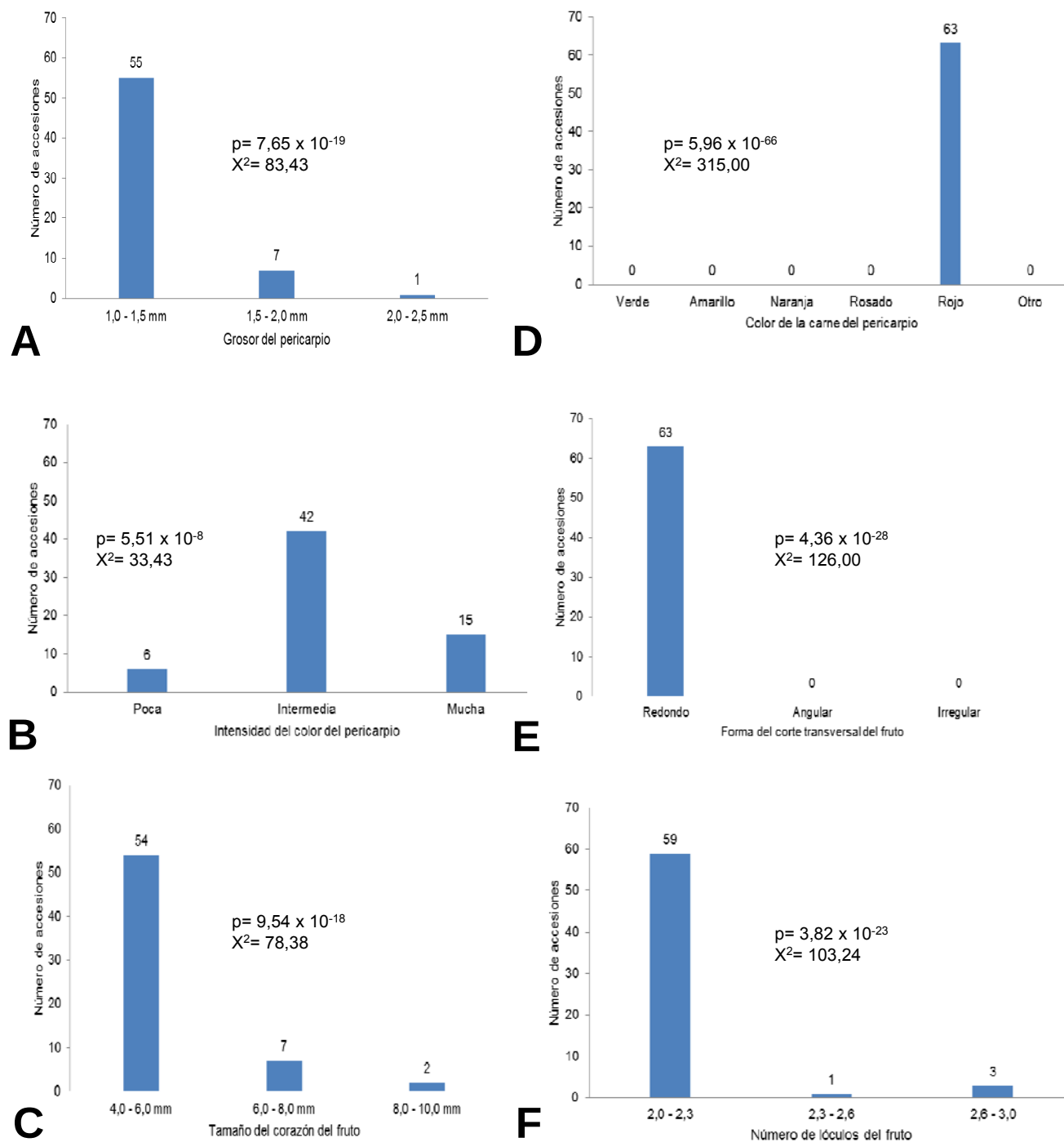


Figura 11. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Grosor del pericarpio. B: Intensidad del color del pericarpio. C: Tamaño del corazón del fruto. D: Color de la carne del pericarpio. E: Forma del corte transversal del fruto. F: Número de lóculos del fruto.

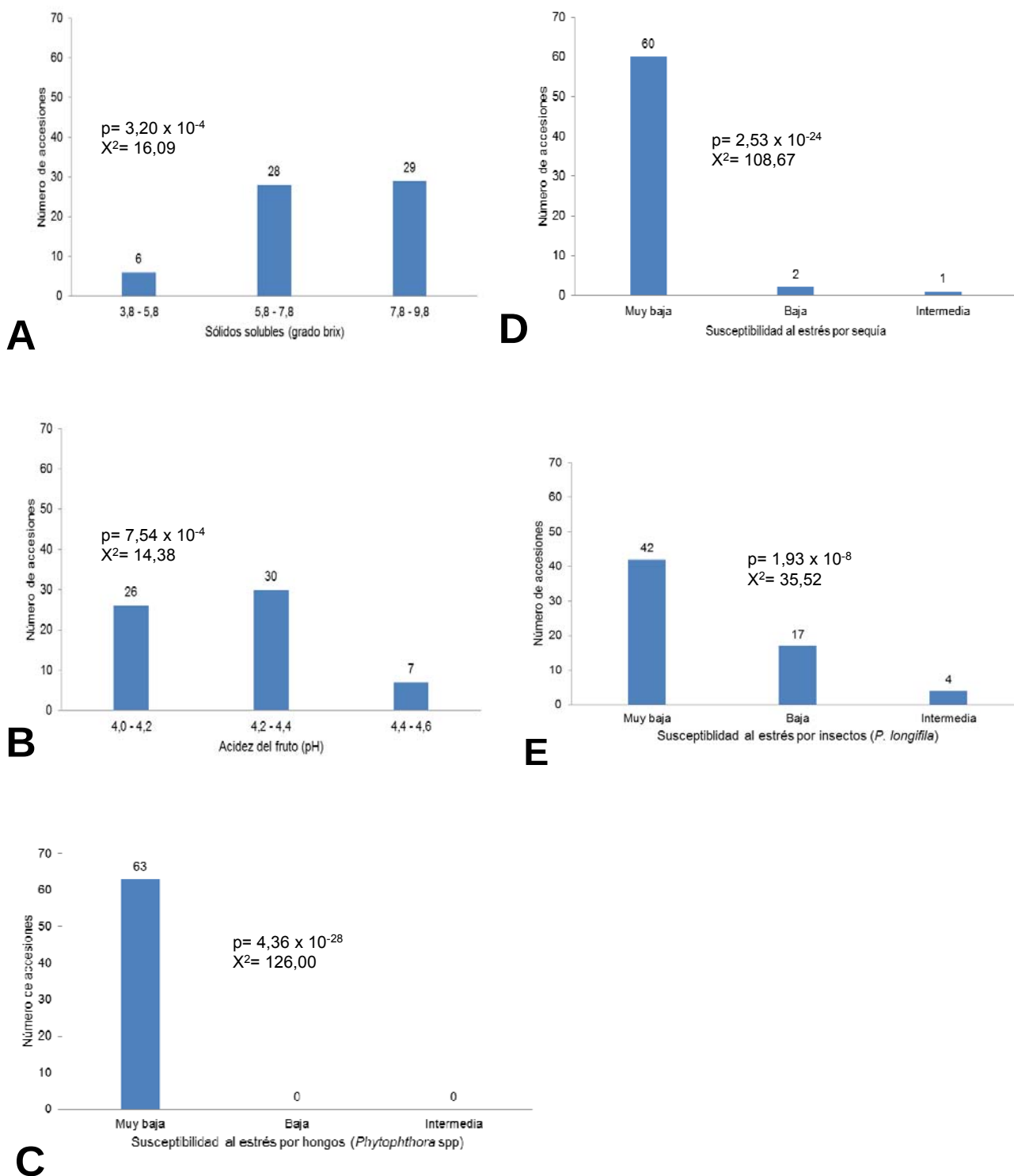


Figura 12. Caracterización *ex situ* de las accesiones. A: Sólidos solubles. B: Acidez del fruto. C: Susceptibilidad al estrés por hongos. D: Susceptibilidad al estrés por sequía. E: Susceptibilidad al estrés por insectos.

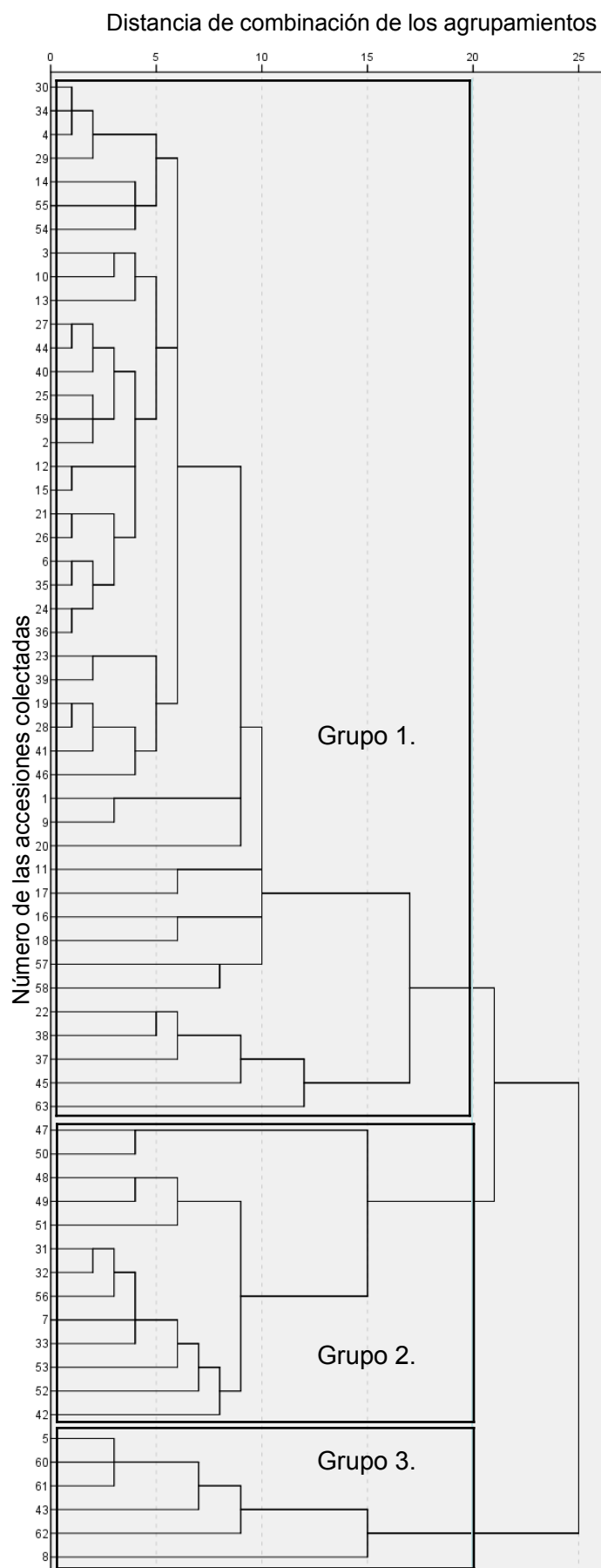
El análisis jerárquico de clusters, mostró un dendograma que se generó con los agrupamientos promedios de las 13 variables cuantitativas evaluadas *ex situ*, bajo condiciones controladas en el área experimental de Manabí (Figura 13). El dendograma se generó con el cuadrado de la distancia Euclideana y para clasificar las accesiones en grupos homogéneos de tal manera que permitiera una mejor interpretación de los mismos, se procedió a realizar el corte con una distancia de combinación de 20.

Se conformaron tres grupos en los cuales se ubicaron las accesiones que se parecieron más en cuanto a todas las variables cuantitativas evaluadas. El grupo 1 estuvo conformado por 44 accesiones cuyos valores en los descriptores longitud de guía y longitud de pétalo son considerados altos; los descriptores que se encontraron cercanos al valor promedio de las accesiones fueron longitud del sépalo, número de frutos por inflorescencia, grosor del pericarpio y número de lóculos; y los descriptores con valores bajos en este grupo fueron masa del fruto, longitud del fruto, ancho del fruto, longitud del pedicelo, tamaño del corazón, sólidos solubles y acidez del fruto.

El grupo 2 estuvo conformado por 13 accesiones con valores considerados altos para los descriptores sólidos solubles y acidez del fruto; valores cercanos al promedio para los descriptores longitud de la guía, longitud del pétalo, masa del fruto, longitud del fruto, ancho del fruto, longitud del pedicelo y tamaño del corazón; así como, valores bajos para la longitud del sépalo, frutos por inflorescencia, grosor del pericarpio y número de lóculos.

El grupo 3 estuvo conformado por 6 accesiones y con valores altos para los siguientes descriptores, longitud de sépalo, frutos por inflorescencia, masa de fruto, longitud de fruto, ancho de fruto, longitud de pedicelo, grosor del pericarpio, tamaño del corazón y número de lóculos; se encontraron cercano al valor promedio los descriptores, sólidos solubles y acidez del fruto; y con valores considerados bajos de los descriptores longitud de guía y longitud de pétalo.

Figura 13. Análisis jerárquico de clusters. Dendograma generado con los agrupamientos promedios (entre grupos). Se utilizaron 13 variables cuantitativas evaluadas *ex situ*.



El análisis de las variables cualitativas permitió establecer que existió una gran similitud en la mayoría de los descriptores aplicados a los grupos establecidos, es así que, prevalecieron plantas con un tipo de crecimiento semideterminado, tamaño de planta intermedio, densidad de pubescencia del tallo densa, longitud del entre nudo corto, densidad del follaje intermedio, posición de la hoja horizontal, tipo de hoja *pimpinellifolium*, disección de la hoja alta, coloración de las venas normales, color de la corola amarilla, tipo de corola abierta, color del fruto no maduro blanco verduzco, rayas verdes en el fruto no maduro presente, pubescencia en el fruto escasa, forma predominante del fruto redondeado, homogeneidad del fruto alta, color del fruto maduro rojo, intensidad del color del fruto alto, forma secundaria del fruto algo achatado, hombro del fruto aplanado, color del pericarpio rojo, intensidad del color del pericarpio intermedia, forma del corte transversal del fruto redondo, susceptibilidad a estrés abiótico (sequía) muy baja, susceptibilidad a estrés biótico por insectos (*P. longifila*) muy baja, susceptibilidad a estrés biótico por hongos (*Phytophthora* spp.) muy baja. La similitud descrita también fue compartida en el descriptor uniformidad de madurez en donde las accesiones del grupo 1 fueron catalogadas como de madurez escasa-intermedia y accesiones del grupo 2 como intermedia-buena, y en el grupo 3 todas presenta buena uniformidad de la madurez. Además, el descriptor tamaño del fruto evidenció diferencias entre los grupos, por lo que correspondió al grupo 1 y 2 el calificativo de frutos medianos y para el grupo 3, frutos grandes.

Los caracteres masa del fruto, longitud del sépalo y grosor del pericarpio tuvieron un CV >30%, lo cual sugiere que tienen la más alta variabilidad en la especie. Así mismo, apareció la variable acidez del fruto con CV <10%, lo que indica que *S. pimpinellifolium* puede tener poca variabilidad en ese carácter (Tabla 3). La aplicación de estadísticos simples permiten

estimar y describir el comportamiento de las diferentes accesiones en relación con cada carácter, éstos se deben realizar antes de cualquier análisis multivariado, ya que proporcionan una idea general de la variabilidad del germoplasma y permiten detectar datos no esperados y errores de medición en el ingreso de los mismo (Hidalgo, 2003).

Tabla 3. Descriptores de características cuantitativas y estadísticos simples en la evaluación *ex situ* de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*) en el cantón Bolívar, Manabí, Ecuador.

DESCRIPTOR	ESTADÍSTICOS				
	n	$\bar{X}$	S ²	r	CV %
Longitud de la enredadera (m)	63	2,13	0,36	1,9	17,08
Longitud de pétalo (mm)	63	8,44	1,37	6,0	16,30
Longitud del sépalo (mm)	63	3,85	1,17	7,0	30,48
Masa del fruto (g)	63	2,65	0,85	5,2	32,11
Longitud del fruto maduro (cm)	63	1,47	0,15	0,7	10,73
Ancho del fruto (cm)	63	1,61	0,18	1,0	11,23
Longitud del pedicelo (mm)	63	7,22	0,99	5,0	13,72
Grosor del pericarpio (mm)	63	1,17	0,35	1,5	30,32
Tamaño del corazón (mm)	63	5,42	1,22	6,0	22,61
Sólidos solubles (°Brix)	63	7,44	1,25	6,0	16,83
Acidez del fruto	63	4,28	0,14	0,6	3,31
Número de frutos/ inflorescencia	63	5,04	1,06	5,0	21,17
Número de lóculos	63	2,04	0,42	1,0	10,65

n= número de accesiones. $\bar{X}$ = media aritmética. S²= desviación estándar. **r** = rango.
CV= Coeficiente de variación

Lobo y Medina (2001) realizaron un estudio de variabilidad morfológica con 39 caracteres cualitativos y 11 cuantitativos de tomate cherry, evaluaron y caracterizaron 82 introducciones de tomate cherry provenientes de diferentes partes del mundo. Los resultados obtenidos mostraron una amplia variabilidad cualitativa y cuantitativa, señalaron un gran potencial para realizar mejoramiento de este tomate cherry o para insertar genes a materiales de frutos grandes. Restrepo (2007) evaluó 25 accesiones de tomate tipo “chonto” provenientes de diferentes departamentos de Colombia y encontró diferencias muy significativas entre las accesiones para 11 de los 14 descriptores y coeficientes de variación altos, además indicó el uso promisorio de la colección.

Terzopoulos y Bebeli (2008) realizaron una caracterización molecular con secuencias simples repetidas (SSRs) para evaluar la diversidad genética en *S. lycopersicum* de variedades locales, razas criollas, tres cultivares comerciales, tres cultivares de tomate cherry *S. Lycopersicum* var. cerasiforme y dos accesiones de *S. pimpinellifolium*. Estos autores encontraron que todos los tomates criollos y los cultivares comerciales se ubicaron dentro del mismo grupo, debido a que tienen un gran número de genes insertados de especies silvestres de *S. lycopersicum*, por lo cual lo separa del otro grupo conformado por los híbridos de cherry y las accesiones de *S. pimpinellifolium*.

La respuesta de las accesiones colectadas a diferentes estreses bióticos y abióticos es de resaltar pues existe información científica que afirma la posibilidad de uso de ese recurso en el mejoramiento genético (Florido *et al.*, 2007). En ese contexto, Rodríguez (2012) encontró fuentes de resistencia al virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV-Col) en las introducciones de tomate silvestre analizadas, en las cuales aplicó una selección individual por plantas que no presentaran replicación del virus en ninguno de los tiempos evaluados, en condiciones de campo. La identificación de dos regiones genómicas asociadas a la resistencia que posee la especie silvestre *S. pimpinellifolium* a *Phytophthora infestans*, considerada como una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de tomate, fue observada por Merk *et al.* (2012).

