

Morphological and molecular variation in 55 native tomato collections from Mexico

Variación morfológica y molecular de 55 colectas de tomate nativo de México

Iván Maryn Marín-Montes; Juan Enrique Rodríguez-Pérez*; Jaime Sahagún-Castellanos; Lucas Hernández-Ibáñez; Ángela Manuela Velasco-García

Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia.
Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, México, C. P. 56230, MÉXICO.
erodriguezx@yahoo.com.mx, tel.: (595) 952 1500 ext. 6389 (*Corresponding author)

Abstract

Recognizing native populations as genetic reservoirs necessitates their conservation, especially when referring to characters that are of interest for breeding new cultivars and in light of the limited genetic variation present in current commercial varieties. This research sought to evaluate the genetic variation in 55 collections of native tomato (*Solanum lycopersicum* L.) from nine states of Mexico, through their morphological and molecular characterization, and to create a strategy for their sustainable and efficient conservation. The collections were characterized morphologically under greenhouse conditions based on 62 descriptors used by the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Molecular characterization was performed using ISSR markers with 16 primers, which generated 118 amplified products, of which 81 allowed differentiating collections (68.7 % polymorphism). Multivariate analysis detected three groups based on morphological descriptors of leaves, flowers, stem and fruit, while the molecular characterization generated seven groups, coinciding by only 26.5 %. The origins of the collections had no association with the clusters. The presence of significant genetic variability in the native tomatoes was detected, so it is concluded that within the groups generated it is possible to identify materials with traits of interest for breeding. On the other hand, sustainable conservation of this genetic variability in seedbanks may be more efficient by requiring the safeguarding of 67 % of the collections studied.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., molecular markers, morphological characters, ISSR.

Resumen

Reconocer a las poblaciones nativas como reservorios genéticos obliga a su conservación, especialmente al referirse a caracteres que son de interés para el mejoramiento de nuevos cultivares y a la escasa variación genética presente en las actuales variedades comerciales. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la variación genética de 55 colectas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) nativo, provenientes de nueve estados de la República Mexicana, a través de su caracterización morfológica y molecular, y generar una estrategia para su conservación sustentable y eficiente. El cultivo se caracterizó morfológicamente en condiciones de invernadero con base en 62 descriptores del *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI). La caracterización molecular se realizó mediante marcadores ISSR's con 16 iniciadores; éstos generaron 118 productos amplificados, de los cuales 81 permitieron diferenciar colectas (68.7 % de polimorfismo). Análisis multivariados detectaron tres grupos con base en descriptores morfológicos de hojas, flores, tallo y fruto; en tanto que la caracterización molecular generó siete grupos, los cuales coincidieron únicamente 26.5 %. Los orígenes de las colectas no tuvieron asociación con las agrupaciones. Se detectó la presencia de variabilidad genética apreciable en los tomates nativos, por lo que se considera que dentro de los grupos generados es posible identificar materiales con caracteres de interés para el mejoramiento genético. Por otra parte, la conservación sustentable de esta variabilidad genética en bancos de germoplasma podrá ser más eficiente al necesitar el resguardo de 67 % de las colectas estudiadas.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., marcadores moleculares, caracteres morfológicos, ISSR.



Introduction

Mexico is considered to be the main center of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) domestication, since it has great genetic variation as reflected in the diverse traits found in native varieties (Peralta & Spoonner, 2007).

Knowledge of an ecosystem's biodiversity is of great importance for the immediate conservation of genetic resources; this requires having an inventory to effectively quantify and conserve the genetic variation, in order to achieve sustainable use and exploitation through breeding (Benavides-González, Cisne-Contreras, Querol-Lipovich, & Morán-Centeno, 2011). This leads to the need to characterize wild and native species through their morphology or molecular DNA markers.

Despite the importance of recognizing the characteristics and patterns of genetic variation in genetic resources, it is estimated that 80 % of the collections created worldwide have not been characterized and 95 % remain without agronomic evaluation; thus, the role of seedbanks is limited to just storing seed (Boada-Higuera, Mejía-Ramírez, Ceballos-Aguirre, & Orozco, 2010). On the other hand, with the growing number of accessions to conserve, it is essential to detect and remove duplicate materials and, additionally, discover the value of the collections conserved (González-Aguilera et al., 2011). This will facilitate their use through the rescue of traits of interest for breeding (Benavides-González et al., 2011).

Studies have been conducted in order to generate groups according to their genetic similarity or characteristics of anthropocentric interest, such as postharvest quality, fruit shapes and colors, culinary quality, nutraceutical quality, taste and agronomic benefits (Carrillo-Rodríguez & Chávez-Servia, 2010; Crisanto-Juárez, Vera-Guzmán, Chávez-Servia, & Carrillo-Rodríguez, 2010). The purpose of this research has been to generate information to identify sets of genotypes with high variation among them, so that their differentiation is evident; but at the same time, groups must be homogeneous in their interior.

Genetic variation in plant species can be explored in a fast, accurate and efficient manner by using molecular markers (González-Aguilera et al., 2011). Different molecular markers have been used in tomato, including ISSR (Robinson & Harris, 2000), which do not require prior knowledge of the genome and generate high polymorphism, facilitating studies of genetic diversity, phylogenetics, genomics and biological evolution (González-Aguilera et al., 2011).

Sequencing techniques have verified that there is very little polymorphism at the DNA level in commercial tomato (Park, West, & St-Clair, 2004). In the case of 96 tomato accessions characterized by González-Aguilera

Introducción

México es considerado como el principal centro de domesticación del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ya que posee gran variación genética reflejada en diversos caracteres de las variedades nativas (Peralta & Spoonner, 2007).

El conocimiento de la biodiversidad de un ecosistema es de gran importancia para la conservación inmediata de los recursos genéticos, esto obliga a contar con un inventario que permita cuantificar y conservar en forma eficaz la variación genética, con el fin de lograr el uso sustentable y aprovechamiento a través del mejoramiento genético (Benavides-González, Cisne-Contreras, Querol-Lipovich, & Morán-Centeno, 2011). Lo anterior deriva en la necesidad de realizar caracterizaciones de las especies silvestres y nativas, a través de su morfología o de marcadores moleculares de ADN.

