



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Engenieria
Agronòmica i del Medi Natural (ETSIAMN)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización morfológica y molecular
en pepino dulce (*Solanum muricatum*) y
especies silvestres relacionadas**

CURSO ACADÉMICO 2013-2014

Trabajo presentado por Daniel Torrent Silla

Tutor académico: D. JAIME PROHENS TOMÁS

Co-tutor académico: D. SANTIAGO VILANOVA NAVARRO

Tutor experimental: D. FRANCISCO JAVIER HERRAIZ GARCÍA

Valencia, septiembre de 2014



Título: Caracterización morfológica y molecular en pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies silvestres relacionadas.

Autor: Daniel Torrent Silla

Localidad y fecha: Valencia, septiembre de 2014

Tutor académico: D. Jaime Prohens Tomás

Co-tutor académico: D. Santiago Vilanova Navarro

Tutor experimental: D. Francisco Javier Herraiz García

Tipo de licencia: Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial – Sin Obra Derivada”

Resumen

El pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) es un cultivo herbáceo de origen andino que se propaga vegetativamente, y que es cultivado por sus frutos comestibles, jugosos y aromáticos. Perteneció a la familia de las solanáceas, estando ampliamente relacionado con otras especies como el tomate y la patata. Su origen es incierto, siendo las especies silvestres de la serie *Caripensia* las que mayormente han contribuido en la evolución del pepino dulce, y su cultivo ha ido experimentando un creciente interés agronómico y económico.

Este trabajo trata del análisis de la variabilidad intraespecífica, detectada entre distintos cultivares de *Solanum muricatum*, y de la variabilidad interespecífica, entre *Solanum muricatum* y especies silvestres relacionadas. Para ello, se llevó a cabo la caracterización morfológica y molecular de una colección de 27 accesiones (con 5 réplicas clonales de cada una), 18 pertenecientes a la especie *Solanum muricatum*, 1 a *Solanum tabanoense*, 1 *Solanum basendopogon*, 1 a *Solanum trachycarpum*, 1 *Solanum catilliflorum* y 1 a *Solanum perlongystilum*.

En la caracterización morfológica se emplearon 58 descriptores morfológicos, referentes a caracteres cualitativos y cuantitativos de planta, flor y fruto. Esta evaluación permitió detectar la gran variabilidad existente, tanto a nivel intra como interespecífico. A grandes rasgos, se observó que *Solanum muricatum* presentaba plantas de menor tamaño que sus especies silvestres relacionadas, y unos frutos más grandes, más dulces y partenocárpicos, los cuales variaban en forma según el cultivar, siendo los frutos de las especies silvestres mayormente esféricos, muy ácidos y con mayor contenido en sólidos solubles. El análisis de componentes principales (PCA) derivado de esta caracterización morfológica explicó un 51.64% de la variación morfológica entre las 3 primeras componentes, y puso de manifiesto que la mayor parte de la variabilidad la explicaban los caracteres relacionados con el vigor y la producción de la planta y el color del fruto. Por otro lado, el diagrama de dispersión 2D generado a partir del PCA separó las entradas pertenecientes a *Solanum muricatum* de las especies silvestres, y a su vez separó las pertenecientes a *Solanum caripense* del resto de silvestres.

En lo que se refiere a la caracterización molecular, se analizaron 20 loci microsatélites procedentes de tomate, 14 de los cuales amplificaron correctamente y presentaban polimorfismos, resultando para cada locus un promedio de alelos de 4.07. En las entradas pertenecientes a *Solanum muricatum* se encontró un alto grado de monomorfismo y homocigosis, resultantes del proceso de domesticación de la especie, aunque algunos de los loci polimórficos mostraron la variabilidad intraespecífica existente. La variabilidad

interespecífica quedó patente por el alto grado de polimorfismo detectado entre los loci de *Solanum muricatum* y las distintas especies silvestres, siendo la heterocigosis frecuente en estas últimas. El análisis de coordenadas principales (PCoA) derivado de esta caracterización molecular explicó un 63.24% de la variabilidad molecular total entre las 3 primeras coordenadas, la primera de las cuales separó las entradas pertenecientes a *Solanum muricatum* de las silvestres, y dentro de estas, a *Solanum caripense* del resto.

Las caracterizaciones morfológica y molecular llevadas a cabo en este trabajo han permitido evidenciar la variabilidad intra e interespecífica existente, y esto puede constituir una potente herramienta informativa en futuros proyectos de mejora del pepino dulce.

Palabras clave: *Solanum muricatum*, caracterización morfológica, caracterización molecular, variabilidad intraespecífica, variabilidad interespecífica

Summary

The pepino (*Solanum muricatum* Aiton) is an herbaceous Andean domesticate vegetatively propagated, and that is cultivated for its edible, aromatic and juicy fruits. It belongs to the family of Solanaceae, being very related to other species such as tomato and potato. Its origin is uncertain, being the wild species of the series Caripensia which mostly have contributed in the evolution of the pepino, and its cultivation has been experiencing a growing agronomic and economic interest.

This work deals with the intraspecific variability analysis, detected between different cultivars of *Solanum muricatum*, and interspecific variability, between *Solanum muricatum* and related wild species. To do this, was carried out the morphological and molecular characterization of a collection of 27 accessions (with 5 clonal replicates of each one), 18 belonging to the species *Solanum muricatum*, 1 to *Solanum tabanoense*, 1 to *Solanum basendopogon*, 1 to *Solanum trachycarpum*, 1 to *Solanum catilliflorum* and 1 to *Solanum perlongystilum*.

In the morphological characterization were used 58 morphological descriptors, relating to qualitative and quantitative characters of plant, flower and fruit. This assessment allowed to detect the big variability, both intra- and interspecific level. In broad strokes, it was observed that *Solanum muricatum* presented smaller plants than their related wild species, and bigger, sweeter and parthenocarpic fruits, which varied in shape depending on the cultivar, being the fruits of the wild species mostly spherical, very acidic and with more soluble solids content. The principal components analysis (PCA) derived from this morphological characterization explained a 51.64 per cent of the morphological variation between the first 3 components, and showed that the greater part of the variability was explained by the characters related to the vigour and the production of the plant and the fruit colour. On the other hand, the scatter 2D diagram generated from the PCA separated the entries belonging to *Solanum muricatum* of wild species, and in turn separated the *Solanum caripense* belonging to the rest of wild species.

In regards to the molecular characterization, we analyzed 20 microsatellite loci from tomato, 14 of which were amplified and presented correctly polymorphisms, proving for each locus an average of alleles of 4.07. In the entries belonging to *Solanum muricatum* found a high degree of monomorphism and homocygosis, resulting from the process of domestication of the species, although some of the polymorphic loci showed the existing intraspecific variability.

The interspecific variability was evident in the high degree of polymorphism detected between the loci of *Solanum muricatum* and the different wild species, being heterozygosity frequent in the latter. The analysis of principal coordinates (PCOA) derived from this molecular characterisation explained a 63.24 % of the total molecular variability between the first 3 coordinates, the first of which separated the entries belonging to *Solanum muricatum* and wild, and within these, *Solanum caripense* from the rest.

The morphological and molecular characterizations carried out in this work have allowed to show the existing intra- and interspecific variability, and this can be a powerful informational tool in future projects to improve the characteristics of pepino.

Key words: *Solanum muricatum*, morphological characterization, molecular characterization, intraspecific variability, interspecific variability

Agradecimientos:

A mi tutor académico, Jaime Prohens; a la gente del laboratorio: Santi, Mariola, Pietro, Isabel y Dionís. Al resto de gente, que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo. A mi familia.

Y, por supuesto, al crack de Javi.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. El pepino dulce	1
1. 2. Etimología.....	2
1. 3. Especies relacionadas y ancestros	3
1. 4. Domesticación.....	4
1. 5. Difusión	5
1. 6. Composición e información nutricional	6
1. 6. 1. Constituyentes no volátiles	6
1. 6. 2. Constituyentes volátiles del aroma	6
1. 7. Usos e importancia económica	7
1. 8. Aspectos morfológicos de la planta	7
1. 8. 2. Flores	8
1. 8. 3. Frutos.....	8
1. 9. Tipos varietales	9
1. 9. 1. Región andina	9
1. 9. 2. Nueva Zelanda, España y otros países.....	9
1. 10. Cultivo y manejo.....	10
1. 10. 1. Estrés biótico	11
1. 10. 2. Estrés abiótico	12
1. 11. Marcadores genéticos.....	12
1. 11. 1. Marcadores morfológicos	13
1. 11. 1. 1. Isoenzimas	13
1. 11. 1. 2. Proteínas de reserva.....	13
1. 11. 2. Marcadores moleculares basados en ADN.....	13
1. 11. 2. 1. Marcadores basados en la hibridación del ADN.....	14
1. 11. 2. 2. Marcadores basados en la amplificación del ADN	14
1. 11. 2. 3. Marcadores mixtos.....	14

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1. Caracterización morfológica.....	17
3. 1. 1. Material vegetal	17
3. 1. 2. Caracteres evaluados	18
3. 1. 2. Análisis de datos.....	21

3. 2. Caracterización molecular	21
3. 2. 1. Material vegetal	21
3. 2. 2. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN	22
3. 2. 3. Marcadores microsatélite (SSR)	23
3. 2. 4. Separación de los productos amplificados	24
3. 2. 5. Análisis de datos	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4. 1. Caracterización morfológica.....	26
4. 1. 1. Correlaciones entre caracteres	33
4. 1. 2. Análisis de componentes principales	34
4. 2. Caracterización molecular.....	37
4. 2. 1. Análisis de coordenadas principales.....	40
5. CONCLUSIONES	
5. 1. Caracterización morfológica.....	43
5. 2. Caracterización molecular.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA	
7. ANEXOS	
ANEXO I. Compuestos volátiles del aroma	
ANEXO II. Extracción de ADN genómico de planta (método CTAB modificado)	
ANEXO III. Valores de los caracteres morfológicos para cada una de las entradas	
ANEXO IV. Valores de correlación de cada carácter con respecto al resto de caracteres	
ANEXO V. Tabla de pesos de los 3 primeros componentes (caracterización morfológica)	
ANEXO VI. Tabla de los loci microsatélite con sus respectivos alelos para cada entrada	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tomate, pepino dulce e híbrido somático (SH) entre ambos.	1
Figura 2. Veteado en el fruto de <i>Solanum muricatum</i>	1
Figura 3. Ilustración de <i>Solanum muricatum</i>	2
Figura 4. <i>Solanum muricatum</i> , <i>Solanum caripense</i> e híbro somático entre ambos	3
Figura 5. Representaciones en cerámica del pepino dulce	5
Figura 6. Variedad de hoja en pepino dulce y especies relacionadas	8
Figura 7. Entutorado con hilos verticales.....	11

Figura 8. Presencia de protuberancias radiculares en el tallo.....	20
Figura 9. Forma de la corola	21
Figura 10. Espacio de color Hunter L, a, b.....	21
Figura 11. Homogeneidad en la distribución a rayas del color secundario de fruto.....	26
Figura 12. Variabilidad en forma, tamaño y color de los frutos	27
Figura 13. Pubescencia en la entrada silvestre E-62.....	27
Figura 14. Hojas semi-erectas y alargadas de la entrada cultivada Otavalo.....	28
Figura 15. Flores de la entrada El Camino	29
Figura 16. Flor de la entrada silvestre E-62, con la corola morada.....	29
Figura 17. Variedad de formas en los frutos.....	30
Figura 18. Fruto de la entrada El Camino	31
Figura 19. ‘Cracking’ en los frutos.....	31
Figura 20. Diagrama de dispersión 2D (dos primeras componentes principales)	35
Figura 21. Diagrama de dispersión 2D (componentes 1 y 3)	37
Figura 22. PCoA (dos primeras coordenadas).....	40
Figura 23. PCoA (coordenadas 1 y 3)	41
Figura 24. Matriz de distancias genéticas vs Matriz de distancias morfológicas.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información nutricional del pepino dulce	6
Tabla 2. Las 27 entradas de pepino dulce con las que se trabajó.....	17
Tabla 3. 58 descriptores empleados para la caracterización morfológica	18
Tabla 4. Entradas empleadas conservadas como semillas, réplicas clonales o silvestres	22
Tabla 5. Los 20 loci microsatélite analizados	23
Tabla 6. Componentes de las reacciones de PCR	24
Tabla 7. Correlaciones entre caracteres relacionados con el tamaño de la planta.....	33
Tabla 8. Análisis de componentes principales	35
Tabla 9. Relación del número de alelos y tamaño de los mismos para cada locus	37
Tabla 10. Porcentaje de variación explicada por las 3 primeras coordenadas.....	40

1. Introducción

1. 1. EL PEPINO DULCE

El pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) pertenece a la extensa familia de las solanáceas, encuadrándose dentro de esta en el género *Solanum*, como otras especies cultivadas importantes como son el tomate (*S. lycopersicum*), la patata (*S. tuberosum*) o la berenjena (*S. melongena*). Dentro de este género, el pepino dulce se incluye en el subgénero *Potatoe*, en la sección *Basarthurum*, de la cual es la única especie cultivada, y a la serie *Muricata*, constituyendo el único miembro de esta. Se trata de un cultivo originario y propio de la región andina.

Desde un punto de vista evolutivo, el pepino dulce está ampliamente relacionado con el tomate y la patata (Lester, 1991; Spooner *et al.*, 1993), de forma que, en la taxonomía actual, solo se diferencian por pequeñas características morfológicas. Además, son especies con muy pocas diferencias desde el punto de vista filogenético, y se han llegado a obtener híbridos somáticos entre pepino dulce y tomate, con floración y cuajado de los frutos (Sakamoto y Taguchi, 1991) (figura 1).

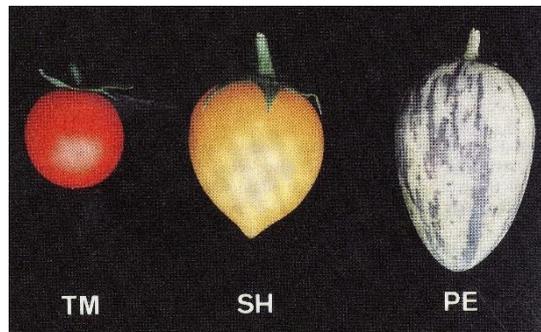


Figura 1. Frutos de tomate (TM), pepino dulce (PE) e híbrido somático (SH) entre ambos (Sakamoto y Taguchi, 1991).

El nombre científico acuñado al pepino dulce, *Solanum muricatum*, fue concedido por William Aiton, del Real Jardín Botánico de Kew, Londres, en el año 1789 (Aiton, 1789). No obstante, anteriormente se le había denominado *laurifolia* (padre Feuillée, inicios del siglo XVIII) (Schultes y Romero-Castañeda, 1962) por el parecido de alguno de los cultivares de berenjena, y *Solanum variegatum* (Ruiz y Pavón, a la expedición botánica que realizaron entre 1777 y 1788), en referencia al característico veteado que presenta el fruto (Ruiz y Pavón, 1799) (figura 2).



Figura 2. Veteado en el fruto de *Solanum muricatum*.

La descripción citada por Aiton, de forma traducida, se muestra a continuación: “*Solanum de tallo subinérme, subfruticoso y radicante, con turiones muricados y hojas oblongo-lanceoladas íntegramente pubescentes*” (figura 3). El nombre asignado por Aiton al pepino dulce, *muricatum*, probablemente no se refiera a la presencia de espinas, sino a la apariencia que presentan los tallos de pepino cuando existen condiciones de alta humedad (Nuez y Ruiz, 1996), desarrollando con facilidad raíces adventicias, cuyo desarrollo inicial confiere un aspecto engañoso al tallo.



Figura 3. Ilustración de una planta, con flores y frutos de *Solanum muricatum* Aiton (National Research Council, 1989)

1. 2. ETIMOLOGÍA

Cuando los españoles llegaron a las zonas donde se encontraba cultivado, el pepino dulce recibía el nombre en lengua quechua de *cachum*, y en lengua aymara, *cachuma*. Los españoles, acostumbrados a designar a las plantas desconocidas del Nuevo Mundo con términos de plantas del Viejo Mundo, le dieron el nombre de *pepino* (en referencia a *Cucumis sativus* L., Cucurbitaceae). Actualmente, en castellano se emplea para su designio la palabra *pepino* seguida de un modificador, que comúnmente es *dulce*, para diferenciarlo de *C. sativus* y reflejar su mayor sabor dulce. Existen, sin embargo, otros muchos modificadores, como pueden ser pepino de fruta, morado, amarillo, blanco, de agua, mango, de la tierra y más (Nuez y Ruiz, 1996). No obstante, en muchas zonas andinas se hace referencia a él simplemente como pepino, sin ningún modificador (Heiser, 1985; Nuez *et al.*, 1993; Patiño, 1962). Otros nombres por los que se conoce en determinadas regiones son: peramelón (Canarias), melón pera y huevo de gato (Cuba); manguena (Costa Rica).

En inglés se le conoce como *pepino*, término adaptado directamente del español. También es frecuente el nombre de *melon pear*. Otros nombres en inglés son *pear melon*, *Peruvian pepino*, *tree melon*, *sweet cucumber* y *mellowfruit*. Algunos de los nombres asignados en otros idiomas son: *melon poire* y *poire-melon* (francés); *pepino doce* (portugués); *peermeloen* (holandés); *Melonbirne* (alemán); *melonpaere* (danés); *xiang gua quie* (chino); *pepiino* (japonés).

1. 3. ESPECIES RELACIONADAS Y ANCESTROS

Solanum muricatum constituye la única especie realmente cultivada de las 22 que forman la sección *Basarthrum*. No se conoce en estado silvestre (Anderson, 1979), y es el único miembro de la serie *Muricata*. A día de hoy no se ha establecido con seguridad la especie o especies ancestro del pepino dulce, aunque sí se han realizado numerosos estudios sobre las relaciones evolutivas que forman parte de esta sección, basándose en criterios tales como la morfología de la planta, relaciones de cruzabilidad, morfología del polen, flavonoides foliares, cromosomas meióticos y mitóticos, serología de proteínas de la semilla, análisis del DNA cloroplastídico y DNA mitocondrial, etc (Anderson, 1975, 1977, 1979; Anderson y Bernardello, 1991; Bitter, 1913; Heiser, 1964, 1969; Lester, 1991; Seithe y Anderson, 1982).

Al estar *Solanum muricatum* estrechamente relacionado con un grupo de especies silvestres de la serie *Caripensa*, algunas de ellas se han considerado tradicionalmente como más probablemente involucradas en el origen del pepino dulce:

***S. caripense* Humb. & Bonpl. ex Dunal:** presenta globalmente menos diferencias de cariotipo con *S. muricatum* (Bernardello y Andreson, 1990), con el cual cruza dando híbridos con meiosis regular y fértiles (Anderson, 1979; Heiser, 1964; Murray, 1992) (figura 4). Además, también presenta una corola rotada (Rodríguez-Burruezo, 2002).



Figura 4. Frutos de *Solanum muricatum* (cultivar 'SWEET LONG'), *Solanum caripense* (entrada EC-40.9) e híbrido somático (F1) entre ambos

***S. tabanoense* Correll:** presenta un tamaño de fruto, sabor, aroma y pulpa del mismo más parecido al de pepino dulce (Brücher, 1966, 1968, 1970).

***S. basendopogon* Bitter:** gran similitud con el pepino dulce en hábito y en morfología de la hoja, teniendo también inflorescencias ramificadas.

***Solanum cochoae* G.J. Anderson & Bernardello:** los híbridos resultantes de su cruce con *S. muricatum* demuestran una fertilidad del polen muy alta (Anderson y Bernardello, 1991), a pesar del bajo porcentaje de éxito de los híbridos y del bajo número de semillas que germinaban.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, y apoyados por distintos análisis de DNA cloroplástico y mitocondrial realizados y por su amplia distribución desde Costa Rica hasta el Perú, autores como Anderson y Jansen (1995) o Nuez y Ruiz (1996) consideraron a *S. caripense* como el ancestro más probable, sin descartar, no obstante, las otras especies mencionadas. Estudios posteriores indicaron que probablemente no existiera una única especie progenitora, sino que otras especies probablemente habían estado envueltas en la diversificación del pepino dulce mediante la hibridación producida después de su aparición, incluso si el pepino se hubiera originado a partir de una única especie (Anderson y Jansen, 1998; Prohens *et al.*, 2003).

Uno de los estudios más recientes relacionados con los posibles ancestros del pepino dulce es el de Blanca *et al.* (2007), en el cual se llevaron a cabo análisis AFLP y de variación en la secuencia de DNA en pepino dulce. El análisis AFLP indicó que *S. muricatum* es genéticamente cercano a *S. filiforme*, *S. cochoae* y *S. caripense* PI-243342, relaciones que podrían indicar que estas especies son los ancestros salvajes del pepino dulce, aunque esto no puede afirmarse con rotundidad. La accesión de *S. caripense* empleada es bastante diferente al resto de accesiones de la misma especie, además de que su origen (Costa Rica) está fuera del rango de aparición de *S. muricatum* y de que es muy similar a algunos híbridos artificiales entre *S. caripense* y *S. muricatum*, por lo que esta accesión podría derivar de uno de estos híbridos. Por su parte, *S. filiforme* y *S. cochoae* son especies raras de las cuales solo se disponía de una accesión.