En otro estudio Mena (2012) señaló que las accesiones silvestres de *S. habrochaites* var. *glabratum* no mostraron daño, ni fueron atractivas ni preferidas para la oviposición por prodiplosis y las clasifica como muy resistentes a *P. longifila*. Tanto las accesiones silvestres y el material 4212P4 pueden ser útiles en futuros programas de mejoramiento, con miras a la obtención de variedades resistentes a *P. longifila*.

La información científica precedente señaló lo importante para futuros programas de mejoramiento genético del tomate preservar sus parientes silvestres. Como resultado de este trabajo se colectaron 63 accesiones de *S. pimpinellifolium* con marcadas diferencias en la mayoría de los indicadores aplicados, tanto ambientales *in situ* como de caracterización bioquímica y botánica *ex situ* lo que es importante de conservar.

4.2 Influencia de la exposición de semillas de *S. pimpinellifolium* L. al nitrógeno líquido y su respuesta bioquímica, botánica y molecular

4.2.1 Caracterización bioquímica de plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas en etapas tempranas de la germinación

La exposición al NL no mostró diferencias significativas en el porcentaje de germinación a los 7 d (Figura 14A). Además, a los 17 d de sembradas las semillas con la conversión en plántulas y la masa fresca no mostraron diferencias significativas (Figura 14B, C).

La homogeneidad del crecimiento se aprecia en la Figura 15. Sin embargo, varios efectos significativos de la crioconservación se observaron a nivel bioquímico posterior a la germinación (17 d de sembradas).

Se determinaron altos coeficientes de variación con niveles superiores de actividad peroxidasa y fenoles ligados a las paredes celulares en las hojas. En las raíces, se obtuvo alto coeficiente de variación, con decrementos en los fenoles ligados a las paredes celulares (Tabla 4).

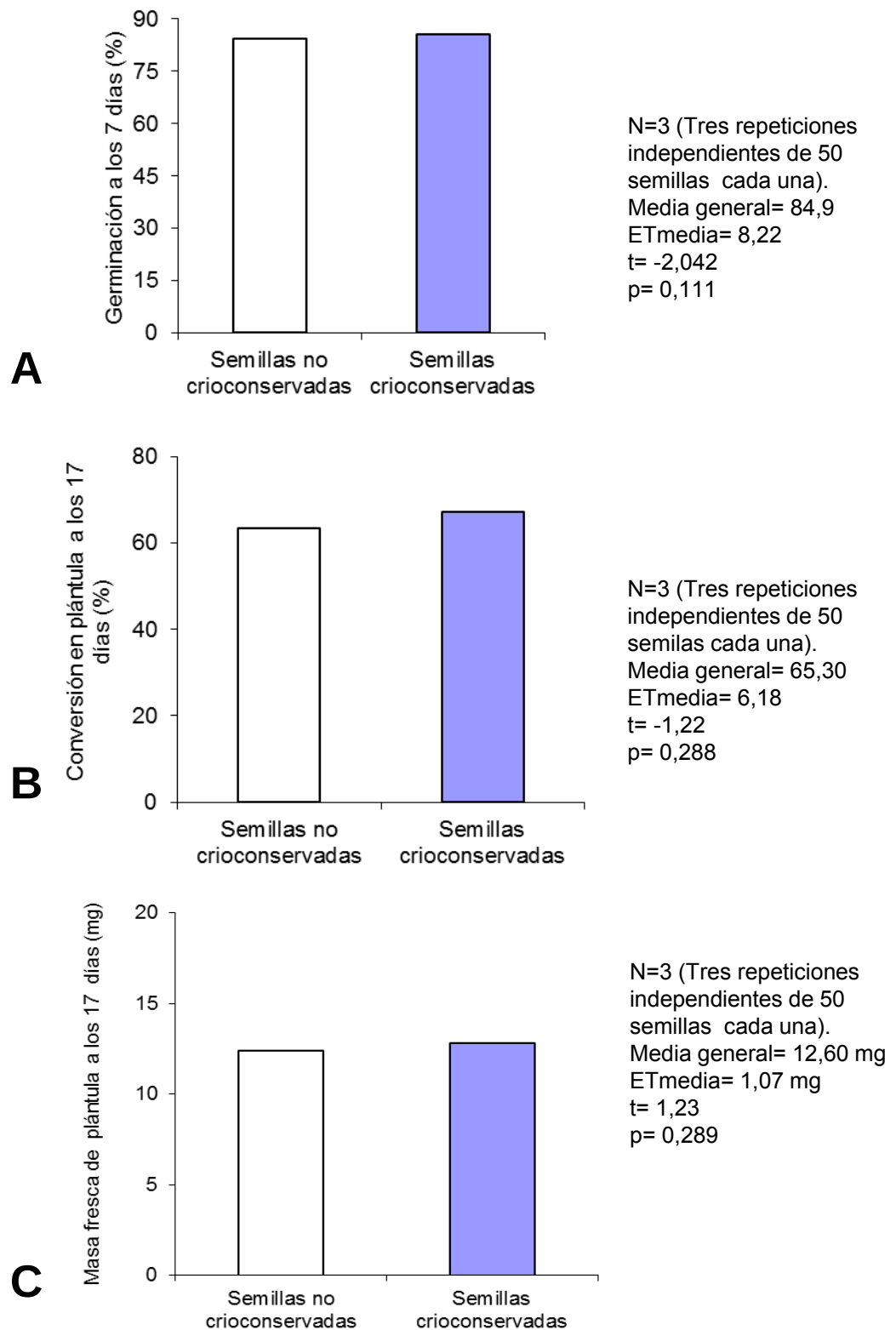


Figura 14. Germinación, conversión en plántula y masa fresca de plántula provenientes de semillas inmersas en nitrógeno líquido por 2 semanas. Accesoión 56. Para el análisis estadístico, los porcentajes se transformaron según $y' = 2 * \arccos(y/100)^{0.5}$.

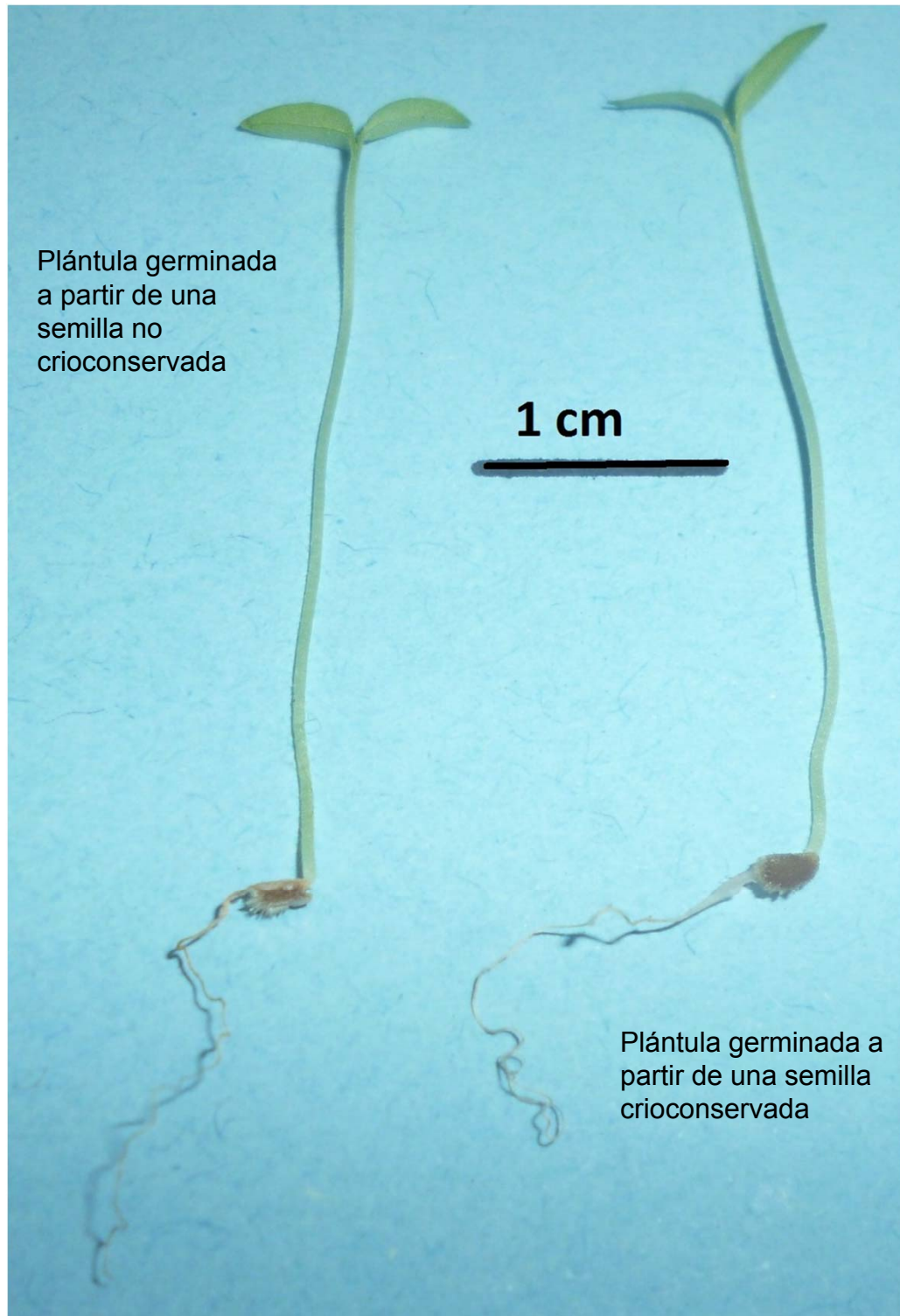


Figura 15. Efecto de la crioconservación de semillas (2 semanas inmersas en nitrógeno líquido) a los 17 días de siembra. Accesoión 56.

Tabla 4. Caracterización bioquímica de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. derivadas de semillas no crioconservadas (SNC) y crioconservadas (SC) a los 7 días de la germinación.

	Raíces					Tallos					Hojas				
	Plantas de SNC	Plantas de SC	Media general	ET media	CV (%)**	Plantas de SNC	Plantas de SC	Media general	ET media	CV (%)**	Plantas de SNC	Plantas de SC	Media general	ET media	CV (%)**
Contenido total de clorofilas ($\mu\text{g.g}^{-1}$ masa fresca) *						290,26 a	241,51 b	265,88	25,32	12.96	583,19 a	581,12 a	582,15	57,13	0,25
Contenido de clorofila a ($\mu\text{g.g}^{-1}$ masa fresca) *						178,15 a	148,60 b	163,37	15,88	12.79	218,17 a	216,87 a	217,52	21,22	0,42
Contenido de clorofila b ($\mu\text{g.g}^{-1}$ masa fresca) *						112,12 a	92,90 b	102,51	9,78	13.26	365,01 a	364,25 a	364,63	35,87	0,15
Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ masa fresca) *	24,35 b	63,45 a	43,90	4,12	62,98	7,89 b	10,04 a	8,96	0,84	16.96	45,74 a	46,33 a	46,03	4,32	0,91
Contenido de otros aldehídos ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ masa fresca) *	75,30 b	216,07 a	145,68	14,21	68,33	61,76 b	69,16 a	65,46	6,34	7.99	507,55 a	471,91 b	489,73	48,54	5,15
Contenido de fenoles ligados a las paredes celulares (mg.g^{-1} masa fresca) *	11,80 a	3,21 b	7,50	0,68	80,93	6,34 a	2,97 b	4,65	0,38	51.19	3,22 b	13,78 a	8,50	0,77	87,85
Contenido de fenoles solubles (mg.g^{-1} masa fresca) *	4,30 a	3,90 a	4,10	0,38	6,90	6,58 a	2,61 b	4,59	0,38	61.09	3,35 b	4,57 a	3,96	0,32	21,78
Contenido total de fenoles (mg.g^{-1} masa fresca) *	16,10 a	7,10 b	11,60	1,08	54,86	12,92 a	5,58 b	9,25	0,86	56.11	6,58 b	18,35 a	12,46	1,14	66,77
Contenido total de proteínas (mg.g^{-1} masa fresca) *	0,013 b	0,015 a	0,014	0,0012	11,20	0,013 a	0,14 a	0,07	0,006	8.24	0,025 a	0,023 b	0,024	0,0021	7,53
Actividad específica guayacol peroxidasa (U.mg^{-1} de proteínas) *	423,91 b	557,05 a	490,48	48,76	19,19	67,47 b	159,79 a	113,63	10,24	57.45	19,70 b	115,12 a	67,41	6,53	82,0
Actividad superóxido dismutasa específica (U.mg^{-1} de proteínas) *	90,86 a	55,04 b	72,95	7,14	34,73	102,65 a	96,96 a	99,80	9,46	4.03	78,01 b	104,21 a	91,11	8,92	20,34
					CV prom. 42,39%					CV prom. 27,46%					CV prom. 26,65%

* En cada órgano de la planta, medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (t-test, $p \leq 0.05$). $n = 3$ (Tresmuestras independientes de 100 mg cada una).

** Coeficiente de variación (CV) = (Desviación típica/Promedio)* 100. Para calcular este coeficiente, los valores promedio de los dos tratamientos se consideraron. A mayor diferencia entre las dos medias, mayor CV. Los CV se clasificaron en tres categorías: para los CV menores que 36%, el efecto de la crioconservación de las semillas se consideró como bajo, de 36 a 72% como medio y por encima de 72% como alto. Esto tuvo como precedente el trabajo de Cejas *et al*, (2012).

Los efectos de la crioconservación se clasificaron como medios, de acuerdo con sus CV, para los siguientes indicadores: incremento del contenido total de fenoles en las hojas; y mayores niveles de malondialdehído y otros aldehídos en las raíces. La exposición de las semillas al NL disminuyó el contenido total de fenoles en las raíces. Incrementó la actividad peroxidasa y disminuyó los fenoles solubles en los tallos. Además, en los tallos, el contenido total de fenoles y de los fenoles ligados a la pared disminuyeron. El efecto del NL en otros indicadores se clasificó como bajo (Tabla 4).

Los efectos bioquímicos altos y medios de la crioconservación de semillas pueden resumirse de la forma siguiente. En las raíces, se manifestaron menores niveles de fenoles, y mayores contenidos de malondialdehído y otros aldehídos. En los tallos, se determinaron menores niveles de fenoles y mayor actividad peroxidasa. En las hojas, se encontró mayor actividad peroxidasa, así como, mayores niveles de fenoles ligados a las paredes celulares y totales. Los pigmentos clorofílicos (a, b, total) disminuyeron en los tallos como resultado de la inmersión de las semillas en NL. Tal decremento no se observó en las hojas, quizás asociado con la función fotosintética de este órgano, lo cual implica un contenido mayor de pigmentos clorofílicos (De las Rivas, 2008).

En cuanto al mayor contenido de clorofilas b respecto a la clorofila a en las hojas, quizás tuvo relación con el grado de crecimiento de las hojas de tomate silvestre al momento del análisis (17 d de sembradas las semillas), ya que en un tejido normal funcional se tiene más contenido de clorofila a (Rodríguez *et al.*, 2003; Aragón *et al.*, 2012). También es conocido que las clorofilas a y b se interconvierten entre ellas (Hortensteiner y Krautler, 2011), y por tanto las plantas de tomate en momentos posteriores a los 17 d podrían alcanzar la composición adecuada de pigmentos clorofílicos en los fotosistemas, donde la relación de

clorofilas a/b sea mayor que 1. La relación de la clorofila a y b es muy influenciada por la luz mientras que no es así por el régimen hídrico ni la nutrición mineral (Dale y Causton, 1992).

Está bien establecido que cualquier planta durante su ciclo de vida está sometida al estrés ambiental. El estrés altera el curso normal del crecimiento y desarrollo, el metabolismo y otros procesos fisiológicos. Varios tipos de estrés abiótico disminuyen el contenido de clorofilas en las plantas (Ahmad *et al.*, 2007).

El descenso del contenido de clorofila que se evidenció en los tallos puede ser el resultado de la inhibición de importantes enzimas, tales como, la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa y la protoclorofilida reductasa, asociada con la biosíntesis de clorofilas (Van Assche y Clijsters, 1990). Cabe señalar que la mencionada investigación contempla estrés abiótico provocado por metales pesados, diferente a lo planteado en esta investigación en cuanto al efecto de la exposición de las semillas al NL. A diferencia, en las hojas, que es donde más debió influir el descenso de temperatura por existir una mayor cantidad de pigmentos clorofílicos, no se observaron esos cambios.

En este estudio, se evaluaron las clorofilas a y b como indicadores de la fisiología del estrés. Tales medidas se usan en estudios de estrés y fotooxidación de pigmentos para derivar la relación clorofila a:b como un indicador de las respuestas de la estabilidad de los pigmentos del cloroplasto bajo los retos ambientales (Carvalho *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2008; Aragón *et al.*, 2012).

Por otra parte, se observó un incremento de los fenoles en las hojas, lo cual se relacionó con un aumento de la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los

compuestos fenólicos. Algunos autores como Sakihama y Yamasaki (2002) han planteado que los fenoles están por lo general asociados con la prevención del daño oxidativo mediante la liberación de las especies reactivas del oxígeno y la obstaculización de la cadena de reacciones relacionadas con la peroxidación lipídica. Estos efectos antioxidantes requieren las formas reducidas de los fenoles, las que actúan como prooxidantes en sus formas oxidadas. La actividad antioxidante de los fenoles se debe en gran medida a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores, bloqueadores de especies reactivas del oxígeno y agentes quelantes de metales (Sakihama y Yamasaki, 2002).

Otros compuestos bioquímicos tales como los marcadores de la peroxidación lipídica (aldehídos) están involucrados en la respuesta a factores bióticos (Companioni *et al.*, 2005) y abióticos (Yabor *et al.*, 2006, 2008; Cejas *et al.*, 2012). El daño por enfriamiento induce la producción de radicales libres, en gran medida por las especies reactivas del oxígeno (Benson, 2008). Los radicales libres atacan la fracción lipídica de las membranas y resulta en la formación de peróxidos lipídicos inestables. Las especies reactivas del oxígeno están involucradas en varios aspectos de la fisiología de las semillas (Bailly, 2004; Berjak *et al.*, 2011a; Leymarie *et al.*, 2012). Por su parte Martínez-Montero *et al.*, 2002b encontraron que el nivel de malondialdehído y otros aldehídos en la fracción microsomal fue mayor en los callos de caña de azúcar crioconservados en comparación con el testigo, durante los primeros 3 d posteriores a la exposición al NL.

Los niveles de malondialdehído y de otros aldehídos, y la actividad peroxidasa, han sido descritos como bien relacionados. El malondialdehído es uno de los primeros metabolitos en formarse en respuesta de las plantas al estrés (Dumet y Benson, 2000). Este compuesto

resulta de la peroxidación de las membranas lipídicas y promueve la formación de otros aldehídos (Moller, 2001). Está bien documentado que como resultado de la acción de las especies reactivas del oxígeno, además de aldehídos, se forma peróxido de hidrógeno y la actividad peroxidasa se incrementa (Gross *et al.*, 2000; Breusegem *et al.*, 2001; Moller, 2001; Arora *et al.*, 2002; De Jong *et al.*, 2002; Kuo y Kao, 2004).

En la Tabla 4 también se observa que los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, así como, la actividad específica peroxidasa se incrementó en las raíces y tallos después de la exposición de las semillas al NL, lo cual concuerda con las referencias mencionadas anteriormente. En las hojas de tomate, la actividad peroxidasa específica fue superior después de la inmersión de las semillas en NL.