A pesar de la importancia que representa el reconocer las características y patrones de variación genética de los recursos genéticos, se estima que 80 % de las colectas realizadas a nivel mundial no se han caracterizado y 95 % siguen sin evaluación agronómica; así, la función de los bancos de germoplasma se limita a almacén de semillas (Boada-Higuera, Mejía-Ramírez, Ceballos-Aguirre, & Orozco, 2010). Por otra parte, ante el crecimiento del número de accesiones a conservar, es preponderante detectar y eliminar materiales duplicados y, adicionalmente, descubrir el valor de las colecciones conservadas (González-Aguilera et al., 2011). Esto facilitará su uso a través del rescate de caracteres de interés para el mejoramiento genético (Benavides-González et al., 2011).

Se han realizado estudios con el fin de generar grupos de acuerdo con su similitud genética o de características de interés antropocéntrico, como la calidad postcosecha, formas y colores de fruto, calidad culinaria, calidad nutraceutica, sabor y ventajas agronómicas (Carrillo-Rodríguez & Chávez-Servia, 2010; Crisanto-Juárez, Vera-Guzmán, Chávez-Servia, & Carrillo-Rodríguez, 2010). El propósito de estas investigaciones ha sido generar información que permita identificar conjuntos de genotipos con alta variación entre ellos, de tal forma que su discriminación sea evidente; pero a la vez, los grupos en su interior deben ser homogéneos.

La variación genética de especies vegetales puede explorarse mediante marcadores moleculares de manera rápida, precisa y eficiente (González-Aguilera et al., 2011). En tomate se han utilizado diferentes marcadores moleculares, entre ellos los ISSR (Robinson & Harris, 2000), los cuales no requieren conocimiento previo del genoma y generan alto polimorfismo, facilitando los estudios de diversidad genética, filogenética, genómica y evolución biológica (González-Aguilera et al., 2011).

et al. (2011) with ISSR primers, they generated 144 bands, of which only 53 showed polymorphism, with an average of 14.4 bands per primer.

In this situation, the wild relatives of tomatoes are one of the main sources of germplasm for breeding this crop, since they have developed multiple traits that have allowed them to survive in adverse environmental conditions, including pests and diseases (Eingenbrode, Trumble, & Jones, 1993; Pérez-Grajales, Márquez-Sánchez, & Peña-Lomelí, 1997); consequently, efforts have been made to collect and characterize materials native to Mexico.

Based on the above, this research was conducted in order to evaluate the genetic variation in 55 native tomato (*Solanum lycopersicum* L.) collections from nine states of Mexico, through their morphological and molecular characterization, and create a strategy for their sustainable and efficient conservation.

Materials and methods

Collections evaluated

A total of 55 native tomato collections from nine states in the Mexican Republic were characterized morphologically and molecularly: Campeche (C14), Chiapas (C6, C7, C8, C24, C33, C36, C37, C50, C58, C59), Guanajuato (C43), Guerrero (C60), Hidalgo (C55), Jalisco (C39, C40, C47), Oaxaca (C4, C12, C17, C19, C20, C21, C22, C27, C29, C32, C45, C46, C61), Puebla (C2, C3, C16, C48, C49, C52, C56), San Luis Potosí (C11, C18), Tabasco (C1, C53), Veracruz (C5, C9, C25, C26, C31, C35, C42, C51). Additionally, eight collections of unknown origin (C15, C28, C54, C62, C63 and C64) were studied.

Morphological characterization

The morphological characterization was carried out in the 2013 spring-summer growing season in a full-vent, medium-technology greenhouse with 600-grade polyethylene covering with 70 % light transmission, and front, side and top ventilation protected by anti-aphid mesh, located at Chapingo Autonomous University (19° 29' NL and 98° 53' WL; 2240 masl), with a mean annual temperature of 15.9 °C. The collections were sown in 200-cavity polystyrene trays with peatmoss substrate.

Transplanting was performed 30 days after sowing; the plants were grown hydroponically in 15-kg polypropylene pots. The substrate used was volcanic pumice (tezontle) with particles of less than 3 mm in diameter. The nutrient solution used was that proposed by Cadahia-López (2000), and the amount applied varied according to the phenological stage and weather conditions. The conduction system was a stem and the planting density was 3.7 plants·m⁻². The

Con técnicas de secuenciación se ha verificado que en tomate comercial existe muy poco polimorfismo al nivel de ADN (Park, West, & St-Clair, 2004). En el caso de 96 accesiones de tomate caracterizadas por González-Aguilera et al. (2011) con iniciadores ISSR's, generaron 144 bandas, sólo 53 presentaron polimorfismo, con promedio de 14.4 bandas por iniciador.

Ante esta situación, los parientes silvestres del tomate son una de las principales fuentes de germoplasma para el mejoramiento de este cultivo, ya que han desarrollado múltiples características que les han permitido sobrevivir en condiciones ambientales adversas, entre ellas las plagas y enfermedades (Eingenbrode, Trumble, & Jones, 1993; Pérez-Grajales, Márquez-Sánchez, & Peña-Lomelí, 1997), por lo que se han realizado esfuerzos para coleccionar y caracterizar materiales nativos de México.

Con base en lo anterior, la presente investigación se realizó con el propósito de evaluar la variación genética de 55 colectas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) nativo, provenientes de nueve estados de la República Mexicana, a través de su caracterización morfológica y molecular, y generar una estrategia para su conservación sustentable y eficiente.

Materiales y métodos

Colectas evaluadas

Se caracterizaron morfológica y molecularmente 55 colectas nativas de tomate originarias de nueve estados de la República Mexicana: Campeche (C14), Chiapas (C6, C7, C8, C24, C33, C36, C37, C50, C58, C59), Guanajuato (C43), Guerrero (C60), Hidalgo (C55), Jalisco (C39, C40, C47), Oaxaca (C4, C12, C17, C19, C20, C21, C22, C27, C29, C32, C45, C46, C61), Puebla (C2, C3, C16, C48, C49, C52, C56), San Luis Potosí (C11, C18), Tabasco (C1, C53), Veracruz (C5, C9, C25, C26, C31, C35, C42, C51). Adicionalmente, se estudiaron ocho colectas de origen desconocido (C15, C28, C54, C62, C63 y C64).

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó en el ciclo primavera-verano 2013 en un invernadero tipo "full vent" de nivel tecnológico medio, con cubierta de polietileno calibre 600 con transmisión de luz de 70 %, y ventilación frontal, lateral y superior protegida por malla antiáfidos, ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' LN y 98° 53' LO; 2240 msnm); con temperatura media anual de 15.9 °C. Las colectas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato de turba.