Más allá de dichas tres excepciones, *S. muricatum* no aparecía vinculada con ningún grupo único de especies silvestres, ni en el árbol realizado a partir de análisis AFLP ni en el árbol de haplotipo. Además, en este último las secuencias de *S. muricatum* aparecían dispersas por el árbol. Por tanto, los datos AFLP y de haplotipos vincularon a *S. muricatum* a un grupo de especies silvestres de la serie *Caripensia*, a pesar de que no fue posible esclarecer si existe una única especie que sea la más cercana genéticamente al pepino dulce. Sin embargo, no todos los haplotipos presentes en *S. muricatum* fueron encontrados en las accesiones silvestres estudiadas, indicando que otros materiales silvestres han contribuido al origen y evolución de *S. muricatum*. Además, estos datos sugerían que, durante la domesticación y la posterior selección, el pepino dulce no parece haber pasado por el mismo proceso de pérdida genética que otras especies domesticadas, debido probablemente a que el pepino dulce es una especie polifilética intercompatible con muchas especies silvestres simpátricas de la serie *Caripensia*, las cuales pueden explicar esta alta diversidad genética.

1. 4. DOMESTICACIÓN

Se desconoce tanto el momento en que empezó a cultivarse el pepino dulce como la región geográfica específica en la cual se llevó a cabo el proceso de domesticación. No obstante, algunos restos arqueológicos hallados (figura 5) y los datos relativos a la distribución de especies relacionadas indican que surgió en algún lugar de la región andina varios miles de años atrás (Brücher, 1989; Heiser, 1985; Prohens *et al.*, 1996). Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que únicamente se conozca el pepino dulce en su forma cultivada (Anderson y Jansen, 1998), por lo que muy probablemente la domesticación del mismo tuvo lugar hace mucho tiempo.



Figura 5. Representaciones del fruto de pepino dulce en cerámica de la cultura nazca (izquierda) y cultura moche (derecha). Museo Nacional de Antropología y Arqueología. Lima, Perú.

1. 5. DIFUSIÓN

Todo parece indicar que al llegar los españoles a los territorios andinos donde se cultivaba el pepino dulce, este causó muy buena impresión en ellos, de tal forma que los españoles intentaron llevar a cabo su difusión. Si bien esta difusión se llevó a cabo con éxito en territorios como México (Cobo, 1653), Nueva Granada (Zamora, 1701) y resto de América Central o Guatemala, no se tiene constancia de que se llevara a España, y en caso de haberse llevado, probablemente no se hubiese adaptado y se hubiera desistido en cultivarlo (Acosta, 1987; Nuez y Ruiz, 1996).

La primera referencia a la difusión del pepino dulce hacia Europa se debe a la expedición botánica a los reinos de Perú y Chile protagonizada por Ruiz y Pavón (1777-1788). Se hicieron entonces varios intentos de envíos de pepino dulce a España, pero no fue hasta 1788 cuando uno de los envíos de semillas, al Jardín Botánico de Tenerife (Mapa, 1993a), resultó exitoso. En tierras canarias se adaptó con gran facilidad, e incluso se sigue cultivando en la actualidad. Por otro lado, el primer cultivo de pepino dulce del que se tiene constancia en Francia corresponde a 1785, en los jardines del Rey, y también ese mismo año en Inglaterra, en los jardines de Kew.

Las siguientes referencias de las que se disponen corresponden a finales del siglo XIX, cuando se describe su cultivo en los alrededores de París (en 1885) (Tioutine, 1937) y su introducción en Rusia como planta de invernadero (1887) (Bukasov, 1930). A inicios del siglo XX, se tiene constancia de la venta en mercados del fruto (Anónimo, 1903) y de su cultivo en Italia (Baccarini, 1908).

En Estados Unidos, el cultivo es introducido en 1882 (Anónimo, 1892), teniendo éxito fundamentalmente en muchos lugares del estado de California, donde algunos frutos alcanzaron el mercado a principios del siglo XX (Wickson, 1914). En Cuba fue introducido en el año 1918, y en Nueva Zelanda en el año 1906 (Cossio, 1988) ya se tiene constancia de su presencia en el jardín de Allison.

1. 6. COMPOSICIÓN E INFORMACIÓN NUTRICIONAL

1. 6. 1. *Constituyentes no volátiles*

La mayor parte de los estudios realizados acerca de los componentes del fruto de pepino dulce se centran tan solo en unos pocos componentes, como los sólidos solubles, acidez, ácido ascórbico y otros, y en su variación entre el tipo de cultivar, el abonado, la salinidad y otros factores. Solo unos pocos trabajos profundizan en ello, siendo la mayoría de ellos folletos o informes divulgativos de países de la región andina o de Nueva Zelanda. No obstante, y de forma general, el fruto del pepino dulce presenta un alto porcentaje de agua, y un nivel calórico muy bajo. Su contenido en proteínas, fibra y minerales es también bajo, a excepción del potasio. Cabe resaltar su contenido en vitamina C, que si bien es variable según el genotipo, la forma de cultivo y las condiciones ambientales, suele ser bastante elevado, superando incluso los niveles en que se encuentran la mayoría de frutos, incluyendo los cítricos.

En la tabla 1 aparece la información nutricional detallada del cultivar El Camino, de Nueva Zelanda (Redgwell y Turner, 1986) y un resumen de trabajos llevados a cabo en Perú (Delgado de la Flor, 1988) y Chile (Bravo y Arias, 1983).

Tabla 1. Información nutricional del pepino dulce.

Componente (Valores por 100 g)	NZ ("El Camino")	Perú	Chile
Calorías	---	26.0	25.0
Agua (g)	91.8-93.2	92.3	92.4
Fibra (g)	---	0.5	0.5
Proteínas (g)	0.10-0.13	0.30	0.40
Lípidos y pigmentos (mg)	25-44	---	100
Azúcares solubles (g)	4.9-6.4	7.0	6.3
Almidón (mg)	20.0-90.0	---	---
Vitamina A (mg)	---	317	---
Vitamina C (mg)	46.0-68.8	29.7	26.0
Acidos orgánicos no volátiles (mg)	119-153	---	---

1. 6. 2. *Constituyentes volátiles del aroma*

Existe una gran variedad de aromas en el fruto de pepino dulce, y estos dependen en gran medida del cultivar en cuestión, encontrándose desde cultivares con aromas exóticos y frutales y otros con un aroma más herbáceo, similar al de una hortaliza. Las concentraciones más altas de los constituyentes volátiles del aroma se encuentran mayormente en la pulpa, y menos en la piel (Ruiz-Beviá *et al.*, 2002).

En cuanto a los principales componentes del aroma, el estudio realizado por Rodríguez-Burruezo *et al.* (2004), en el cual se analizaron frutos de pepino dulce que diferían en su aroma, determinó que los acetatos de 3-metil-2-buten-1-ilo y de 3-metil-3-buten-1-ilo y sus

formas de alcoholes insaturados, 3-metil-2-buten-1-ol y de 3-metil-3-buten-1-ol, están generalmente muy presentes. Otros componentes, como el butil acetato o el (Z)-non-6-enal, entre otros, también se hallaban en abundancia en determinados clones (relación de todos los compuestos volátiles identificados en este estudio en Anexo I).

1. 7. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA

Los frutos de pepino dulce pueden consumirse como postre, en el caso de los cultivares que presentan frutos más aromáticos, o como componentes de ensaladas y alimento refrescante, en el caso de los cultivares que presentan frutos más ácidos y con menos azúcares (Nuez y Ruiz, 1996). También es posible su consumo en zumos (Schwartz y Nuñez, 1988) o en platos y postres más elaborados. Su uso como hortaliza se limita a las regiones donde se cultiva de forma tradicional, tales como Colombia, Perú y Ecuador. En otros países, como Chile, Nueva Zelanda, Australia o España, se ha tratado de expandir su consumo como fruta de postre o en macedonias (Nuez y Ruiz, 1996). En algunas regiones, cuando el fruto presenta un estado muy inmaduro, se puede consumir en hervidos (Esquivel y Hammer, 1991). Otra de sus posibles formas de consumo en estado maduro es como acompañante de carnes o pescados (National Research Council, 1989) o en rodajas espolvoreadas con azúcar (Cossio, 1988). Además, se ha descrito su procesado en almíbar, mermeladas o helados (Fouqué, 1973; Matus, 1983; Mejía, 1984).

Más allá de sus usos a nivel alimentario, puede emplearse como planta decorativa y ornamental, y también se han destacado sus propiedades medicinales hipotensivas y diuréticas (Sánchez-Vega, 1992), muy probablemente debido a su alto contenido en agua, e incluso se ha descrito actividad antitumoral de su extracto acuoso contra diferentes tipos de células cancerosas (Ren y Tang, 1999). Su alto contenido en vitamina C es otra de sus características favorables.

En cuanto a la importancia económica del pepino dulce, solo se cultiva comercialmente en Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú, Chile, Nueva Zelanda (Dennis *et al.*, 1985) y en Australia (Goubran, 1985). No se disponen de datos fiables de producción a nivel internacional, y por ello es difícil determinar la importancia económica del pepino dulce. No obstante, sí se disponen de los datos de superficie y producción de pepino dulce en Ecuador, donde ambos parámetros se han ido incrementando progresivamente, llegando a quintuplicarse la producción de pepino dulce en este país, desde el año 1998 hasta el 2010 (datos según la FAO). Estos datos pueden ofrecer una idea de que el interés en el mercado externo por el producto se está viendo incrementando gradualmente (Hidalgo, 2006). En España en particular, algunos invernaderos experimentales están llevando a cabo el cultivo del pepino dulce, y solo ocasionalmente, algunos de los frutos derivados de estos cultivos se venden en mercados locales (Van der Vlugt, 2010).

1. 8. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA PLANTA

La planta del pepino dulce es de tipo semiarbusivo, presentando un desarrollo rastrero si se la deja crecer libremente. Tiene un sistema radicular muy abundante y ramificado, y posee un crecimiento indeterminado, por lo que puede extenderse continuamente y ser perenne (Rodríguez-Burruezo, 2002).

1. 8. 1. Tallos y hojas

Inicialmente, los tallos son herbáceos, pero con el tiempo se lignifican, principalmente en la base de la planta, mientras que las zonas apicales conservan la consistencia herbácea. El color que presentan depende del cultivar, aunque suelen ser verdes con más o menos pigmentación, sobre todo en las regiones próximas a los nudos. La sección suele ser circular, pero en algunos cultivares es cuadrangular o incluso alada. Es importante señalar que el pepino dulce presenta una gran facilidad para emitir raíces adventicias en los entrenudos, si está en contacto con un sustrato húmedo.

El tamaño y la forma de las hojas son otras características que varían entre los cultivares de forma muy marcada (figura 6). Mientras que algunos presentan hoja de tipo simple alargada y lanceolada, otros poseen hojas compuestas, de entre 3 y 7 folíolos. Además, es común que al inicio del desarrollo las hojas sean compuestas, para posteriormente ser únicamente simples. El tamaño de las hojas varía entre los 10 y 30 centímetros, dependiendo de las condiciones del suelo y del clima, y pueden llegar a alcanzar en algunas hojas los 40 centímetros.



Figura 6. Variedad en tamaño, forma y número de folíolos en pepino dulce y especies silvestres relacionadas.

1. 8. 2. Flores

Las características de las flores de pepino dulce también dependen del cultivar y de las condiciones ambientales en las cuales se ha desarrollado. Se trata de flores hermafroditas y de corola pentámera y rotada, que aparecen en racimos compuestos de 5 a 20 flores, aunque se ven casos donde llegan a haber más de 50 flores en un racimo. Los pétalos son de color blanco, con vetas moradas más o menos presentes. Normalmente presentan una exéresis estigmática (el pistilo sobresale del cono formado por las 5 anteras, las cuales no están soldadas entre ellas) y dehiscencia apical.

1. 8. 3. Frutos

El fruto es una baya, usualmente bicarpelar, con una cavidad central en la cual se alojan las semillas. No obstante, algunos cultivares producen frutos partenocárpicos, es decir, sin semillas. La forma que presenta el fruto depende fundamentalmente del tipo de cultivar,

aunque suelen ser frutos de forma ovoide, aunque también los hay acorazonados, alargados casi cilíndricos e incluso casi esféricos.

En la madurez, el color de fondo es amarillo, amarillo claro (casi crema) o amarillo dorado, surcado por vetas de color púrpura, que, según el cultivar y las condiciones ambientales (luminosidad y temperatura), puede llegar a recubrir casi todo el fruto o, por el contrario, ser prácticamente inexistente. En algunos cultivares el veteado no es púrpura, sino verde. El color de la carne varía, desde un amarillo pálido hasta un anaranjado vivo.

1. 9. TIPOS VARIETALES

1. 9. 1. *Región andina*

Nuez y Ruiz (1996) llevaron a cabo el análisis de los tipos varietales más comunes en la región andina, según el tamaño, la forma y el color de los frutos.

Ecuador

A pesar de que existe una gran diversidad dentro de cada una de ellas, se distinguen a grandes rasgos dos clases de cultivares. La primera de ellas abarca frutos grandes, con formas generalmente globosas (en algunos casos, alargada), con el ápice del fruto redondeado. El color de fondo en frutos inmaduros es verde, con un escaso veteado púrpura. La segunda clase presenta frutos de menor tamaño, con formas más alargadas e incluso casi cilíndricas de extremo apical más apuntado. El color de fondo en estado inmaduro es casi blanco, el veteado está más presente, aunque las bandas moradas están menos definidas.

Perú

Los cultivares propios peruanos se conocen como Corazón de Paloma, Corazón de Toro, Morado listado y Oreja de Burro. Mientras que los frutos de los dos primeros, como su nombre indica, tienen forma acorazonada, los frutos de Morado Listado son ovoide-cónicos (con tamaño variable y abundante veteado morado) y los de Oreja de Burro, alargados (de tamaño mediano o grande y con escasa pigmentación).

Chile

La zona norte del país presenta frutos ovalados o acorazonados de extremos redondeados, piel amarilla en estado maduro y escasas manchas púrpura. La región central de Chile se caracteriza por sus frutos alargados (con el extremo apical puntiagudo) de color cremoso y vetas moradas cuando maduran.

1. 9. 2. *Nueva Zelanda, España y otros países*

Nueva Zelanda es el país donde existe mayor variedad de cultivares. Algunos de los más importantes (Dawes y Pringle, 1983; Endt, 1983) son:

Asca: muy productivo. Fruto grande, ovoide, de color amarillo claro, vetas verdes y contenido en sólidos solubles medio-bajo.

Kawi: de producción media. Fruto de tamaño medio, alargado, verde pálido, vetas púrpuras y contenido en sólidos solubles medio.

El Camino: el más cultivado y de buena producción. Fruto de tamaño medio, forma ovoide-acorazonada, amarillo, vetas púrpuras y contenido en sólidos solubles alto. Otros cultivares neozelandeses relevantes son **Miski, Schmidt, Suma, Toma y Lincoln Gold.**

En España, tras un programa de selección y mejora de varios años a partir de semillas de diversos orígenes, se han ido liberando clones desarrollados en la Universidad Politécnica de Valencia:

Sweet Long (Ruiz *et al.*, 1997): de producción media. Fruto alargado, amarillo dorado, vetas moradas y contenido en sólidos solubles elevado.

Sweet Round (Ruiz *et al.*, 1997): producción media (inferior a Sweet Long). Fruto redondo, amarillo dorado, vetas moradas y contenido en sólidos solubles elevado.

Puzol (Prohens *et al.*, 2002): de producción alta. Frutos grandes y elongados, amarillo dorado, abundante veteado púrpura y contenido en sólidos solubles medio.

Turia (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2003): de producción alta. Fruto de tamaño medio, ovalado, color dorado, vetas moradas definidas y contenido en sólidos solubles medio.

Valencia (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2004): de producción media-alta. Frutos de tamaño medio, elongados, color dorado, vetas estrechas moradas y contenido en sólidos solubles muy alto.

En Australia aparecen los cultivares Colossal, Golden Splendour y Temptation, entre otros, además de algunos clones procedentes de Nueva Zelanda como El Camino y Toma. En Estados Unidos, principalmente cultivados en California, se encuentran Cascade Gold, Miski Prolific y Rio Bamba, entre otros.

1. 10. CULTIVO Y MANEJO

La propagación del pepino dulce es vegetativa, mediante esquejes de tallo más o menos lignificados. La propagación por semilla, aunque posible, no se suele emplear, principalmente debido al carácter altamente heterocigoto del pepino dulce y la enorme segregación que de ello se deriva, además de la dificultad que entraña la germinación de las semillas. En contraposición a esto, la propagación por esquejes resulta muy sencilla ya que estos enraízan y desarrollan brotes vigorosos con gran facilidad. Se puede realizar una plantación directa de los esquejes en el terreno o bien estos pueden ser puestos a enraizar en un sustrato húmedo durante un período de un mes o más, para ser trasplantados posteriormente. Este último método permite una mayor supervivencia y el acortamiento del ciclo de cultivo.

En lo que respecta a los sistemas de conducción del cultivo, se distingue entre: rastrera, donde no hay ni poda ni entutorado, provocando un desarrollo vegetativo desmesurado y de menor rendimiento; entutorado con hilos verticales (figura 7), en el cual entre 2 y 4 brazos por planta son entutorados con hilos verticales tensados y sí hay poda, evitando así el desarrollo excesivo; en seto, el cual es de 10-25 cm de ancho, y se consigue empleando un sistema de hilos colocados horizontalmente, de forma que impide el contacto de los frutos con el suelo.



Figura 7. Entutorado con hilos verticales

En cuanto al riego, es importante tener en cuenta que el sistema radicular del pepino dulce es poco profundo (Nuez y Ruiz, 1996), por lo que conviene que los riegos sean frecuentes. Los sistemas de riego que se emplean son variables. En la zona andina se utiliza el riego a manta o por inundación (Bravo y Arias, 1983), adecuado para regiones con alta pluviometría, pero que favorece la proliferación de malas hierbas. En las plantaciones al aire libre de Nueva Zelanda se emplea con asiduidad el riego por aspersión (Goubran, 1985), que si bien puede evitar ligeras heladas, favorece el desarrollo de enfermedades fúngicas. En cultivo en invernadero se utiliza el riego por goteo, que corrige los defectos de los anteriores, además del ahorro hídrico que supone.

La fertilización requerida por el pepino dulce es baja. El abonado depende de la fertilidad del suelo y de los anteriores cultivos que este ha soportado, además de los requerimientos nutricionales de la planta en cada fase del desarrollo.

1. 10. 1. Estrés biótico

Las **plagas** que afectan al pepino dulce suelen ser muy comunes en otras solanáceas hortícolas (Cifuentes, 1981; Martín, 1981; Bravo y Arias, 1983; Nuez y Ruiz, 1996). A continuación se muestran algunas de ellas:

- **Araña roja:** produce picaduras en las hojas, dañándolas y produciendo pérdidas de la superficie foliar, lo que perjudica el rendimiento. Es una plaga muy frecuente, aunque su control es relativamente sencillo. Además, las plantas afectadas se recuperan con facilidad.
- **Orugas:** la recuperación de muchas plantas, tras el ataque por orugas, es complicada, debido a que sus hojas pueden llegar a verse reducidas al nervio foliar. Lo conveniente es llevar a cabo los tratamientos necesarios nada más se detecte su presencia.
- **Otras plagas:** araña blanca de los invernaderos, moscas blancas, escarabajo de la patata, mosca minadora, polilla barrenadora y otros.

En cuanto a las **enfermedades** propias del pepino dulce, cobran importancia aquellas enfermedades **viróticas**, debido a la propagación vegetativa propia del cultivo (Dolby y Jones, 1988; Jones *et al.*, 1980, 1983; Nuez y Ruiz, 1996). El virus del mosaico del tomate (**ToMV**) tiene como principal vector el propio hombre (Mapa, 1993b), debido a la facilidad que tiene

para transmitirse mecánicamente desde ropas contaminadas y herramientas de poda. Puede llegar a causar daños severos: deformación de fruto, reducción del crecimiento e incluso detención del desarrollo (Pérez-Benlloch *et al.*, 2001). Otro virus que puede afectar los cultivos de pepino dulce es el virus del mosaico del pepino (**PepMV**), también mediante transmisión mecánica, aunque no resulta tan dañino para el pepino dulce como el ToMV. Otros virus citados al respecto son el virus de la peste negra o bronceado (**TSWV**), el virus del mosaico de la alfalfa (**AMV**), el virus del mosaico del pepino (**CMV**), el Pepino latent virus (**PepLV**), Potato leaf roll virus (**PLRV**), Potato Virus X (**PVX**), Potato virus Y (**PVY**) e incluso se ha detectado un viroide, el Potato spindle tuber viroid (**PSTVd**).

1. 10. 2. Estrés abiótico

Las principales causas de estrés abiótico en pepino dulce son la **salinidad** y la **temperatura**, ya que el pepino dulce ha demostrado ser muy tolerante a otros factores como pueden ser la sequía (Morley-Bunker, 1983) y el encharcamiento.

En cuanto a la **salinidad**, la tolerancia a la misma es moderadamente alta, e incluso se ha llegado a describir una mejora de la calidad organoléptica de los frutos a cambio de una reducción del rendimiento tras el riego con aguas de salinidad moderada (Pluda *et al.*, 1993a, 1993b; Ruiz y Nuez, 1997).