En general, la inmersión de las semillas de tomate silvestre en NL afectó más a las raíces que a otras partes de la planta, y pudo ser posible debido a que las radículas son estructuras grandes, tienen mayor volumen de células del parénquima cortical y la médula, las que son más vacuoladas y tienen menos características meristemáticas. Por lo tanto, el daño a este tejido parenquimatoso, especialmente por su tamaño, podría ser el evento más importante que causa los desórdenes bioquímicos inducidos por la crioconservación de las semillas.

En cuanto a la variabilidad en el contenido de los diferentes indicadores bioquímicos analizados, se estableció que los fenoles fueron el compuesto que más reflejó el efecto de la exposición al NL, al considerar el coeficiente de variación expresado en el análisis estadístico de los diferentes órganos evaluados. Por lo tanto, en el próximo acápite se profundizaría en un estudio detallado del efecto de la exposición de las semillas en NL en el contenido de los fenoles.

4.2.2 Caracterización en etapas tempranas de la germinación del contenido de fenoles en plántulas producidas a partir de semillas crioconservadas durante diferentes tiempos en nitrógeno líquido

Tanto el testigo (sin inmersión en NL), como las semillas crioconservadas mostraron alrededor del 80% de germinación, sin diferencias estadísticas significativas. No se observaron visualmente cambios fenotípicos en las plántulas obtenidas a los 17 d después de sembradas. Sin embargo, el almacenamiento de las semillas de tomate silvestre en NL durante diferentes períodos de tiempo (0-28 d) modificó los niveles de fenoles (Figuras 16, 17 y 18).

Cuando las semillas se sumergieron en NL por 7, 14 y 21 d, los niveles de fenoles ligados a la pared, soluble y total disminuyeron en las raíces y en los tallos, comparados con el testigo. Sin embargo, sus concentraciones se incrementaron para las semillas que se almacenaron por 28 d (Figuras 16A, B, C; 17 A, B, C).

En las hojas, se observó un patrón similar en los fenoles solubles (Figura 18B), pero los resultados obtenidos con los fenoles ligados a las paredes y totales fueron diferentes (Figuras 18A, C). De hecho, los fenoles ligados a la pared celular y totales se incrementaron en las hojas de las plántulas derivadas de semillas crioconservadas a los 7 y 14 d.

Se asume que la actividad metabólica y la división celular cesa y el envejecimiento se detiene a la temperatura del NL o su vapor (-196°C a -140°C) (Benson, 2008). Sin embargo, estudios desarrollados por Walters *et al.* (2004) alertaron que, aunque se asume que el almacenamiento criogénico causa longevidad infinita, los efectos del tiempo sobre la viabilidad no han sido probados, ni teórica ni empíricamente.

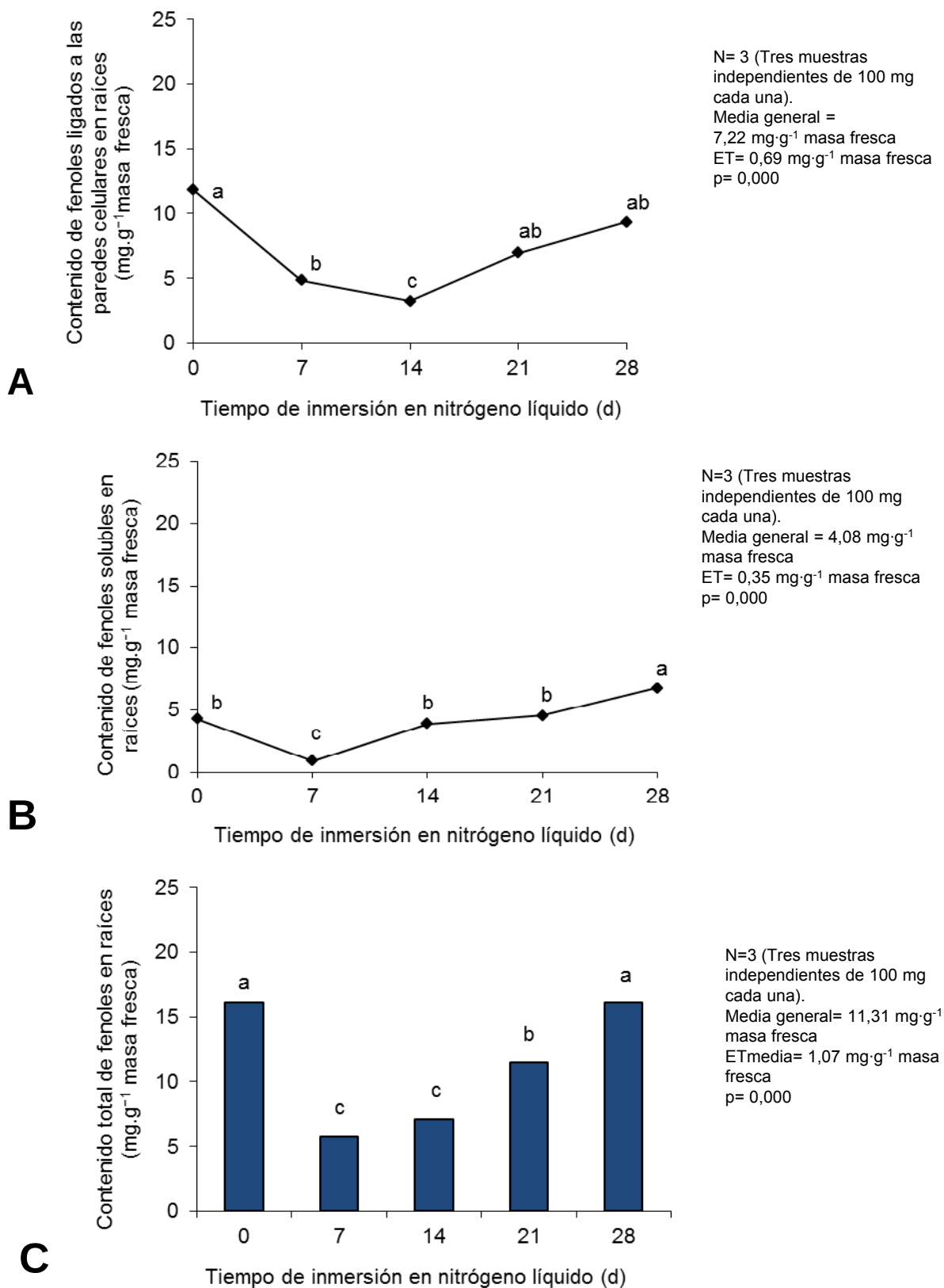


Figura 16. Efecto del tiempo de inmersión de las semillas en nitrógeno líquido en los contenidos de fenoles en las raíces. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0,05$).

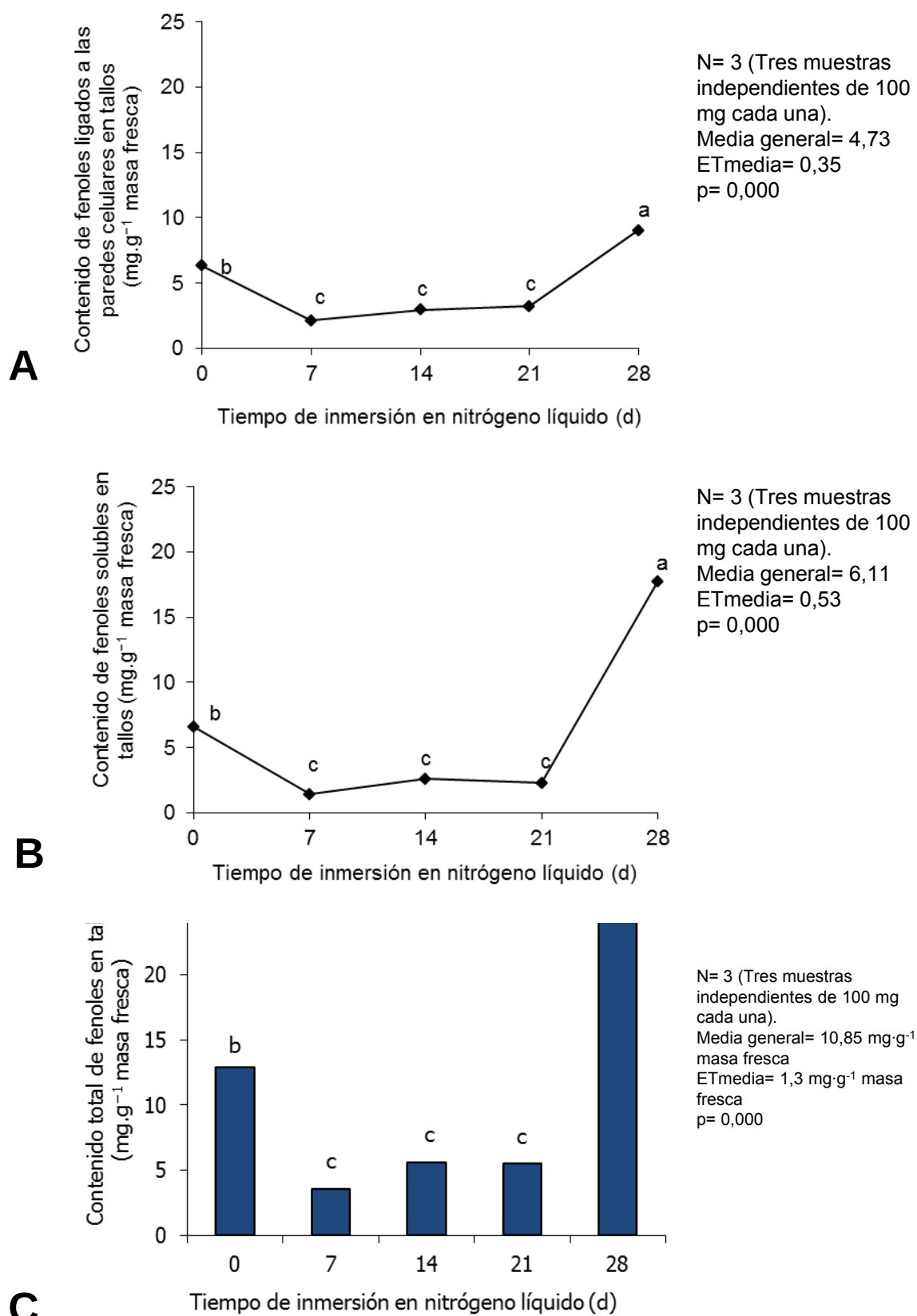


Figura 17. Efecto del tiempo de inmersión de las semillas en nitrógeno líquido en los contenidos de fenoles en los tallos. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0,05$).

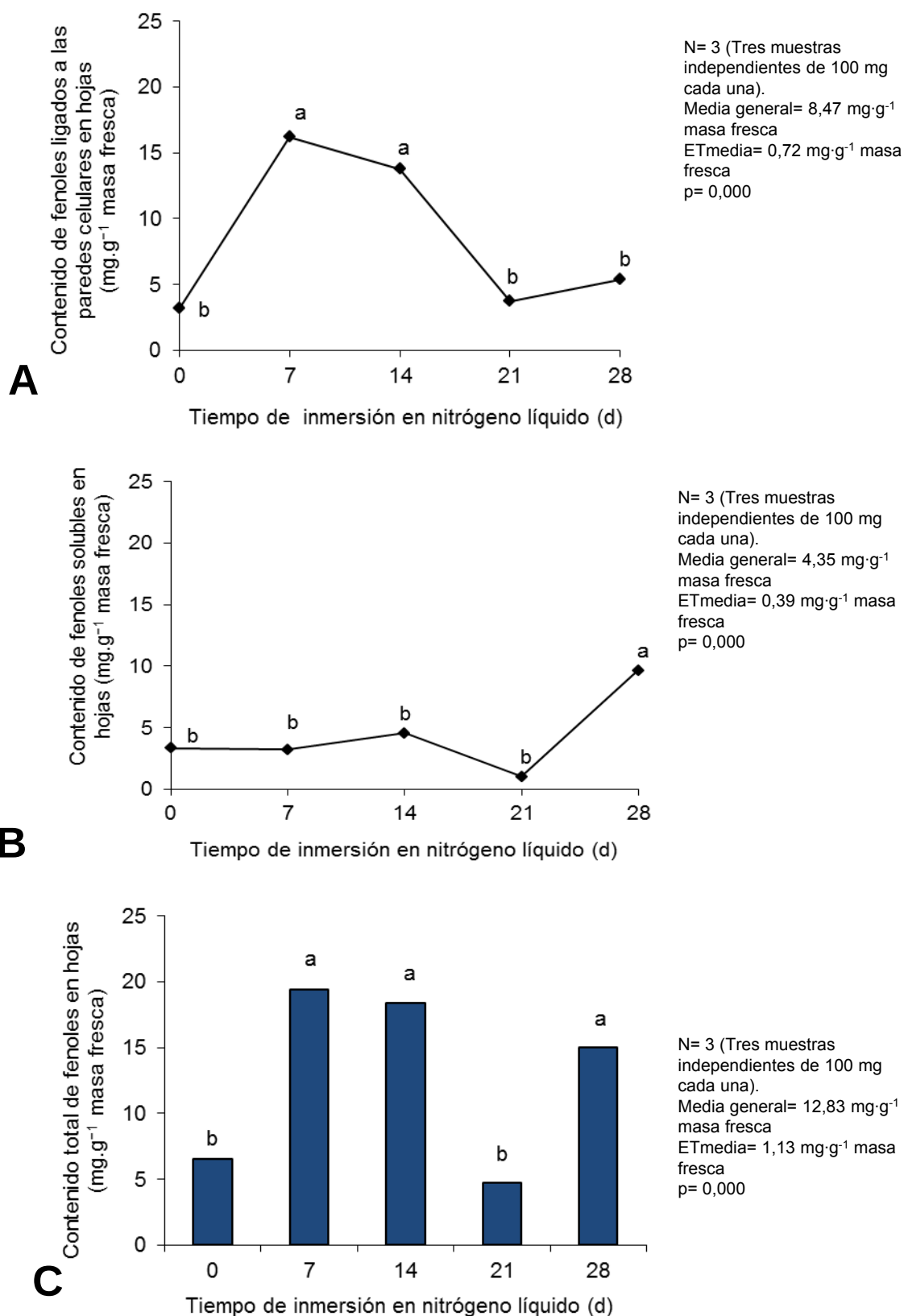


Figura 18. Efecto del tiempo de inmersión de las semillas en nitrógeno líquido en los contenidos de fenoles en las hojas. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0,05$).

Walters (2004) analizó la estabilidad biofísica de semillas secas con el uso de la temperatura Kauzmann, el punto en el cual la estabilidad molecular de los cristales es cercano a cero, como un indicador de la movilidad molecular. Concluyó que la movilidad molecular podía ocurrir aún a la temperatura criogénica, aunque estaba limitada por el estado del agua. Buitink *et al.* (2000) aplicaron la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica para estudiar la rotación de una sonda *spin* en el citoplasma de semillas, polen y varias especies de plantas, como una función del contenido de humedad y la temperatura. Sus estudios sugirieron que el envejecimiento perjudicial estuvo asociado con la movilidad molecular en el citoplasma.

Aunque las escalas de tiempo observadas por Buitink *et al.* (2000) y Walters (2004) son diferentes de las empleadas en este estudio (años en su caso, días aquí), sus criterios pueden usarse para explicar algunos de estos resultados. La movilidad molecular que ocurre en el citoplasma durante la crioconservación podría, por ejemplo, inducir cambios en el estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres, los que pueden dañar los sistemas membranosos y producir algunas microfracturas en las membranas. Estos cambios en la estructura de las membranas de los compartimentos celulares pueden unir algunos compuestos químicos que están aislados en condiciones normales y entonces producir alteraciones en diferentes rutas metabólicas, e incluir a los fenoles.

En el presente trabajo se mostró por primera vez que la inmersión de semillas de *S. pimpinellifolium* en NL durante diferentes períodos de tiempo (0-28 d) modificó los niveles de fenoles. De esta manera resultaba interesante conocer si los cambios en el contenido de fenoles a los 28 d de inmersión en NL podían tener implicaciones mayores a nivel fenotípico y molecular.

4.2.3 Caracterización botánica en campo y molecular de plantas regeneradas a partir de semillas crioconservadas y no crioconservadas

Es importante determinar la posibilidad de variación que pueda ocurrir en las plantas procedentes de semillas sometidas a la inmersión en NL, estos análisis se llevaron a cabo a nivel fenotípico, bioquímico y molecular. Las evaluaciones botánicas de la primera y segunda generación de plantas derivadas de semillas crioconservadas y no crioconservadas (testigo), no revelaron diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos (t-test, $p > 0,05$), los datos se aprecian en la Tabla 5 y la Figura 19.

Se emplearon 12 marcadores (SSR) para el análisis de la estabilidad genética de diez plantas de la segunda generación (cinco plantas derivadas de semillas crioconservadas y cinco plantas de semillas no crioconservadas, testigo), estos marcadores fueron escogidos por su alto polimorfismo y la pequeña talla de sus productos de PCR. Las 12 combinaciones de cebadores detectaron un alelo por individuo y en consecuencia son considerados homocigóticos en los loci analizados. Estos resultados indicaron que ninguno de los marcadores mostró cambios en la secuencia de ADN entre las semillas derivadas de plantas provenientes de semillas crioconservadas y no crioconservadas, este último considerado tratamiento testigo (Tabla 6).

En el caso del análisis molecular se utilizaron los microsatélites por su importancia (Kalia *et al.*, 2011). Estas técnicas se emplean para develar la diversidad genética (Asfaw *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2011), medir estructuras de poblaciones (Ribeiro *et al.*, 2010; Albertini *et al.*, 2011), y en mapas de integridad genética, física y fisiológica (McClean *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011).

Tabla 5. Caracterización botánica de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. procedentes de semillas no crioconservadas y crioconservadas durante el crecimiento *in vivo*.