El trasplante se realizó 30 días después de la siembra; las plantas se establecieron en cultivo hidropónico, en macetas de polipropileno con capacidad de

experimental unit consisted of a pot with two plants. A randomized complete block experimental design with five replications was used.

The morphological characterization was carried out by quantifying 62 qualitative and quantitative descriptors according to the IPGRI guide for tomato.

Molecular characterization

The molecular characterization was performed in 2014 at Chapingo Autonomous University's Laboratory for Assisted Plant Breeding. DNA was extracted from the collections using the protocol described by Wagner et al. (1987). To determine the DNA concentration obtained in $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, a Thermo Scientific NanoDrop Lite spectrometer was used. DNA quality assessment was performed on 0.8 % agarose gel by electrophoresis with 90 volts for 1.5 h. Subsequently the gel was stained in an ethidium bromide solution ($0.6\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in TAE 1 X) for 20 minutes. Then it was documented using a UVP-brand transilluminator and the UVP Doc-It LS Image Acquisition package.

Taq DNA polymerase chain reactions were performed with 16 primers (Table 1). For each genotype, 2.5 μL of DNA diluted to 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ were added to a 0.2-mL Eppendorf tube with 22.5 μL of reaction mixture; thus, the final volume was 25 μL . The reaction mixture consisted of: 5.2 μL of Molecular Biology grade H_2O , 10 μL of dNTPs (500 μM), 2.5 μL of buffer (10 x), 1.5 μL of MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL of ISSR primer (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.3 μL of Taq DNA polymerase enzyme (5 $\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), and 2.5 μL of DNA (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Amplification was carried out in a TECHNE-brand FTC41H2D model thermocycler, with the following program: a pre-denaturation cycle at a temperature of 93 °C for 1 min; forty denaturation cycles, each with: 20 s at 93 °C, 60 s at the annealing temperature of the primer used and 20 s at 72 °C; final extension at 72 °C for 6 min. Finally the sample was cooled to 10 °C.

Amplified products were separated by electrophoresis in agarose gel, stained with ethidium bromide and documented by a transilluminator and the UVP-brand Doc-It LS Image Acquisition package.

Encoding of the information obtained in the gels was carried out based on the similarities of the banding patterns by assigning the value 0 to the absence and 1 to the presence of each band. The number of polymorphic bands resulting from amplification was quantified for each primer, and each band was identified according to the migration distance in the gel.

Statistical analysis

For the analysis of morphological characters, the most useful variables for differentiating collections were

15 kilogramos. El sustrato empleado fue espuma volcánica (tezontle) con partículas de diámetro menor a 3 mm. La solución nutritiva utilizada fue la propuesta por Cadahia-López (2000), la cantidad aplicada varió de acuerdo con la etapa fenológica y las condiciones climáticas. El sistema de conducción fue de un tallo y la densidad de plantación correspondió a 3.7 plantas·m⁻². La unidad experimental consistió en una maceta con dos plantas. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con cinco repeticiones.

La caracterización morfológica se realizó mediante la cuantificación de 62 descriptores cualitativos y cuantitativos de acuerdo con la guía para tomate del (IPGRI, 1996).

Caracterización molecular

La caracterización molecular, se realizó en 2014, en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la misma institución. La extracción de ADN de las colectas se llevó a cabo con el protocolo descrito por Wagner et al. (1987). Para determinar la concentración de ADN obtenido en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, se usó un espectrofotómetro "NanoDrop Lite" de "Thermo Scientific". La evaluación de calidad del ADN se realizó en gel de agarosa al 0.8 % mediante electroforesis con 90 voltios durante 1.5 h. Posteriormente, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio ($0.6\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en TAE 1 X) por 20 minutos. Después se documentó mediante un transiluminador marca UVP y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP.

Las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa se realizaron con 16 iniciadores (Cuadro 1). Para cada genotipo, 2.5 μL de ADN diluido a 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ fue adicionado a un tubo Eppendorf de 0.2 mL con 22.5 μL de mezcla de reacción; así, el volumen final fue 25 μL . La mezcla de reacción consistió de: 5.2 μL de H_2O grado Biología Molecular, 10 μL de dNTP's (500 μM), 2.5 μL de amortiguador (10 x), 1.5 μL de MgCl_2 (50 mM), 3.0 μL de iniciador ISSR (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 0.3 μL de enzima Taq DNA polimerasa (5 $\text{u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), y 2.5 μL de ADN (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo FTC41H2D marca TECHNE, con el siguiente programa: un ciclo de predesnaturalización con temperatura de 93 °C por 1 min; cuarenta ciclos de desnaturalización, cada uno con: 20 s a 93 °C, 60 s a la temperatura de alineamiento del iniciador empleado y 20 s a 72 °C; para extensión final a 72 °C por 6 min. Finalmente la muestra se enfrió hasta 10 °C.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y se documentaron mediante un transiluminador y el paquete Doc-It LS Image Acquisition marca UVP.

La codificación de la información obtenida en los geles se realizó con base en las similitudes de los patrones

Table 1. Sequence and annealing temperature of 16 ISSR primers**Cuadro 1. Secuencia y temperatura de alineamiento de 16 iniciadores ISSR**

Primer/ Iniciador	Sequence/ Secuencia	Annealing temperature °C/ Temperatura de alineamiento °C
ISSR1	(C A) ₈ A A G G	62
ISSR3	(C A) ₈ A A G C T	49
ISSR4	(A G) ₈ C T C	55
ISSR6	(A C) ₈ C T G	59
ISSR7	(A G) ₈ C T G	53
ISSR8	(A C) ₈ C T T	57
ISSR9	(A G) ₈ C	47
ISSR10	(G A) ₈ T	43
UBC820	(G T) ₈ C	50
UBC822	(T C) ₈ A	46
UBC823	(T C) ₈ C	48
UBC829	(T G) ₈ C	56
UBC840	(G A) ₈ C T T	51
UBC862	(A G C) ₆	68
UBC866	(C T C) ₆	60
LOL 7	(G A) ₆ C C	44

selected by means of successive covariance analyses. Subsequently, cluster analysis was conducted from the squared Euclidean distance matrix and the generation algorithm of Ward's minimum distance dendrogram; the height cutoff point was decided based on the cubic clustering criterion (Statistical Analysis System [SAS], 1983), the pseudo t^2 statistic (Hotelling, 1951) and the pseudo F statistic (Johnson, 1998).