La **temperatura** es el factor de estrés abiótico más condicionante en el pepino dulce, ya que afecta principalmente a la floración y al cuajado de frutos del mismo (Nuez y Ruiz, 1996). Las altas temperaturas pueden llevar a fallos en el cuajado, pues favorecen una mayor ejerción del estigma en algunos clones de pepino dulce. Además, afectan a la calidad del polen, pues disminuyen su fertilidad y su facilidad de liberación a partir de las anteras, y pueden llegar a causar la abscisión de la flor. No obstante, estas limitaciones en el cuajado no se aplican en aquellos frutos partenocárpicos, por lo que estos genotipos son considerados como muy prometedores para la adaptación del pepino dulce a climatologías extremas (Nuez y Ruiz, 1996).

Por su parte, el efecto de las bajas temperaturas sobre el pepino dulce (daños en hojas y en frutos pequeños) no es tan perjudicial, ya que la planta es capaz de recuperarse fácilmente una vez pasada la helada (Nuez y Ruiz, 1996).

1. 11. MARCADORES GENÉTICOS

Se considera como marcador genético un carácter cuyo patrón de herencia puede definirse en un nivel morfológico, bioquímico o molecular, siguiendo las leyes de Mendel (Gregor Mendel, 1865). Permiten establecer diferencias (polimorfismos) entre individuos distintos (genotipos) pertenecientes a la misma especie o a especies relacionadas. Su estudio tiene aplicaciones muy diversas, entre las cuales se encuentran el establecimiento de hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos y la estimación de la variación dentro de las poblaciones y especies. En los análisis genómicos, se han empleado varios tipos de marcadores genéticos: morfológicos, isoenzimas, proteínas de reserva y marcadores basados en ADN.

1. 11. 1. Marcadores morfológicos

Con marcador morfológico se hace referencia a las características fenotípicas que pueden identificarse con facilidad, tales como la forma, el tamaño, el color, etc. Como principal ventaja, además de la mayor sencillez y menor costo de su metodología, los marcadores morfológicos permiten un muestreo mucho más cuidadoso que el que se realiza con análisis moleculares, lo cual cobra importancia en los estudios de la evolución del carácter y la valoración filogenética (Rentería Alcántara). Sin embargo, el uso de estos marcadores presenta limitaciones, ya que su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, además de que su evaluación solo es posible a nivel de toda la planta, cuando esta llega a su estado adulto (Azofeita-Delgado, 2006).

1. 11. 1. 1. Isoenzimas

Las isoenzimas son las diferentes formas moleculares de una enzima, con actividad catalítica común. Si se producen mutaciones en la región del ADN codificante de estas enzimas se pueden producir cambios en la composición aminoacídica de la enzima, originando proteínas con la misma actividad biológica pero con distinta carga neta, es decir, diferente velocidad de migración en un campo eléctrico, por lo que se pueden determinar patrones característicos de migración electroforética de las formas iso-enzimáticas. Dentro del estudio de las poblaciones vegetales, han sido importantes en la determinación de variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva, pero dado el bajo número de marcadores isoenzimáticos disponibles, su aplicación en la construcción de mapas se ha visto limitada (Picca *et al.*), además de que revelan poca variación, y la técnica es laboriosa y poco reproducible.

1. 11. 1. 2. Proteínas de reserva

La evolución los genes que codifican para algunos de las proteínas del endospermo en cereales ha incluido cambios en ellos cuya consecuencia ha sido un alto nivel de polimorfismo proteico entre especies y variedades de una misma especie. Este polimorfismo puede detectarse mediante la separación electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y visualización por tinción con Azul de Comassie (Picca *et al.*, 2004).

1. 11. 2. Marcadores moleculares basados en ADN

Estos marcadores revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. Las variaciones no se muestran por sí mismas en el fenotipo, a diferencia de los marcadores morfológicos. Permiten detectar polimorfismos en la secuencia del ADN entre dos individuos, afecten estos o no al fenotipo. No se ven afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, son universales y muy abundantes y una pequeña cantidad de ADN es suficiente para el análisis. Su utilidad es máxima, empleándose en numerosas aplicaciones: estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores, clonado de genes, etc. Se pueden clasificar en los siguientes 3 grupos.

1. 11. 2. 1. Marcadores basados en la hibridación del ADN

Entre estos, los más utilizados son los marcadores de tipo **RFLP** (“restriction fragment length polymorphisms”). El ADN se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos generados se separan en geles de agarosa y se transfiere el ADN a una membrana. En esta membrana se produce la hibridación con una sonda radiactiva, y mediante una autoradiografía se detectan los polimorfismos. Como ventajas presenta que son altamente reproducibles, codominantes (permiten distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos) y multialélicos, aunque son laboriosos y caros, al trabajar con radiactivos.

1. 11. 2. 2. Marcadores basados en la amplificación del ADN

La amplificación del ADN se lleva a cabo mediante PCR (“polymerase chain reaction”), que se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento de ADN, empleando una polimerasa de ADN termoestable y dos oligonucleótidos llamados “primers”, uno de los cuales hibrida en la hebra *a* del ADN y el otro hibrida en la hebra *b*, de manera que el fragmento de ADN amplificado es aquel que queda delimitado por los primers.

En el análisis mediante **RAPDs** (“random amplified polymorphic DNAs”) se emplean primers diseñados sin tener en cuenta información de la secuencia genómica de la especie a analizar, normalmente de unos 10 nucleótidos de longitud, por lo que la secuencia amplificada es desconocida. El polimorfismo observado entre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado. Su principal ventaja es que no requiere de conocimiento previo del genoma, además de ser una técnica altamente polimórfica, rápida y de bajo costo. No obstante, se trata de marcadores dominantes y de baja reproducibilidad.

Otro tipo de marcadores basados en la amplificación por PCR son los **microsatélites** o **SSR** (“simple sequence repeats”), muy abundantes en los genomas eucariotas. Se trata de secuencias constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces, y que están flanqueadas por secuencias de copia única. Estas secuencias microsatélite se amplifican mediante PCR y después se someten a electroforesis en geles de alta resolución, de forma que se permite detectar diferencias de 2, 3 ó 4 nucleótidos, que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite. Es decir, la base genética del polimorfismo que se detecta en microsatélites se basa en la variabilidad del tamaño del microsatélite, directamente relacionado con el número de repeticiones en tándem. Presentan múltiples ventajas: son marcadores codominantes; se distribuyen abundantemente por el genoma; tienen alta reproducibilidad e interpretación de los resultados sencilla; presentan alto polimorfismo por locus (multialelismo). Como desventaja principal, se requiere del conocimiento previo del genoma en cuestión para el diseño de los primers. El uso de microsatélites abarca muchas aplicaciones, entre las cuales se encuentran el análisis de poblaciones, estudios de diversidad e identificación varietal, construcción de mapas genéticos y estudios de asociación y ligamiento genético.

1. 11. 2. 3. Marcadores mixtos

Destacan los **AFLPs** (“amplified fragment length polymorphism”), los cuales se pueden considerar como una combinación de RFLP y RAPDs. Tras una digestión, se lleva a cabo una

amplificación de solo un grupo de los fragmentos de restricción y el análisis por electroforesis y visualización por autoradiografía o tinción con nitrato de plata. El origen del polimorfismo resulta de mutaciones puntuales, inversiones, deleciones e inserciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o a la alteración de la secuencia reconocida por los iniciadores. Como ventajas presenta la versatilidad y reproducibilidad, el elevado polimorfismo y el hecho de que no requieren conocer previamente el genoma. No obstante, son marcadores dominantes, ofrecen poca información por locus y el procedimiento es laborioso.

Además, en los últimos años ha experimentado un auge el uso de SNPs (“single nucleotide polymorphism”), variaciones en nucleótidos únicos que no modifican la longitud total de la secuencia de ADN en la región. Aquellos SNPs que introducen mutaciones en secuencias expresadas o que influyen en la expresión son los que tienen el potencial de detectar la variación genética funcional (FAO, 2010). Por ello, son marcadores atractivos para aplicarlos en el futuro a estudios de diversidad genética, por ser fáciles de usar en la evaluación de la variación funcional o neutra.

En la actualidad, los datos morfológicos y los moleculares se emplean conjuntamente con el fin de establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, estimar la variación dentro de las poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas. Ambos enfoques, morfológico y molecular, presentan sus ventajas e inconvenientes, pero juntos desempeñan una función muy importante a la hora de describir e identificar los grupos de organismos. Es decir, se trata de acercamientos complementarios, no excluyentes.

2. Objetivos

El pepino dulce es un cultivo con creciente interés en el panorama agronómico de muchas regiones, por lo que en los proyectos encaminados a la mejora genética del mismo cobra importancia el conocimiento previo de la variabilidad existente, tanto dentro de la misma especie como en especies silvestres relacionadas.

En este sentido, este trabajo pretende:

- 1) Llevar a cabo la caracterización morfológica y molecular (mediante el empleo de marcadores microsatélite de tomate) de una colección de 27 accesiones, 18 pertenecientes a la especie *Solanum muricatum*, 1 a *Solanum tabanoense*, 1 *Solanum basendopogon*, 1 a *Solanum trachycarpum*, 1 *Solanum catilliflorum* y 1 a *Solanum perlongystilum*.
- 2) Analizar la variabilidad intraespecífica e interespecífica resultante de la caracterización morfológica y molecular realizada.

3. Materiales y métodos

3. 1. Caracterización morfológica

3. 1. 1. *Material vegetal*

Se llevó a cabo la caracterización morfológica de 27 accesiones proporcionadas por el banco de germoplasma del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) (tabla 2), de las cuales 18 pertenecían a la especie cultivada *Solanum muricatum*, 4 a la especie silvestre relacionada *Solanum caripense*, 1 a la especie *Solanum tabanoense*, 1 a la especie *Solanum basendopogon*, 1 a la especie *Solanum trachycarpum*, 1 a la especie *Solanum catilliflorum* y 1 a la especie *Solanum perlongystilum*.

Tabla 2. Las 27 entradas de pepino dulce con las que se trabajó.

Entrada	Características
Puzol (9-2x6-21)	Clon obtenido en UPV.
SL (Sweet Long)	Clon obtenido en UPV. Parental usado en el mapa.
SR (Sweet Round)	Clon obtenido en UPV.
Otavaló	Variedad comercial. ADN de 7 plantas.
Lima	Variedad comercial. ADN de 7 plantas.
Quito	Variedad comercial. ADN de 7 plantas.
El Camino	Clon.
Kawi	Variedad comercial. ADN de 7 plantas.
Turia (D16)	Clon obtenido en UPV.
Valencia (C27)	Clon obtenido en UPV.
37-A	Variedad local. ADN de 7 plantas.
EC-12	Variedad local. ADN de 7 plantas.
Col-1	Variedad local. ADN de 7 plantas.
OV-8	Variedad local. ADN de 7 plantas.
Viru	Variedad local. ADN de 7 plantas.
QL-003	Variedad local. ADN de 7 plantas. Parece que es <i>S. caripense</i> o híbrido <i>S. muricatum</i> x <i>S. caripense</i>
CH2-22	Variedad local. ADN de 7 plantas.
PT-154	Variedad local. ADN de 6 plantas.
EC-40 pl 9	<i>Solanum caripense</i> . Parental usado en el mapa.
E-7	<i>Solanum caripense</i> . Clon de planta única.
BIRM S/1034	<i>Solanum caripense</i> . Clon de planta única.
E-257	<i>Solanum tabanoense</i> . Clon de planta única.
BIRM S/0032	<i>Solanum basendopogon</i> .
E-34	<i>Solanum trachycarpum</i> .
E-80	<i>Solanum catilliflorum</i> .
E-62	<i>Solanum perlongystilum</i> .
RP-1	<i>Solanum muricatum</i> . ADN 7 plantas. De www.rareplant.co.uk .

Para cada entrada se realizaron 5 réplicas clonales de un genotipo único. El método de implantación del cultivo fue el de trasplante, es decir, los esquejes enraizaron durante 1 mes aproximadamente en un sustrato húmedo y posteriormente fueron trasplantados al cultivo en invernadero de cristal en la Universidad Politécnica de Valencia, con arena como sustrato. El sistema de conducción empleado fue el entutorado con hilos verticales de 2 brazos por planta, podando las partes más bajas de la planta para favorecer el desarrollo de las partes superiores.

La forma de riego utilizada fue el riego por goteo con fertirrigación. El ciclo de cultivo fue el de primavera-verano.

3. 1. 2. Caracteres evaluados

Se llevó a cabo la caracterización de las accesiones con 58 descriptores morfológicos de la lista de descriptores para pepino dulce (IPGRI y COMAV, 2004) (tabla 3). Se evaluaron caracteres de planta, flor y fruto, tanto cualitativos como cuantitativos, obteniéndose los valores medios de cada accesión (mediante la caracterización de cada uno de los 5 clones de cada una de las 27 accesiones).

Tabla 3. 58 descriptores empleados para la caracterización morfológica.

Descriptor	Abreviatura	Características
Caracteres de planta		
Tamaño de planta	Plant.siz	Estimación visual de las dimensiones de la planta (3 Bajo 5 Medio 7 Alto)
Longitud de tallo en la primera inflorescencia	Stem.length	Medida del tallo desde la base del mismo hasta el punto de inserción de la primera inflorescencia. En cm.
Vigor de la planta	Vigour	Potencia, viveza que transmite visualmente la planta (3 Débil 5 Intermedio 7 Fuerte)
Grado de ramificación	Deg.ram	(3 Bajo 5 Intermedio 7 Alto)
Intensidad de antocianina en el ápice	Int.anthoc	(0 Ausente 3 Débil 5 Intermedia 7 Intensa)
Protuberancias radiculares en el nódulo	Root. prot	(0 Ausente 3 Débil 5 Intermedio 7 Intenso)
Densidad pubescente del tallo	Stem.pub	Cobertura del tallo de pequeños pelos suaves y blanquecinos (0 Glabro 3 Escasa 5 Intermedia 7 Densa)
Color del tallo	Stem.col	(1 Verde 2 Verdoso con manchas moradas 3 Morado verdoso 4 Morado 5 Morado oscuro)
Longitud de entrenudos	Intern.leng	Medida del tallo comprendido entre dos nudos. En cm.
Longitud del pecíolo	Pet.leng	En mm.
Color del pecíolo	Pet.col	(1 Verde 2 Verdoso con manchas moradas 3 Morado verdoso 4 Morado 5 Morado oscuro)
Densidad foliar	Fol.dens	(3 Escasa 5 Intermedia 7 Densa)
Actitud de la hoja	Leaf.att	Disposición de la hoja (1 Semi-erecta 2 Horizontal 3 Caída)
Longitud laminar de la hoja	Leaf.leng	En cm.
Anchura laminar de la hoja	Leaf.wid	En cm.
Ratio longitud laminar / anchura laminar	Ratio	
Tipo de hojas	Leaf.type	El tipo predominante de hojas observadas en una planta adulta (1 Simple 2 Compuesto)
Número de folíolos	Num.leaf	Número medio de folíolos en el tipo predominante de hojas observadas en una planta adulta

Color de la hoja	Leaf.col	Observado en el haz de la hoja (1 Verde claro 2 Verde 3 Verde oscuro 4 Morado verdoso 5 Morado)
Coloración de antocianina de las venas de la hoja	Ant.leaf.vei	(3 Verde 5 Venas principales moradas y el resto, verdes 7 Morado)
Actitud de la superficie de la hoja	Leaf.sur.att	(3 Flat 5 Intermedia 7 Muy convexa)
Caracteres de inflorescencia		
Número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia	Num.leaf.grn	
Tipo de inflorescencia	Infl.typ	(1 Generalmente unípara 2 Ambos: parcialmente unípara, parcialmente múltipara 3 Generalmente múltipara)
Número de flores por inflorescencia	Num.flow.infl	
Forma de la corola	Corol.shap	(1 Estrellada 2 Semi-estrellada 3 Rotada) (figura)
Color de la corola	Corol.col	(1 Blanco 2 A rayas: blanco>75% y morado<25% 3 A rayas: blanco 50-75% y morado 25-50% 4 A rayas: blanco 25-50% y morado 50-75% 5 A rayas: blanco<25% y morado>75% 6 Morado)
Longitud del sépalo	Sep.leng	En mm.
Longitud del estambre	Sta.leng	En mm.
Exerción del estilo	Sty.ex	Más allá del cono de la antera. En mm.
Producción de polen	Poll.prod	(0 Ninguna 3 Baja 5 Media 7 Alta)
Caracteres de fruto		
Número de frutos por inflorescencia	Nmb.fr	Número medio de frutos para los tres primeros nudos
Número de frutos por planta	Nmb.fr.ppl	
Producción de fruto por planta		En gramos.
Peso medio de fruto		En gramos.
Uniformidad en el tamaño de fruto	Size unif.	(3 Baja 5 Intermedia 7 Alta)
Longitud de fruto	Fr.leng	En cm.
Anchura de fruto	Fr.width	En cm.
Posición de la parte más ancha del fruto	Pos.widest	Medido como la porción de distancia desde la base hasta la punta del fruto (3 Menos de ¼ 5 Entre ¼ y ½ 7 Más de ½)
Ratio longitud de fruto / anchura de fruto	Leng/Wid	
Parámetros de color: luminosidad, ángulo de color (arctg b/a)	L, ATAN(b/a)	Se empleó el espacio de color Hunter L, a, b, y las mediciones se realizaron con el colorímetro Hunter Lab Minolta CR400. (figura)
Distribución a rayas del color secundario de fruto en la madurez comercial	Sec.col.strps	(0 Ausente 1 Presente)
Distribución moteada del	Sec.col.mott	(0 Ausente 1 Presente)

color secundario de fruto en la madurez comercial		
Superficie de fruto cubierta por color adicional de fruto	Surf.cover	(1 Menos del 10% 2 Entre el 10 y el 30% e Entre el 30 y el 50%)
Brillo epidérmico de fruto	Epid.gloss	(3 Mate 5 Intermedio 7 Brillante)
Número de lóculos por fruto	Nmb.loc	
Longitud de área placentar interna	Inn.plc.leng	En cm.
Anchura de área placentar interna	Inn.plc.brd	En cm.
Ratio longitud área placentar interna / anchura área placentar interna	Inn.plc.ratio	
Color de la carne del fruto	Fr.flesh col	(1 Verde oscuro 2 Verde claro 3 Blanco 4 Amarillo pálido 5 Amarillo dorado 6 Amarillo anaranjado 7 Naranja 8 Salmón)
Sabor de fruto	Fr.flvour	(1 Muy ácido 3 Ácido 5 Moderadamente dulce 7 Dulce 9 Muy dulce)
Presencia de regusto amargo	Pres.bitter	(0 Ausente 3 Débil 5 Intermedio 7 Fuerte)
Número de semillas por fruto	Nb.seedpfr	(1 Muy pocas: 1-5 2 Pocas: 6-25 3 Intermedio 26-75 4 Muchas: 76-250 5 Gran cantidad: >250)
Color de semilla	Seed col	(1 Blanco 2 Amarillo claro 3 Amarillo grisáceo 4 Amarillo amarronado 5 Marrón 6 Marrón-negro 7 Negro)
Diámetro de semilla	Seed diam	Este descriptor es teóricamente cualitativo, pero se ha determinado el diámetro de la semilla de forma cuantitativa debido a que la variabilidad que así se obtiene es mucho mayor. En cm.
Tipo de semilla	Type seed	(1 No alada 2 Intermedia 3 Alada)
'Cracking' del fruto	Fr.crack	Presencia de grietas en los laterales (0 Ausente 1 Presente)
Fasciación del fruto	Fr.fasc	(0 Ausente 3 Leve 5 Intermedia 7 Severa)
Contenido en sólidos solubles	Brix	Las mediciones se realizaron con un refractómetro de mano. En °Brix.



Figura 8. Presencia de protuberancias radiculares en el tallo.

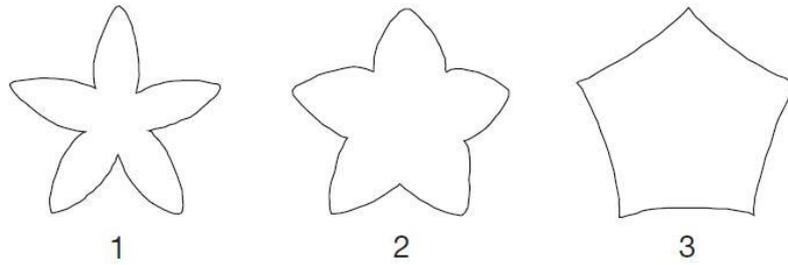


Figura 9. Forma de la corola (1 Estrellada 2 Semi-estrellada 3 Rotada).