	Plantas de semillas no crioconservadas	Plantas de semillas crioconservadas	Media general	ET media
Longitud del tallo más largo (cm) *	280,3 a	271,8 a	276,05	26,71
Longitud del pétalo (mm) *	11,1 a	11,0 a	11,05	0,98
longitud del sépalo (mm) *	5,1 a	5,1 a	5,1	0,43
Número de frutos por inflorescencia *	6,9 a	7,3 a	7,1	0,67
Masa del fruto (g) *	1,5 a	1,5 a	1,5	0,13
Longitud del fruto (cm) *	1,3 a	1,3 a	1,3	0,10
Ancho del fruto (cm) *	1,5 a	1,5 a	1,5	0,12
Longitud del pedicelo (mm) *	8,1 a	8,1 a	8,1	0,79
Grosor del pericarpio (mm) *	1,3 a	1,3 a	1,3	0,11
Diámetro del corazón del fruto (cm) *	0,4 a	0,4 a	0,4	0,03
Número de lóculos por fruto *	2,1 a	2,2 a	2,15	0,19
Brix del fruto (%) *	8,1 a	7,9 a	8,0	0,72
pH del fruto *	3,8 a	3,9 a	3,85	0,33
Tipo de crecimiento **	Semi-determinado	Semi-determinado		
Densidad de pubescencia del tallo **	Intermedio	Intermedio		
Longitud de los entrenudos del tallo **	Corto	Corto		
Densidad del follaje **	Intermedio	Intermedio		
Posición de la hoja **	Horizontal	Horizontal		
Tipo de hoja **	<i>Pimpinellifolium</i>	<i>Pimpinellifolium</i>		
Grado de disección de la hoja **	Intermedio	Intermedio		
Color de las venas de las hojas **	Normal	Normal		
Color de la corola **	Amarillo	Amarillo		
Tipo de corola **	Abierto	Abierto		
Posición del estilo **	Insertado	Insertado		
Color externo de los frutos inmaduros **	Verde claro con venas blancas	Verde claro con venas blancas		
Pubescencia del fruto **	Limitado	Limitado		
Forma predominante del fruto **	Ligeramente aplanado	Ligeramente aplanado		
Uniformidad del tamaño del fruto **	Intermedio	Intermedio		
Color externo del fruto **	Rojo	Rojo		
Intensidad del color externo del fruto **	Alto	Alto		
Facilidad para separar el fruto del pedicelo **	Intermedio	Intermedio		
Forma del hombro del fruto **	Aplanado	Aplanado		
Facilidad para pelar el fruto **	Intermedio	Intermedio		
Color del pericarpio **	Rojo oscuro	Rojo oscuro		
Consistencia del fruto a los 10 días de la cosecha **	Bueno	Bueno		

* Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (t-test, $p \leq 0.05$). n= 3 (3 réplicas de 30 plantas cada una).

**Acorde a IPGRI (1996).

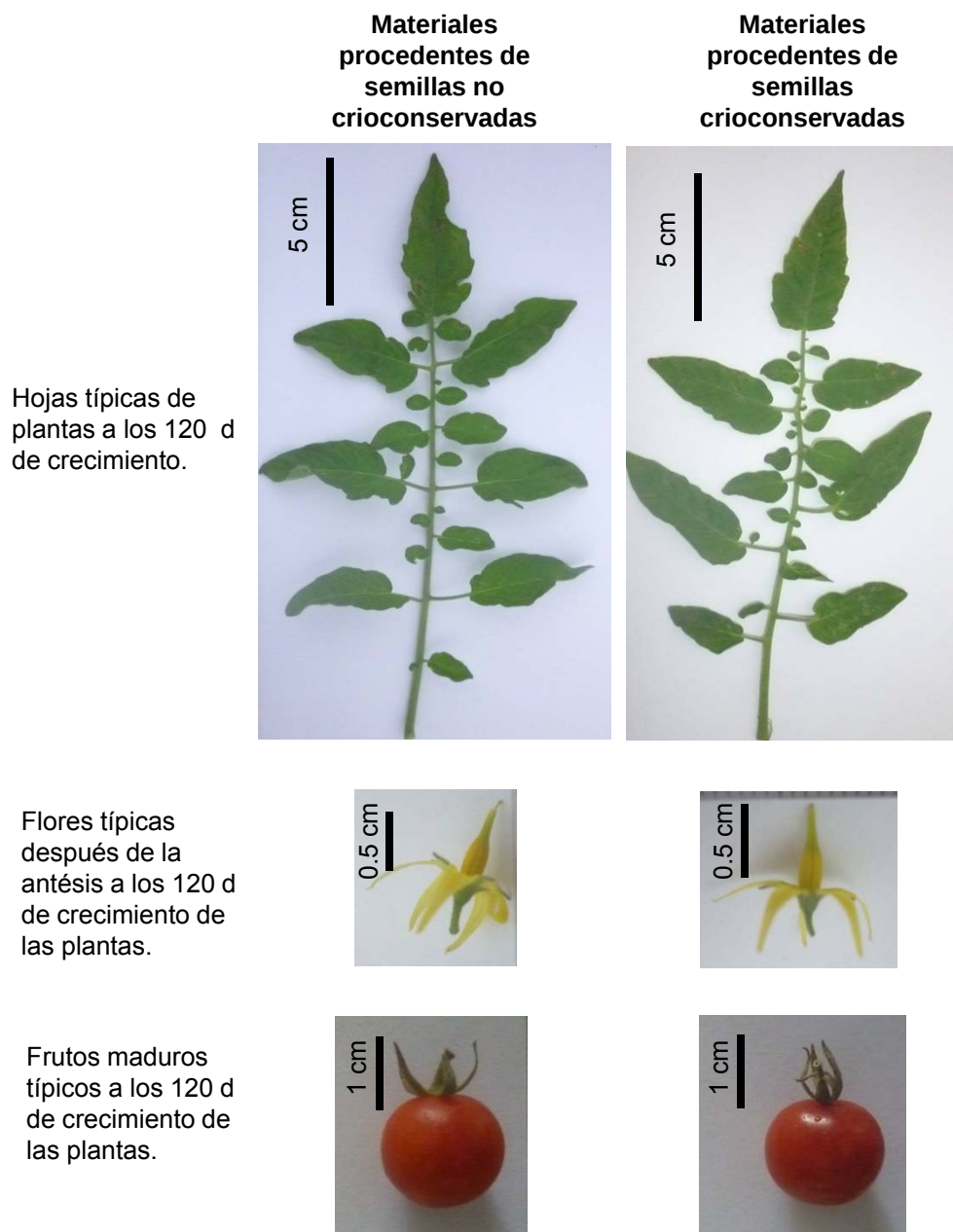


Figura 19. Caracterización fenotípica en campo del efecto de la crioconservación de semillas, primera generación, N= 3 (3 repeticiones de 30 plantas cada una). Acceso 56.

Tabla 6. Alelos SSR detectados (pares de bases) mediante 12 marcadores microsatélites en plantas de *Solanum pimpinellifolium* derivadas de semillas crioconservadas y no crioconservadas (2da generación).

Muestra	LE 20592	LE 21085	LE ct001	LE aat002	LE aat007	LE caa001
C1	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
C3	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
C4	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
C6	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
C7	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
NC1	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
NC2	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
NC3	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
NC5	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100
NC6	171-171	109-109	98-98	104-104	99-99	100-100

Muestra	LE ctt001	LE tat002	LE ga003	LE LE 25	LE ta003	LE ta015
C1	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
C3	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
C4	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
C6	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
C7	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
NC1	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
NC2	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
NC3	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
NC5	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98
NC6	91-91	202-202	235-251	230-230	97-97	98-98

En ese sentido, Harding y Benson (2001) los emplearon para el análisis de la estabilidad genética de plantas de *S. tuberosum* L., procedentes de brotes crioconservados y no crioconservados. Ellos encontraron una estabilidad en el genoma de cloroplastos de las plantas procedentes de la crioconservación idéntica a las de las plantas procedentes del cultivo *in vitro*. Los microsatélites también se usan para la selección asistida por marcadores (Benchimol *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011; Kalia *et al.*, 2011), en el análisis de la diversidad del genoma en especies, y para evaluar relaciones entre individuos en colecciones núcleos de cultivos como el tomate (Gonçalves-Vidigal y Benchimol, 2011).

Por otra parte, en estudios donde se compararon el desarrollo vegetativo y floral en plantas de campo originadas de material crioconservado en especies como *Musa* sp. (Côte *et al.*, 2000), *Solanum tuberosum* (Mix-Wagner *et al.*, 2003) y *Elaeis guineensis* (Konan *et al.*, 2007), no se encontraron diferencias en los caracteres estudiados producto de la acción de la crioconservación. En el caso de semillas crioconservadas, tampoco se encontraron diferencias en las plantas regeneradas a partir de semillas de cebolla cuando se realizaron análisis citológicos (Lakhanpaul *et al.*, 1996). Uragami *et al.* (1993) informaron que el número de plantas diploides regeneradas de embriones de colza no difirió del control no crioconservado.

En este sentido, en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, se estudió el comportamiento en campo de plantas de caña de azúcar regeneradas de callos embriogénicos crioconservados (100 plantas por tratamiento (Martínez-Montero *et al.*, 2002a, 2002b). Los resultados mostraron diferencias transitorias que desaparecieron a los 12 meses de cultivo. Otros trabajos realizados en la misma institución sobre los efectos de la conservación de semillas de frijol en NL no mostraron cambio fenotípico en los

caracteres macroscópicos de plantas jóvenes y adultas crecidas *in vivo* (Cejás *et al.*, 2012, 2013).

Por otra parte, solo muestras de alta calidad puedan almacenarse en NL, lo cual requiere rigurosos procedimientos operacionales (Berjak *et al.*, 2011a), esto se debe a que, el estado del germoplasma antes ser sometido a las temperaturas ultra bajas tiene importantes implicaciones para su estabilidad y viabilidad (Benson, 2008), dentro de lo que se incluyen la estabilidad física y bioquímica del sistema (Reed *et al.*, 2001). La última confirmación de la estabilidad genética de un material crioconservado debe ser la reintroducción en el ambiente y la producción de plantas completas y fértiles.

En el contexto de los bancos de germoplasma y desde el punto de vista agronómico, el efecto de la exposición al NL en la viabilidad y germinación, debe estudiarse para cada material antes del uso de la crioconservación para el almacenamiento a largo plazo. Los resultados de este experimento confirmaron a nivel del fenotipo y del genotipo evaluado, la efectividad de la crioconservación de semillas de *S. pimpinelifolium* para preservar y regenerar plantas que conserven los caracteres agronómicos principales.

4.3 Determinación del efecto de la crioconservación a largo plazo en la germinación de semillas de tomate silvestre

En los primeros seis meses, las semillas que se guardaron en frío a 4°C alcanzaron un porcentaje de germinación que no difirió estadísticamente con las que estaban almacenadas en NL (Figura 20). Sin embargo, a los 12 meses para las semillas del tratamiento testigo (semillas almacenadas a 4°C), disminuyó el porcentaje de germinación con diferencias estadísticas respecto a las semillas crioconservadas hasta el final del tiempo de evaluación.

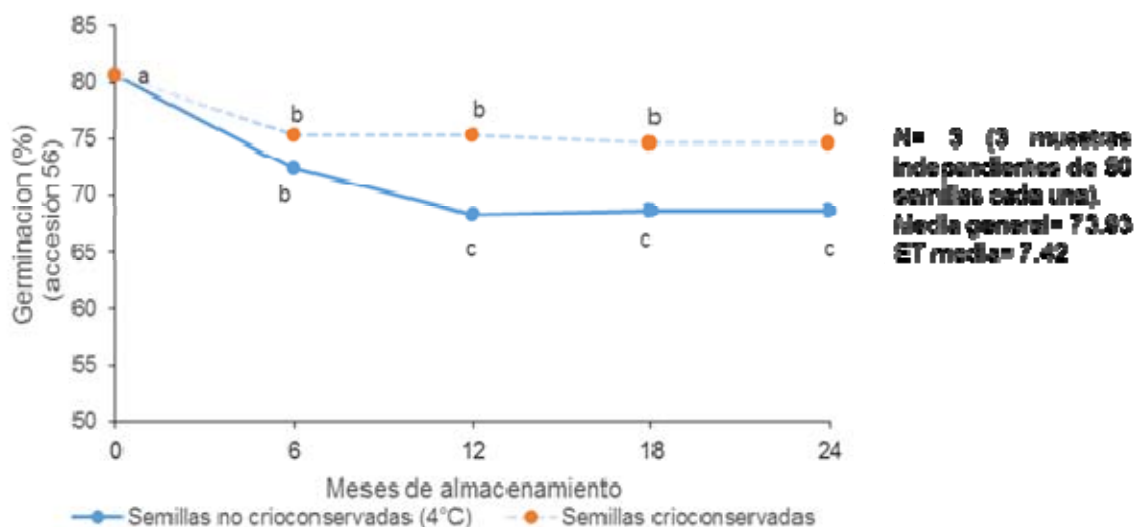


Figura 20. Porcentaje germinación de semillas de *Solanum pimpinellifolium* posteriores a la inmersión en nitrógeno líquido hasta 24 meses de almacenamiento. ANOVA bifactorial, Tukey, $p < 0,05$. Para el análisis estadístico los porcentajes se transformaron según $y = 2 * \arccos(y/100)^{0,5}$.

A pesar de que se determinó una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas crioconservadas después de 12 meses de almacenamiento, éstas conservaron un porcentaje de germinación cercano al 75% hasta el final del tiempo de evaluación (24 meses). La viabilidad de las muestras debe controlarse periódicamente (Iriondo, 2001) y establecerse en dependencia de su uso. Si el porcentaje de germinación es inferior al 85% del valor inicial en muestras almacenadas en colecciones a largo plazo y al 65% del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración ya sea mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables, todo esto, independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas. Sin embargo, según van Treuren *et al.* (2013) los niveles de germinación de semillas para las especies silvestres emparentadas a los cultivos es menos estricto que sus correspondientes cultivos, y se consideran buenos resultados de germinación valores mayores al 57% si se almacenan a largo-plazo.

La limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento, es un principio básico para la conservación de semillas. No obstante, se conoce que condiciones de baja temperatura y bajo contenido en humedad prolongan la longevidad de las semillas (Iriondo, 2001). Las reglas de Harrington, establecen que existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5°C en la temperatura y por cada reducción de un 1% en el contenido de humedad.

De acuerdo con este criterio, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis *et al.* (1990), establecieron que los efectos beneficiosos de la desecación de la semilla sobre la longevidad de ésta, tiene límites y que depende de la composición química de la misma.

Se ha comprobado también que, contrario a lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1990). El uso apropiado de estos dos factores proporciona una vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma (Iriondo, 2001).

Las semillas ortodoxas, es decir semillas capaces de permanecer viables largo tiempo bajo determinadas condiciones, sobreviven a un estado de sequía inicial, pero pueden también perder la viabilidad durante el almacenamiento (Mira *et al.*, 2010). El deterioro de las semillas puede seguir un patrón sigmoideal, en el cual la viabilidad permanece por un

período constante, seguido de una abrupta disminución y finalizan en un período lento durante el cual unas pocas semillas se mantienen viables (Walters, 1998; Walters *et al.*, 2005).

Es muy importante para la regeneración de las accesiones en los bancos de germoplasmas predecir la duración de la fase inicial (Walters, 1998; Walters *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos exactos que conllevan a la pérdida de la viabilidad de la semillas no están bien definidos y la susceptibilidad de la semilla a envejecer varía dentro de las familias y las especies (Walters *et al.*, 2005; Niedzielski *et al.*, 2009; Nagel y Borner, 2010).

El deterioro de la semilla durante la fase inicial depende de la humedad y la temperatura durante el almacenamiento y otros aspectos más como la calidad, de los antecedentes genéticos y, muy importante, las condiciones ambientales en que se desarrollaron las mismas (Walters *et al.*, 2004). Esta es una fase asintomática difícil de medir (Mira *et al.*, 2010).

En este sentido, se ha planteado un mecanismo de dos etapas que involucra la oxidación durante el envejecimiento de las semillas ortodoxas según reconocen Smith y Berjak (1995). Es decir, aún para este tipo de semillas con bajo contenido de humedad durante el almacenamiento se ha comprobado que ocurren las reacciones de auto-oxidación que provocan la producción de radicales libres (McDonald, 1999; Bailly, 2004). En estas condiciones la actividad de las enzimas de desintoxicación son casi nulas y, por lo tanto es poco probable la eliminación de las sustancias reactivas del oxígeno, las que tienen un efecto negativo en los componentes celulares (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas

estructurales y enzimáticas) o se encuentran atrapadas en las estructuras intracelulares (Smirnoff, 1993).

Por otra parte, se conoce que las semillas ortodoxas presentan características apropiadas para la formación del estado vítreo (Walters, 2004). Sin embargo, el contenido de agua mediante el cual el citoplasma se transforma en ese estado durante la desecación-almacenamiento depende de la temperatura (Buitink y Leprince, 2008). Es decir, mientras más baja es la temperatura de desecación, es mayor el contenido de agua al que el citoplasma pasa a estado vítreo. Así, aunque la formación vítrea en las semillas de manera drástica disminuye la movilidad molecular, pero las moléculas en estas condiciones no están muy restringidas en movimiento y una pequeña difusión en el tiempo es posible. Esto en parte puede explicar por qué las semillas envejecen a más altas temperaturas debido a los procesos de deterioro de las semillas como la peroxidación lipídica pero de manera lenta.

Existen evidencias donde muestran que la degradación es mucho más lenta y la durabilidad aumenta cuando las células son almacenadas a temperaturas criogénicas y se comparan con el refrigerador. Por ejemplo, diferentes líneas de patógenos, cultivos celulares, espermatozoides, y embriones se mantienen viables en criogenia durante 10-40 años (Walters *et al.*, 2004; Buitink y Leprince, 2008; Volk, 2010). Similares resultados se informaron por Day (2004), donde se menciona que la viabilidad de algas crioconservadas se mantiene por más de 20 años sin afectaciones.

El estudio de los mecanismos de envejecimiento de las semillas y la determinación de indicadores de calidad pueden salvar enormes cantidades de tiempo, esfuerzo y materiales

en los bancos de germoplasma (Stanwood, 1985) y preservar de esta forma la biodiversidad genética. También en los bancos de semillas que emplean el método de crioconservación se deben realizar pruebas de viabilidad y de vigor de forma periódica.

Walters *et al.* (2004), realizaron importantes estudios de longevidad en germoplasma crioconservado. Estos autores informaron sobre cambios medibles en la germinación de semillas secas en NL por más de 10 años. Se demostró que existe variabilidad en el deterioro de las semillas entre las especies y dentro de una misma especie y que la longevidad de la semilla puede superar los 500 años. Por otro lado, también concluyeron que el almacenamiento a temperaturas criogénicas, no es suficiente para disminuir el deterioro, principalmente si el estado inicial de envejecimiento de la semilla ocurre a temperaturas mayores antes de ser colocadas en NL.

Sin embargo, lo anterior se contradice con los estudios realizados por Ellis *et al.* (1990), y Pritchard y Dickie (2003) donde consideran que los efectos de las reacciones del envejecimiento se limitan con las ultra-bajas temperaturas según modelos de predicción de la viabilidad en el tiempo. Además, existen evidencias que demuestran que la posible degradación durante el almacenamiento criogénico se debe atribuir también a las fluctuaciones en la temperatura que provoca la devitrificación del estado vítreo con el crecimiento de cristales de hielo dañinos, más allá que las reacciones de envejecimiento que tienen lugar a esta temperatura de almacenamiento (Day, 2004; Buitink y Leprince, 2008; Volk, 2010).

De esta forma, se estableció que a pesar de que el proceso de deterioro de las semillas debe ocurrir irremediablemente, la crioconservación hace más lento el mismo y se obtienen niveles de germinación altos durante los 24 meses de la investigación.

4.4 Comparación de las accesiones más representativas en cuanto a la germinación y porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al nitrógeno líquido

En la Tabla 7 se muestra el tiempo de secado de las semillas y su contenido de humedad antes del almacenamiento en NL según su representatividad de semillas con diferente uniformidad de la maduración. Se observa que para las semillas con buena uniformidad de la madurez se logra la misma humedad de las semillas en menor tiempo de desecación lo que puede ser favorable con un menor daño de las semillas y por eso son los mayores valores de germinación para esta maduración.