In order to corroborate the appropriateness of the grouping generated and identify the characters responsible for it, discriminant analysis in which the generated groups were considered as the categorical variable was performed. Additionally, resubstitution tests were conducted to verify the appropriateness of each collection to the assigned group (Johnson, 1998).

The molecular data were used to obtain the Jaccard (1912) index, with which a cluster analysis was performed with the methodology described above.

Results and discussion

Morphological characterization

Selection of informative variables

From 62 evaluated morphological characters, successive analyzes of covariance were able to reduce the

de bandeo al asignar el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de cada banda. Se cuantificó el número de bandas polimórficas producto de la amplificación para cada iniciador; cada banda se identificó de acuerdo con la distancia de migración en el gel.

Análisis estadístico

Para el análisis de caracteres morfológicos se seleccionaron las variables de mayor utilidad para discriminar colectas a partir de análisis de covarianzas sucesivas; posteriormente se llevó a cabo un análisis de agrupamiento a partir de la matriz de distancias euclidianas elevadas al cuadrado y el algoritmo de generación del dendrograma de la mínima varianza de Ward, la altura de corte se decidió con base en el criterio cúbico de agrupamiento (*Statistical Analysis System* [SAS], 1983), la pseudo estadística t^2 (Hotelling, 1951) y la pseudo F (Johnson, 1998).

Con el fin de corroborar la pertinencia de la agrupación generada e identificar los caracteres responsables de ésta, se realizó un análisis discriminante en el que se consideró como variable categórica los grupos generados. Adicionalmente se realizaron pruebas de resustitución para verificar la pertinencia de cada colecta al grupo asignado (Johnson, 1998).

A partir de los datos moleculares se obtuvo la matriz de disimilaridad de Jaccard (1912), con la que se realizó un análisis de agrupamiento con la metodología descrita anteriormente.

Resultados y discusión

Caracterización morfológica

Selección de variables informativas

A partir de 62 caracteres morfológicos evaluados, los análisis de covarianza sucesiva lograron reducir la dimensionalidad de la matriz de datos al identificar a 15 con mayor relevancia para discriminar colectas: peso de semilla, longitud de hoja primaria, ancho de hoja primaria, forma de fruto, color de fruto inmaduro, longitud de fruto, ancho de fruto, firmeza de fruto, color de pericarpio, número de lóculos, longitud del sépalo, longitud de pétalo, longitud de estambre, tamaño de la planta y número de nudos. Estos caracteres fueron empleados para realizar los análisis multivariados subsecuentes; el resto no fueron considerados por no tener utilidad para diferenciar colectas, o bien, debido a su alta asociación con las variables seleccionadas.

Los resultados anteriores indican que todas las estructuras de la planta mostraron variabilidad (hojas, frutos, flores y tamaño de planta), lo cual fue de utilidad para la discriminación de colectas.

dimensionality of the data matrix by identifying 15 with greater relevance for discriminating collections: seed weight, primary leaf length, primary leaf width, fruit shape, immature fruit color, fruit length, fruit width, fruit firmness, pericarp color, number of locules, sepal length, petal length, stamen length, plant size and number of nodes. These characters were used for the subsequent multivariate analyzes; the rest were not considered to be useful to differentiate collections, or because of their high association with the selected variables.

The above results indicate that all plant structures showed variability (leaves, fruits, flowers and plant size), which was useful for differentiating the collections. In a study by Pacheco-Triste, Chávez-Servia, and Carrillo-Rodríguez (2014), similar results where the differences among characterized populations were due to the divergence in fruit and plant characteristics were obtained; on the other hand, Carrillo-Rodríguez and Chávez-Servia (2010) found that the number of flowers per cluster, average fruit weight, fruits per cluster and total number of fruits to the fifth cluster had high variation among collections studied under greenhouse conditions.

Cluster analysis

The dendrogram in Figure 1, built with Ward's minimum variance algorithm, with a height cutoff point of semipartial $0.1 r^2$, defined from the cubic

En el trabajo de Pacheco-Triste, Chávez-Servia, y Carrillo-Rodríguez (2014), se obtuvieron resultados similares donde las diferencias entre poblaciones caracterizadas se debieron a la divergencia en características de fruto y planta; por otra parte, Carrillo-Rodríguez y Chávez-Servia (2010) detectaron que el número de flores por racimo, peso medio de frutos, frutos por racimo y total de frutos al quinto racimo, tuvieron alta variación entre colectas estudiadas bajo invernadero.

Análisis de agrupamiento

El dendrograma de la Figura 1, construido con el algoritmo de mínima varianza de Ward, con altura de corte de $0.1 r^2$ semiparcial, definida a partir del criterio cúbico de agrupamiento, la pseudo F y la pseudo t^2 , determinó que el número de grupos óptimos fueron tres, los cuales incluyeron 16, 31 y 8 colectas, respectivamente. Si bien la mayoría de los trabajos utilizan el método UPGMA, en el presente se considera que al trabajar con colectas de varias regiones del país realizadas con diferentes criterios, el método de Ward es el adecuado para este tipo de análisis, con base en las ventajas mencionadas por Núñez-Colín y Escobedo-López (2011): reduce la presencia de individuos atípicos y es de mayor utilidad cuando el objetivo del trabajo es conocer la variabilidad existente en genotipos de una especie o género específico.