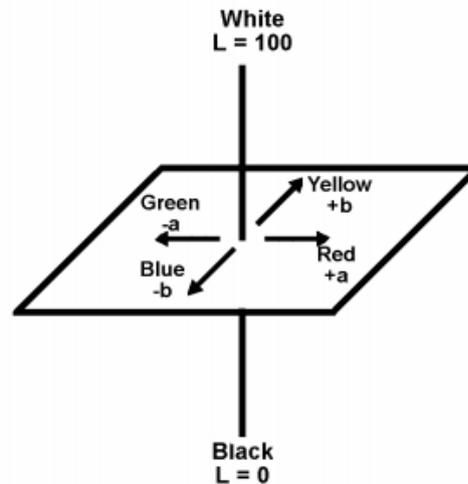


Figura 10. El valor L (luminosidad) está representado en el eje Z, siendo el blanco el valor máximo 100 y el negro el valor mínimo 0. El eje X representa el valor a, yendo desde el verde (negativo) hasta el rojo (positivo). El eje Y representa el valor b, yendo desde el azul (negativo) hasta el amarillo (positivo) (Hunter L, a, b Applications Note, 2008)

3. 1. 2. *Análisis de datos*

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI, con el cual, y a partir de los valores medios de los distintos descriptores anteriormente citados, se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson entre los distintos caracteres y se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados. Además, se realizó una matriz de distancias euclídeas cuadradas entre las distintas entradas según las características morfológicas que presentaban, con el software NTSys para su posterior empleo en un test Mantel.

3. 2. *Caracterización molecular*

3. 2. 1. *Material vegetal*

Las accesiones empleadas para la caracterización molecular fueron las mismas que se utilizaron en la caracterización morfológica. Cabe indicar que el material se trató de distinta manera en función de la condición de conservación de las mismas, como réplicas clonales o como semillas (tabla 4).

Tabla 4. Entradas empleadas conservadas como semillas, como réplicas clonales o silvestres.

Entradas conservadas como semillas	Entradas conservadas como réplicas clonales	Especies silvestres
Otavalo	Puzol	EC-40
Lima	SL (Sweet Long)	E-7
Quito	SR (Sweet Round)	BIRM S/1034
Kawi	El Camino	E-257
37-A	Turia	BIRM S/0032
EC-12	Valencia	E-34
Col-1		E-80
OV-8		E-62
Viru		
QL-013		
CH2-22		
PT-154		
RP-1		

3. 2. 2. Toma de muestras, extracción y cuantificación del ADN

Se pesaron aproximadamente 50 mg de tejido de hoja joven de cada planta. En las accesiones conservadas mediante semilla se pesó tejido de 7 plantas de cada entrada de pepino cultivado, mientras que en las accesiones conservadas vegetativamente se cogió tejido del clon original. En el caso de las especies silvestres se tomó tejido de una sola planta.

Se congeló el tejido en nitrógeno líquido y se realizó la extracción del ADN genómico siguiendo una modificación del método CTAB (Doyle and Doyle, 1987) (ver Anexo II). Tras la extracción se visualizó el ADN en un gel de agarosa al 0.8% teñido con GELRED y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El ADN genómico extraído se depositó en una placa PCR 12x8 a una concentración de 20 ng/ μ L.

A partir de este stock de DNA genómico, se pasaron a una nueva placa de PCR 35 μ L de los pocillos correspondientes a entradas conservadas como réplicas clonales y a especies silvestres, mientras que para las entradas conservadas como semillas se pasaron 5 μ L de cada uno de los 7 mix (en el caso de las entradas de las cuales se aportó DNA de tejido de 7 plantas) correspondientes a la misma entrada al mismo pocillo (quedando un volumen final de 35 μ L) , y 6 μ L de cada uno de los 6 mix (en el caso de las entradas de las cuales se aportó DNA de tejido de 6 plantas) correspondientes a la misma entrada al mismo pocillo (quedando un volumen final de 36 μ L).

3. 2. 3. Marcadores microsatélite (SSR)

Se analizaron 20 loci microsatélites procedentes de tomate (tabla 5).

Tabla 5. Los 20 SSRs procedentes de tomate que se probaron en el genoma de pepino dulce, junto a su localización cromosómica, su tamaño estimado, el tipo de repetición y la secuencia de sus cebadores y temperatura de fusión (T_m), necesarios para la reacción de PCR.

	Cromosoma	Foward primer	Reverse primer	Tamaño estimado	Repetición	T_m
SSR578	6	ACGACGTTGTAAAACGACATTC CCAGCACAACCAGACT	GTTGGTGGATGA AATTTGTG	294	(AAC) ₆ (ATC) ₅	55°C
SSR285	7	ACGACGTTGTAAAACGACAGTG GCTCTCACCTACTGCG	CAATTCTCAGGC ATGAAACG	276	(TTAT) ₂ (AT) ₆	55°C
SSR20	12	ACGACGTTGTAAAACGACGAG GACGACAACAACAACGA	GACATGCCACTT AGATCCACAA	157	(GAA) ₈	50°C
SSR80	11	ACGACGTTGTAAAACGACGGCA AATGTCAAAGGATTGG	AGGGTCATGTTC TTGATTGTCA	186	(TTTCAA) ₂ (GTA CAA) ₂ (CAA) ₇	50°C
SSR45	7	ACGACGTTGTAAAACGACTGTA TCCTGGTGGACCAATG	TCCAAGTATCAG GCACACCA	246	(AAT) ₁₄	50°C
SSR52	7	ACGACGTTGTAAAACGACTGAT GGCAGCATCGTAGAAG	GGTGC GAAGGG ATTTACAGA	202	(AAC) ₉	50°C
SSR128	6	ACGACGTTGTAAAACGACGGTC CAGTTCAATCAACCGA	TGAAGTCGTCTC ATGGTTCCG	123	(CAG) ₆ (CAA) ₃ (C AG) ₇	50°C
SSR13	5	ACGACGTTGTAAAACGACGGGT CACATACACTCATACTAAGGA	CAAATCGCGACA TGTGTAAGA	102	(AAG) ₆	50°C
SSR43	4	ACGACGTTGTAAAACGACTCC AAATTGGGCAATAACA	TTAGGAAGTTGC ATTAGGCCA	237	(TAC) ₇	55°C
SSR248	10	ACGACGTTGTAAAACGACGCAT TCGCTGTAGCTCGTTT	GGGAGCTTCATC ATAGTAACG	251	(TA) ₂₁	55°C
SSR306	4	ACGACGTTGTAAAACGACACAT GAGCCCAATGAACCTC	AACCATTCCGCA CGTACATA	258	(ATT) ₇	55°C
SSR593	4	ACGACGTTGTAAAACGACTGGC ATGAACAACAACCAAT	AGGAAGTTGCAT TAGGCCAT	295	(TAC) ₇	55°C
SSR51	1	ACGACGTTGTAAAACGACTAC CCTGGTCTTGGTGAA	AAAGGATGCTCT AGTTCTCCA	148	(ACAA) ₆	50°C
SSR111	3	ACGACGTTGTAAAACGACTTCT TCCCTTCCATCAGTTCT	TTTGCTGCTATAC TGCTGACA	188	(TC) ₆ (TCTG) ₆	50°C
SSR150	1	ACGACGTTGTAAAACGACATGC CTCGCTACCTCCTCTT	AATCGTTCGTTCA CAAACCC	217	(CTT) ₇	50°C
SSR38	8	ACGACGTTGTAAAACGACGTTT CTATAGCTGAAACTCAACCTG	GGGTTTCATCAAA TCTACCATCA	237	(TCT) ₈	55°C
SSR590	5	ACGACGTTGTAAAACGACTCTC AAAGTCGTTCTTCTTGA	GGAAGAGAAAC GCGGACATA	161	(TC) ₆ (AC) ₄	55°C
SSR66	2	ACGACGTTGTAAAACGACTGCA ACAACCTGGATAGGTCG	TGGATGAAACGG ATGTTGAA	185	(ATA) ₈	50°C
SSR136	11	ACGACGTTGTAAAACGACGAAA CCGCCTCTTCACTTG	CAGCAATGATTC CAGCGATA	149	(CAG) ₇	50°C
SSR14	3	ACGACGTTGTAAAACGACTCTG CATCTGGTGAAGCAAG	CTGGAATGCCTG GTTGATT	166	(ATA) ₉	55°C

Dichos SSRs fueron amplificados mediante PCR siguiendo la receta mostrada en la tabla 6, empleando en todos los casos un termociclador automático Mastercycler eppgradient S (Eppendorf).

Tabla 6. Componentes de las reacciones de PCR, con sus respectivos volúmenes para una única reacción y para la realización de un mix para 30 reacciones, junto con el perfil térmico empleado. T_m hace referencia a la temperatura de fusión, que varía según el microsatélite analizado (ver tabla 5).

	Por reacción para 12 µL	Total Mix (x30)	Perfil térmico
Agua MilliQ	8,45 µL	253,5 µL	94°C 3 min
Buffer PCR	1,2 µL	36 µL	94°C 20 seg
MgCl₂	0,36 µL	10,8 µL	T _m 30 seg
dNTPs	0,24 µL	7,2 µL	72°C 20 seg
F.M13	0,06 µL	1,8 µL	72°C 1 min
R	0,3 µL	9 µL	10°C ∞
Fluor	0,24 µL	7,2 µL	
Taq casera	0,15 µL	4,5 µL	
ADN	1 µL		

El volumen final de cada reacción fue de 12 µL, 11 µL procedentes del mix y 1 µL correspondiente a la dilución de ADN de cada entrada. Se empleó la estrategia de PCR conocida como multiplex con cebadores de cola (Oetting *et al.*, 1995), en la cual se emplea un cebador *forward* con una extensión adicional de 18 pb en su extremo 5' idéntica a la secuencia del cebador M13 (TGTAACGACGGCCAGT), un cebador regular *reverse* y un tercer cebador universal M13 marcado con fluorescencia. El cebador "cola" proporciona una secuencia complementaria del cebador universal fluorescente, de forma que el producto de PCR que se genera puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN. Los fluoróforos empleados para el marcaje del cebador M13 fueron FAM (azul), PET (rojo), VIC (verde) y NED (amarillo). El marcaje utilizado varió entre las distintas reacciones de PCR, con el fin de espaciar los rangos de alelos de los loci similares en tamaño, para así evitar solapamientos entre alelos correspondientes a loci diferentes y asegurar de esta forma un correcto genotipado.

El tamaño de los fragmentos obtenidos por PCR se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en tampón TAE y revelados con GelRed. Cada muestra contenía 2 µL de GelRed, 5 µL de agua MiliQ y 3 µL de reacción de PCR. La escalera de peso molecular utilizada fue 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas). Las muestras fueron corridas a 150 V durante 40 minutos y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador UV.

3. 2. 4. Separación de los productos amplificados

Para la visualización de los productos amplificados, se utilizó un secuenciador automático ABI/PRISM 3100 de Applied Biosystems. El secuenciador lleva a cabo una reacción de electroforesis capilar, donde los fluoróforos son excitados por un láser de forma que son detectados por el sistema de lectura, que permite detectar 5 fluoróforos distintos en una única reacción. Un color se utiliza para el marcador de pesos moleculares. Conociendo el tamaño esperado de cada fragmento es posible cargar varios SSR marcados con el mismo fluoróforo. De esta manera puede resolverse el producto de la amplificación de varios cebadores en una misma muestra.

Se prepararon diluciones para cada una de las 27 muestras, que eran cada una combinaciones de las PCRs realizadas, cuyo resultados en la secuenciación no iban a solapar por el correcto

marcaje llevado a cabo. En total las distintas PCR se agruparon en 3 combinaciones, es decir, se prepararon un total de 81 diluciones. Según la claridad de los resultados observados en las electroforesis, se pudieron inferir las concentraciones a las que debían estar cada una de las distintas PCR, y por tanto determinar sus volúmenes a partir de un volumen final de reacción, distinto según la combinación.

Los otros reactivos de la reacción de secuenciación fueron la formamida, para evitar la rehibridación del ADN, y el Liz-500, un marcador de pesos para la calibración de las muestras. Se preparó una dilución 1:25 de formamida y una dilución 1:25 de Liz-500.

Cada reacción de secuenciación estuvo compuesta por 4 μL de dilución de PCRs combinadas, 12 μL de formamida 1:25 y 1 μL de Liz-500 1:25. Una vez realizadas las 81 reacciones de secuenciación, se llevaron a secuenciar al secuenciador automático ABI/PRISM 3100 de Applied Biosystems, ubicado en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Valencia.

3. 2. 5. Análisis de datos

Los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación se analizaron con el software bioinformático Applied Biosystem Genotyper. A partir de este análisis de alelos, se realizó una tabla en una hoja Excel, empleando el programa Microsoft Office Excel 2007, en la cual se reflejaban los alelos de cada microsatélite para cada entrada. Con estos datos, y empleando el paquete estadístico GenAEx (Genetic Analysis in Excel), complemento del programa Microsoft Office Excel 2007 para análisis de poblaciones genéticas, se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales. Además, se realizó una matriz de distancias euclídeas cuadradas entre las distintas entradas según los distintos alelos que presentaban para cada microsatélite, también con el paquete GenAEx, para su posterior empleo en un test Mantel.

El test Mantel se realizó mediante el paquete GenAEx. Con este test se estudió la correlación entre las matrices de distancias euclídeas cuadradas resultantes de la caracterización morfológica y la caracterización molecular.

4. Resultados y discusión

4. 1. Caracterización morfológica

Tras la plantación de las distintas accesiones en el invernadero, se encontró que las entradas Lima y Viru, de la especie *Solanum muricatum*, y BIRM S/0032, de la especie *Solanum basendopogon*, presentaron problemas vegetativos. Mientras que tanto Viru como BIRM S/0032 simplemente no llegaron a seguir con su desarrollo vegetativo a partir del trasplante, Lima sí lo hizo, pero las plantas que se formaron exhibían una marcada falta de vigor, eran débiles y no llegaron a florecer. Por tanto, estas tres entradas no se incluyeron en los análisis morfológicos.

Los diferentes valores de los caracteres tanto cualitativos como cuantitativos para cada una de las entradas se recogen en la tabla presente en el Anexo III.

Por otro lado, tras las mediciones de los caracteres morfológicos, se encontró homogeneidad en algunos descriptores de fruto, por los que estos no fueron incluidos en los análisis. Estos caracteres fueron: la distribución a rayas del color secundario de fruto en la madurez comercial (todos los frutos evaluados la presentaban) (figura 11); el número de lóculos por fruto (todos los frutos evaluados presentaban 2 lóculos); el tipo de semilla producida por los frutos (todos aquellos que presentaban semilla, esta era del tipo no alada); y la fasciación del fruto (ausente en todos los frutos evaluados).



Figura 11. Homogeneidad en la distribución a rayas del color secundario de fruto.

Es importante mencionar la enorme variabilidad encontrada para muchos de los caracteres estudiados en esta colección, lo cual encaja con la gran diversidad genética propia del pepino dulce (Blanca *et al.*, 2007). Aquellos caracteres que destacan por su variabilidad son la forma, color y tamaño de los frutos y las hojas (figuras 6 y 12), y también otros como la forma y coloración de las flores. Un carácter que no fue incluido en los análisis pero que sí que se observó fue la precocidad en la producción del fruto, el cual también presentó una gran variabilidad. De forma general, las plantas pertenecientes a la especie *Solanum muricatum* fueron sensiblemente más precoces que las plantas de las especies silvestres relacionadas.



Figura 12. Variabilidad en forma, tamaño y color de los frutos.

En relación a los caracteres relativos al tamaño y al vigor de la planta (tamaño de planta, longitud de tallo en la primera inflorescencia, vigor y longitud de entrenudos), las especies silvestres presentaron valores mayores que la especie cultivada, lo que señala que esta última da lugar a plantas de menor tamaño que sus ancestros silvestres. Estos, a su vez, presentaban generalmente mayor intensidad de antocianina en el ápice y menor presencia de protuberancias radiculares, pese a que estas se podían encontrar en la gran mayoría de las entradas, silvestres y cultivadas. Algo similar ocurría con la pubescencia en el tallo, siendo este un carácter común a casi todas las entradas, aunque con mayor densidad en las silvestres (figura 13). El color del pecíolo en gran parte de las entradas fue más bien verdoso, aunque otras como 37-A, E-7 y RP-1 presentaban colores cercanos al morado. En el análisis de la densidad foliar se encontró que esta era ligeramente superior en la especie cultivada. La actitud de la hoja fue generalmente horizontal o caída, y solo Otavalo presentó hojas en disposición predominantemente semi-erecta (figura 14). Si bien los valores de longitud y anchura de hoja mostraron que estos eran caracteres variables entre las entradas, el carácter del ratio longitud laminar / anchura laminar sí permitió ver que *Solanum muricatum* presentaba (generalmente) hojas más bien alargadas (figura 14).



Figura 13. Pubescencia en la entrada silvestre E-62



Figura 14. Hojas semi-erectas y alargadas de la entrada cultivada Otavalo

El carácter que hace referencia al tipo de hoja mostró que entre las especies silvestre predomina la hoja compuesta, mientras que en la cultivada se alterna la hoja simple con la compuesta, según la entrada, o incluso dentro de una misma planta. En cuanto al color de las hojas, no se vio ninguna entrada que presentase pigmentación morada, siendo todas las hojas de color verde o verde oscuro. No obstante, sí se vio la coloración de las venas de la hoja con antocianina (principalmente en algunas entradas cultivadas como CH2-22, Valencia y Quito), aunque predominaban las venas verdes en el resto de entradas. En relación a la actitud de la superficie foliar, en las entradas silvestres predominaron las hojas planas (excepto la entrada E-34 de *Solanum trachycarpum*, con hojas intermedias) mientras que en las cultivadas la variabilidad era abundante entre ellas. Por otro lado, el número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia fue comúnmente superior en las especies silvestres.

En cuanto al tipo de inflorescencia de las entradas, en las cultivadas predominaban las inflorescencias múltiparas (con excepciones como Otavalo y Col-1, generalmente uníparas), mientras que en las silvestres eran las uníparas las predominantes (con la excepción de la múltipara E-7). El número de flores que presentaban las plantas por inflorescencia fue un carácter más o menos uniforme, pero se vieron reseñables excepciones con una cantidad bastante superior al resto, como es el caso de las entradas OV-8, E-7 y RP-1, y otras con una cantidad considerablemente inferior, como es el caso de las entradas silvestres E-34 y E-80. En el carácter de la forma de la corola sí se vieron diferencias apreciables entre silvestres y cultivadas, siendo la corola de estas últimas principalmente estrellada (figura 15) y la de las silvestres semi-estrellada o rotada. En cuanto al color de la misma, en las entradas cultivadas predominaban las mezclas de blanco y morado en distintos porcentajes (figura 15), mientras que en las entradas silvestres se encontró una variabilidad considerable, puesto que, aun siendo la mayoría de corola blanca, otras presentaban coloraciones más o menos intensas de morado (E-80, E-62, E-34), llegando a presentar corolas exclusivamente moradas (figura 16). La ejerción del estilo se encontró levemente superior en las especies silvestres (figura 16), algo parecido a lo que ocurre con las especies silvestres de tomate (Herraiz, 2003) ampliamente relacionado con el pepino dulce. Además, en las especies silvestres la producción de polen era ampliamente superior a todas las entradas de *Solanum muricatum*.



Figura 15. Flores de la entrada El Camino, con la corola estrellada y de color blanco y morado combinado.



Figura 16. Larga excreción estilar de la flor de la entrada silvestre E-62, con la corola morada.

La producción de frutos por planta era muy variable entre las entradas, destacando por su alta producción entradas como 37-A y E-34 y por su baja producción entradas como OV-8 y E-80. Cobra mucha importancia la comparación del tamaño del fruto (longitud y anchura, además de la longitud y amplitud del área placentar interna) entre *Solanum muricatum* y el resto de especies salvajes. *Solanum muricatum* presenta frutos mucho mayores en tamaño que las especies silvestres. La explicación de esto viene dada por el proceso de domesticación, por el cual los frutos más grandes son los seleccionados para el cultivo. Las especies silvestres, al no haber sufrido el proceso de domesticación, conservan sus menores tamaños. Los caracteres que hacen referencia a la posición de la parte más ancha del fruto y el ratio longitud de fruto / anchura de fruto ofrecen una idea de cómo es la forma de los frutos. En base a los resultados, se puede concluir que las entradas silvestres presentaban frutos más bien esféricos (figuras 17a y 17b), mientras que las cultivadas presentaban variabilidad al respecto: alargados (figura 17c), cilíndricos (figura 17d), esféricos (figura 17e) o acorazonados (figura 17f).