En las semillas de tomate, que es del tipo de semilla que madura dentro de la fruta húmeda; el contenido de humedad no declina durante la maduración, aunque las semillas sean tolerantes a la desecación y germinen. Estas semillas previenen su germinación precoz en el fruto por el control hormonal y por el potencial osmótico de la fruta en el desarrollo tardío (Welbaum y Bradford, 1990; Berry y Bewley, 1992). En este sentido se ha comprobado que el máximo de la calidad de la semilla coincide con el inicio de la maduración del fruto, y las semillas declinan su calidad con la hiper-maduración (Welbaum, 1999; Bradford, 2004). Las semillas de tomate deficientes en ABA reducen su dormancia y pueden germinar vivíparas en los frutos muy maduros debido a la disminución de la sensibilidad a la imbibición osmótica (Groot y Karssen, 1992; Ni y Bradford, 1993).

Tabla 7. Tiempo de desecación en gel de sílice de semillas de *Solanum pimpinellifolium* y su contenido de humedad antes de la inmersión en nitrógeno líquido.

Accesión	Uniformidad en la madurez	Tiempo de desecación (h)	Humedad de la semillas (% masa fresca)	Germinación (%)
14	Escasa	24	6,2 ± 2,3	65,2 ± 6,0
15	Escasa	24	6,0 ± 2,1	68,1 ± 5,8
26	Escasa	25	5,8 ± 2,4	60,3 ± 4,3
29	Escasa	24	5,5 ± 2,0	62,3 ± 5,1
30	Escasa	25	5,7 ± 2,5	68,1 ± 3,2
7	Intermedia	17	6,0 ± 1,5	80,1 ± 3,2
32	Intermedia	20	6,3 ± 0,8	78,1 ± 4,2
49	Intermedia	20	6,5 ± 1,1	79,1 ± 5,1
53	Intermedia	17	5,9 ± 0,9	81,5 ± 4,1
56	Intermedia	19	6,0 ± 1,0	85,2 ± 3,5
5	Buena	15	6,0 ± 0,3	95,0 ± 1,1
43	Buena	15	6,1 ± 0,1	91,2 ± 2,3
60	Buena	17	5,7 ± 0,3	89,1 ± 3,0
61	Buena	15	5,9 ± 0,1	92,1 ± 4,6
62	Buena	15	6,0 ± 0,1	90,3 ± 3,1
Promedio		19.4	6.3 ± 1,1	

Por otra parte, se ha estudiado en semillas de *Cucumis melo* (Welbaum y Bradford, 1990; Welbaum, 1999) que durante la cosecha, las semillas jóvenes (menos de 45 d después de la antesis) germinan muy poco pero después pierden esa dormancia durante el almacenamiento. Por ejemplo, después de seis años de almacenamiento a 6% de contenido de humedad y a 10°C, estas semillas relativamente inmaduras pierden la viabilidad mientras que las semillas maduras no lo hacen. Este ejemplo ilustra el efecto beneficioso del

almacenamiento por desecación de las semillas inmaduras y la reducción de su viabilidad en el almacenamiento.

El efecto de la maduración en la calidad de las semillas es particularmente evidente en cultivos con crecimiento indeterminado donde la floración y la producción de semillas se extienden en el tiempo. En las Brassicas, por ejemplo las semillas en varios estados de desarrollo (Bradford y Bewley, 2002) están presentes simultáneamente en la plantas. En estos casos, el efecto de la madurez en la calidad de la semilla es exacerbada por el hecho que estas semillas exhiben el desgarramiento una vez que las semillas maduran.

Las condiciones del medioambiente durante el desarrollo de las semillas también afectan la dormancia. Por ejemplo, semillas de lechuga que maduran a elevadas temperaturas y por eso exhiben límites de temperature alta y limitan la germinación cuando se compara con semillas maduras a bajas temperaturas (Sung *et al.*, 1998). También existen otras influencias en la germinación de las semillas debido a las condiciones del ambiente durante el desarrollo o la maduración y están bien documentadas, incluyen la duración del día, la calidad de la luz, el tipo de maduración, la altitud entre otros factores (Guttermann, 1992; Baskin y Baskin, 1998). Todo lo anterior explica las diferencias en la producción de semillas entre las especies y las variedades con el objetivo de obtener una alta calidad de la semilla y minimizar los problemas con la dormancia.

La crioconservación no afectó la germinación inicial de las semillas en ninguno de los biotipos seleccionados para la experimentación por sus características contrastantes en la uniformidad en la madurez, y además en todos los casos las plántulas alcanzaron altos porcentajes de expansión de sus hojas cotiledonales (Tabla 8). Sin embargo cuando se

compara con los 4°C de almacenamiento si existieron diferencias significativas a los 18 meses en el caso de las accesiones con escasos e intermedias madurez. Correspondiéndose como se había planteado que la calidad de las semillas dependía en gran medida del momento de maduración.

Tabla 8. Plántulas con hojas cotiledonales expandidas a los 17 d de la siembra posterior a la inmersión en nitrógeno líquido (18 meses).

Accesión	Uniformidad en la madurez	Plántulas con hojas cotiledonales expandidas (%)		Significación t-test
		4°C	-196°C	
14	Escasa	52,5 ± 2,3	63,2 ± 3,0	*
15	Escasa	50,0 ± 2,5	62,1 ± 3,8	*
26	Escasa	48,7 ± 2,4	60,3 ± 4,3	*
29	Escasa	55,0 ± 2,0	60,8 ± 2,1	*
30	Escasa	57,3 ± 2,6	67,1 ± 3,2	*
7	Intermedia	60,7 ± 1,5	80,1 ± 3,2	*
32	Intermedia	63,8 ± 0,8	78,1 ± 4,2	*
49	Intermedia	65,7 ± 1,1	79,1 ± 5,1	*
53	Intermedia	59,9 ± 0,9	81,5 ± 4,1	*
56	Intermedia	60,7 ± 1,0	85,2 ± 3,5	*
5	Buena	90,3 ± 3,3	95,0 ± 4,1	n.s.
43	Buena	90,1 ± 3,1	91,2 ± 2,3	n.s.
60	Buena	87,3 ± 2,3	89,1 ± 3,0	n.s.
61	Buena	89,7 ± 3,1	92,1 ± 4,6	n.s.
62	Buena	88,0 ± 4,1	90,3 ± 3,1	n.s.

N= 3 (tres muestras independientes de 50 semillas cada una). T-Student para valores de $p < 0.05$, n.s. sin significación; *: significación. ±: Error estandar de la media.

La respuesta diferenciada después de la crioconservación en las accesiones estudiadas era de suponer y coincide también con lo evidenciado en otros cultivos. Dumet y Benson (2000) sugirieron que la diferencia en los porcentajes de supervivencia entre los clones de embriones somáticos en *Elaeis quineensis* después del NL dependió de los distintos niveles de absorción de sacarosa según el estado fisiológico de cada clon, lo cual determinó diferentes cantidades de agua con tendencia a formar cristales de hielo. Al respecto Panis y Lambardi (2006) subrayaron que la elección del material tiene una extrema importancia a la hora de establecer una estrategia de crioconservación. Malaurie *et al.* (1998) manifestaron que la diferencia en sus resultados entre los clones crioconservados de malanga se debió a que a pesar de pertenecer a una misma especie, el origen genético fue diferente.

Engelmann (2000) evidenció que una metodología de crioconservación funciona en rangos de respuestas a la temperatura del nitrógeno líquido en dependencia del genotipo y si se estimara conveniente mejorar la eficiencia del procedimiento para un genotipo elite entonces se justificaría la realización de ajustes al protocolo de crioconservación. Paulet *et al.* (1993), Cyr (1998) y Reed *et al.* (2001) plantean que el factor genotipo se necesita siempre tener en cuenta para validar cualquier protocolo de crioconservación. Incluso, Turner *et al.* (2001) demostraron que resultó eficiente utilizar primero una especie indicadora (en su caso *Anigozanthos viridis* que tenía una alta tasa de multiplicación *in vitro*) para optimizar el protocolo de crioconservación y después aplicarlo a otras especies relacionadas.

En sentido general, la comparación de las accesiones de tomate silvestre (*S. pimpinellifolium*) en cuanto al porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales y que se seleccionaron para el análisis por su diversidad, según el dendograma mostrado en el acápite 4.1.2, respondieron bien a la crioconservación.

□

5. CONCLUSIONES

1. En el cantón Bolívar de la provincia de Manabí en Ecuador se colectaron 63 accesiones de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) con diferencias marcadas en cuanto a los indicadores de caracterización *ex situ*.
2. La exposición de las semillas al NL produjo variaciones en los indicadores bioquímicos en las plantas de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.).
3. No se observaron diferencias en los caracteres estudiados entre las plantas derivadas de semillas crioconservadas y no crioconservadas a nivel fenotípico visible. Además, la crioconservación no causó cambios en la secuencia de ADN.
4. La crioconservación de semillas de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) a largo plazo, no afectó el porcentaje de germinación respecto a las semillas almacenadas a 4°C.
5. Las accesiones de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.) más representativas, mostraron similar viabilidad y no se observaron diferencias en relación con el porcentaje de plántulas que lograron la expansión de las hojas cotiledonales después de exponer las semillas al NL.

6. RECOMENDACIONES

1. □ Preservar las accesiones colectadas mediante su exposición a NL, pues los caracteres botánicos más relevantes no se afectaron por la técnica empleada.
2. □ Determinar la relación de las temperaturas ultra bajas con otros indicadores bioquímicos e histológicos y su efecto sobre caracteres fenotípicos no estimados en el presente trabajo.
3. □ Considerar los resultados de este trabajo como referencia para interpretar la respuesta fisiológica de otras semillas ortodoxas a la crioconservación.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) □ Ahmad P, Sharma S, Srivastava PS (2007) *In vitro* selection of NaHCO₃ tolerant cultivars of *Morus alba* (Local and Sujanpuri) in response to morphological and biochemical parameters. HortScience 34:114-122.
- 2) □ Ahuja MR (1986) Storage of forest tree germplasm in liquid nitrogen (-196°C). Silvae Genet 35:5-6.
- 3) □ Albertini E, Torricelli R, Bitocchi E, Raggi L, Marconi G, Pollastri L, Veronesi F (2011) Structure of genetic diversity in *Olea europaea* L. cultivars from central Italy. Mol Breeding 27:533-547.
- 4) □ Álvarez-Hernández JC (2009) Injerto de Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en germoplasma silvestre como fuente de resistencia a plagas y enfermedades. Tesis para obtener el título de Maestría, Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Michoacán, Jiquilpan, México, 170 pp.
- 5) □ Ammiraju J, Veremis J, Huang X, Roberts P, Kaloshian I (2003) The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. Theor Appl Genet 106:478-484.
- 6) □ Aragón C, Carvalho L, González J, Escalona M, Amâncio S (2012) The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. Plant Cell Rep 31:757-769.
- 7) □ Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Curr Sci India 82:1227-1238.
- 8) □ Asfaw A, Blair M, Almekinders C (2009) Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. Theor Appl Genet 120:1-12.
- 9) □ Ashrafuzzaman M, Haque MA, Razi Ismail M, Islam MT, Shahidullah SM (2010) Genotypic and seasonal variation in plant development and yield attributes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. Inter J Bot 6:41-46.
- 10) □ Astua-Monge G, Minsavage G, Stall R, Vallejos C, Davis M, Jones J (2000) A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* Race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. Mol Plant Microbe In 13(12):1346-1355.

- 11)□ Auld JR, Agrawal A, Relyea R (2010) Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *P R Soc London* 277:503-511.
- 12)□ Bacchetta G, Bueno Sánchez A, Fenu G, Jiménez-Alfaro B, Mattana E, Piotto B, Virevaire M (Eds) (2008) Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Gobierno del principado de Asturias, La Caixa, Oviedo, España, 378 pp.
- 13)□ Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future. *Ann Bot* 100:1085-1094.
- 14)□ Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14:93-107.
- 15)□ Baskin CC, Baskin JM (1998) Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, New York, NY.
- 16)□ Bauchet G, Causse M (2012) Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. En: Caliskan PM (ed) Genetic Diversity in Plants, Croatia, pp. 133-162.
- 17)□ Benchimol L, Souza Jr C, Souza A (2005) Microsatellite-assisted backcross selection in maize. *Genet Mol Biol* 28:789-797.
- 18)□ Benson E (2008) Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *CRC Cr Rev Plant Sci* 27:141-219.
- 19)□ Benson E, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den Houwe I, Roux N (2011) Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part III. Multi-crop guidelines for developing in vitro conservation best practices for clonal crops System-wide Genetic Resources Programme, Roma, Italia, 145 pp.
- 20)□ Berjak P, Bartels P, Benson EE, Harding K, Mycock DJ, Pammenter NW, Wesley-Smith J (2011) Cryoconservation of South African plant genetic diversity. *In Vitro Cell Dev-Plant* 47:65-81.
- 21)□ Berjak P, Serphen, Varghese B, Pammenter NW (2011b) Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed Sci Res* 21:187-203.
- 22)□ Bernacchi D, Beck-Bunn T, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley S (1998) Advanced backcross QTL analysis in tomato. I. Identification of QTLs for

- traits of agronomic importance from *Lycopersicon hirsutum*. Theor Appl Genet 97:381-397.
- 23)□ Berry T, Bewley JD (1992) A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: a consideration of the osmotic environment and abscisic acid. Plant Physiol 100: 951-957.
- 24)□ Bino RJ, De Vries JN, Kraak HL, Pijlen JG (1992) Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination. Ann Bot 69:231-236.
- 25)□ Bioversity (2006) Parientes silvestres de cultivos. Geneflow, Roma, Italia, 26 pp.
- 26)□ Blair MW, Díaz LM, Buendía HF, Duque MC (2009) Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 119:955-972.
- 27)□ Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. PLoS ONE 7(10): e48198.
- 28)□ Bradford KJ, Bewley JD (2002) Seeds: biology, technology and role in agriculture. En: Chrispeels MJ, Sadava DE (eds), Plants, Genes and Crop Biotechnology, 2nd Edition. Jones and Bartlett, Boston, MA, pp. 210-239.
- 29)□ Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- 30)□ Breusegem FV, Vranova E, Dat JF (2001) The role of oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci 161:405-414.
- 31)□ Buitink J, Leprince O (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. CR Biol 331:788-795.
- 32)□ Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000) Molecular mobility in cytoplasm: An approach to describe and predict lifespan in dry germplasm. Natl Acad Sci USA 97:2385-2390.
- 33)□ Burke MJ (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. En: Leopold AC (ed). Membranes, metabolism and dry organisms. Cornell University Press, Ithaca, New York, pp. 358-363.

- 34)□ Campos T, Oblessuc PR, Sforça DA, Cardoso JM, Baroni RM, de Sousa AC, de Souza AP (2011) Inheritance of growth habit detected by genetic linkage analysis using microsatellites in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol Breeding 27:549-560.
- 35)□ Cardoso F, Pita J, Palmeira J (2000) Efecto de la Crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Rev Bras Prod Agroind 2:67-71.
- 36)□ Carvalho LC, Osorio ML, Chaves MM, Amancio S (2001) Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and plantlets under *ex vitro* acclimatization. Plant Cell Tiss Org 67:271-280.
- 37)□ Cejas I, Méndez R, Villalobos A, Palau F, Aragón C, Engelmann F, Carputo D, Aversano R, Martínez ME, Lorenzo JC (2013) Phenotypic and molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* plants from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. Am J Plant Sci 4:844-849.
- 38)□ Cejas I, Vives K, Laudat T, González-Olmedo J, Engelmann F, Martínez-Montero ME, Lorenzo JC (2012) Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. Plant Cell Rep 31:2065-2073.
- 39)□ Chang Y, Reed BM (2000) Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. Cryobiology 40:311-322.
- 40)□ Chen KY, Tanksley SD (2004) High-resolution mapping and functional analysis of se2.1: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. Genetics 168:1563-1573.
- 41)□ Chen L, Zhao Z, Liu X, Liu L, Jiang L, Liu S, Wan J (2011) Marker-assisted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile japonica rice with high cross-compatibility with indica rice. Mol Breeding 27:247-258.
- 42)□ Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. Physiol Plantarum 126:52-61.
- 43)□ Companioni B, Mora N, Díaz L, Pérez A, Arzola M, Espinosa P, Hernández M, Ventura J, Pérez MC, Santos R, Lorenzo JC (2005) Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense culture filtrates. Plant Breeding 123:1-8.

- 44)□ Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv Physiol* 1:doi: 10.1093/conphys/cot001.
- 45)□ COPISA (2012) Conferencia Plurinacional e Intercultural de Soberanía Alimentaria. Propuesta de Ley Orgánica de Agrobiodiversidad, Semillas y Fomento Agroecológico, Comisión Técnica de Agrobiodiversidad, Agroecología, Soberanía Alimentaria (ed.), Quito, Ecuador, 93 pp.
- 46)□ Correll DS (1958) A new species and some nomenclatural changes in *Solanum*, section *Tuberarium*. *Madroño* 14:232-236.
- 47)□ Cortez-Madriral H (2010) Resistencia a insectos de tomate injertado en parientes silvestres, con énfasis en *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera: Psyllidae). *Bioagro* 22:11-16.
- 48)□ Côte FX, Goue O, Domergue R, Panis B, Jenny C (2000) In-field behavior of banana plants (*Musa AA* sp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *Cryo-Lett* 21:19-24.
- 49)□ CUARTO%20INFORME.pdf (Consultado 20 julio 2014).
- 50)□ Cuesta F, Peralvo M, Ganzenmüller A, Sáenz M, Novoa J, Riofrío G, Beltrán K (2006) Identificación de vacíos y prioridades de conservación en el Ecuador continental.
<http://protectedareas.info/upload/document/ecuador_terrestrial_gap_analysis.pdf>Ecociencia (ed.) Ministerio del Ambiente del Ecuador, Quito.
- 51)□ Dale M, Causton D (1992) Use of the chlorophyll a/b ratio as a bioassay for the light environment of a plant. *Funct Ecol* 6:190-196.
- 52)□ D'Arcy WG (1991) The *Solanaceae* since 1976, with a review of its biogeography. En: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada N (eds) *Solanaceae* III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido, pp. 75-137.
- 53)□ Day JG (2004) Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing-thawing and application in culture collections. *Nova Hedwigia* 79: 191-206.
- 54)□ De Castro R, Hilhorst H (2000) Dormancy, germination and the cell cycle in developing and imbibing tomato seeds. *Rev Bras Fisiol Veg* 12:105-136.