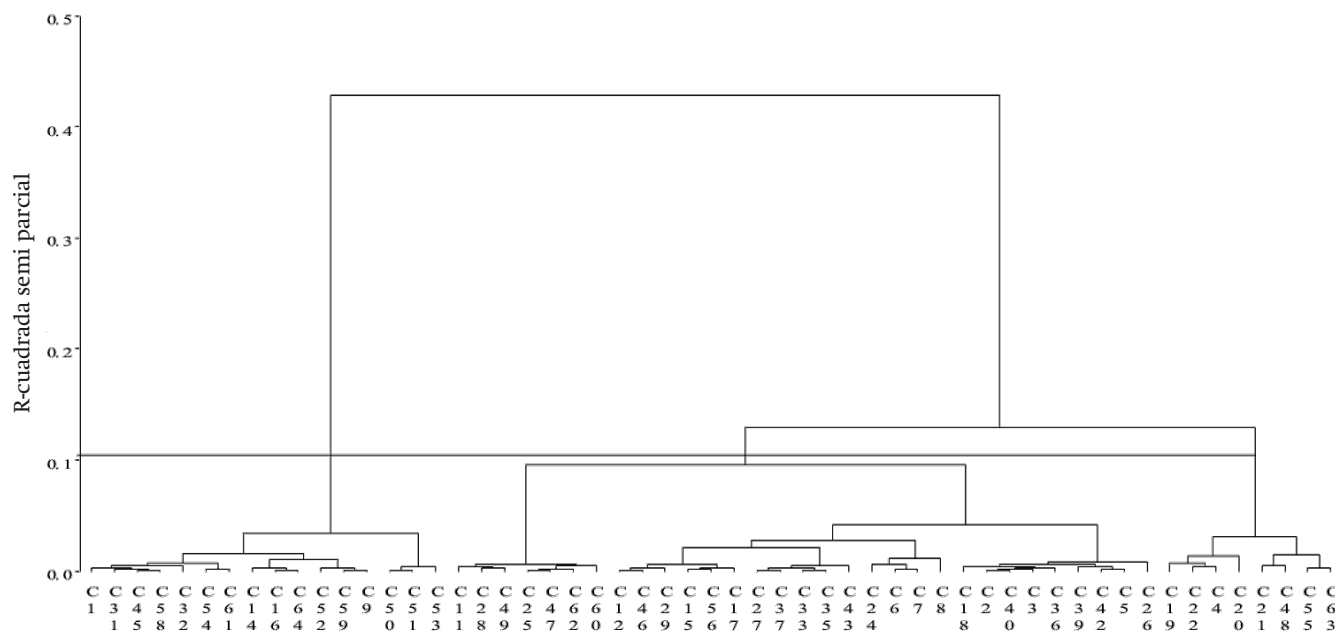


Figure 1. Hierarchical dendrogram of morphological characters derived from squared Euclidean distances and Ward's minimum variance algorithm. C: collection

Figura 1. Dendrograma jerárquico de caracteres morfológicos, derivado de distancias euclidianas cuadradas y algoritmo de mínima varianza de Ward. C: colecta.

clustering criterion, pseudo F and pseudo t^2 , determined that the number of optimal groups was three, which included 16, 31 and 8 collections, respectively. While most studies use the UPGMA method, the present one considers that when working with collections from various regions of the country made with different criteria, Ward's method is suitable for this type of analysis, based on the advantages mentioned by Núñez-Colín and Escobedo-López (2011): it reduces the presence of outliers and is most useful when the aim of the study is to determine the existing variability in genotypes of a specific species or genus.

Discriminant analysis

The discriminant analysis, conducted in order to corroborate the groupings of the previous analysis and detect the relative importance of the characters in the formation of the three groups, considered these groupings as the categorical variable. Being three groups included in the analysis, the two discriminant variables (DV) generated explained the total variability observed. The first DV accounted for 80.7 % and the second the remaining 19.3 %.

The total canonical structure indicated the linear associations between the discriminant functions generated and the 15 characters used in the analysis. DV1 was positively associated with fruit shape, fruit width and number of locules, and negatively with the number of nodes, which means that collections with high DV1 values had rounder fruits, a bright green color before maturity, greater fruit width and fewer nodes in a linear meter of plant and vice versa. With respect to DV2, it was positively associated with fruit

Análisis discriminante

El análisis discriminante realizado con el fin de corroborar las agrupaciones del análisis anterior y detectar la importancia relativa de los caracteres en la conformación de los tres grupos, consideró como variable categórica a dichas agrupaciones. Al ser tres los grupos incluidos en el análisis, las dos variables discriminantes (VD) generadas explicaron el total de la variabilidad observada. La primer VD representó 80.7 % y la segunda el restante 19.3 %.

La estructura canónica total indicó las asociaciones lineales entre las funciones discriminantes generadas y los 15 caracteres usados en el análisis. La VD1 se asoció en forma positiva con la forma del fruto, ancho del fruto y número de lóculos, y en forma negativa con el número de nudos; lo cual quiere decir que colectas con altos valores de VD1 tuvieron frutos más redondos, color verde intenso antes de la madurez, mayor anchura de fruto y menor número de nudos en un metro lineal de planta y viceversa. En lo que respecta a la VD2 tuvo asociación positiva con longitud y ancho de fruto; y en forma negativa con el tamaño de planta; es decir, colectas con altos valores en VD2 tienen mayor longitud de fruto y tamaño de planta pequeña y viceversa. Con base en lo anterior, en el Cuadro 2 se muestran las características morfológicas de los grupos generados y los genotipos que los conforman.

Resultados similares se encontraron por Vásquez-Ortiz, Carrillo-Rodríguez, y Ramírez-Vallejo (2010) al discriminar colectas con base en caracteres cualitativos y cuantitativos de fruto, flor y hoja. El estudio de Agudelo-Agudelo, Ceballos-Aguirre, y Orozco (2011)

Table 2. Groups of native tomato collections obtained from morphological characterization by multivariate cluster and discriminant analysis.

Cuadro 2. Grupos de las colectas nativas de tomate obtenido a partir de la caracterización morfológica mediante análisis multivariados de agrupamiento y discriminante.

Group/ Grupo	Frequency/ Frecuencia	Collection / Colecta	Characteristics / Características
1	16	1, 9, 14, 16, 31, 32, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 58, 59, 61, 64	Plants with few nodes, oblate fruits of medium size, soft green color before maturity and few locules per fruit. / Plantas con pocos nudos, frutos de forma achatada de tamaño mediano, color verde suave antes de madurez y pocos lóculos por fruto.
2	31	11, 25, 28, 47, 49, 60, 62, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 15, 17, 18, 24, 26, 27, 29, 33, 35, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 46, 56	Smaller-sized plants, with small, round fruits, dark green before maturity and a larger number of locules. / Plantas de porte menor, con frutos redondos de tamaño pequeño y mayor número de lóculos, los frutos antes de la madurez son de un verde oscuro.
3	8	4, 19, 20, 21, 22, 48, 55, 63	Plants with few nodes, large cylindrical fruits, light green color before maturity and fewer locules. / Plantas con pocos nudos, frutos cilíndricos de gran tamaño, menor número de lóculos, antes de la madurez presentan un color verde claro.

length and width, and negatively with plant size, that is, collections with high values in DV2 have longer fruit and small size plant and vice versa. Based on the above, the morphological characteristics of the generated groups and the genotypes that comprise them are shown in Table 2.