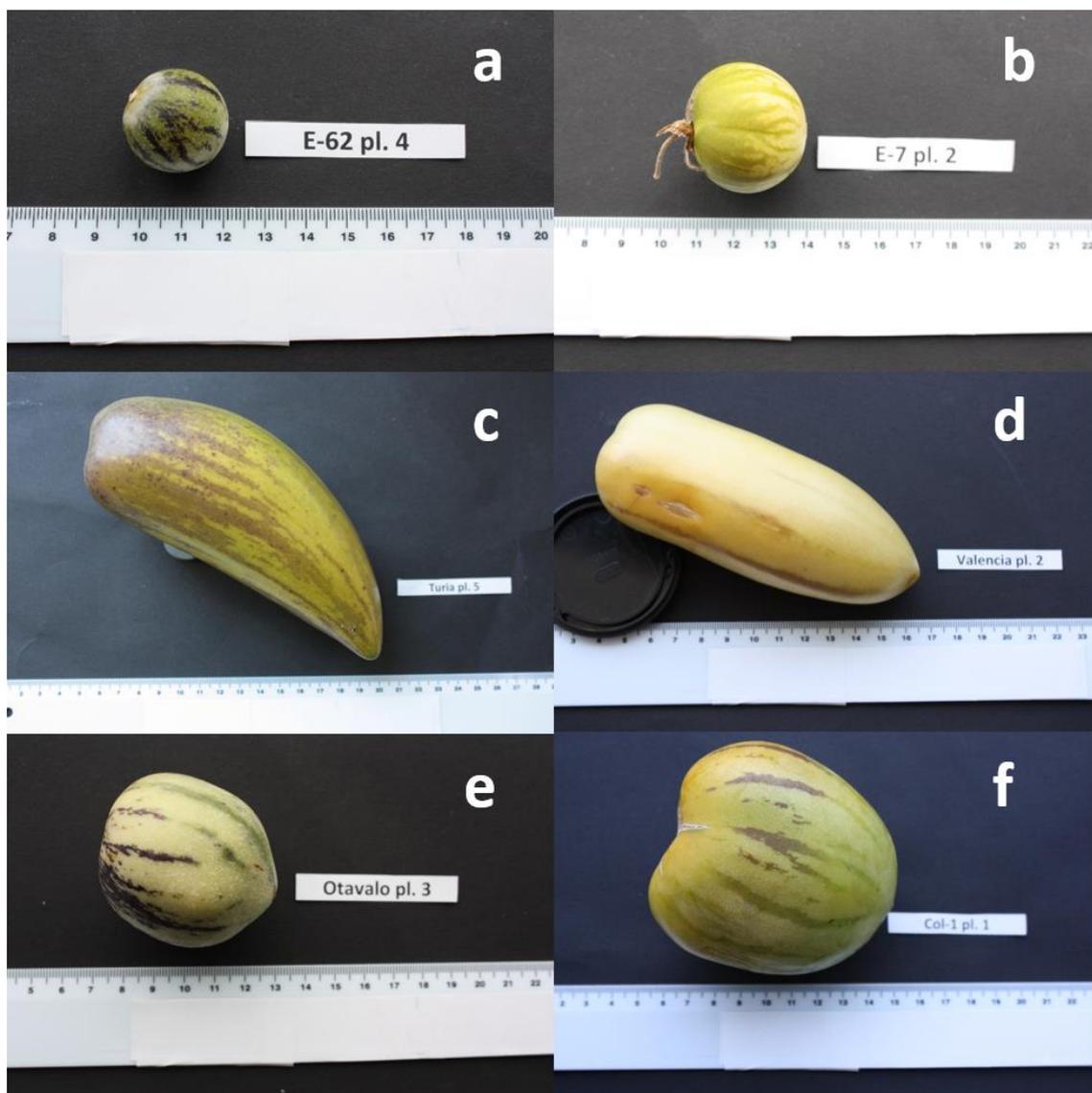


Figura 17. a. Fruto esférico correspondiente a la entrada silvestre E-62 b. Fruto esférico correspondiente a la entrada silvestre E-7. c. Fruto alargado correspondiente a la entrada cultivada Turia d. Fruto cilíndrico correspondiente a la entrada cultivada Valencia e. Fruto esférico correspondiente a la entrada cultivada Otavalo f. Fruto acorazonado correspondiente a la entrada cultivada Col-1.

Los parámetros de color muestran los distintos colores entre la especie cultivada y las silvestres. Mientras que el fruto de *Solanum muricatum* presentaba en estado de madurez colores de fondo amarillos, las silvestres exhibían colores más verdosos. En moteado del color secundario del fruto era escaso, aunque sí se observó en entradas tales como Puzol, Turia y Pt-154 (todas cultivadas, en silvestres no se observó). Por otro lado, el brillo epidérmico del fruto se encontró usualmente superior en las entradas cultivadas. Estas, a su vez, presentaron generalmente un color de carne de fruto anaranjado (figura 18), mientras que las silvestres presentaban colores de carne más verdosos. Las especies silvestres, además, se caracterizaron por su fuerte sabor ácido y presencia de cierto regusto amargo, mientras que todas las entradas de *Solanum muricatum* presentaron un sabor dulce, variando el nivel de dulzor según la entrada. Otro carácter que diferenciaba claramente las entradas cultivadas de las silvestres fue el número de semillas por fruto. La partenocarpia era la tónica general en los frutos de

Solanum muricatum, pese a que algunos de ellos presentaban en su interior alguna semilla aislada. En contraposición, las especies silvestres se caracterizaron por tener abundantes semillas en su interior. Esta marcada diferencia también es consecuencia del proceso de domesticación anteriormente descrito.



Figura 18. Fruto de carne anaranjada y pigmentación de antocianina correspondiente a la entrada cultivada El Camino.

El 'cracking' en el fruto fue característico en de algunas entradas cultivadas como Otavalo y Col-1 (figura 19), y en menor medida de otras como Turia y Pt-154. No se observó en las entradas silvestres, salvo en E-7, en la cual sí era habitual (figura 20). En cuanto al contenido en sólidos solubles, se observó una diferencia considerable entre la especie cultivada y las silvestres, dado el mayor contenido en estas últimas, lo cual encaja con estudios realizados previamente (Prohens *et al.*, 2010). Si comparamos los valores de contenido en sólidos solubles observados con otros estudios (Prohens *et al.*, 2010) se puede observar que los valores obtenidos son inferiores. Esto es debido a que el cultivo se llevó a cabo en la temporada primavera-verano, en la cual se ha visto que el contenido en sólidos solubles en pepino dulce es inferior a dicho contenido si el cultivo se lleva a cabo en la temporada otoño-invierno (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2002).

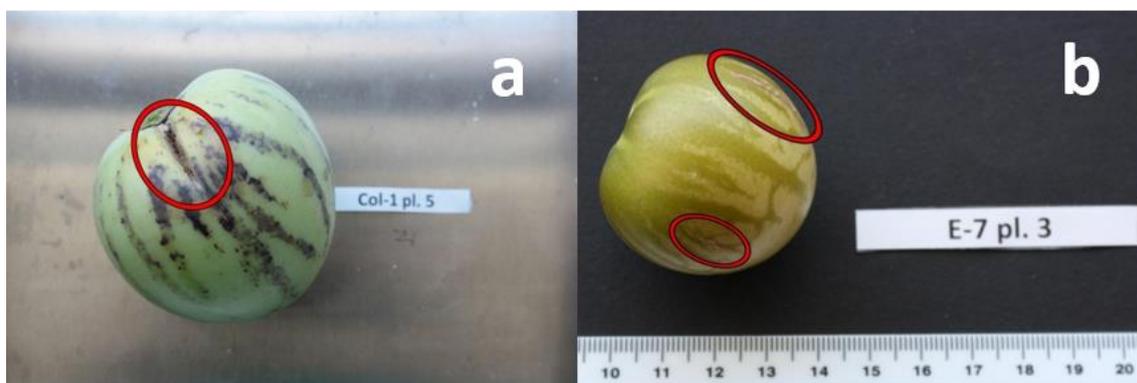


Figura 19. a. 'Cracking' presente en el fruto de Col-1 **b.** 'Cracking' presente en el fruto de E-7

El resto de caracteres presentaron valores muy variables, por lo cual no se pudo extraer con claridad generalidades que englobaran a distintas entradas. Entre estos caracteres se incluyen:

grado de ramificación, color del tallo, longitud del pecíolo, actitud de la hoja, longitud de hoja, anchura de hoja, número de folíolos, longitud del sépalo, longitud del estambre, número de frutos por inflorescencia, uniformidad de tamaño, superficie cubierta por el color secundario, color de semillas, diámetro de las semillas.

Es importante resaltar la importancia del carácter relativo al contenido en sólidos solubles. Cuando el pepino dulce es empleado como fruta de postre, las preferencias de los consumidores europeos y norteamericanos sitúan en 8 °Brix el contenido mínimo en sólidos solubles (Prohens y Nuez, 1999), por lo cual este carácter adquiere importancia desde el punto de vista comercial.

El mínimo de 8 °Brix anteriormente citado, en vista a los resultados de caracterización para cada entrada, solo lo cumplieron 7 entradas (EC-12, QL-003, E-7, Birm S/1034, E-34, E-80 y E-62), las cuales pertenecían todas a especies silvestres o a una hibridación interespecífica entre la especie cultivada y una silvestre, en el caso de EC-12 (la naturaleza de esta entrada se discute más adelante), y ninguna a *Solanum muricatum*. No obstante, es importante señalar que el contenido en sólidos solubles en pepino dulce es considerablemente mayor si este se cultiva en la temporada de otoño-invierno que si se hace lo propio en la temporada de primavera-verano (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2002). En el presente estudio, el ciclo de cultivo fue el de primavera-verano, por lo que los valores de este carácter determinados para cada entrada resultaron inferiores a los determinados en estudios anteriores en los cuales el ciclo de cultivo fue el de otoño-invierno (Prohens *et al.*, 2010; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2002), y podría ser la causa de que ninguna entrada de la especie cultivada superase estos 8 °Brix.

El estudio y utilización de la variación interespecífica para la mejora genética en *Solanum muricatum* en cuanto a contenido en sólidos solubles ha sido analizado en profundidad en distintos estudios previos (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2003; Prohens *et al.*, 2002; Rodríguez-Burruezo, 2002), en los cuales se analizó principalmente las especies silvestres relacionadas *Solanum caripense* y *Solanum tabanoense* para su aprovechamiento en dicha mejora. Estas especies, con un alto contenido en sólidos solubles y además fácilmente cruzables con *Solanum muricatum* (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2003) se consideran muy interesantes para los programas de mejora de *Solanum muricatum*, ya que en aquellos en los que se han empleado la recuperación del peso normal de fruto de pepino dulce se ha alcanzado relativamente rápido, a la par que se ha incrementado en este el contenido en sólidos solubles. Es por ello que tanto *Solanum caripense*, a la cual pertenecen las entradas QL-003, E-7 y Birm S/1034, como *Solanum tabanoense* son especies muy interesantes para lograr incrementar el contenido en sólidos solubles en *Solanum muricatum*, además de mejorar otros muchos caracteres que puedan ser de interés. No obstante, en estos trabajos no se incluyeron las especies correspondientes a las otras entradas que en el presente estudio se comprobó que tienen un alto contenido en sólidos solubles (llegando incluso a superar a las dos especies anteriores): *Solanum trachycarpum* (E-34), *Solanum catilliflorum* (E-80) y *Solanum perlongistillum* (E-62). Por ello, podría resultar interesante llevar a cabo en próximos estudios investigaciones acerca de la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos de estas especies con *Solanum muricatum*, y si fuera posible, llevar a cabo programas de mejora a partir de retrocruzamientos de estos híbridos con la especie cultivada, con la finalidad de ver la

viabilidad de estos programas, según el tiempo invertido y los resultados obtenidos en lo que a nuevas variedades generadas se refiere.

4. 1. 1. *Correlaciones entre caracteres*

El coeficiente de correlación de Pearson mide la relación lineal existente entre dos variables cuantitativas. El hecho de que dos caracteres cuantitativos estén fuertemente correlacionados y midan aspectos similares indica que la medición de uno de ellos puede ofrecer una información suficiente por sí misma, e indica que se podría evitar la medición del segundo carácter, para así no obtener información redundante. De hecho, en la caracterización morfológica que en este estudio se realizó se obvió la toma de datos de algunos caracteres de los cuales se sabía por estudios anteriores que estaban fuertemente correlacionados con otros que sí se midieron, evitando así la obtención de información redundante. Es el caso de la anchura de los pétalos, carácter que no se midió pero que está muy correlacionado con la longitud de los mismos, la cual sí se midió.

En el Anexo IV aparecen indicados todos los valores de correlación de cada carácter con respecto al resto de caracteres, señalándose en rojo aquellos con un valor superior a 0.65 e inferior a -0.65, valor a partir del cual se estimó una validez alta del análisis.

Los resultados mostraron que los caracteres referentes al tamaño de planta, longitud del tallo y la longitud de entrenudos están directamente relacionados entre ellos, como se indica en la tabla.

Tabla 7. Correlaciones entre caracteres relacionados con el tamaño de la planta

	Plant_size	Stem_length
Plant_size		
Stem_length	0,68	
Intern_lenght	0,72	0,79

También se observa alta correlación entre la densidad foliar y el grado de ramificación (0.67), así como entre la densidad foliar y la cantidad de protuberancias radiculares (0.69). Además, la longitud del tallo muestra elevada correlación con el número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia (0.74), los colores de tallo y pecíolo están directamente relacionados (0.72) y también había correlación muy elevada entre el tipo de hojas y el número de folíolos (0.85).

Otra correlación que presenta gran interés es la que existe entre la longitud y la anchura de los frutos (0.69). Encontrar dicha correlación tiene sentido, a pesar de la gran variabilidad encontrada en la forma de estos (esférica, alargada, acorazonada, etc.), ya que el aumento en el tamaño de fruto venía determinado habitualmente por un aumento simultáneo tanto de la longitud como de la anchura del mismo. Además, de entre todas las correlaciones realizadas, aquella que presentaba el mayor valor de correlación fue la que relacionaba la longitud del fruto con la longitud del área placentar interna del mismo, llegando casi a la unidad (0.98). Es de destacar también la correlación existente entre el tamaño de fruto (longitud y anchura) y el

sabor del mismo (0.71 y 0.8, respectivamente), la cual viene claramente justificada porque los frutos más grandes eran los cultivados, los cuales tienen un sabor dulce, mientras que los frutos más pequeños eran los silvestres, los cuales mostraban un sabor claramente ácido.

La producción de polen y el número de semillas por fruto también quedaron correlacionadas (0.7). Esto podría venir dado por el incremento del fenómeno de la autofecundación: las anteras liberan más polen, que caerá en los estigmas de las flores, generándose mayor cantidad de semillas.

Este análisis de todas las correlaciones altamente válidas puede llevar a simplificaciones en caracterizaciones morfológicas de estudios posteriores en pepino dulce. La medición de solo uno de los caracteres de aquellos implicados en la correlación podría evitar la obtención de información redundante, se reduciría el número de caracteres a medir en posteriores ensayos y ello conllevaría un ahorro de tiempo y recursos, agilizando de esta forma los ensayos. El caso más evidente lo encontramos en la última correlación expuesta (longitud de fruto y longitud del área placentar interna), la cual, llegando casi a la unidad, claramente sugiere que son caracteres redundantes, por lo cual bastaría con la medición de uno de ellos.

Cabe mencionar que se han encontrado correlaciones entre caracteres a las cuales no se les ha podido asignar un significado biológico evidente. Dichas correlaciones merecerían quizá un análisis más exhaustivo a nivel morfológico y fisiológico, ya que muy probablemente no sean simple coincidencia y dichas correlaciones cumplan verdaderamente un papel en la planta o tengan una explicación biológica por la cual existe la correlación. No obstante, es también muy probable que al menos alguna de ellas sea simple producto del azar. Para esclarecer esto se debería profundizar con estudios más especializados en ello. Algunos ejemplos de este tipo de correlaciones son: longitud de tallo y forma de la corola de la flor (0.84); número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia y brillo epidérmico de fruto (-0.7); número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia y forma de la corola (0.66).

4. 1. 2. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales permite conocer qué caracteres tienen más influencia en la variabilidad y en qué grado, y las relaciones de las distintas entradas en función de dichos caracteres.

Se llevó a cabo dicho análisis a partir de los datos de la caracterización morfológica, resultando una explicación por parte de la primera componente del 29.06% de la variabilidad total, del 12.91% por parte de la segunda componente y del 9.67% de la tercera componente (tabla 8). Es decir, el porcentaje acumulado de varianza explicado entre las tres primeras componentes es de un 51.64%. Este valor indica que el análisis es sólido y que los resultados derivados del mismo son robustos.

Tabla 8. Análisis de componentes principales, con los porcentajes de varianza de las 3 primeras componentes.

<i>Componente Número</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Porcentaje de Varianza</i>	<i>Porcentaje Acumulado</i>
1	15,4035	29,063	29,063
2	6,84002	12,906	41,969
3	5,12608	9,672	51,641

La tabla de pesos de los 3 primeros componentes (Anexo V) indica que la componente 1 está intensamente relacionada con caracteres vinculados con el vigor de la planta y la producción (longitud de tallo, tamaño de planta, longitud de entrenudos, vigor, número de folíolos, producción de polen, número de frutos por inflorescencia), así como con el tamaño de algunos elementos de la planta (longitud del sépalo, longitud del pecíolo, diámetro de semilla), mientras que se halla negativamente correlacionada con caracteres de color y brillo de fruto.

Por otro lado, la componente 2 se correlaciona positivamente con caracteres de color de fruto y del tallo, con el tipo de hoja, número de folíolos y con la anchura de hoja, además de con caracteres que determinan la arquitectura de la planta (grado de ramificación, número de flores por inflorescencia y número de hojas hasta la primera inflorescencia); se correlaciona negativamente con el tamaño de semilla, el ratio longitud laminar / anchura laminar y con la actitud de las hojas.

La componente 3 está positivamente correlacionada con la presencia de pubescencia en el tallo, actitud y color de la hoja y contenido en sólidos solubles. Se correlaciona negativamente con caracteres relativos al vigor de la planta y la producción (número de folíolos, producción de polen, número de frutos por inflorescencia, densidad foliar, vigor, longitud de la hoja), el grado de ramificación y la presencia de protuberancias radiculares.

La representación en dos dimensiones de la dispersión de las distintas entradas en función de las dos primeras componentes principales, generada a partir del análisis de componentes principales, se muestra en la figura 20.

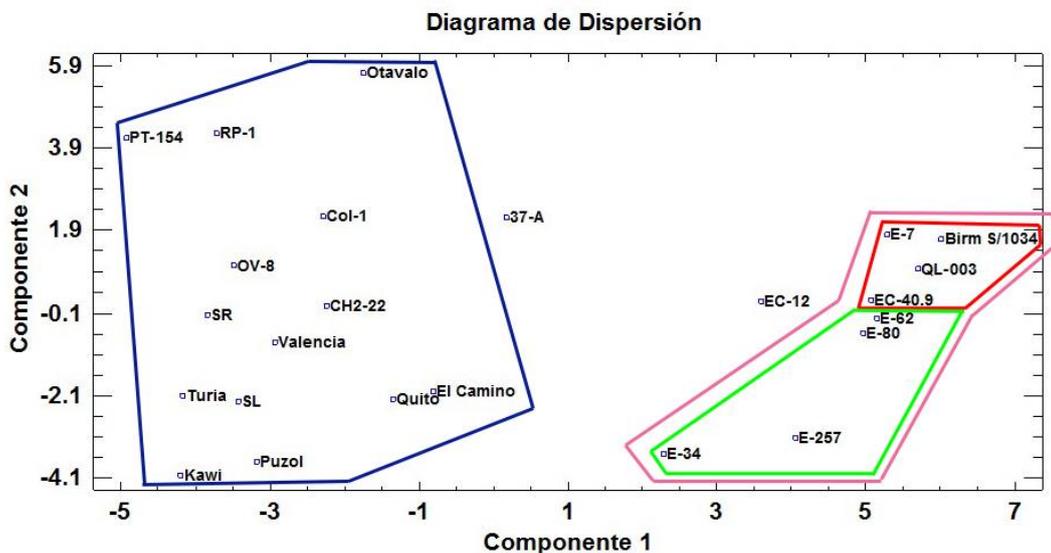


Figura 20. Diagrama de dispersión 2D en función de las dos primeras componentes principales.

La primera componente, representada en el eje X, separa claramente las entradas cultivadas pertenecientes a la especie *Solanum muricatum* (marcadas en azul) de las distintas especies silvestres (marcadas en rosa). Las entradas cultivadas se sitúan a la izquierda del eje, mientras que las silvestres se ubican a la derecha del mismo. Estos son resultados esperables y lógicos, puesto que esta separación de entradas está basada en las características morfológicas de cada una de ellas. Las especies silvestres diferían en gran medida de la cultivada, y ello queda plasmado en este diagrama de dispersión. La entrada EC-12, a pesar de pertenecer teóricamente a la especie *Solanum muricatum*, se sitúa claramente más cerca de las especies silvestres. Si se analizan los resultados morfológicos de esta entrada se puede ver que muchos de sus caracteres se asemejan más a los típicos de especies silvestres (tamaño de fruto pequeño, presencia de semillas en el fruto, alto contenido en sólidos solubles) que a los de la cultivada, y es por ello que su localización en el diagrama de dispersión la sitúa en la zona donde se encuentran las especies cultivadas. Una explicación a la proximidad de esta entrada en cuanto a características a las silvestres es que realmente EC-12 sea un material derivado de la hibridación interespecífica entre la especie cultivada y una silvestre (Blanca *et al.*, 2007).

La segunda componente representada en el eje Y, no logra un patrón de separación tan fácilmente explicable como en el caso de la primera componente. No obstante, en el caso de las especies silvestres se puede observar que la segunda componente separa las entradas pertenecientes a *Solanum caripense* (señaladas en rojo) de las entradas pertenecientes a las otras especies silvestres (marcadas en verde), agrupándose las primeras de forma evidente, dada su proximidad morfológica. En el caso de las especies cultivadas la discusión de las agrupaciones es más complicada. A pesar de ello, se observa que las entradas El Camino, Kawi, Sweet Long, Sweet Round, Puzol, Valencia y Turia quedan por debajo del eje Y. Se tratan todos ellos de cultivares modernos (IPGRI y COMAV, 2004), y en muchos casos emparentados entre sí, como es el caso de Puzol (en cuya obtención participó el cultivar Sweet Round (Prohens *et al.*, 2002)), Valencia (en cuya obtención participó el cultivar Sweet Long (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2004)) o Turia (en cuya obtención participó el cultivar Puzol (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2003)). Ello puede explicar su cercana localización en el diagrama de dispersión.