- 55)□ De Jong AJ, Yakimova ET, Kapchina VM (2002) A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214:537-545.
- 56)□ De las Rivas J (2008) La luz y el aparato fotosintético. En: Azcon-Bieto J, Talón M (eds) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill, Barcelona. España, pp. 165-189.
- 57)□ De Vicente MC, Tanksley SD (1993) QTL analysis of transgressive segregation in an interespecific tomato cross. *Genetics* 134:585-596.
- 58)□ Decruse SW, Seeni S, Pushpangdan P (1999) Effects of cryopreservation on seed germination of selected rare medicinal plants of India. *Seed Sci Technol* 27:501-505.
- 59)□ Duan H, Zhu Y, Qi D, Li W, Hua X, Liu Y, Deng X (2012) Comparative study on the expression of genes involved in carotenoid and ABA biosynthetic pathway in response to salt stress in tomato. *J Integr Agric* 11:1093-1102.
- 60)□ Dulloo ME, Ebert AW, Dussert S, Gotor E, Astorg C, Vásquez N, Rakotomalala JJ, Rabemiafar A, Eira M, Bellachew B, Omondi C, Engelmann F, Anthony F, Watts J, Qamar Z, Snook L (2009) Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Sci* 49:2123-2138.
- 61)□ Dumet D, Benson EE (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. JIRCAS/IPGRI, Tsukuba/Roma, pp. 43-56.
- 62)□ Eigenbrode S, Trumble JT, Jones RA (1993) Resistance to beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hubner]), hemipterans, and *Liriomyza* spp. in *Lycopersicon*. *J Am Soc Hortic Sci* 118:525-530.
- 63)□ Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, Tao KL (1990) Low moisture limits to relations between seed longevity and moisture. *Ann Bot* 65:493-504.
- 64)□ Engelmann F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57:227-243.
- 65)□ Engelmann F (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell Dev-Plant* 40:427-433.

- 66)□ Engelmann F (2010) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev-Plant* 47:5-16.
- 67)□ Engels J, Arora R, Guarino (1995) An introduction to plant germplasm exploration and collecting: planning, methods and procedures. En: Guarino L, Rao R, Reid R (eds). *Collecting plant genetic diversity, technical guidelines*. CAB International, Wallingford, Reino Unido. pp. 31-63.
- 68)□ Engels JM, Maggioni L, Maxted N, Dulloo ME (2008) Complementing *in situ* conservation with *ex situ* measures. En: Iriondo J, Maxted N, Dulloo M (eds) *Conserving Plant Genetic Diversity in Protected Areas*. CAB International, Wallingford, Reino Unido, pp. 169-181.
- 69)□ Esquinas-Alcázar J (2005) Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. *Nat Rev Genet* 6:948-953.
- 70)□ FAO (1990) *Guidelines for soil profile description*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- 71)□ FAOSTAT (2012) Statistical database of the food and agriculture of the United Nations. Disponible sitio de la FAO (Visitado el 24 Abril de 2014). <http://faostatfaoorg/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>
- 72)□ Finch-Savage W, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171:501-523.
- 73)□ Florido M, Arencibia A, Plana D, Alvarez M, Lopez J, Lara R (2007) Análisis de la diversidad genética en tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicom* subsección *Lycopersicom*) utilizando AFLP. *Cultivos Tropicales* 28:83-87.
- 74)□ Fordyce JA (2006) The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 209:2377-2383.
- 75)□ Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ (1995) *Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press, Reino Unido, 299 pp.
- 76)□ Gallardo A (2012) Libro blanco de los recursos fitogenéticos con riesgo de erosión genética de interés para la agricultura y la alimentación en Andalucía-Sevilla. Secretaría General Técnica, Servicio de Publicaciones y Divulgación, Sevilla.
- 77)□ García A, Calvo E, Kiihl R, Souto E (2011) Evidence of a susceptible allele inverting the dominance of rust resistance in soybean. *Crop Sci* 51:32-40.

- 78)□ García-Mas J, Graziano E, Aranzana M, Monforte A, Oliver M, Ballester J, Viruel M, Arús P (2000) Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos. En: Nuez F CJE (ed) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 91-151.
- 79)□ Gold K, León-Lobos P, Way M (2004) Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile. Boletín INIA N°110, 62 pp.
- 80)□ Gonçalves-Vidigal MC, Benchimol L (2011) Development and application of microsatellites in plant breeding. *Crop Breed Appl Biot* 1:66-72.
- 81)□ González-Benito ME, Iriondo JM, Perez-Garcia F (1998) Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Sci Technol* 26:257-262.
- 82)□ Gray GR, Heath D (2005) A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolic fingerprinting. *Plant Physiol* 124:236-248.
- 83)□ Grijalva J, Checa X, Ramos R, Barrera P, R L (2012) Situación de los Recursos Genéticos Forestales - Informe País Ecuador. En: FAO (ed) Primer Informe sobre el Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el Mundo. FAO, Roma, 95 pp.
- 84)□ Groot SPC, Karssen CM (1992) Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the *sitens* mutant. *Plant Physiol* 99: 952-958.
- 85)□ Gross NT, Hultenby K, Mengarelli S (2000) Lipid peroxidation by alveolar macrophages challenged with *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* or *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 38:443-449.
- 86)□ Guan R, Chang R, Li Y, Wang L, Liu Z, Qiu L (2010) Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. *Genet Resour Crop Ev* 57:229-242.
- 87)□ Gurr S, McPherson J, Bowles D (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls. En: Wilkinson DL (ed) *Molecular Plant Pathology*. Oxford Press, Oxford, pp. 51-56.

- 88)□ Guterman Y (1992) Maternal effects on seeds during development. In M Fenner, ed, Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities. CAB International, Wallingford, UK, pp. 27-59.
- 89)□ Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet 1:0179-0196.
- 90)□ Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. Cryo-Lett 25:3-22.
- 91)□ Harding K, Benson EE (2001) The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm. Cryo-Lett 22:199-208.
- 92)□ He C, Poysa V, Yu K (2003) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. Theor Appl Genet 106:363-373.
- 93)□ Heath R, Packer J (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125:189-198.
- 94)□ Heywood V, Casas A, Ford-Lloyd B, Kell S, Maxted N (2007) Conservation and sustainable use of crop wild relatives. Agr Ecosyst Environ 121:245-255.
- 95)□ Heywood VH, Iriondo JM (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. Biol Conserv 113:321-335.
- 96)□ Hidalgo R (2003) Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: Franco TL, Hidalgo R (eds) Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) Boletín técnico no.8, Cali, Colombia, 15 pp.
- 97)□ Hilhorst HWM, Groot SPC, Bino RJ (1998) The tomato seed as a model system to study seed development and germination. Act Bot Neerl 47:169-183.
- 98)□ Hortensteiner S, Krautler B (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. Biochem Biophys Acta 1807:977-988.
- 99)□ Hoyt E, Forero E, Brown S (1992) Conservando los parientes silvestres de las plantas cultivadas. Versión en español publicada por IBPGR, IUCN, WWF, US Fish, Wildlife Service y Conservation International. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware, 52 pp.

- 100)□Hunter D, Heywood V (2012) *Parientes silvestres de los cultivos: manual para la conservación in situ*. Bioersity International, Roma, Italia, 470 pp.
- 101)□Hunziker A (1979) South American *Solanaceae*: a synoptic survey. En: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*. Linnean Soc. Symp., Academic Press, Londres, pp. 49-85.
- 102)□Ibitoye DO, Akin-Idowu PE, Ademoyegun OT (2009) Agronomic and lycopene evaluation in tomato (*Lycopersicon lycopersicum* Mill.) as a function of genotype. *World J Agric Sci* 5:892-895.
- 103)□IPGRI (1996) *Descriptors for tomato (Lycopersicon spp.)*. International Plant Genetic Resources, Roma, Italia, 70 pp.
- 104)□Iriondo JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest Agr Prod Prot Veg* 16(1):5-24.
- 105)□Iriondo JM, Pérez C, Pérez-García F (1992) Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. *Seed Sci Technol* 20:165-171.
- 106)□ISTA (2005) *International Rules for Seed Testing*. Edición del 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. Disponible en sitio de la ISTA: <http://www.seedtest.org>.
- 107)□Jaramillo J, Rodríguez V, Guzmán M, Zapata M, Rengifo T (2007) *Manual técnico: buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas*. Disponible sitio de la FAO: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>. (Consultado 21 Julio 2014).
- 108)□Jørgensen J (1990) Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. *J Plant Physiol* 136:373-376.
- 109)□Juárez P, Castro R, T. Colinas P, Ramírez M, Sandoval DW, Reeds L, Cisneros Z, King S (2009) Evaluación de calidad en frutos de siete genotipos nativos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). *Rev Chapingo Ser Horticultura* 15:5-9.
- 110)□Juvik J, Berlinger M, Ben-David T, Rudich J (1982) Resistance among accessions of the genera *Lycopersicon* and *Solanum* to four of the main insect pest of tomato in Israel. *Phytoparasitica* 10:145-156.
- 111)□Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309-334.

- 112)□Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung D, Guy CL (2004) Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136:4159-4168.
- 113)□Kasrawi MA, Mansour A (1994) Genetics of resistant to tomato yellow leaf curl virus in tomato. *J Hort Sci* 69:1095-1100.
- 114)□Keurentjes JJB, Koornneef M, Vreugdenhil D (2008) Quantitative genetics in the age of omics. *Curr Opin Plant Biol* 11:123-128.
- 115)□Keyghobadi N, Roland J, Strobeck C (1999) Influence of landscape on population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Mol Ecol* 8:1481-1495.
- 116)□Khoury C, Laliberte B, Guarino L (2010) Trends in ex situ conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. *Genet Resour Crop Ev* 57:625-639.
- 117)□Kochhar S, Kochhar V, Khanduja S (1979) Changes in the pattern of isoperoxidases during maturation of Grape berries cv. Gulabi as effected by ethephon (2-chloroethyl phosphoric acid). *Am J Enol Viticult* 30:275-277.
- 118)□Konan EK, Durand-Gasselin T, Koadio YJ, Niamké AC, Dumet D, Duval Y, Rival A, Engelmann F (2007) Field development of oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) originating from cryopreserved stabilized polyembryonic cultures (SPCs). *Cryo-Lett* 28:377-386.
- 119)□Koo B, Pardey P, Wright BD, Bramel P, Debouck D, Van Dusen ME, Jackson MT, Rao NK, Skovmand B, Taba S, Valkoun J (2004) Saving seeds. The economics of conserving crop genetic resources *ex situ* in the future harvest centres of the CGIAR. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido.
- 120)□Kubota C, McClure MA, Kokalis-Burelle N, Bausher ME, Roskopf N (2008) Vegetable grafting: History, use, and current technology status in North America. *HortScience* 43:1664-1669.
- 121)□Kuo MC, Kao CH (2004) Antioxidant enzyme activities are up-regulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Bot Bull Acad Sinica* 45:291-299.

- 122) □ Labate JA, Robertson LD (2012) Evidence of cryptic introgression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on wild tomato species alleles. BMC Plant Biology 12:133.
- 123) □ Lakhanpaul S, Babrekar PP, Chandel KPS (1996) Monitoring studies in onion (*Allium cepa* L.) seeds retrieved from storage at -20°C and -180°C. Cryo-Lett 17:219-232.
- 124) □ Laugé R, Joosten MHAJ, Haanstra JPW, Goodwin PH, Lindhout P, Wit PJGMD (1998) Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. Natl Acad Sci USA 95:9014-9018.
- 125) □ Leymarie J, Vitkauskaite G, Hoang H, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, Corbineau F, Hayat E, Bailly C (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. Plant Cell Physiol 53:96-106.
- 126) □ Liedl B (1995) Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). J Econ Entomol 88:742-748.
- 127) □ Lindhout P (2005) Genetics and breeding. En: Heuvelink E (ed.) Crop production science in horticulture: Tomatoes. CABI Publishing, CAB International Wallingford Oxfordshire, Reino Unido, pp. 21-52.
- 128) □ Lippman Z, Tanksley SD (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruit wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. Genetics 158:413-422.
- 129) □ Liu Y, Hilhorst H, Groot S, Bino R (1997) Amounts of nuclear DNA and internal morphology of gibberellin and abscisic acid-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during maturation, imbibition and germination. Ann Bot 79:161-168.
- 130) □ Lobo M, Medina CI (2001) Variabilidad morfológica en el tomate pajarito (*Lycopersicon esculentum* var cerasiforme), precursor del tomate cultivado. Rev Corpoica 3(2):39-50.
- 131) □ MAE (2010) Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Ministerio del Ambiente del Ecuador. Quito, Ecuador. Disponible en sitio del gobierno Ecuador:

- <http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/users/jloartefls/CUARTO%20INFORME.pdf> (Consultado 20 julio 2014).
- 132) □ Mahuad SL, Pratta GR, Rodriguez GR, Zorzoli R, Picardi LA (2013) Preservation of *Solanum pimpinellifolium* genomic fragments in recombinant genotypes improved the fruit quality of tomato. J Genet 92:195-203.
- 133) □ Malaurie B, Trouslot MF, Engelmann F, Chabrillangi N (1998) Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of in vitro-cultured yam (*Dioscorea alata* ‘Brazo Fuerte’ and *D. bulbifera* ‘Nouméa Imboro’) shoot apices by encapsulation dehydration. Cryo-Lett 19:15-26.
- 134) □ Martínez-Ballesta MC, Lopez-Perez L, Hernandez M, Lopez-Berenguer C, Fernandez- Garcia N, Carvajal M (2008) Agricultural practices for enhanced human health. Phytochem Rev 7:251-260.
- 135) □ Martínez-Montero ME, Mora N, Quiñones J, González-Arno MT, Engelmann F, Lorenzo JC (2002a) Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. Cryo-Lett 23:237-244.
- 136) □ Martínez-Montero ME, Ojeda E, Espinosa A, Sánchez M, Castillo R, González-Arno MT, Engelmann F, Lorenzo JC (2002b) Field performance of cryopreserved callus-derived sugarcane plants. Cryo-Lett 23:21-26.
- 137) □ Maxted N, Kell SP (2009) Establishment of a global network for the in situ conservation of crop wild relatives: status and needs. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO, Roma, Italia.
- 138) □ McClean P, Mamidi S, McConnell M, Chikara S, Lee R (2010) Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. BMC Genet 11:178-184.
- 139) □ McCord J, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Inorg Biochem 244:6049–6055.
- 140) □ McDonald MB (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Sci Technol 27:177-237.
- 141) □ Mena Y (2012) Evaluación de la resistencia a *Prodiplosis longifila* Gagné (diptera: Cecidomyiidae) en materiales segregantes de tomate cultivado y accesiones silvestres

- de *Solanum habrochaites* Knapp y Spooner var. *Glabratum*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- 142)□Menda N, Strickler S, Mueller L (2013) Advances in tomato research in the post-genome era. *Plant Biotechnol* 30:243-256.
- 143)□Mercer KL, Perales HR (2010) Evolutionary response of landraces to climate change in centers of crop diversity. *Evol Appl* 3:480- 493.
- 144)□Merk H, Ashrafi H, Foolad M (2012) Selective genotyping to identify late blight resistance genes in an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium* L. *Euphytica* 187:63-75.
- 145)□Midatharahally NM, Czosnek H, Vidavski F, Tarba S, Milo J, Leviatov S, Venkatesh HM, Padmaja AS, Kulkarni RS, Muniyappa M (2003) Comparison of resistance to tomato leaf curl virus (India) and tomato yellow leaf curl virus (Israel) among *Lycopersicon* wild species, breeding lines and hybrids. *Eur J Plant Pathol* 109:1-11.
- 146)□Mieslerova B, Lebeda A, Chetelat R (2000) Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* sp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *J Phytopathol* 148:303-311.
- 147)□Miller JC, Tanksley SD (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* 80:137-118.
- 148)□Mira S, González-Benito ME, Hill LM, Walters C (2010) Characterization of volatile production during storage of lettuce (*Lactuca sativa*) seed. *J Exp Bot* 61:3915-3924.
- 149)□Mira S, González-Benito ME, Ibars AM, Estrelles E (2011) Dormancy release and seed ageing in the endangered species *Silene diclinis*. *Biodivers Conserv* 20:345-358.
- 150)□Mix-Wagner G, Schumacher HM, Cross RJ (2003) Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *Cryo-Lett* 24:33-41.
- 151)□Moller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Phys* 52:561-591.
- 152)□Morales FJ, Tamayo PJ, Castaño M, Olaya C, Martínez AK, Velasco AC (2009) Enfermedades virales del tomate (*Solanum Lycopersicum*) en Colombia. *Fitopatol Colomb* 33:23-27.
- 153)□Morrison N, Cochrane G, Faruque N, Tatusova T, Tateno Y, Hancock D, Field D (2006) Concept of sample in Omics technology. *Omics* 10:127-137.

- 154) □ Nagel M, Borner A (2010) The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci Res* 20:1-12.
- 155) □ Nakazato T, Housworth EA (2011) Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. *Am J Bot* 98(1):88-98.
- 156) □ Ni BR, Bradford KJ (1993) Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. Sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential. *Plant Physiol* 101: 607-617.
- 157) □ Niedzielski M, Walters C, Luczak W, Hill LM, Wheeler LJ, Puchalski J (2009) Assessment of variation in seed longevity within rye, wheat and the intergeneric hybrid triticale. *Seed Sci Res* 19:213-224.
- 158) □ Osborn TC, Kramer C, Graham E, Braun CJ (2007) Insights and innovations from wide crosses: Examples from canola and tomato. *Crop Sci* 47:228-237.
- 159) □ Pacheco I (2011) Distribución geográfica de la variabilidad morfológica intraespecífica de *Lycopersicon esculentum* Mill. (*Solanaceae*) en el estado de Oaxaca. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Biología, Universidad del Mar, Oaxaca, México, 88 pp.
- 160) □ Panis B, Lambardi M (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En: Ruane J, Sonnino A (eds) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. FAO, Roma, Italia, pp. 61-78.
- 161) □ Parra-Quijano M, Iriondo JM, Torres E (2011) Strategies for the collecting of wild species. En: Guarino L, Ramanatha Rao V, Goldberg E (eds). *Collecting plant diversity: Technical guidelines - 2011 update*. Chapter 6. Disponible en el sitio de Bioversity International http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Collecting_
- 162) □ Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from northern Peru. *Syst Bot* 30:424-434.
- 163) □ Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genet Coop Rep* 56:6-12.
- 164) □ Peralta IE, Spooner DM (2000) Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28:45-54.

- 165)□Peralta IE, Spooner DM (2007) History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). En: Razdan MK, Mattoo AK (eds) Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato. Science Publishers, Enfield, USA, pp. 1-27.
- 166)□Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). Systemat Bot Monog 84:1-186.
- 167)□Pesaresi P, Mizzotti C, Masiero S (2014) Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. Front Plant Sci 5:124, doi: 10.3389/fpls.2014.00124.
- 168)□Pita JM, Barrero S, Escudero A (1997) Cryopreservation: an alternative method for the conservation of endangered populations of two Iberian pines (*Pinus nigra* and *Pinus sylvestris* L.). Silvae Genet 46:250-252.
- 169)□Pita JM, Sanz V, Escudero A (1998) Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species. Silvae Genet 47:220-223.
- 170)□Plucknett DL, Smith N, J.H., Williams JT, Murthi-Anishetty N (1987) Gene banks and the world's food. Princeton University Press, USA.
- 171)□Porra R (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynth Res 73:149-156.
- 172)□Porra R, Thompson W, Kriedemann P (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochem Biophys Acta 975:384-395.
- 173)□Pratta G, Rodriguez G, Zorzoli R, Valle E, Picardi L (2011) Phenotypic and molecular characterization of selected tomato recombinant inbred lines derived from the cross *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium*. J Genet 90:229-237.
- 174)□Pratta G, Zorzoli R, Picardi L (2003) Diallel analysis of production traits among domestic, exotic and mutant germoplasm of *Lycopersicon*. Genet Mol Res 2:206-213.
- 175)□Pritchard H (1995) Cryopreservation of seeds. En: Day J, McLellan M (eds) Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 133-144.