Similar results were found by Vásquez-Ortiz, Carrillo-Rodríguez, and Ramírez-Vallejo (2010) by differentiating collections based on qualitative and quantitative fruit, flower and leaf characteristics. A study by Agudelo-Agudelo, Ceballos-Aguirre, and Orozco (2011) showed that corolla color, hypocotyl pubescence and leaf type were not useful for differentiating collections, whereas fruit color, intensity and shape, along with the type of plant growth, were efficient in differentiating collections.

From the DV1 and DV2 values assigned to each collection, Figure 2 was generated. In it, the formation of groups obtained in the cluster analysis is verified.

Group 1 consisted of plants with kidney-type fruits, while group 2 was made up of collections with mostly cherry-type fruit, some kidney shaped and one cylindrical, which are similar in length and width, so that they resemble round fruits. Group 3 contains genotypes with large fruits by having the largest diameter, with cylindrical or kidney shape. This same pattern of grouping based on fruit characters was reported by Carrillo-Rodríguez and Chávez-Servia (2010); for example, in a group with predominantly kidney-type fruits, they also found some pear-shaped ones; in another where a high frequency of fruits with less size and weight were grouped together, there were variations in shape, from large kidney-type fruits to very small round ones with a diameter of 1 cm.

The average fruit equatorial diameter of the 55 collections studied was 3.81 cm, while the polar diameter was 3.29 cm and the average number of locules was 3.18. Comparison of these values with those obtained in previous studies on tomato diversity (Bonilla-Barrientos et al., 2014; Álvarez-Hernández, Cortés-Madrigal, & García-Ruíz, 2009) suggests that, like Lobato-Ortiz et al. (2012) and Chávez-Servia, Carrillo-Rodríguez, Vera-Guzmán, Rodríguez-Guzmán, and Lobato-Ortiz (2011), there is great variability in native populations, which is very useful for breeding programs, which is why their study and conservation takes on such relevance.

In the resubstitution test performed with the linear discriminant functions (Johnson, 1998), it was confirmed that the grouping was done correctly because no evaluated collection was placed in any group other than the original one.

mostró que el color de la corola, la pubescencia del hipocotilo y el tipo de hoja, no fueron útiles para discriminar colectas, por otra parte el color y su intensidad, la forma del fruto y el tipo de crecimiento de la planta fueron eficientes para diferenciar colectas.

A partir de los valores de VD1 y VD2 asignadas a cada colecta, se generó la Figura 2 en la cual se verifica la conformación de grupos obtenidos en el análisis de agrupamiento.

El grupo 1 estuvo constituido por plantas con frutos tipo riñón, mientras que el grupo 2 mostró colectas con fruto tipo cereza en su mayoría, algunos con forma de riñón y uno cilíndrico, los cuales son similares en el largo y ancho, por lo que se asemejan a frutos redondos. El grupo 3 contiene genotipos con frutos de tamaño grande al tener el mayor diámetro, con forma cilíndrica o riñón. Este mismo patrón de agrupación basado en caracteres de fruto fue encontrado por Carrillo-Rodríguez y Chávez-Servia (2010); por ejemplo, en un grupo con predominancia de frutos tipo riñón, encontraron otros tipo pera; en otro donde se congregaron alta frecuencia de frutos con menor tamaño y peso, hubo variaciones en la forma, desde grandes tipo riñón, a redondos muy pequeños con diámetro de 1 cm.

El promedio del diámetro ecuatorial de fruto de las 55 colectas estudiadas fue de 3.81 cm, en tanto que polar fue 3.29 cm y el número de lóculos promedio correspondió a 3.18. La comparación de estos valores con los obtenidos en estudios previos sobre diversidad de tomates (Bonilla-Barrientos et al., 2014; Álvarez-Hernández, Cortés-Madrigal, & García-Ruíz, 2009) sugiere que, al igual que Lobato-Ortiz et al. (2012) y Chávez-Servia, Carrillo-Rodríguez, Vera-Guzmán, Rodríguez-Guzmán, y Lobato-Ortiz (2011), existe gran variabilidad en poblaciones nativas, lo que es de gran utilidad para programas de mejoramiento genético; razón por la cual toma relevancia su estudio y conservación.

En la prueba de resustitución realizada con las funciones lineales discriminantes (Johnson, 1998), se corroboró que el agrupamiento realizado fue el correcto ya que ninguna colecta evaluada fue colocada en algún grupo diferente al original.

Caracterización molecular

Los 16 iniciadores ISSR utilizados en la caracterización molecular generaron 118 bandas de las cuales sólo 81 fueron polimórficas, con porcentajes de variación entre 10 y 90 % dentro de las colectas estudiadas. Así, se generaron en promedio siete bandas por iniciador, de las cuales cinco fueron polimórficas, lo que representó 68.7 % de polimorfismo total. Con base en los resultados