Cabe destacar de forma aislada la entrada 37-A, perteneciente a la especie *Solanum muricatum*, la cual ocupa una posición intermedia entre ambos grupos. En esta entrada, a pesar de pertenecer a la especie cultivada, se observaron algunas características que podrían considerarse intermedias entre la especie cultivada y sus ancestros silvestres. Un caso muy claro de ello son sus frutos, de un tamaño a caballo entre los pequeños frutos silvestres y los grandes frutos cultivados, con una disposición en la planta en ramillete y con un tamaño muy homogéneo entre ellos. Estas características pueden ser de suma importancia para la mejora genética de la especie, siguiendo la tendencia de las exigencias de los consumidores en otras hortalizas como el tomate. Por ejemplo, el tomate en ramillete ha demostrado tener particularidades con un gran interés desde el punto de vista agronómico. Es decir, el cultivar 37-A de *Solanum muricatum* puede ser uno de los cultivares a tener en cuenta a la hora de afrontar la mejora genética del pepino dulce, por poseer características que pueden resultar atractivas tanto para el productor como para el consumidor, y que no se encuentran en los cultivares típicos de *Solanum muricatum*.

La representación en dos dimensiones de la dispersión de las distintas entradas en función de las componentes 1 y 3, generada a partir del análisis de componentes principales, se muestra en la figura.

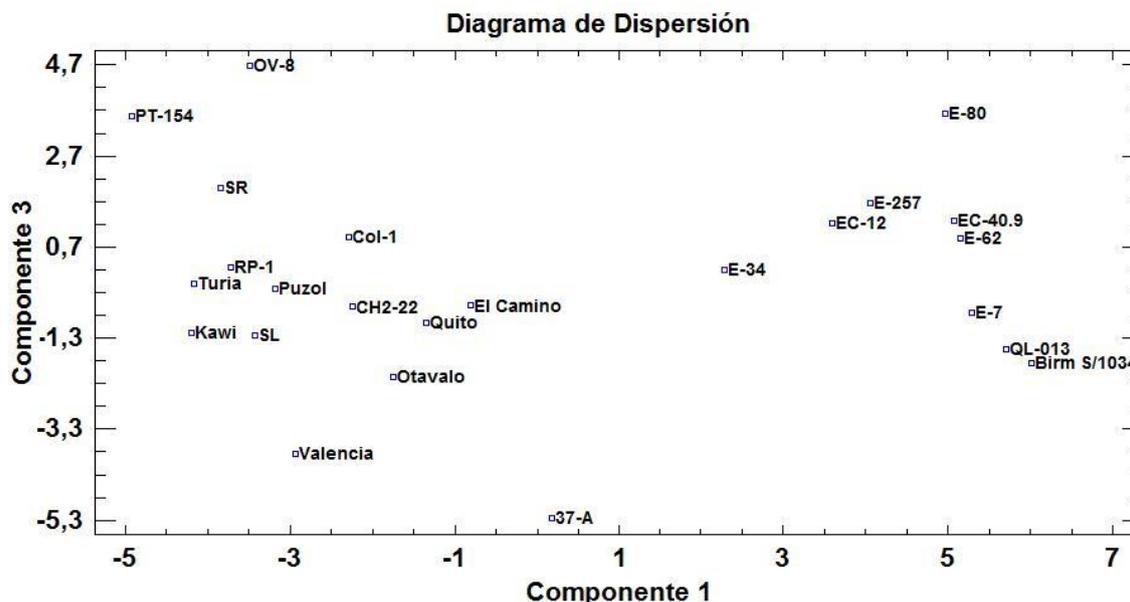


Figura 21. Diagrama de dispersión 2D en función de las componentes 1 y 3.

Con la componente 3, la agrupación más destacable es la relativa a entradas pertenecientes a la especie silvestre *Solanum caripense*, dada la proximidad morfológica comprobada.

4. 2. Caracterización molecular

Se llevó a cabo el análisis de 20 loci microsatélites de tomate, los cuales se había demostrado que amplifican en otras especies relacionadas (Frery *et al.*, 2005). De estos 20 loci se seleccionaron 14 loci que amplificaron correctamente y presentaban polimorfismo (tabla 9). De los 6 loci restantes, 3 no amplificaron (SSR13, SSR51 y SSR136) y 3 no fueron polimórficos en las especies estudiadas (SSR38, SSR248 y SSR150), por lo cual no se seleccionaron.

El número de alelos varió para cada locus, estando comprendido entre 2 alelos para el locus con menor número de ellos y 8 alelos para que con mayor número, con un promedio de 4.07 alelos por locus (tabla 9).

Tabla 9. Relación del número de alelos y tamaño de los mismos encontrados para cada locus microsatélite que amplificó y presentaba polimorfismos.

Nombre locus	Nº total de alelos	Tamaño de los alelos (pb)
SSR52	3	201, 205, 210
SSR285	4	281, 290, 293, 297
SSR128	5	158, 161, 164, 167, 170
SSR20	8	188, 191, 194, 197, 200, 203, 205, 206
SSR45	6	153, 156, 159, 161, 164, 169
SSR578	2	324, 327
SSR80	2	225, 227

SSR111	4	211, 215, 218, 223
SSR306	6	259, 263, 266, 268, 270, 276
SSR593	4	288, 291, 294, 297
SSR590	4	215, 219, 223, 233
SSR43	4	234, 237, 240, 243
SSR14	3	175, 178, 181
SSR66	2	245, 248

Analizando la tabla de loci con sus respectivos alelos para cada entrada (Anexo VI) resultante de las pruebas molecular realizadas se pueden extraer una serie de generalidades que describirían a grandes rasgos estos resultados moleculares.

En el caso del análisis de los alelos presentes en los loci de la especie cultivada, *Solanum muricatum*, se puede apreciar que muchas de las entradas correspondientes a esta especie comparten mayormente los mismos alelos, es decir, son monomórficas entre ellas. Además, se encontró que predominan los loci homocigotos, es decir, con dos copias del mismo alelo. El proceso de domesticación, como se sabe, conduce a la homogeneidad genética entre las poblaciones (Harlan, 1992), y esto es lo que podría explicar dicho monoformismo entre loci y el alto grado de homocigosis de entradas correspondientes a la misma especie cultivada. No obstante, existen entradas que no siempre siguen el patrón monomórfico del resto. Un ejemplo claro de esto es la entrada EC-12, la cual en prácticamente ningún loci comparte el mismo patrón alélico que las otras *muricatum*, excepto en los loci SSR20, SSR45 y SSR66, en los cuales lo comparte, además, con la mayoría de especies silvestres. Esto podría indicar que EC-12 no corresponde verdaderamente a la especie *Solanum muricatum*, ya que difiere considerablemente en el aspecto molecular, además de en el morfológico, como se ha explicado en la caracterización morfológica. Además, esta hipótesis puede verse reforzada por el hecho de que comparte muchos de los alelos con las especies silvestres, como en el locus SSR52 con E-34, en el locus SSR285 con EC-40.9, en el locus SSR80 con E-257, E-34, E-80, E-62, QL-003, E-7 y Birm-S/1034 o en el locus SSR593 con EC-40.9 y E-62.

Es también reseñable el caso de 37-A, la cual, si bien en algunos loci coincide en cuanto a alelos con la gran mayoría del resto de entradas de *Solanum muricatum* (loci SSR52, SSR128, SSR45, SSR578, SSR11, SSR14 Y SSR66), en otros no se corresponde con ellos (loci SSR285, SSR80, SSR306, SSR593 y SSR43) pero sí con los alelos de algunas de las entradas silvestres. Esta evidente mezcla alélica entre *Solanum muricatum* y las especies silvestres puede hacer indicar que la entrada 37-A es un híbrido entre *muricatum* y una especie silvestre, lo que a su vez explicaría sus características morfológicas intermedias entre cultivada y silvestre, anteriormente citadas.

Otras entradas pertenecientes a la especie cultivada también difieren en ocasiones del patrón alélico en aquellos loci donde predomina el monomorfismo en *Solanum muricatum*. Es el caso de Otavalo (loci SSR20, SSR578, SSR80, SSR43), Col-1 (loci SSR285, SSR111, SSR306, SSR43), Pt-154 (loci SSR52, SSR20, SSR306), RP-1 (loci SSR128, SSR20, SSR593), OV-8 (locus SSR20), CH2-22 (locus SSR45), Kawi (loci SSR578, SSR80) y Valencia (locus 578). No obstante, en la mayor parte de estos casos sí compartían uno de los dos alelos con aquellos de la tendencia monomórfica. Las entradas consideradas como cultivares modernos (El Camino, Kawi, Sweet

Long, Sweet Round, Puzol, Valencia y Turia (IPGRI y COMAV, 2004)), con pequeñas variaciones en loci aislados, coinciden en sus alelos y establecen el patrón monofórico propiamente encontrado en la especie cultivada.

En cuanto a las especies silvestres, el grado de polimorfismo y de heterocigosis aumenta considerablemente al compararlo con el de las entradas de la especie cultivada. No obstante, sí se puede diferenciar una clara tendencia por parte de las entradas de *Solanum caripense* a coincidir en muchos de sus alelos, dejando así patente su natural cercanía genética, e incluso en bastantes loci todas las entradas *caripense* poseen al menos uno de sus alelos iguales, como es el caso de los loci SSR52, SSR20, SSR578, SSR111, SSR590, SSR43, SSR14 y SSR66. En los otros loci también se observan similitud en cuanto a alelos entre estas entradas, con la excepción de los loci SSR128 y SSR45, donde sí se observa un alto grado de polimorfismo entre ellas.

Las otras entradas silvestres, E-257 (*Solanum tabanoense*), E-34 (*Solanum trachycarpum*), E-80 (*Solanum catilliflorum*) y E-62 (*Solanum perlongystilum*) llegaron a resultar en algunos loci (SSR578, SSR80, SSR590, SSR66) completamente monomórficas, aunque en el resto de loci la tónica general es la discrepancia polimórfica en al menos una de ellas. En cuanto a coincidencia de alelos, en algunos casos los alelos de estas especies coinciden con el monomorfismo de las *muricatum*, mientras que en otros lo hacen con los alelos recurrentes de las *caripense*.

Es de resaltar la presencia de los loci que presentan un carácter altamente polimórfico y heterocigoto y, por lo tanto, más informativos en cuanto a la variabilidad intra e interespecífica. El caso más claro es el del locus 4, en el cual se distinguen hasta 8 alelos distintos, siendo uno de ellos el mayoritario (203) acompañado por otro alelo distinto (elevada heterocigosis). En este locus se encuentran hasta 6 combinaciones alélicas distintas solo en *Solanum muricatum* y 3 en *Solanum caripense* (de las 4 entradas analizadas de esta especie), lo que demuestra la alta variabilidad que existe en esta posición genética.

El locus 9 también es altamente variable, existiendo hasta 5 combinaciones alélicas distintas en *Solanum muricatum* y también 5 entre 7 entradas distintas referentes a las especies silvestres.

A su vez, existen loci que son altamente monomórficos entre las entradas de *Solanum muricatum* pero polimórficos en las especies silvestres. Es el caso de los loci SSR128, SSR80, y SSR306 y SRR593 en menor medida, donde con una homocigosis en la especie cultivada relativamente alta, las especies silvestres presentan un grado de polimorfismo más o menos elevado. Por el contrario, los loci SSR578 y SSR590 se caracterizan por un monomorfismo elevado dentro del grupo *caripense* y también dentro del grupo de las otras entradas silvestres y una alta variabilidad entre las entradas de *Solanum muricatum*.

El locus SSR66 es el más monomórfico de todos, ya que todas las entradas comparten los mismos alelos en homocigosis, con una única excepción: la entrada QL-003, de *Solanum caripense*, que es heterocigota, presentando otro alelo más aparte del compartido por todas las entradas.

4. 2. 1. Análisis de coordenadas principales

Se llevó a cabo el análisis de coordenadas principales a partir de una matriz de distancias genéticas (Nei, 1974) entre las distintas entradas, resultando una explicación por parte de la primera coordenada del 39.38% de la variabilidad total, del 13.5% por parte de la segunda coordenada y del 10.36% de la tercera coordenada (tabla 10). Es decir, el porcentaje acumulado de varianza explicado entre las tres coordenadas es de un 63.24%. Un valor alto como este da a entender que la robustez del análisis es alta, por lo que la base sobre la que construir las conclusiones derivadas del mismo es consistente.

Tabla 10. Porcentaje de variación explicada por las 3 primeras coordenadas

Coordenada	1	2	3
Porcentaje	39.38	13.5	10.36
Porcentaje acumulado	39.38	52.88	63.24

El análisis de las dos primeras coordenadas principales se muestra en la figura 22.

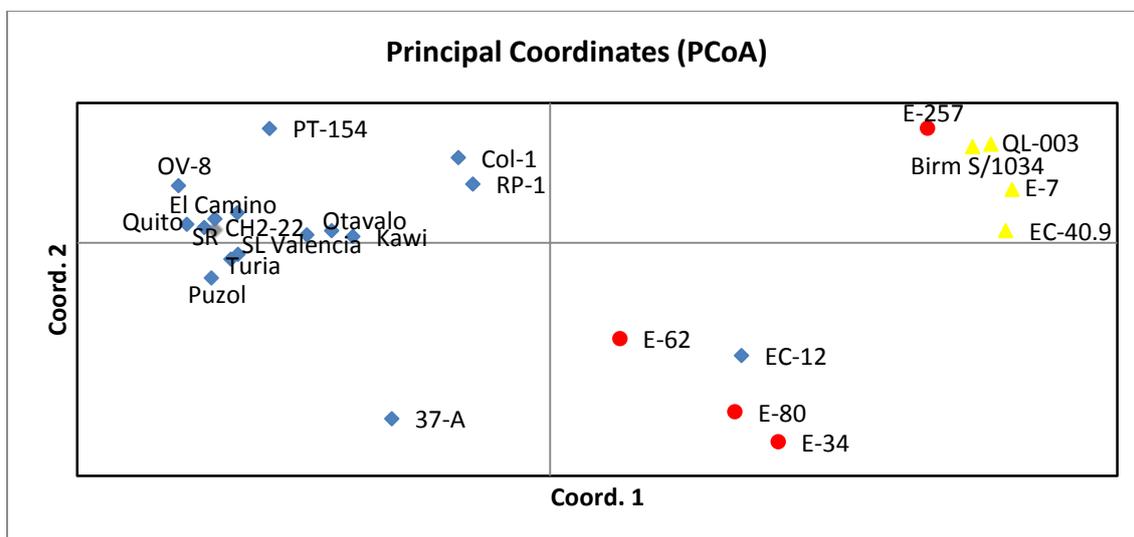


Figura 22. PCoA realizado a partir de la matriz de distancias genéticas entre las distintas entradas, en función de las dos primeras coordenadas. Los rombos representan las entradas de *Solanum muricatum*; los triángulos, las entradas de *Solanum caripense*; los círculos, el resto de entradas silvestres.

La explicación de la variación por parte de la primera coordenada es la mayor de todas (39.38%), y como se puede ver en la figura, esta coordenada permite la separación entre las entradas pertenecientes a la especie cultivada, *Solanum muricatum*, de las entradas correspondientes a las entradas silvestres, con la excepción de la entrada EC-12, que quedó agrupada junto con las especies *Solanum trachycarpum*, *Solanum catilliflorum* y *Solanum perlongystilum*. La discusión de la significancia de esta primera coordenada es muy similar a la realizada con la primera componente del análisis de componentes principales. Las entradas de la especie cultivada se ubican a la izquierda de la primera componente, dada la proximidad genética que describen los distintos loci existente entre ellas. Las entradas silvestres E-62, E-80 y E-34, junto con EC-12, se sitúan cercanas entre ellas, mientras que las entradas pertenecientes a la especie *Solanum caripense*, junto con E-257 (*Solanum tabanoense*) se agrupan muy a la derecha de la primera coordenada. Este grupo se forma, además de por la

patente proximidad genética de las entradas de *Solanum caripense*, debido a que ambas especies, *Solanum caripense* y *Solanum tabanoense*, pueden ser especies cercanas genéticamente, como ya se mostró en estudios anteriores (Blanca *et al.*, 2007). Además, se ha visto que estas dos especies cruzan bien, dando híbridos con fertilidad relativamente alta (Anderson, 1979).

En el análisis de la coordenada 2, y al igual que sucede en el de la segunda componente del análisis de componentes principales, se vuelve a observar cómo la entrada 37-A se sitúa lejana del resto de entradas de *Solanum muricatum*. Esto podría explicar, ahora a nivel molecular, parte de las diferencias morfológicas evidentes de esta entrada con el resto, como son el tamaño de fruto y su disposición en ramillete. Además, y siguiendo con la especie cultivada, las especies modernas y emparentadas entre sí, enumeradas en el análisis de caracterización morfológica, vuelven a quedar muy próximas entre ellas. En cuanto a las entradas silvestres, y al igual que sucedía con la coordenada 1, esta segunda coordenada vuelve a separar a *Solanum caripense* del resto de especies silvestres, con la excepción, de nuevo, de *Solanum tabanoense*.

El análisis de las coordenadas 1 y 3 se muestra en la figura 23.

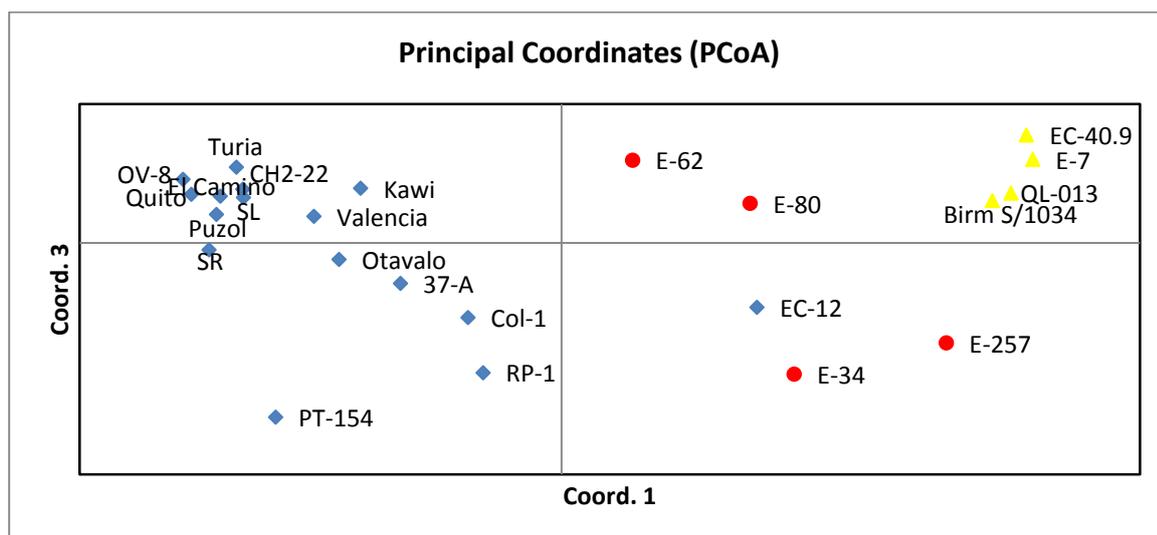


Figura 23. PCoA realizado a partir de la matriz de distancias genéticas entre las distintas entradas, en función de las coordenadas 1 y 3. Los rombos representan las entradas de *Solanum muricatum*; los triángulos, las entradas de *Solanum caripense*; los círculos, el resto de entradas silvestres.

Nuevamente, la coordenada 3 agrupa a las entradas correspondientes a *Solanum caripense*: EC-40.9, E-7, QL-003 y Birm S/1034. Además, las entradas consideradas como cultivares modernos de *Solanum muricatum* quedan completamente agrupadas entre ellas.

Todas estas coincidencias encontradas en los análisis de componentes principales y de coordenadas principales no hacen más que reafirmarse entre sí y dar consistencia a los resultados obtenidos. Es por ello que, para estudiar más en profundidad la relación entre la variación morfológica y la variación genética halladas, se llevó a cabo un test de Mantel, con el fin de encontrar las correlaciones existentes entre ambas matrices de distancias, la morfológica y la genética.

La recta de regresión generada a partir de dicho test de Mantel se muestra en la figura 24.