- 176)□Pritchard H, Ashmore S, Berjak P, Engelmann F, González-Benito M, Li D, Nadarajan J, Panis B, Pence V, Walters C (2009) Storage stability and the biophysics of preservation. Proc Plant Conservation for the Next Decade: A celebration of Kew's 250th anniversary, 12-16 Oct 2009. Royal Botanic Garden Kew, Londres, Reino Unido.
- 177)□Pritchard H, Dickie J (2003) Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. En: Smith R (ed) Seed conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido, pp. 653-722.
- 178)□Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Mainia G, Quaglia G (2006) Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). J Food Compos Anal 19:11-19.
- 179)□Ramanatha Rao V, Hodgkin T (2002) Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. Plant Cell Tiss Org 68:1-19.
- 180)□Ramírez M, Salcedo J (2013) Los recursos fitogenéticos y la importancia estratégica de su conservación en las Américas. En: Gonzalez-Arnao MT, Engelmann F (eds) Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. IICA, San Jose, Costa Rica, pp. 15-23.
- 181)□Ramirez-Villegas J, Jarvis A, Touval J (2012) Analysis of threats to South American flora and its implications for conservation. J Nature Conserv 20:337-348.
- 182)□Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Novell D, Larinde M (2007) Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia, 165 pp.
- 183)□Reed BM (2008) Cryopreservation-practical considerations. En: Reed BM (ed) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, pp. 3-13.
- 184)□Reed BM, Dumet DJ, Denoma JM, Benson E (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. Biodivers Conserv 10:939-949.
- 185)□Renaut J, Hausman JF, Wisniewski ME (2006) Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. Physiol Plantarum 126:97-109.

- 186) □Renaut J, Hoffmann L, Hausman JF (2005) Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiol Plantarum* 125:82-94.
- 187) □Restrepo E (2007) Estudios básicos para iniciar la producción de cultivares de tomate *Solanum lycopersicum* L. con resistencia al pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- 188) □Ribeiro FE, Baudouin L, Lebrun P, Chaves LJ, Brondani C, Zucchi MI, Vencovsky R (2010) Population structures of Brazilian tall coconut (*Cocos nucifera* L.) by microsatellite markers. *Genet Mol Biol* 33:696-702.
- 189) □Rick CM (1979) Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. En: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*. Linnean Soc. Symp., Academic Press, Londres, pp. 667-677.
- 190) □Rick CM, Chetelat RT (1995) Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Hort* 412:21-38.
- 191) □Rick CM, Holle M (1990) Andean *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme: genetic variation and its evolutionary significance. *Econ Bot* 44: 69-78.
- 192) □Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol* 1:499-514.
- 193) □Robertson LD, Labate JA (2007) Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives. En: Razdan MK, Mattoo AK (eds). *Genetic improvement of Solanaceous crops, Tomato*, Vol 2, Enfield, NH, Science Publishers, pp. 25-75.
- 194) □Rodríguez DM (2012) Identificación de fuentes de resistencia a begomovirus en introducciones silvestres de tomate. Tesis de grado presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- 195) □Rodríguez R, Aragón C, Escalona M, González-Olmedo J, Desjardins Y (2008) Carbon metabolism in leaves of micro propagated sugarcane during acclimatization phase. *In Vitro Cell Dev-Plant* 44:533-539.
- 196) □Rodríguez R, Cid M, Pina D, Gonzalez-Olmedo J, Desjardins Y (2003) Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev-Plant* 39:657-662.

- 197)□Rosales MA, Ruiz JM, Hernandez J, Soriano T, Castilla N, Romero L (2006) Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *J Sci Food Agr* 86:1545-1551.
- 198)□Roselló J, Soriano J (2009) Como obtener tus propias semillas. Manual para agricultores ecológicos. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca y Red de Semillas “Resembrando e Intercambiando”. Dirección General de Planificación y Análisis de Mercados, Sevilla, España, 138 pp.
- 199)□Roselló S, Nuez F (2002) Mejora de la calidad nutritiva del tomate: estudio de la estructura de la variación del contenido en licopeno y β -caroteno en entradas de *Lycopersicon*. *Act Horticult* 31:287-292.
- 200)□Rubin DL, Lewis SE, Mungall CJ, Misra S, Westerfield M, Ashburner M, Sim I, Chute CG, Musen MA (2006) National Center for Biomedical Ontology: advancing biomedicine through structured organization of scientific knowledge. *Omics* 10:185-198.
- 201)□Sakai A (2004) Plant cryopreservation. En: Fuller B, Lane N, Benson E (eds) *Life in the frozen state*. CRC Press, Londres, pp. 329-345
- 202)□Sakihama Y, Yamasaki H (2002) Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biol Plantarum* 45:249-254.
- 203)□Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants. Progress in the past decade. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42:206-214.
- 204)□Scowcroft WR (1984) Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. International Board for Plant Genetic Resources. Report (AGPG:IBPGR/84/152), Rome, Italia.
- 205)□Shalata A, Tal M (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol Plantarum* 104:1399-1405.
- 206)□Sifres A, Blanca J, Nuez F (2011) Pattern of genetic variability of *Solanum habrochaites* in its natural area of distribution. *Genet Resour Crop Ev* 58:347–360.
- 207)□Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27–58.

- 208) □ Smulders MJM, Bredemeijer G, Rus-Kortekaas W, Arens P, Vosman B (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor Appl Genet* 97:264-272.
- 209) □ Spooner DM, Peralta I, Knapp S (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.). *Taxon* 54:43-61.
- 210) □ Stanwood PC (1980) Tolerance of crops seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). *J Seed Technol* 5:26-31.
- 211) □ Stanwood PC (1985) Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. En: Kartha K (ed) *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 199-226.
- 212) □ Stanwood PC, Bass L (1981) Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci Technol* 9:423-437.
- 213) □ Stanwood PC, Roos EE (1979) Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). *HortScience* 14:628-630.
- 214) □ Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci* 8:179-187.
- 215) □ Sung Y, Cantliffe DJ, Nagata RT (1998) Seed developmental temperature regulation of thermotolerance in lettuce. *J Amer Soc Hort Sci* 123: 700-705.
- 216) □ Sungcome K, Photchanachai S, Prachayawarakorn S (2013) Drying behavior and quality of tomato fl hybrid seed by desiccant. *Materials Proc. Southeast Asia Symp. on Quality Mgt. Posthar. Sys. in conj. w/ Asia-Pacific Symp. Posthar. Quality Mgt. Root & Tuber Crops Eds.: S. Kanlayanarat et al. Acta Hort.* 989, ISHS 383-388.
- 217) □ Symon DE (1981) The solanaceous genera *Browallia*, *Capsicum*, *Cestrum*, *Cyphomandra*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nierembergia*, *Physalis*, *Petunia*, *Salpichroa*, *Withania*, naturalized in Australia. *Adel Bot Gard* 3: 133-166.
- 218) □ Tapia C, Zambrano E, Montero A (2008) Estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación en Ecuador: a más uso, más conservación. Publicación Miscelánea N° 144, INIAP, Quito, Ecuador, 74 pp.

- 219) Terzopoulos PJ, Bebeli PJ (2008) DNA and morphological diversity of selected Greek tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Sci Horti-Amsterdam* 116:354-361.
- 220) Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol* 118:1-7.
- 221) Touchel DH, Dixon KW (1993) Cryopreservation of seed of western Australian native species. *Biodivers Conserv* 2: 594-602.
- 222) Towill LE, Ellis DD (2008) Cryopreservation of dormant buds. En: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, pp. 421-442.
- 223) Uragami A, Lucas M, Ralambosoa J, Renard M, Dereuddre J (1993) Cryopreservation of microspore embryos of oilseed rape (*Brassica napus*) by dehydration in air with or without alginate encapsulation. *Cryo-Lett* 14:83-90.
- 224) Vaca-Vaca JV, Betancurt-Pérez JF, López-López K (2012) Detección, identificación y localización geográfica de begomovirus que afectan al tomate en Colombia. *Rev Colomb Biotech* 8:115-122.
- 225) Valarezo O, Cañarte E, Navarrete B, Arias M (2003) *Prodiplosis longifila* (Diptera: Cecidomyiidae) principal plaga del tomate en Ecuador. Diagnóstico, bioecología y manejo. Manual No. 51. INIAP, PROMSA Y CEDEGE. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Portoviejo. Proyecto IGCV028.
- 226) Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13:195-206.
- 227) Van Buskirk HA, Thomashow MF (2006) *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation. *Physiol Plantarum* 126:72-80.
- 228) Van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu Y, Clevenger J, Illa-Berenguer E, Huang Z, Keyhaninejad N, Mu Q, Sun L, Wang J, Wu S (2014) What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front Plant Sci* 5(227):1-13.
- 229) Van Doorn GS, Noest AJ, Hogeweg P, Vargas CD (1998) Sympatric speciation and extinction driven by environment dependent sexual selection. *P R Soc London* 265:1915-1919.

- 230) □ Van Treuren R, van Hintum TJL, de Groot EC (2013) Preservation of seed viability during 25 years of storage under standard genebank conditions. *Genet Resour Crop Ev* 60:1407-1421.
- 231) □ Vázquez JF, Sánchez-Yélamo MD, Carrillo JM (2000) Marcadores morfológicos y bioquímicos. En: Nuez F, Carrillo JM (eds) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 23-89.
- 232) □ Vertucci CW, Roos EE (1990) Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiol* 94:1019-1023.
- 233) □ Vertucci CW, Roos EE (1993) Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Sci Res* 3:201-213.
- 234) □ Vieira E, Schuster I, Silva R, Oliveira M (2009) Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. *Pesqui Agropecu Bras* 44:1460-1466.
- 235) □ Volk G (2010) Application of functional genomics and proteomics to plant cryopreservation. *Curr Genomics* 11:24-29.
- 236) □ Walters C (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci Res* 8:223-244.
- 237) □ Walters C (2004) Temperature dependency of molecular mobility in preserved seeds. *Biophys J* 86:1253-1258.
- 238) □ Walters C, Wheeler LJ, Grotenhuis JM (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Sci Res* 15:1-20.
- 239) □ Walters C, Wheeler LJ, Stanwood P (2004) Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48:229-244.
- 240) □ Wang K, Jiang Y (2007) Antioxidant responses of creeping bent grass roots to water logging. *Crop Sci* 47:232-238.
- 241) □ Warnock SJ (1991) Natural habitats of *Lycopersicon* species. *HortScience* 26:166-171.
- 242) □ Welbaum GE (1999) Cucurbit seed development and production. *HorTechnology* 9: 341-348.
- 243) □ Welbaum GE, Bradford KJ (1990) Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). III. Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiol* 92: 1029-1037.

- 244)□Weller JI, Soller M, Brody T (1988) Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics* 118:329-339.
- 245)□Wikelski M, Cooke SJ (2006) Conservation physiology. *Trends Ecol Evol* 21(2):38-46.
- 246)□Williams CE, St. Clair DA (1993) Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome* 36:619-630.
- 247)□Xin Z (2001) Temperature sensing and cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol* 4:241-246.
- 248)□Yabor L, Aragón C, Hernández M, Arencibia A, Lorenzo JC (2008) Biochemical side effects of the herbicide FINALE on bar gene-containing transgenic pineapple plantlets. *Euphytica* 164:515-520.
- 249)□Yabor L, Arzola M, Aragón C, Hernández M, Arencibia A, Lorenzo JC (2006) Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. *Plant Cell Tiss Org* 86:63-67.
- 250)□Yang T, Zhang L, Zhang T, Zhang H, Xu S, An L (2005) Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. *Plant Sci* 169:987-995.
- 251)□Zhang ZJ, Wang YM, Long LK, Lin Y, Pang J, Liu B (2008) Tomato rootstock effects on gene expression patterns in eggplant scions. *Russ J Plant Physiol* 55:93-100.
- 252)□Zuriaga E, Blanca JM, Cordero L, Sifres A, Blas-Cerdán W, Morales R, Nuez F (2009) Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genet Resour Crop Ev* 56:39-51.

Anexo 1: Características de los lugares de colección de las diferentes accesiones de tomate silvestre (*Solanum pimpinellifolium* L.).

Accesión	Latitud (Sur)	Longitud (Oeste)	Altitud (msnm)	Textura del suelo	Drenaje	Disponibilidad de agua	pH	Conductividad del suelo $\mu\text{S.cm}^{-1}$	Salinidad (mg.L ⁻¹)	Color del suelo	Pedregosidad del suelo
1	0° 51' 46.2"	80° 08' 53.8"	27	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	5,30	65,7	30,3	Amarillo	Pedregoso
2	0° 52' 11.1"	80° 08' 50.9"	32	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	6,98	92,9	43,1	Amarillo	Excesivamente pedregoso
3	0° 52' 47.4"	80° 06' 41.5"	31	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	5,51	71,9	33,6	Amarillo	Excesivamente pedregoso
4	0° 50' 25.6"	80° 10' 39.6"	23	Franco Arenoso	Moderado	Bajo riego	6,69	312	148	Amarillo	Excesivamente pedregoso
5	0° 52' 04.1"	80° 09' 27.3"	26	Franco Arenoso	Moderado	Bajo riego	4,80	70,4	32,8	Negro	Sin piedras
6	0° 51' 06.3"	80° 09' 47.5"	15	Franco Arcilloso	Escaso	Bajo riego	4,62	208	99,9	Amarillo	Pedregoso
7	0° 56' 09.8"	80° 03' 45.7"	132	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	4,47	119	56,2	Amarillo	Excesivamente pedregoso
8	0° 55' 08.5"	80° 04' 55.8"	47	Franco Arenoso	Bueno	Bajo riego	5,80	94,5	47,5	Gris	Sin piedras
9	0° 50' 31.5"	80° 09' 39.2"	12	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	6,76	119	100	Amarillo	Excesivamente pedregoso
10	0° 53' 17.2"	80° 05' 03.7"	33	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	7,20	246	124	Amarillo rojizo	Muy pedregoso
11	0° 52' 57.3"	80° 04' 11.5"	56	Franco	Moderado	Orilla rio	6,54	133	67,1	Verde grisáceo	Sin piedras
12	0° 51' 21.9"	80° 08' 53.3"	23	Franco	Moderado	Otro. Seco	5,50	183	92,1	Amarillo rojizo	Moderadamente pedregoso
13	0° 50' 39.4"	80° 07' 21.5"	54	Franco Arcilloso	Moderado	Otro. Seco	5,12	79,9	40,3	Amarillo	Sin piedras
14	0° 51' 16.3"	80° 09' 37.4"	38	Limoso	Moderado	Otro. Seco	4,90	576	290	Amarillo	Muy pedregoso
15	0° 51' 35.5"	80° 09' 15.9"	28	Franco	Moderado	Otro. Seco	5,43	83,1	41,9	Amarillo	Pedregoso
16	0° 51' 00.4"	80° 08' 45.9"	38	Arcilloso	Moderado	Otro. Seco	7,50	127	64,2	Amarillo rojizo	Pedregoso
17	0° 52' 51.9"	80° 05' 53.8"	42	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	4,94	73,4	37,1	Amarillo	Pedregoso
18	0° 50' 39.3"	80° 09' 40.8"	20	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	7,41	138	69,6	Amarillo	Excesivamente pedregoso
19	0° 50' 25.7"	80° 09' 54.1"	19	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	7,73	162	81,9	Amarillo	Muy pedregoso
20	0° 50' 26.0"	80° 09' 54.4"	25	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	7,45	113	57,1	Amarillo	Muy pedregoso
21	0° 50' 40.9"	80° 10' 34.8"	24	Franco Limoso	Moderado	Otro. Seco	7,53	149	75,0	Amarillo	Excesivamente pedregoso

22	0° 51' 04.0"	80° 12' 06.6"	55	Arcilloso	Moderado	Otro. Seco	4,94	65,4	33,0	Amarillo	Moderadamente pedregoso
23	0° 51' 07.3"	80° 11' 07.4"	30	Franco Limoso	Moderado	Otro. Seco	7,82	269	136	Negro	Sin piedras
24	0° 50' 55.6"	80° 10' 25.4"	24	Franco Limoso	Moderado	Otro. Seco	5,77	149	75,6	Amarillo	Moderadamente pedregoso
25	0° 51' 09.7"	80° 09' 19.2"	23	Franco Arenoso	Moderado	Bajo riego	6,79	92,3	46,6	Amarillo	Muy pedregoso
26	0° 51' 10.1"	80° 09' 19.6"	23	Franco	Moderado	Orilla rio	7,14	118	60,7	Amarillo	Muy pedregoso
27	0° 50' 41.1"	80° 10' 00.1"	24	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	7,09	207	104	Amarillo	Muy pedregoso
28	0° 50' 33.0"	80° 09' 48.1"	21	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	6,97	332	167	Gris	Sin piedras
29	0° 50' 36.7"	80° 09' 43.9"	19	Franco Limoso	Moderado	Otro. Seco	5,21	488	246	Negro	Moderadamente pedregoso
30	0° 50' 35.7"	80° 09' 46.1"	21	Franco Arenoso	Moderado	Bajo riego	7,58	242	122	Amarillo	Muy pedregoso
31	0° 56' 12.0"	80° 03' 44.7"	128	Franco	Moderado	Otro. Seco	5,36	50,0	25,2	Negro	Sin piedras
32	0° 56' 12.4"	80° 03' 44.5"	130	Franco	Moderado	Otro. Seco	4,99	44,8	22,7	Gris	Pedregoso
33	0° 56' 12.4"	80° 03' 43.4"	130	Franco	Moderado	Otro. Seco	4,10	297	150	Amarillo	Moderadamente pedregoso
34	0° 50' 58.5"	80° 09' 44.8"	23	Franco Arenoso	Moderado	Orilla rio	4,17	196	100	Amarillo	Pedregoso
35	0° 50' 51.0"	80° 10' 07.9"	15	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	5,44	155	78,3	Gris	Sin piedras
36	0° 51' 52.0"	80° 09' 05.8"	15	Franco Arenoso	Moderado.	Bajo riego	5,80	52,9	25,1	Amarillo	Pedregoso
37	0° 51' 16.3"	80° 09' 37.2"	34	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	4,29	244	125	Amarillo	Pedregoso
38	0° 49' 37.2"	80° 10' 51.9"	16	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	7,06	154	77,8	Amarillo	Muy pedregoso
39	0° 49' 53.4"	80° 11' 05.4"	18	Franco Arcilloso	Moderado	Otro. Seco	6,60	158	80,1	Negro	Excesivamente pedregoso
40	0° 49' 39.1"	80° 10' 49.8"	15	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	6,70	114	57,5	Gris	Pedregoso
41	0° 50' 06.3"	80° 10' 27.6"	18	Franco	Moderado	Bajo riego	7,30	144	67,5	Gris	Sin piedras
42	0° 51' 16.1"	80° 03' 29.6"	116	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	5,80	91,6	42,7	Amarillo	Muy pedregoso
43	0° 50' 54.6"	80° 09' 43.3"	30	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	7,84	190	89,9	Verde grisáceo	Muy pedregoso
44	0° 50' 47.5"	80° 10' 46.4"	29	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	7,10	336	161	Amarillo	Pedregoso
45	0° 51' 19.4"	80° 07' 28.7"	64	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	5,30	224	107	Negro	Sin piedras
46	0° 51' 19.4"	80° 07' 28.9"	23	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	5,48	471	230	Negro	Sin piedras
47	0° 58' 45.5"	79° 58' 08.0"	145	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	6,51	54,8	25,3	Amarillo	Pedregoso