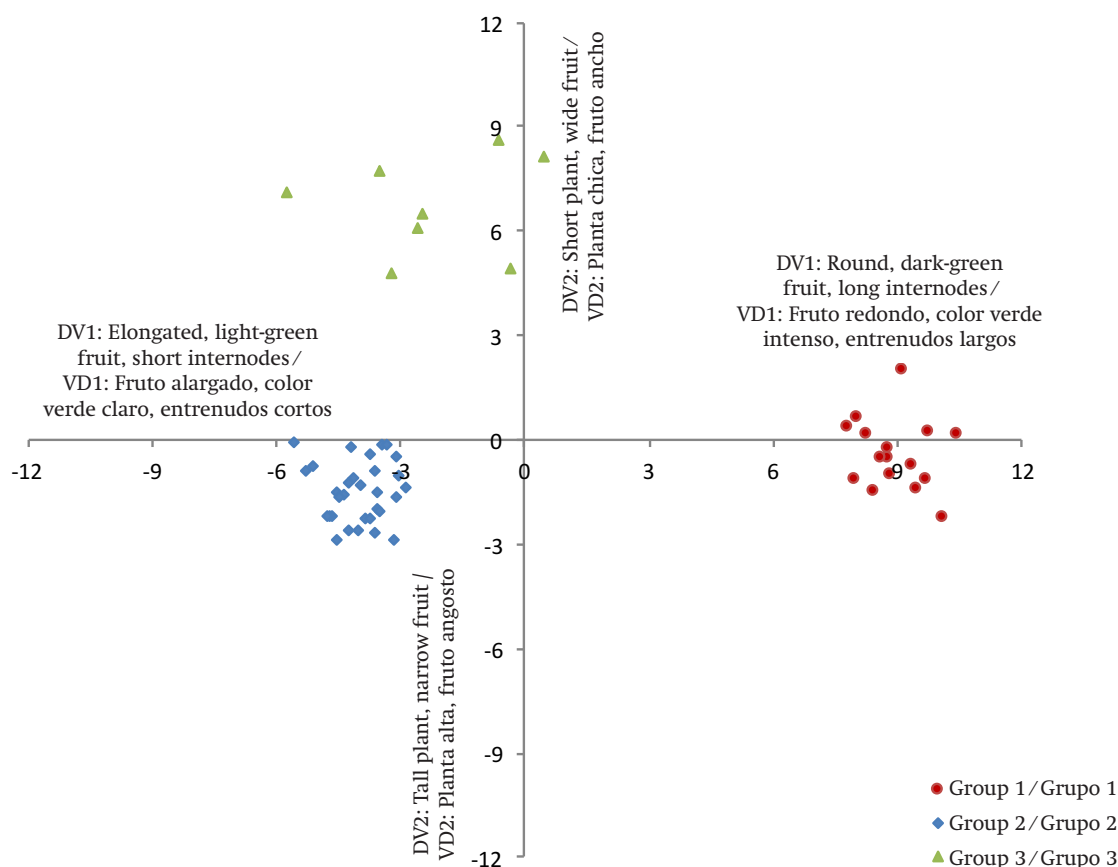


Figure 2. Graphical representation of discriminant variables (DV1 and DV2) of three groups of native tomato according to their morphological characteristics.

Figura 2. Representación gráfica de variables discriminantes (VD1 y VD2) de tres grupos de colectas nativas de tomate de acuerdo con sus características morfológicas.

Molecular characterization

The 16 ISSR primers used in the molecular characterization generated 118 bands, of which only 81 were polymorphic, with variation percentages between 10 and 90 % within the collections studied. Thus, on average seven bands per primer were generated, of which five were polymorphic, accounting for 68.7 % of total polymorphism. Based on the results of González-Aguilera et al. (2011), the polymorphism level obtained is suitable for characterizing and establishing the genetic differences of the native tomatoes evaluated. The ISSR1 primer had the highest number of polymorphic bands (12) and 70.6 % polymorphism. The primers with the greatest polymorphism in the present study were those with the amino acid sequence (GA)₈ or (CA)₈, results that partially match those of González-Aguilera et al. (2011) and Tikunov, Khrustaleva, and Karlov (2003).

The technique used is very useful for determining the genetic variability in autogamic plants like tomatoes, since both from the results here and those of González-Aguilera et al. (2011) and Tikunov et al. (2003), the polymorphism detected allowed classifying the evaluated collections adequately.

de González-Aguilera et al. (2011), se considera que el nivel de polimorfismo obtenido fue adecuado para realizar la caracterización y establecer las diferencias genéticas de los tomates nativos evaluados. El iniciador ISSR1 tuvo el mayor número de bandas polimórficas (12) y 70.6 % de polimorfismo. Los iniciadores con mayor polimorfismo en el presente trabajo fueron los que presentan la secuencia de aminoácidos (GA)₈ o (CA)₈; resultados que coinciden parcialmente con los de González-Aguilera et al. (2011) y Tikunov, Khrustaleva, y Karlov (2003).

La técnica empleada es de gran utilidad para determinar la variabilidad genética en plantas autógamas como tomate, ya que, tanto a partir de los presentes resultados, como los de González-Aguilera et al. (2011) y Tikunov et al. (2003), el polimorfismo detectado permitió clasificar las colectas evaluadas en forma adecuada.

Análisis de agrupamiento

Las distancias genéticas de Jaccard, que promediaron 0.48, junto con el método de Ward, generaron el dendrograma de la Figura 3. La altura de corte (0.04 r^2