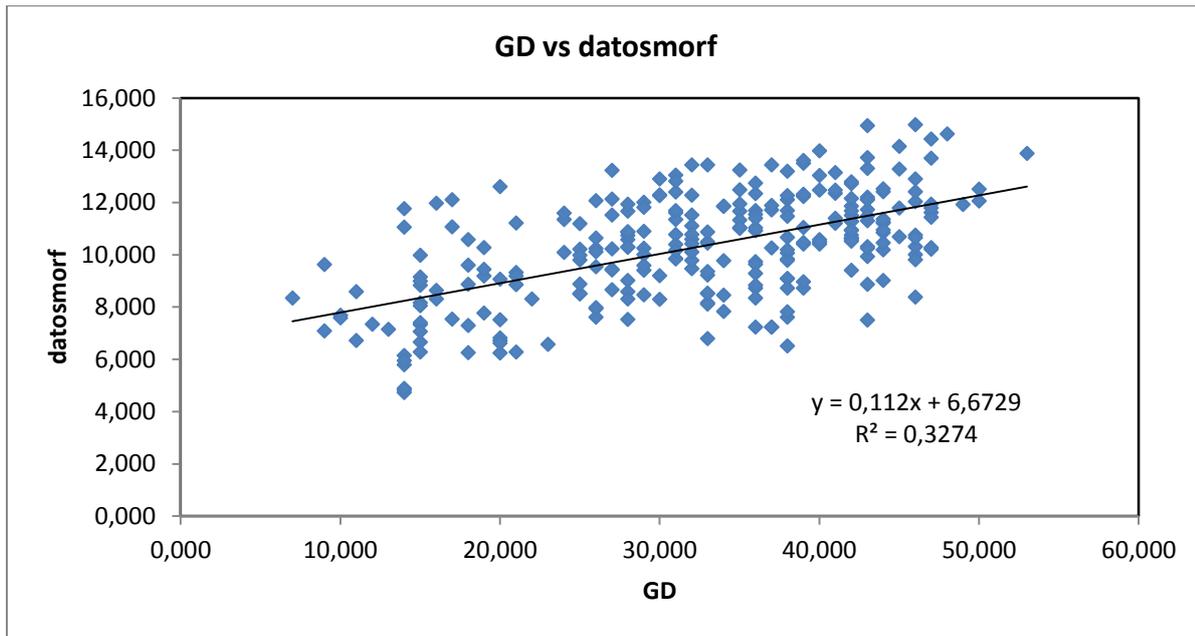


Figura 24. Gráfica matriz de distancias genéticas (eje X) vs matriz de distancias morfológicas (eje Y), con su correspondiente recta de regresión, ecuación de la misma y valor de R^2 .

Se puede observar cierta relación directa entre los datos morfológicos y los moleculares, ya que los puntos quedan claramente orientados hacia una dirección y parcialmente agrupados. El valor de R^2 nos indica esto mismo, ya que a pesar de no ser un valor alto, sí indica que entre los datos de ambos ejes está presente una relación.

5. Conclusiones

5. 1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

- La caracterización morfológica dejó patente la gran variabilidad existente tanto dentro de *Solanum muricatum* como entre esta y sus especies relacionadas.
- La alta variabilidad encontrada en las especies silvestres pueden suponer un reservorio de genes de interés para la mejora genética del pepino dulce. Un ejemplo de esto es el elevado contenido en sólidos solubles.
- Los resultados del análisis de correlaciones entre caracteres puede simplificar la realización de futuras caracterizaciones morfológicas de pepino dulce, gracias a la medición de solo uno de los caracteres implicados en la correlación.
- El análisis de componentes principales obtenido mediante esta caracterización explicó un alto porcentaje de esta variación (51.64%). Son los caracteres relacionados con el vigor, producción y tamaño de los órganos los mayores responsables de esta variación. La primera componente de este análisis separa claramente a *Solanum muricatum* de las especies silvestres. La segunda componente separa, dentro de las especies silvestres, aquellas entradas pertenecientes a *Solanum caripense*, posible ancestro silvestre del pepino dulce.

5. 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

- Generalmente, se encontró un alto grado de monomorfismo en las entradas pertenecientes a *Solanum muricatum*, los loci de las cuales, además, presentaban un elevado grado de homocigosis, probablemente debido al proceso de domesticación propio de especies cultivadas.
- El grado de polimorfismo y heterocigosis en las especies silvestres fue considerablemente superior a los de la especie cultivada. Por su parte, las entradas de *Solanum caripense* sí presentaban mayor coincidencia alélica entre ellas.
- El análisis de coordenadas principales dio como resultado una explicación de la variabilidad molecular total de 63.24% entre las 3 primeras coordenadas. La primera separaba las entradas pertenecientes a *Solanum muricatum* de las entradas silvestres, y dentro de estas últimas, las *caripense* del resto de silvestres. La segunda coordenada separa la entrada 37-A del resto de entradas *muricatum*, y las *caripense* del resto de entradas silvestres.
- El test de Mantel pone de manifiesto que existe relación entre las distancias morfológicas (obtenidas a partir de los resultados morfológicos) y las distancias genéticas (obtenidas a partir de los resultados moleculares).
- La variabilidad observada a nivel intra e interespecífico en las caracterizaciones morfológica y molecular llevadas a cabo puede abrir nuevas vías en futuros proyectos de mejora genética en pepino dulce

6. Bibliografía

- ACOSTA, J. (1590, ed. 1987). *Historia natural y moral de las Indias*. Vol. 1. Hispano-Americana de Publicaciones, Sevilla, España.
- AITON, W. (1789). *Hortus kewensis, or a catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew*. Vol. 1.
- ANDERSON, G.J. (1975). The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum*. *Brittonia*, 27: 209-222.
- ANDERSON, G.J. (1977). The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). II. *Brittonia*, 29: 116-128.
- ANDERSON, G.J. (1979). Systematic and evolutionary consideration of *Solanum* section *Basarthurum*. *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Linnean Society Symposium Series Nº7. Londres, Reino Unido. 549-562.
- ANDERSON, G.J.; BERNARDELLO, L.M. (1991). The relationships of *Solanum cochoae* (Solanaceae), a new species from Peru. *Novon*, 1: 127-13.
- ANDERSON, G.J.; JANSEN, R.K. (1995). *Contributions to the study of the origin and relationships of the "Pepino dulce"*, *Solanum muricatum*. Abstract of the Annual Meeting of the Botanical Society of America, 16. San Diego, California, Estados Unidos.
- ANDERSON, G.J.; JANSEN, R.K. (1998). Biosystematic and molecular systematic studies of *Solanum* section *Basarthurum* and the origin and relationships of the pepino dulce (*S. muricatum*). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 68: 17-32.
- ANÓNIMO. (1892). The pepino, *Solanum muricatum* – Recent publications. *Garden and forest*, 5: 95-96.
- ANÓNIMO. (1903). Melon-pear. *Gardeners' Chronicle*, 34: 160.
- AZOFEITA-DELGADO, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía meesoamericana* 17(2): 221-242.
- BACCARINI, P. (1908). Il pera-melone (*Solanum muricatum* Ait.). Una nuova pianta da frutto da coltivarci in Italia. *Bolletino della Reale Società Toscana di Orticultura*, 33: 327-331.
- BANCO GERMOPLASMA DEL INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD VALENCIANA (COMAV). <http://www.comav.upv.es/index.php/es/servicios-54/germoplasma-es>
- BERNARDELLO, L.M.; ANDERSON, G.J. (1990) Karyotypic studies in *Solanum* section *Basarthurum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 77: 420-431
- BITTER, G. (1913). Zur Stammesgeschichte der Formen des *Solanum muricatum*. *Feddes Repertorium*, 12: 441:444.
- BLANCA, J.M.; PROHENS, J.; ANDERSON, G.J.; ZURIAGA, E.; CAÑIZARES, J.; NUEZ, F. (2007). AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): implications for evolution and domestication. *American Journal of Botany* 94(7): 1219-1229.
- BRAVO, A.; ARIAS, E. (1983). Cultivo del pepino dulce. Antecedentes agronómicos y económicos. *El campesino* 114(3): 15-34.
- BRAVO, A.; ARIAS, E.; (1983). Cultivo del pepino dulce. Antecedentes agronómicos y económicos. *El campesino* 114(3): 15-34.
- BRÜCHER, H. (1966). *Solanum caripense* HBK (Subsect. *Basarthurum*) in Venezuela. *Feddes Repertorium*, 73(3): 216-221.

- BRÜCHER, H. (1968). Die genetischen Reserven Südamerikas für die Kulturpflanzenzüchtung. *Theoretical and Applied Genetics*, 38: 9-22.
- BRÜCHER, H. (1970). Chromosomenzahlen argentinischer, chilenischer and venezolanischer Wildkartoffeln (*Solanum* sect. *Tuberarium*). *Cytologia*, 35: 153-170.
- BUKASOV, S.M. (1930). The cultivated plants of Mexico, Guatemala and Colombia. *Bulletin of applied botany, genetics and plant breeding*, Supplement 47.
- CIFUENTES. (1981). Ontogenia y etiología de *Symmetrischema plaesiosema* (Turner) (*Lepidoptera Gelechiidae*) en pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.). Tesis Intengiero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.
- COSSIO, F. (1988). Il pepino (*Solanum muricatum* Ait.): aspetti culturali, problemi e prospettive. *Frutticoltura*, 50(10): 67-76.
- DAWES, S.N.; PRINGLE, G.J. (1983). Subtropical fruits from South and Central America. *Plant breeding in New Zealand*: 33-35.
- DELGADO DE LA FLOR, B. (1988). Pepino. *Cultivos hortícolas*: 73-75. Datos básicos. Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú.
- DENNIS, D.J.; BURGE, G.K.; LILL, R. (1985). *Pepinos: cultural techniques*. New Zealand Ministry of Agriculture and Fishery. Aglink HPP 208, 2 pp.
- DOLBY, C.A.; JONES, R.A.C. (1988). The relationship between the Andean strain of potato virus and pepino latent virus. *Annals of Applied Biology*, 112: 231-234.
- DOYLE J.J.; DOYLE J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull* 19: 11-15
- ENDT, R. (1983). Toma: a new pepino variety from Chile. *Orchadist of New Zealand*, 56(5): 163-169.
- ESQUIVEL, M.; HAMMER, K. (1991). The cultivated species of the family *Solanaceae* in Cuba. *Solanaceae* III; Taxonomy, Chemistry, Evolution: 357-364.
- FAO. (2010). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura* 4C: 393-416.
- FOUQUÉ, A. (1973). Espèces fruitières d'Amérique tropicale. Famille des Solanacées. *Fruits* 28: 41-49.
- GOUBRAN, F.H. (1985). *Growing and marketing of pepinos*. Department of Agriculture, Victoria Agnote Agdez 268/11, 3 pp.
- GREGOR MENDEL. (1865). Experimentos en la hibridación de las plantas.
- HARLAN, J.R. (1992). *Crops and Man*. Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- HEISER, C.B. (1964). Origin and variability of the pepino (*Solanum muricatum*): A preliminary report. *Baileya*, 12:151-158.
- HEISER, C.B. (1985). *Of plants and people*. University of Oklahoma Press, Norman, Oklahoma, Estados Unidos.
- HERRAIZ, F. J. (2003). Análisis de la variación de poblaciones de *Lycopersicon pimpinellifolium* colectadas tras el fenómeno de El Niño 1997-98. Trabajo Final de Carrera ETSIA, Universitat Politècnica de València, Valencia, España.
- HIDALGO, A. (2006). Proyecto de exportación del pepino dulce al mercado alemán. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador.

- HUNTER L, a, b APLICACIONES NOTE. (2008).
- IPGRI; COMAV. (2004). Descriptors for pepino (*Solanum muricatum*). International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia, e Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Valencia, España.
- JONES, R.A.C.; KOENING, R.; LESEMANN, D.E. (1980). Pepino mosaic virus, a new potex virus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, 94: 61-68.
- JONES, R.A.C.; LOCY, R.; DYER, P. (1986). Eradication of PLRV from *Solanum tuberosum* and *Solanum muricatum* by chemotherapy of axillary buds. *Phytopathology*, 76(10): 1122.
- LESTER, R.N. (1991). Evolutionary relationships of tomato, potato, pepino and wild species of *Lycopersicon* and *Solanum*. *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*, 283-301.
- MAPA. (1993a). *Relación de especies americanas introducidas en España desde mediados del siglo XVIII hasta principios del siglo XIX*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- MAPA. (1993b). *Las enfermedades del tomate: bases para el control integrado*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- MARTIN, N.A. (1981). Pepino: insect and mite control. *New Zealand Summary of Vegetable Research, 1980-1981*: 56-57.
- MATUS, S.M. (1983). Efecto de la madurez y calibre en la calidad de pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.) apertizado como pulpa y en mitades. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.
- MEJÍA, L. (1984). El cultivo del pepino dulce en el valle del Cañete. Guía de referencia 29. Instituto Rural, Valle Grande, Perú.
- MORLEY-BUNKER, M.J.S. (1983). A new commercial crop, the pepino (*Solanum muricatum*, Ait.) and suggestions for further development. *Annual Report of the Royal New Zealand Institute of Horticulture*, 11: 8-19.
- MURRAY, B.G.; HAMMETT, K.R.W.; GRIGG, F.D.W. (1992). Seed set and breeding system in the pepino *Solanum muricatum*, Ait., Solanaceae. *Scientia Horticulturae*, 49: 83-92.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1989). Lost crops of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist* Vol. 106, No 949.
- NUEZ F.; MORALES, R.; RUIZ, J.J.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOBA, P.; VALDIVIESO, E.; GONZÁLEZ, F.I.. (1993). Recolección de especies hortícolas en Ecuador. FAO/IPGRI Plant Genetic Resources Newsletter 96, 29-33.
- NUEZ F.; RUIZ J.J. (1996). El pepino dulce y su cultivo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- OETTING, W.S.; LEE, H.K.; FLANDERS, D.J.; WIESNER, G.L. (1995). Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30:450-458.
- PATÍÑO, V.M. (1963). *Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial*. Vol. 1.
- PÉREZ-BENLLOCH, L.; PROHENS, J.; SOLER, S.; NUEZ, F. (2001). Yield and fruit quality losses caused by ToMV in pepino (*Solanum muricatum* Ait.) and search for sources of resistance. *Euphytica* 120: 247-256.

- PICCA, A.; HELGUERA, M.; SALOMÓN, N.; CARRERA, A. Marcadores moleculares. *Biotecnología y mejoramiento vegetal* 4: 61-68
- PLUDA, D.; RABINOVITCH, H.D.; KAFKAKI, U. (1993a). Pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.) quality characteristics respond to nitrogen nutrition and salinity. *Journal of America Society Horticulture Science* 118: 86-91.
- PLUDA, D.; RABINOVITCH, H.D.; KAFKAKI, U. (1993b). Fruit set and yield of pepino dulce response to nitrate-nitrogen and salinity levels and thinning of side branches and trusses. *Journal of plant nutrition* 16: 2121-2133.
- PROHENS, J.; ANDERSON, G.J.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; NUEZ, F. (2003). Exploiting wild species for the genetic improvement of the pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Applied Botany* 77: 21-27.
- PROHENS, J.; ANDERSON, G.J.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; NUEZ, F. (2003). Exploiting wild species for the genetic improvement of pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Applied Botany* 77: 21-27.
- PROHENS, J.; FITA, A.; PLAZAS, M.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. (2010). Introduction and adaptation of the Andean *Solanum muricatum* as a new crop for the Mediterranean region. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1).
- PROHENS, J.; LEIVA-BRONDO, M.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; NUEZ, F. (2002). 'Puzol': a facultatively parthenocarpic hybrid of pepino (*Solanum muricatum*). *Hortscience* 37(2): 418-419.
- PROHENS, J.; NUEZ, F. (1999). Strategies for breeding a new greenhouse crop, the pepino (*Solanum muricatum*). *Can. J. Plant.* 79: 299-305.
- PROHENS, J.; RUIZ, J.J.; NUEZ, F. (1996). The pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): a "new" crop with a history. *Economic Botany* 50: 255-268.
- PROYECTO DE EXPORTACIÓN DEL PEPINO DULCE AL MERCADO ALEMÁN", Alexandra Hidalgo, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, 2006
- REDGWELL, R.J.; TURNER, N.A. (1986). Pepino (*Solanum muricatum*): Chemical composition of ripe fruit. *Journal of Science Food Agriculture* 7: 1217-1222.
- REN, W.P.; TANG, D.G. (1999). Extract of *Solanum muricatum* (pepino/CSG) inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Anticancer Res.* 19 (1A): 403-408
- RENTERÍA ALCÁNTARA, M. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Las herramientas moleculares* 18: 541-566.
- RODRÍGUEZ BURRUEZO, A.; KOLLMANNBERGER, H.; PROHENS, J.; NITZ, S.; NUEZ, F. (2004). *Journal of Agriculture Food Chemistry* 52: 5663-5669.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. (2002). Utilización de la variación intraespecífica e interespecífica para la mejora genética del rendimiento y la calidad del pepino dulce (*Solanum muricatum*). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 239 pp.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; PROHENS, J.; LEIVA-BRONDO, M.; NUEZ, F. (2003). Turia Pepino. *Canadian Journal of plant science*: 603-606.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (2002). Genetic Analysis of Quantitative Traits in Pepino (*Solanum muricatum*) in Two Growing Seasons. *Journal of America Society Horticulture Science* 127(2): 271-278.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (2003). Wild relatives can contribute to the improvement of fruit quality in pepino (*Solanum muricatum*). *Euphytica*, 129: 312-318.

- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (2004). 'Valencia': a new pepino (*Solanum muricatum*) cultivar with improved fruit quality. *Hortscience* 39(6): 1500-1502.
- RUIZ, H., PAVÓN, J. (1799, ed. 1957). *Flora peruviana et chilensis*. Vol. 2.
- RUIZ, J.J.; NUEZ, F. (1997). The pepino (*Solanum muricatum* Ait.), an alternative crop for areas affected by moderate salinity. *Hortscience* 32: 649-652.
- RUIZ, J.J.; PROHENS, J.; NUEZ, F. (1997). 'Sweet Round' and 'Sweet Long': two pepino cultivars for Mediterranean climates. *Hortscience* 32(4): 751-752.
- RUIZ-BEVIÁ, F.; FONT, A.; GARCÍA, A.N.; BLASCO, P.; RUIZ, J.J. (2002). Quantitative analysis of the volatile aroma components of pepino fruit by purge-and-trap and gas chromatography. *Journal of Science Food Agriculture* 82: 1182-1188.
- SAKAMOTO, K.; TAGUCHI, T. (1991). Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 509-513.
- SÁNCHEZ-VEGA, I. (1992). Frutales andinos: Pepino dulce (*Solanum muricatum* Ait.). Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1492: 179-183.
- SCHULTES, R.E.; ROMERO-CASTAÑEDA, R. (1962). Edible fruits of *Solanum* in Colombia. *Harvard University Botanical Museum Leaflets*, 19: 235-286.
- SCHWARTZ, M.M.; NÚÑEZ, K.H. (1988). Preparación de zumo pasteurizado de pera melón (*Solanum muricatum* Ait.). *Alimentos* 13: 31-34.
- SEITHE, A.; ANDERSON, G.J. (1982). Hair morphology and the systematic of *Solanum* section *Basarthurum*. *Plant Systematic and Evolution*, 139: 229-256.
- TIOUTINE, M.G. (1937). Le melon-poire, *Solanum muricatum* Ait. *Revue horticole*, 109:611-615.
- VAN DER VLUGT, R. (2010). Pest risk analysis for *Pepino mosaic virus*. Specific Targeted Research or Innovation Project. Wageningen, Holanda.
- WICKSON, E.J. (1914). *The California fruits and how to grow them*. Pacific Rural Press, San Francisco, California, Estados Unidos.

7. Anexos

ANEXO I

Compuestos volátiles del aroma. Rodríguez-Burruezo *et al.* (2004)

esters

ethyl acetate
propyl acetate
butyl acetate
pentyl acetate
hexyl acetate
octyl acetate
(Z)-hex-3-en-1-yl acetate
(Z)-non-6-en-1-yl acetate
2-methylpropyl acetate
3-methylbutyl acetate
3-methylbut-3-en-1-yl acetate
3-methylbut-2-en-1-yl acetate
2-methylene-butan-1,4-diyl diacetate
(Z)-2-methylbut-2-en-1,4-diyl diacetate
(E)-2-methylbut-2-en-1,4-diyl diacetate
3-methylbut-3-en-1-yl 3-methylbutanoate
3-methylbut-2-en-1-yl 3-methylbutanoate
3-methylbut-2-en-1-yl 2-methylbutanoate
methyl 3-methylbut-2-enoate
butyl 3-methylbut-2-enoate
3-methylbutyl 3-methylbut-2-enoate
3-methylbut-3-en-1-yl 3-methylbut-2-enoate
3-methylbut-2-en-1-yl 3-methylbut-2-enoate
3-methylbut-2-en-1-yl 2-methylbut-2-enoate

aldehydes and ketones

hexanal
(Z)-hex-3-enal
(E)-hex-2-enal
(Z)-non-6-enal
(E,Z)-nona-2,6-dienal
(E)-non-2-enal
(E,E)-deca-2,4-dienal
acetoin (2-hydroxy-3-butanone)
nonan-2-one
undecan-2-one
tridecan-2-one
pentadecan-2-one
heptadecan-2-one

alcohols

butan-1-ol
(E)-hex-2-en-1-ol
(Z)-non-6-en-1-ol
(E,Z)-nona-2,6-dienol
2-methyl-3-buten-2-ol
3-methyl-3-buten-1-ol
3-methyl-2-buten-1-ol
pentadecan-2-ol
heptadecan-2-ol

miscellaneous

β -damascenone
2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone (mesifuran)
linalool
nerolidol
4-nonanolide (ζ -nonalactone)
4-decanolide (ζ -decalactone)
5-dec-2-enolide (massoia lactone)

ANEXO II

Extracción de ADN genómico de planta (método CTAB modificado)

- Pesar 50-75 mg de tejido vegetal. Congelar en nitrógeno líquido (o a -80°C y después se pasa a nitrógeno líquido).
- Triturar mientras está congelado en un eppendorf con un homogeneizador o con bolitas de metal.
- Añadir 700 μL de tampón de extracción + 1,4 μL de β -mercaptoetanol (se agita suavemente hasta homogeneizar la muestra). Preparar el tampón con el mercaptoetanol para todas las muestras inmediatamente antes de realizar la extracción.
- Cambiar de eppendorf para evitar roturas e incubar durante 30' a 65°C .
- Añadir cloroformo : alcohol isoamílico (24:1) hasta llenar el tubo (unos 700 μL). Agitar suavemente.
- Centrifugar a 11.000 rpm durante 5'.
- Recuperar la fase acuosa y ponerla en un tubo nuevo.
- Añadir etanol absoluto (unos 700 μL) a cada eppendorf. Agitar suavemente.
- Mantener 10' a -20°C (ó 5' a -80°C).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5'.
- Eliminar o decantar el sobrenadante con precaución de no perder el precipitado.
- Lavar el ADN con 300 μL de etanol 70% (resuspender el precipitado).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5'.
- Eliminar o decantar el sobrenadante con mucha precaución de no perder el precipitado.
- Secar el pellet o precipitado.
- Resuspender el pellet o precipitado en 50-100 μL de TE.