48	0° 58' 56.2"	79° 56' 37.2"	137	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	5,02	31,7	14,6	Amarillo	Pedregoso
49	0° 58' 50.2"	79° 57' 24.5"	143	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	7,85	90,6	42,4	Amarillo rojizo	Pedregoso
50	0° 58' 29.1"	79° 58' 29.9"	138	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	4,65	180	84,3	Negro	Sin piedras
51	0° 58' 26.5"	79° 58' 47.6"	143	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	7,76	245	116	Verde grisaceo	Moderadamente pedregoso
52	0° 56' 28.7"	80° 03' 06.8"	122	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	5,50	42,6	19,1	Amarillo	Moderadamente pedregoso
53	0° 56' 13.7"	80° 03' 20.6"	118	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	4,96	38,4	17,5	Amarillo rojizo	Pedregoso
54	0° 51' 47.3"	80° 11' 48.1"	30	Franco Limoso	Moderado	Otro. Seco	6,95	125	57,6	Amarillo	Moderadamente pedregoso
55	0° 49' 10.5"	80° 09' 31.6"	24	Franco	Moderado	Bajo riego	6,87	259	122	Negro	Sin piedras
56	0° 55' 32.7"	80° 02' 47.5"	95	Franco	Moderado	Bajo riego	7,00	139	65,8	Negro	Moderadamente pedregoso
57	0° 56' 08.8"	80° 03' 45.1"	12	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	4,79	63,9	28,2	Verde grisaceo	Moderadamente pedregoso
58	0° 51' 53.4"	80° 09' 05.6"	32	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	8,07	137	64,6	Amarillo rojizo	Pedregoso
59	0° 51' 41.9"	80° 08' 56.3"	21	Franco Arenoso	Moderado	Otro. Seco	5,07	80,7	36	Amarillo rojizo	Pedregoso
60	0° 51' 04.1"	80° 09' 27.3"	26	Franco Arenoso	Moderado	Bajo riego	4,80	70,4	32,8	Negro	Sin piedras
61	0° 52' 03.0"	80° 07' 00.9"	26	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	5,26	118	54,6	Negro	Sin piedras
62	0° 51' 03.0"	80° 07' 00.9"	27	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	5,26	118	54,6	Negro	Sin piedras
63	0° 53' 03.0"	80° 07' 00.9"	27	Franco Limoso	Moderado	Bajo riego	5,26	118	54,6	Negro	Sin piedras

Anexo 2. Características promedio de las diferentes accesiones de tomate silvestre cultivadas en condiciones experimentales (*ex situ*) (primera parte)

Accesión	Tipo de crecimiento	Tamaño de la planta	Longitud de la guía (m)	Densidad de la pubescencia del tallo	Longitud del entrenudo	Densidad del follaje	Posición de la hoja	Tipo de hoja	Disección de la hoja	Coloración de las venas	Color de la corola
1	Semi determinado	Intermedia	1,60	Intermedia	Corto	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
2	Semi determinado	Intermedia	1,70	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
3	Semi determinado	Grande	2,57	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
4	Semi determinado	Grande	2,28	Densa	Corto	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
5	Semi determinado	Intermedia	2,17	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
6	Semi determinado	Grande	2,17	Intermedia	Corto	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
7	Semi determinado	Grande	2,22	Densa	Corto	Intermedio	Semi erecta	Estandar	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
8	Determinado	Intermedia	1,30	Densa	Corto	Denso	Inclinada colgante	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
9	Semi determinado	Intermedia	1,94	Escasa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
10	Indeterminado	Grande	2,57	Densa	Corto	Denso	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
11	Semi determinado	Grande	2,11	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
12	Semi determinado	Grande	2,34	Escasa	Corto	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
13	Semi determinado	Grande	2,39	Escasa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
14	Indeterminado	Grande	2,97	Densa	Corto	Denso	Horizontal	Estandar	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
15	Semi determinado	Grande	2,0	Escasa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
16	Semi determinado	Intermedia	2,0	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
17	Indeterminado	Grande	2,70	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
18	Semi determinado	Intermedia	2,55	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
19	Semi determinado	Intermedia	1,92	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
20	Semi determinado	Grande	2,06	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
21	Semi determinado	Grande	2,34	Intermedia	Corto	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
22	Semi determinado	Intermedia	1,77	Densa	Intermedio	Intermedio	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo

Anexo 2. Continuación (primera parte)

23	Semi determinado	Intermedia	2,10	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
24	Semi determinado	Grande	2,14	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
25	Semi determinado	Intermedia	1,80	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
26	Semi determinado	Intermedia	1,98	Densa	Corto	Denso	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
27	Semi determinado	Intermedia	2,0	Densa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
28	Semi determinado	Intermedia	2,06	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
29	Semi determinado	Grande	2,44	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
30	Semi determinado	Intermedia	2,34	Escasa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
31	Semi determinado	Intermedia	2,24	Escasa	Corto	Denso	Semi erecta	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
32	Semi determinado	Intermedia	2,08	Escasa	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
33	Semi determinado	Intermedia	2,48	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo
34	Semi determinado	Intermedia	2,40	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
35	Semi determinado	Intermedia	2,50	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
36	Semi determinado	Intermedia	2,25	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
37	Indeterminado	Intermedia	2,65	Densa	Intermedio	Intermedio	Inclinada colgante	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
38	Semi determinado	Intermedia	2,23	Intermedia	Intermedio	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
39	Semi determinado	Intermedia	2,05	Densa	Corto	Escaso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
40	Semi determinado	Intermedia	1,77	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
41	Semi determinado	Intermedia	1,90	Intermedia	Corto	Escaso	Inclinada colgante	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
42	Semi determinado	Intermedia	1,80	Escasa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
43	Semi determinado	Intermedia	1,68	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
44	Semi determinado	Grande	2,10	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
45	Semi determinado	Intermedia	1,78	Escasa	Intermedio	Intermedio	Inclinada colgante	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
46	Semi determinado	Intermedia	2,30	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	Estandar	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo

Anexo 2. Continuación (primera parte)

47	Semi determinado	Intermedia	2,25	Escasa	Intermedio	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
48	Semi determinado	Intermedia	2,10	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
49	Semi determinado	Intermedia	2,13	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
50	Determinado	Intermedia	1,97	Escasa	Intermedio	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
51	Determinado	Intermedia	1,65	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
52	Enano	Pequeña	1,50	Intermedia	Corto	Escaso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
53	Semi determinado	Intermedia	2,0	Intermedia	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
54	Indeterminado	Intermedia	2,90	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
55	Indeterminado	Intermedia	3,23	Intermedia	Corto	Denso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
56	Determinado	Intermedia	2,67	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
57	Determinado	Intermedia	1,66	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Intermedio	Normales (claras)	Amarillo
58	Semi determinado	Intermedia	2,20	Densa	Corto	Escaso	Inclinada colgante	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
59	Semi determinado	Intermedia	2,0	Intermedia	Corto	Escaso	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
60	Semi determinado	Intermedia	1,90	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
61	Semi determinado	Intermedia	1,60	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
62	Semi determinado	Intermedia	1,80	Densa	Corto	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Alto	Normales (claras)	Amarillo
63	Semi determinado	Intermedia	2,24	Intermedia	Intermedio	Intermedio	Horizontal	<i>Pimpinellifolium</i>	Bajo	Normales (claras)	Amarillo

Anexo 2. Características promedio de las diferentes accesiones de tomate silvestre cultivadas en condiciones experimentales (*ex situ*) (segunda parte)

Accesión	Tipo de corola	Longitud del pétalo (mm)	Longitud del sépalo (mm)	Uniformidad de la madurez	Frutos por inflorescencia	Color del fruto no maduro	Rayas verdes en los frutos	Pubescencia del fruto	Forma predominante del fruto	Tamaño del fruto	Homogeneidad del fruto
1	Abierta	9	3	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
2	Abierta	8	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
3	Abierta	11	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
4	Abierta	9	5	Intermedia	5	Verde	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
5	Abierta	8	4	Buena	8	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Mucha
6	Abierta	9	4	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
7	Abierta	7	3	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
8	Abierta□□□□	9	4	Buena	4	Blanco verduzco	Ausente	Escasa	Ligeramente achatado	grande	Intermedia
9	Abierta	9	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Ausente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
10	Abierta	9	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
11	Abierta	10	5	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
12	Abierta	9	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
13	Abierta	10	3	Intermedia	7	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
14	Abierta	8	5	Escasa	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
15	Abierta	10	4	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
16	Abierta	6	3	Escasa	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Intermedia
17	Abierta	9	3	Escasa	3	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
18	Abierta	8	3	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
19	Abierta	8	3	Escasa	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
20	Abierta	10	9	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
21	Abierta	11	4	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
22	Abierta	7	4	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
23	Abierta	8	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia

Anexo 2. Continuación (segunda parte)

24	Abierta	9	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
25	Abierta	7	3	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
26	Abierta	11	4	Escasa	5	Verde amarillento	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
27	Abierta	9	5	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
28	Abierta	6	3	Escasa	4	verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
29	Abierta	7	3	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
30	Abierta	9	4	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Ligeramente achatado	mediano	Intermedia
31	Abierta	8	3	Buena	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
32	Abierta	2	3	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
33	Abierta	7	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
34	Abierta	8	4	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
35	Abierta	10	3	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
36	Abierta	9	3	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
37	Abierta	9	8	Escasa	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
38	Abierta	9	4	Escasa	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
39	Abierta	9	4	Escasa	4	Verde amarillento	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
40	Abierta	9	4	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
41	Abierta	6	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
42	Abierta	9	5	Buena	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
43	Abierta	9	5	Buena	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Mucha
44	Abierta	8	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
45	Abierta	8	4	Intermedia	8	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Intermedia
46	Abierta	6	3	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
47	Abierta	9	3	Buena	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha

Anexo 2. Continuación (segunda parte)

48	Abierta	8	5	Buena	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
49	Abierta	5	4	Intermedia	5	Verde amarillento	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
50	Abierta	9	3	Buena	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
51	Abierta	6	4	Buena	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Mucha
52	Abierta	6	4	Intermedia	3	Verde amarillento	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Intermedia
53	Abierta	10	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
54	Abierta	9	3	Intermedia	4	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
55	Abierta	9	3	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
56	Abierta	10	3	Intermedia	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
57	Abierta	10	3	Intermedia	4	Verde amarillento	Ausente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
58	Abierta	10	4	Escasa	3	Verde amarillento	Presente	Escasa	Redondeado	pequeño	Mucha
59	Abierta	8	4	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	mediano	Mucha
60	Abierta	8	4	Buena	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Ligeramente achatado	grande	Intermedia
61	Abierta	7	4	Buena	7	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Mucha
62	Abierta	6	3	Buena	5	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Mucha
63	Abierta	9	7	Intermedia	6	Blanco verduzco	Presente	Escasa	Redondeado	grande	Intermedia

Anexo 2. Características promedio de las diferentes accesiones de tomate silvestre cultivadas en condiciones experimentales (*ex situ*) (tercera parte)

Accesión	Masa del fruto (g)	Longitud del fruto (cm)	Ancho del fruto (cm)	Color del fruto maduro	Intensidad del color del fruto	Forma secundaria del fruto	Hombro del fruto	Longitud del pedicelo (mm)	Grosor del pericarpio (mm)	Color del pericarpio	Intensidad del color del pericarpio
1	2,9	1,5	1,7	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	6	2	Rojo	Intermedia
2	2,2	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Redondeado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
3	1,9	1,3	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
4	2,3	1,6	1,5	Rojo	Mucha	Redondeado	Aplanada	6	1	Rojo	Mucha
5	4,5	2,0	1,9	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1,8	Rojo	Intermedia
6	2,1	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Intermedia
7	2,7	1,4	1,6	Rojo	Mucha	Redondeado	Aplanada	7	1,5	Rojo	Intermedia
8	7,0	1,9	2,3	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Ligeramente hundida	9	2,5	Rojo	Poca
9	2,5	1,4	1,6	Rojo	Mucha	Redondeado	Aplanada	8	2	Rojo	Poca
10	2,4	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
11	2,6	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1,5	Rojo	Intermedia
12	1,8	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
13	2,6	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Poca
14	1,9	1,3	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
15	2,0	1,3	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Intermedia
16	2,5	1,5	1,8	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1,2	Rojo	Intermedia
17	2,8	1,6	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1,5	Rojo	Intermedia
18	3,1	1,5	1,8	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	9	1,2	Rojo	Intermedia
19	2,0	1,3	1,3	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Poca
20	2,4	1,4	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
21	2,6	1,5	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Ligeramente hundida	6	1	Rojo	Intermedia
22	2,0	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
23	2,0	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia

Anexo 2. Continuación (tercera parte)

24	2,2	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Mucha
25	2,9	1,5	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
26	1,9	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
27	2,6	1,5	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Intermedia
28	2,4	1,3	1,4	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
29	2,1	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Intermedia
30	2,8	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Ligeramente hundida	5	1	Rojo	Intermedia
31	2,4	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Intermedia
32	3,0	1,5	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Intermedia
33	2,3	1,3	1,4	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
34	2,3	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Intermedia
35	2,5	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Mucha
36	2,3	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
37	2,2	1,4	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
38	2,1	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Intermedia
39	1,8	1,3	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Poca
40	2,5	1,5	1,8	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	6	1	Rojo	Mucha
41	2,4	1,3	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Mucha
42	2,4	1,4	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
43	4,3	1,9	2,2	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Ligeramente hundida	8	2	Rojo	Intermedia
44	2,6	1,5	1,7	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
45	2,5	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1,5	Rojo	Mucha
46	2,1	1,4	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Mucha
47	2,2	1,5	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha

Anexo 2. Continuación (tercera parte)

48	2,3	1,5	1,7	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Mucha
49	2,6	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Mucha
50	2,7	1,5	1,6	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
51	3,4	1,6	1,8	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1,5	Rojo	Intermedia
52	3,0	1,5	1,6	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
53	2,4	1,5	1,7	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
54	2,9	1,5	1,7	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
55	2,4	1,3	1,5	Rojo	Mucha	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
56	2,6	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	7	1	Rojo	Intermedia
57	2,4	1,3	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Intermedia
58	2,0	1,4	1,5	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	10	1	Rojo	Intermedia
59	2,6	1,5	1,7	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	8	1	Rojo	Intermedia
60	5,2	1,9	2,1	Rojo	Mucha	Achatado	Ligeramente hundida	8	1,8	Rojo	Intermedia
61	3,8	1,8	1,9	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	9	2	Rojo	Intermedia
62	3,7	1,8	1,9	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	10	2	Rojo	Intermedia
63	3,8	1,7	1,8	Rojo	Intermedia	Ligeramente achatado	Aplanada	9	1,2	Rojo	Poca

Anexo 2. Características promedio de las diferentes accesiones de tomate silvestre cultivadas en condiciones experimentales (*ex situ*) (cuarta parte)

Accesión	Forma del corte transversal del fruto	Tamaño del corazón del fruto (mm)	Número de lóbulos del fruto	Sólidos solubles (grados brix)	Acidez del fruto	Susceptibilidad al estrés por sequía	Susceptibilidad al estrés por insectos	Susceptibilidad al estrés por hongos
1	Redondo	6	2	8	4,2	Muy baja	Intermedia	Muy baja
2	Redondo	4	2	9	4,3	Muy baja	Intermedia	Muy baja
3	Redondo	5	2	8	4,4	Muy baja	Baja	Muy baja
4	Redondo	5	2	7	4,4	Muy baja	Baja	Muy baja
5	Redondo	7	2	7,4	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
6	Redondo	4	2	7	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
7	Redondo	6	2	9	4,4	Muy baja	Baja	Muy baja
8	Redondo	10	3	7	4,5	Muy baja	Intermedia	Muy baja
9	Redondo	5	2	8	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
10	Redondo	6	2	9	4,3	Muy baja	Baja	Muy baja
11	Redondo	5	2	9	4,3	Muy baja	Baja	Muy baja
12	Redondo	4	2	8,5	4	Muy baja	Baja	Muy baja
13	Redondo	4	2	8	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
14	Redondo	5	2,1	7	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
15	Redondo	4	2	8	4	Muy baja	Baja	Muy baja
16	Redondo	6	2	3,8	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
17	Redondo	7	2	9,5	4	Muy baja	Baja	Muy baja
18	Redondo	5	2	4	4,1	Muy baja	Muy baja	Muy baja
19	Redondo	5	2	7,5	4,3	Muy baja	Baja	Muy baja
20	Redondo	5	2	8	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
21	Redondo	6	2	7	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
22	Redondo	4	2	7	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
23	Redondo	5	2	4,5	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
24	Redondo	5	2	8	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
25	Redondo	5	2	6,5	4,3	Muy baja	Baja	Muy baja
26	Redondo	5	2	7	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
27	Redondo	5	2	8	4,2	Muy baja	Baja	Muy baja
28	Redondo	6	2	8	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
29	Redondo	4	2	7	4,6	Muy baja	Muy baja	Muy baja
30	Redondo	5	2	7,5	4,5	Muy baja	Muy baja	Muy baja
31	Redondo	5	2	8,5	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
32	Redondo	5	2	9	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
33	Redondo	4	2	7,5	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
34	Redondo	5	2	8	4,5	Muy baja	Muy baja	Muy baja
35	Redondo	5	2	6	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
36	Redondo	6	2	9	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
37	Redondo	5	2	8	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
38	Redondo	6	2	7	4,5	Muy baja	Muy baja	Muy baja
39	Redondo	4	2	5,5	4	Intermedia	Muy baja	Muy baja
40	Redondo	6	2	8	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
41	Redondo	4	2	8	4,4	Baja	Muy baja	Muy baja

Anexo 2. Continuación (cuarta parte)

42	Redondo	7	2	7	4,5	Baja	Muy baja	Muy baja
43	Redondo	9	3	6	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
44	Redondo	5	2	8	4,1	Muy baja	Muy baja	Muy baja
45	Redondo	5	2	7	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
46	Redondo	4	2	6,5	4,1	Muy baja	Muy baja	Muy baja
47	Redondo	6	2	9,4	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
48	Redondo	6	2	6,6	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
49	Redondo	5	2	7,8	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
50	Redondo	6	2	7,2	4,1	Muy baja	Muy baja	Muy baja
51	Redondo	7	2	8	4,1	Muy baja	Muy baja	Muy baja
52	Redondo	6	2	9	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
53	Redondo	5	2	7	4,6	Muy baja	Muy baja	Muy baja
54	Redondo	5	2	5	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
55	Redondo	5	2	7	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
56	Redondo	5	2	8	4,3	Muy baja	Muy baja	Muy baja
57	Redondo	4	2	5	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
58	Redondo	5	2	7	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
59	Redondo	5	2	8	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
60	Redondo	8	2,4	7	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
61	Redondo	7	2	7,4	4,4	Muy baja	Muy baja	Muy baja
62	Redondo	6	2	9,8	4,2	Muy baja	Muy baja	Muy baja
63	Redondo	8	3	7,8	4,2	Muy baja	Intermedia	Muy baja