ANEXO III

Valores de los caracteres morfológicos para cada una de las entradas

	Plant.siz	Stem.length	Vlgour	Deg.gram	Int.anthoc	Root.prot	Stem.pub	Stem.col	Intern.leng	Pet.leng	Pet.col	Fol.dens	Leaf.att	Leaf.leng	Leaf.wid	Ratio	Leaf.type	Num.leaf	Leaf.col	
Puzol	6,6	43	5	4,6	0	5	3	2	5,8	72,666667	1,8	4,2	3	33,666667	11,233333	3,01526285	1	1	2	
SR	6,2	50,2	5,8	5,8	0	5	3	3,4	5,56666667	73	2,2	5,4	3	32,633333	11,7	2,79806928	1	1	3	
SL	4,33333333	44	5	5,6666667	0	5	3	2	5,83333333	72,222222	2,2	3	2	29,666667	18,555556	1,91463047	1	1	2	
Oravalo	3	48,8	5	7	0	7	3	3,2	2,6666667	40	2	7	1	24,966667	22,766667	0	2	5	2	
Quito	6,6	60,4	6,6	3	0	5	3	2	6,03333333	69,333333	2	4,2	1,8	33,033333	12,133333	2,7240516	1	1	2	
El Camino	5,4	53,4	5,4	5	0	3,8	3	2	5,4666667	71,7	2	5	2,8	34	18,1	1,97950454	1,5	1,4	2,4	
Kawi	4,6	46,8	4,6	5	0,6	5,4	3	2,4	5,83333333	59,666667	2	5	3	34,4	11,333333	3,12958268	1	1	2	
Turia	3,8	47,6	4,6	3	0	4,2	3	2	5,6	71	2	3,8	2	32,733333	18	1,9629996	1,5	3	3	
Valencia	5	43,8	5	5	0	5	3	2	5,0666667	72,666667	2	6,6	2,8	34,933333	30,6	1,14720165	1,5	3	2	
37-A	4,6	64,4	5	0	3,8	3,8	0	4	4,23333333	82,333333	3,4	4,2	2	37,066667	33,966667	1,1207934	2	2	3	
EC-12	6,6	79,8	5	4,6	0	1,2	5	1	5,33333333	84,333333	1,24	4,2	2	28,933333	23,033333	1,2565124	2	5	2	
Col-1	4,6	53,4	5	5	0	3,4	2,46	2	4,5	38,666667	1,4	5	2	25,366667	25,633333	1,00184032	2	3	2	
OV-8	4,6	70,6	3	3	0	3,4	3	3,4	5,23333333	54,666667	2,8	3	2,6	27,1	15,5	1,99683008	1,3	1	3	
OL-013	7	104,2	7	5	5	5	5	2	7,1666667	70	2	3,4	2,2	31,033333	32,166667	0,96656599	2	2	2	
CH2-22	5	50,6	5	5	0	5	3	2,6	5,3666667	66,333333	2	4,6	2	31,866667	23,633333	1,35495756	1,5	3	2	
PT-154	3,4	46,4	3,4	4,2	1,8	3	3	3,6	4,23333333	47	2,2	3,8	2	26,633333	23,133333	1,15593828	1,8	3,04	2	
EC-40,9	7	99	7	3,4	1,2	0	3,4	4	7,73333333	53,333333	2,6	3	2,8	19,6	18,533333	1,06261946	2	3	2	
E-7	7	143,8	7	4,6	0,6	3	5	2	9,25333333	78,333333	3,2	4,6	2,8	33,966667	29,766667	1,15682794	2	5,4	2	
Bim S/1034	7	115	7	5	3	3	5	5	2	7,50533333	93,333333	2	4,6	2	34,366667	29,766667	1,3697206	2	5,4	2
E-257	7	96,2	5	3	0	3	5	2	8,23333333	56	1	3	3	23,233333	17,066667	1,15682794	2	3	3	
E-34	5	63,2	4,2	4,6	0	3	0	1	4,33333333	64	1	4,2	2,6	23,9	11	2,17381919	1	1	2	
E-80	5	93,666667	3	3	3	0	7	2	8,61111111	83,333333	1,6666667	3,8	3	25,666667	23,555556	1,08949389	2	2	2	
E-62	7	99,2	5	5	0	3	7	1,8	7,4	75,666667	1,8	3,8	3	23,1	27,366667	0,84586243	3	3	2	
Rp-1	4,2	52	5	5,8	3	7	2,4	3	5,23333333	72,666667	3,4	5,4	2	31,266667	25,433333	1,31253464	1,5	3	3	
Puzol	3	5	9	3	16,7	1	3,6	5,2666667	5,73333333	2,41333333	3,8	2,2	8	5,8	10,898	6,83	6,6	1,60569447	58,93	
SR	3,4	5	12,2	3	14,7	1	3,8	4,35333333	5,97333333	2,55333333	5	2,6	11	5	7,17	8,29333333	5	0,86842299	61,2088889	
SL	3	5	9	3	14,166667	1	4	5,63333333	6,12222222	2,23333333	3	3,5	10,666667	5	11,3475	6,02	7	1,89297553	62,0308333	
Oravalo	5	14,6	5	1	14,1	1	3,4	5,52	5,22	3,5	3	4,33333333	14,8	5,4	6,025	5,5075	5	1,09487527	63,8291667	
Quito	3,8	5	12,8	3	23,5	1	4	4,9866667	6,2	2,8466667	5,4	3,4	15,4	3	6,56	6,06333333	5	1,08278607	59,57	
El Camino	3	4,6	14,2	2,6	17,9	1	4	5,89333333	6,0266667	3,71333333	3	2,25	6,25	5,5	14,466667	9,3566667	5	1,54958821	58,1944444	
Kawi	3	7	8,4	3	15,1	1	4	5,89333333	6,07333333	3,14666667	3,8	2,25	7,8	6,2	15,48	7,42	7	2,0843383	62,1983333	
Turia	3	5	10,6	3	14,6	1	3,28	4	5,21333333	6,35333333	4,2	4,4	16,2	5	13,095	5,91	7	2,2617899	62,8033333	
Valencia	3,8	4,6	9,6	1,8	17,6	1	3,28	6,3266667	6,35333333	3,14666667	4,2	4,4	16,2	5	13,095	5,91	7	2,2617899	62,8033333	
37-A	5	3	17,4	3	11,6	1	2	7,61333333	5,58	3,56666667	3	6,2666667	23,6	5,4	7,336	4,1	6,6	1,79101247	57,9643327	
EC-12	3	3	18,6	2	19,3	2	1	5,25333333	5,68	4,9666667	3,4	2,7666667	6,8	6,6	4,02	3,44	5	1,15374544	53,8783333	
Col-1	3	11,6	5,4	1	14,1	1	2	5,7	6,33333333	3,91333333	3	2,4	13	4,2	7,312	7,91	6	0,92598239	57,77	
OV-8	5	4,6	15,6	3	36,2	1	4,2	3,91333333	5,2466667	1,42	1,26	1,3666667	3,4	4,6	4,76	5,5566667	5,6666667	0,85758956	60,1766667	
OL-013	3	3,8	16	1,4	15,2	2	1	6,31333333	5,9466667	4,64	6,2	4,4666667	16,2	6,2	3,226	2,926	5	1,10407822	58,534	
CH2-22	4,6	4,2	10,8	1,2	12,6	1	3,88	4,8666667	5,8266667	3,54	3,4	1,73333333	5,8	4,2	7,846	7,718	7	1,03334585	62,5766667	
PT-154	3	4,6	11	2,6	19,8	1	3,88	4,8666667	5,8266667	3,54	0	1,4666667	2,8	5,8	7,85333333	11,1066667	5	0,71576574	64,0633333	
EC-40,9	3,4	3	16,4	1,2	11,1	1,4	1	5,65333333	5,86	5,2266667	2	2,6666667	16,6	5,8	2,82	2,772	5	1,01446921	39,5973333	
E-7	3	3	18,6	3	36,6	3	1	5,71333333	6,4466667	3,15333333	7	3,43333333	5,6	7	3,526	3,618	5	0,97541706	58,6466667	
Bim S/1034	3	3	17,8	1	20,5	2,2	1	6,16	5,7	4,21333333	5	4,4666667	18	6,6	2,76333333	2,75333333	5	1,00306361	63,1133333	
E-257	3	3	17,2	1	14,1	2	1	5,02	6,62	3,65333333	5	3,03333333	9,8	6	4,5966667	3,6466667	7	1,26060948	42,4408333	
E-34	3	5	18,5	1,25	3,625	2	3,4	5,44444444	4,6	1,3166667	7	3,13333333	22,2	5	2,506	2,09	7	1,20204379	52,7070833	
E-80	3	3	12,666667	1	7,1666667	2	3,4	5,44444444	4,63333333	4,43333333	5	1,33333333	3,5	5	1,68	1,75	5	0,96	60,12	
E-62	3	3	17,6	1	9,5	2,2	5,2	6,4466667	5,48	4,3	5,4	3,43333333	10	5,4	2,16	2,245	5	0,96069795	62,39	
Rp-1	5	3	10	3	38,1	1	2,46	5,79333333	6,5	1,43333333	4,6	2	15,4	4,6	5,64	8,142	5	0,70512379	64,8026667	

	a	b	ATAN(b/a)	Sec.col.strips	Sec.col.mott	Surf.cover	Epid.gloss	Nmb.loc	Inn.plc.leng	Inn.plc.brd	Inn.plc.ratio	Fr.flesh.col	Fr.flavour	Pres.bitter	Nb.seed/gr	Seed.col	Seed.diam	Type.seed	Fr.crack	Fr.fasc	Brix
Puzol	-7,1825	26,07125	-1,30196994	1	0	3	5	2	7	0,66	11,925	6	7	2,4	0,2	5	0,2	1	0,2	0	7,36
SR	-5,52555556	27,1961111	-1,37035026	1	0,66667	2	5	2	2,76666667	0,75	4,58862434	6	7	0	0	0	0	0	0	0	7,66666667
SL	-6,4075	24,4983333	-1,31497846	1	0	3	5	2	6,825	0,8625	7,94722222	4,75	5	0	0,5	4	0,2	1	0	0	6,025
Otavalo	-3,8775	21,5308333	-1,39261566	1	0	2	3	2	2,975	0,275	11,0488095	3,75	5	3	0	0	0	0	1	0	5,2
Quito	-3,31333315	24,7583334	-1,4377598	1	0	1	3	2	2,16666667	0,24333333	8,86243386	3	5	0	0,6	6	0,25	1	0	0	4,93333333
El Camino	-6,70916667	18,7383333	-1,52697252	1	0	2,4	3	2	3,6	0,59	6,45095238	6	5	3	0,4	6	0,18	1	0	0	6,72
Kawi	-11,6655556	24,1677778	-1,121092	1	0	2	5	2	9,66666667	0,32666667	29,8596491	3,33333333	5	0	0,33333333	5	0,15	1	0,33333333	0	5,4
Turina	-6,93416667	20,9583333	-1,25127804	1	0,66667	3	5	2	9,73333333	0,76666667	12,75	6	6,33333333	0,5	0,33333333	5	0,175	1	0,66666667	0	6,5
Valencia	-3,14222222	26,9872222	-1,45488454	1	0	3	5	2	8,01666667	0,675	12,9365079	6	6,66666667	0,5	0,33333333	5	0,175	1	0,16666667	0	7,36666667
37-A	-6,074	16,5583333	-1,21921254	1	0	2	3	2	3,48	0,25	14,28666667	3,8	5	2,4	0,2	5	0,12	1	0	0	5,38
EC-12	-6,4	24,1383333	-1,31162125	1	0	2	3	2	1,8875	0,2125	8,475	5	3	0	1,5	5	0,1375	1	0	0	9,475
Col-1	-5,88333333	28,0033333	-1,36971407	1	0	1,8	5	2	4,04	1,1	3,81837312	4	5	0	0	0	0	0	1	0	7,02
OV-8	-2,8875	21,8666667	-1,43950562	1	0,333333	2,66666667	5	2	2,33333333	0,35	6,7592926	6,5	5,66666667	1	0	0	0,18	1	0	0	7,4
OL-013	-8,589	20,357	-1,17153842	1	0	3	3	2	1,78	0,142	13,1333333	2	1	0	2,8	4,4	0,18	1	0	0	10,18
CH2-22	-1,69133333	24,292	-1,50128339	1	0	1	3,4	2	4,22	0,38	11,5577778	5,4	6,2	0	0,4	4,5	0,225	1	0,2	0	7,32
PT-154	-1,345	28,4811111	-1,5236071	1	1	3	5	2	4,78333333	1,83333333	2,55931495	6,66666667	7	0	0	0	0	0,66666667	1	7,06666667	
EC-40,9	-2,13333333	7,45533333	-1,29209516	1	0	2,2	3	2	1,14	0,166	6,95555556	2	3	3	3	5,4	0,156	1	0	0	7,82
F-7	-5,33333333	23,844	-1,35074233	1	0	3	3	2	2,12	0,2	11,58666667	4	3	3	3,8	5	0,114	1	0,8	0	10,08
Birm S/1034	-5,91	21,4533333	-1,30198237	1	0	3	3	2	1,3	0,18333333	7,11111111	4	1	5	4	5	0,165	1	0	0	9,06666667
E-257	-8,93	14,07	-1,00526372	1	0	1	5	2	2,03333333	0,13	15,7222222	4	1	3	3	5	0,16666667	1	0	0	8,7
E-34	-10,7654167	22,6675	-1,12740723	1	0	1	3	2	1,394	0,192	7,25888889	2,4	3	3	4	5	0,128	1	0	0	11,4
E-80	-8,42	19,43	-1,16187405	1	0	2	3	2	0,6	0,1	6	2	3	5	1	5	0,1	1	0	0	10,1
E-62	-7,135	20,165	-1,23071277	1	0	2	3	2	1,1	0,1	11	2	1	0	3	5	0,125	1	0	0	10,3
RP-1	-1,82733333	17,1066667	-1,4643799	1	0,4	1,2	5	2	2,5	0,75	3,35128205	5,8	5	0	0	0	0	0,2	0,8	0	5,7

ANEXO V

Tabla de pesos de los 3 primeros componentes (caracterización morfológica)

	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>	<i>Componente</i>
	1	2	3
Plant.siz	0,178549	-0,124942	0,00876207
Stem.lenght	0,228371	0,0465509	0,0450624
Vigour	0,110697	0,0143513	-0,206433
Deg.ram	-0,0514784	0,153591	-0,211308
Int.anthoc	0,098755	0,126412	0,0318817
Root.prot	-0,175648	0,0428078	-0,190915
Stem.pub	0,146919	0,000666936	0,154104
Stem.col	-0,0888067	0,209833	0,00617347
Intern.leng	0,172138	-0,11301	0,0932481
Pet.leng	0,0965889	-0,0854821	-0,123148
Pet.col	-0,0435385	0,189487	-0,0923712
Fol.dens	-0,0992352	0,121273	-0,218237
Leaf.att	0,0560577	-0,223374	0,136481
Leaf.leng	-0,0812365	-0,0414714	-0,258687
Leaf.wid	0,104178	0,232856	-0,174798
Ratio	-0,113557	-0,274536	0,0476047
Leaf.type	0,160814	0,218332	-0,0020123
Num.leaf	0,138956	0,238172	-0,145146
Leaf.col	-0,0505472	-0,00904049	0,183323
Ant.leaf.vei	-0,0867097	0,196685	-0,0920952
Leaf.sur.att	-0,171331	-0,193942	0,00681579
Num.leaf.ground	0,201599	0,0657028	0,012724
Infl.typ	-0,15081	-0,0529703	-0,0290737
Num.flow.infl	-0,0465076	0,136022	0,0552312
Corol.shap	0,206073	0,027698	0,0202964
Corol.col	-0,126257	-0,121278	0,0704884
Sep.leng	0,045099	0,0862443	-0,177112
Sta.leng	-0,053226	-0,00416658	-0,107914
Sty.ex	0,151608	0,0694913	-0,0170512
Poll.prod	0,16444	-0,115109	-0,0930709
Nmb.fr	0,085289	0,0601275	-0,359802
Nmb.fr.ppl	0,0540215	0,0336051	-0,283197
Size unif.	0,117634	0,0181079	-0,028498
Fr.leng	-0,196216	-0,124925	-0,146968
Fr.width	-0,226783	0,0434976	0,0354336
Pos.widest	-0,0727745	-0,183907	-0,125713
Leng/Wid	-0,0670079	-0,185975	-0,264953
L	-0,112697	0,143005	-0,0700207
ATAN(b/a)	0,128163	-0,209753	-0,0237782
Sec.col.mott	-0,131409	0,108016	0,198852
Surf.cover	0,00882258	0,0511524	0,0335865
Epid.gloss	-0,183421	-0,0698817	0,0973793
Inn.plc leng	-0,177614	-0,13176	-0,136069
Inn.plc brd	-0,177169	0,0915602	0,0910389
Inn.plc ratio	-0,00246765	-0,167294	-0,192203
Fr.flesh col	-0,18132	0,0418329	0,0544798
Fr.flvour	-0,232305	0,0116606	-0,00568211
Pres.bitter	0,140018	-0,0000140357	-0,0124233
Nb.seedpfr	0,217611	-0,0600735	-0,00741696
Seed col	0,126463	-0,250553	-0,168952
Seed diam	0,0655152	-0,258246	-0,191039
Fr.crack	-0,0797378	0,175987	-0,0168963
Brix	0,189992	-0,0549135	0,138369

ANEXO VI

Tabla de los loci microsatélite con sus respectivos alelos para cada entrada

Sample no.	Pop	SSR52	SSR285	SSR128	SSR20	SSR45	SSR578	SSR80
Puzol	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
SR	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
SL	muricatum	210	290	164	203	164	0	227
Otavalo	muricatum	210	290	164	194	164	324	225
Quito	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
El Camino	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
Kawi	muricatum	210	0	164	203	164	324	225
Turfa	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
Valencia	muricatum	210	290	164	203	164	324	0
37-A	muricatum	210	290	164	203	164	324	225
EC-12	muricatum	201	293	161	203	164	0	225
Col-1	muricatum	210	297	164	203	164	324	0
OY-8	muricatum	210	290	164	203	164	324	227
OL-013	caripense	201	281	161	188	153	327	225
CH2-22	muricatum	210	290	164	203	156	324	227
PT-154	muricatum	205	290	164	197	164	324	0
EC-409	caripense	201	293	161	191	161	327	227
E-7	caripense	201	281	0	188	169	327	225
Birm S/1034	caripense	201	281	158	203	159	327	225
E-257	silvestre	201	281	164	203	164	327	0
E-34	silvestre	201	281	161	191	161	0	225
E-80	silvestre	201	293	164	191	164	327	225
E-62	silvestre	201	290	164	191	164	327	225
Rp-1	muricatum	210	290	164	194	164	324	0
Sample no.	Pop	SSR111	SSR306	SSR593	SSR590	SSR43	SSR14	SSR66
Puzol	muricatum	215	268	0	215	240	175	245
SR	muricatum	0	268	294	215	240	175	245
SL	muricatum	215	268	294	233	240	175	245
Otavalo	muricatum	0	268	288	233	240	175	245
Quito	muricatum	215	268	294	215	240	175	245
El Camino	muricatum	215	0	294	215	240	175	245
Kawi	muricatum	215	0	294	215	240	175	245
Turfa	muricatum	215	268	294	233	0	175	245
Valencia	muricatum	215	268	294	215	0	175	245
37-A	muricatum	215	263	291	215	237	175	0
EC-12	muricatum	223	259	263	223	237	175	245
Col-1	muricatum	218	266	294	219	243	175	245
OY-8	muricatum	215	268	294	215	240	0	0
OL-013	caripense	218	259	294	219	240	181	245
CH2-22	muricatum	215	268	294	215	240	175	245
PT-154	muricatum	0	270	294	233	240	175	0
EC-409	caripense	218	263	291	219	0	181	245
E-7	caripense	218	259	294	219	0	181	245
Birm S/1034	caripense	218	0	297	219	240	181	245
E-257	silvestre	211	270	288	0	0	178	245
E-34	silvestre	0	266	0	215	237	175	245
E-80	silvestre	215	266	0	215	0	175	245
E-62	silvestre	215	276	291	215	0	175	245
Rp-1	muricatum	0	0	291	0	240	175	245