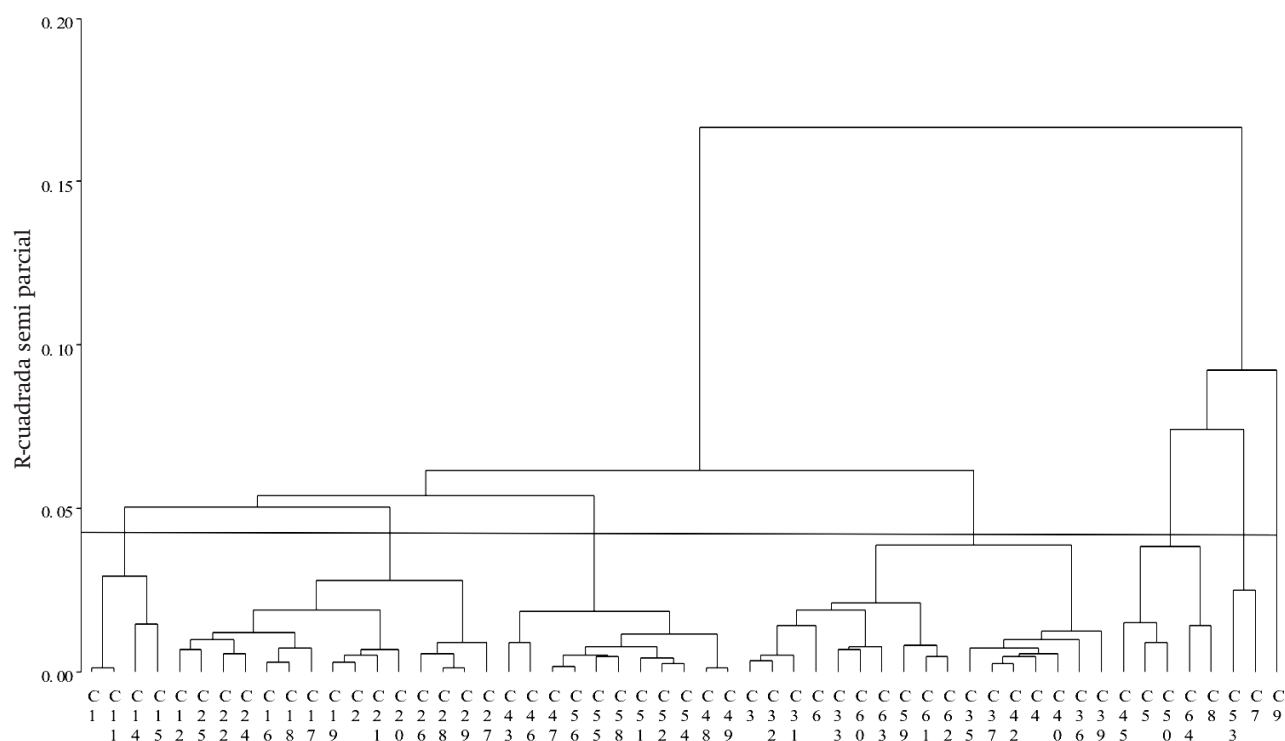


Figure 3. Hierarchical dendrogram of molecular markers (81 polymorphic bands), derived from Jaccard genetic distances and Ward's minimum variance algorithm for 55 native tomato collections from Mexico.

Figura 3. Dendrograma jerárquico de marcadores moleculares (81 bandas polimórficas), derivado de distancias genéticas de Jaccard y algoritmo de mínima varianza de Ward para 55 colectas de tomate nativo de México.

Cluster analysis

The Jaccard genetic distances, which averaged 0.48, along with the Ward method, generated the dendrogram in Figure 3. The height cutoff point (semipartial 0.04 r^2), defined by the pseudo t^2 and pseudo F, determined that the optimum number of groups was seven.

While most of the collections from the same region tend to cluster together, there are some collections from different areas within a specific group (Figure 3), so it is likely that they share adaptation areas with similar climatic and soil characteristics, which explains the greater similarity in their genetic constitution, a situation mentioned by Benor, Zhang, Wang, and Zhang (2008) in tomato lines where clusters were due to the geographical origin of the individuals.

Molecular and morphological characterization

When comparing the results of the groupings of the morphological and molecular characterizations as shown in Table 3, only 14 collections (26.5 %) followed the same grouping pattern and were placed within similar groups in the two analyzes. The other collections (73.5 %) were placed in different groups since in the morphological characters three groups were generated, while the molecular analysis generated seven.

semiparcial), definida mediante los pseudo t^2 y la pseudo F, determinó que el número óptimo de grupos fue siete.

Si bien la mayoría de las colectas procedentes de la misma región tienden a agruparse, existe presencia de colectas de zonas diferentes dentro de un grupo específico (Figura 3); por lo que es probable que compartan áreas de adaptación con características edáficas y climáticas semejantes; lo que explica la mayor similitud en su constitución genética, situación mencionada por Benor, Zhang, Wang, y Zhang (2008), en líneas de tomate cuyas agrupaciones obedecieron al origen geográfico de los individuos.

Caracterización molecular y morfológica

Al comparar los resultados de los agrupamientos de la caracterización morfológica y de la molecular como se muestra en el Cuadro 3, solo 14 colectas (26.5 %) siguieron el mismo patrón de agrupamiento y se ubicaron dentro de grupos similares en los dos análisis. El resto de colectas (73.5 %) se ubicaron en grupos diferentes debido a que en los caracteres morfológicos se generaron tres grupos, en tanto que el análisis molecular generó siete.

La caracterización morfológica al producir menor número de grupos, indica que los caracteres empleados tuvieron menor variación en las 55 colectas; en tanto que

Table 3. Subgroups generated by morphological and molecular characterizations of 55 collections of wild tomato.
Cuadro 3. Subgrupos generados por las caracterizaciones morfológica y molecular de 55 colectas de tomate silvestre.

Molecular characterization groups / Grupos de la caracterización morfológica			
	1	2	3
Molecular characterization groups / Grupos de la caracterización molecular	1	1R; 14R	11CH; 15CH
	2	16R	2CH; 12CH; 17CH; 18R; 24CH, 25CH; 26CH; 27CH; 28CH; 29CH
	3	51C; 52R; 54R; 58R	43CH; 46CH; 47CH; 49CH; 56CH
	4	31R; 32R; 59R; 61R	3CH; 6CH; 33CH; 35CH; 36CH; 37CH; 39CH; 40CH; 42CH; 60R; 62R
	5	45R; 50R; 64R	5CH; 8R
	6	53R	7CH
	7	9R	-

Type of fruit: CH: Cherry; C: cylindrical; R: kidney. Red letters identify collections proposed for conservation.

Tipo de fruto: CH: cereza; C: cilíndrico; R: riñón. Letras en color rojo identifican colectas propuestas a conservar.

The morphological characterization, by producing fewer groups, indicates that the characters used had less variation in the 55 collections; while the molecular characterization allowed us to more accurately estimate the genetic variation attributed to the ISSR markers, theoretically, they do not interact with the environment. On the other hand, by not expressing genetic variations restricted by the unique assessment environment (Boada-Higuera et al., 2010), morphological characterizations can lose accuracy in estimating the variation by confusing both the genetic effects and those of the genotype x environment interaction as suggested by Sultan (2000), who indicates that due to the phenotypic plasticity, a genotype can alter its development and physiology according to the environmental conditions where it grows.

Matches found in this study occurred only in group 2 of the morphological characterizations and group 2 of the molecular ones; the collections share the cherry-type fruit, and although they are not all from the same region of the country, they are native to places with similar environmental conditions, which determines the genetic similarity of these collections: C12 (Oaxaca, Cherry), C25 (Oaxaca, Cherry), C24 (Chiapas, Cherry), C18 (S.L.P., Kidney), C17 (Oaxaca, Cherry), C2 (Puebla, Cherry), C26 (Veracruz, Cherry), C28 (Chiapas, Cherry), C29 (Oaxaca, Cherry), C27 (Veracruz, Cherry). Benor et al. (2008) generated an initial grouping based on molecular matches; on a second level, subgroups of lines with similar origins, which associated with genetic similarities, were formed.

la molecular permitió estimar con mayor precisión la variación genética, atribuido a que los marcadores ISSR, teóricamente, no interaccionan con el medio ambiente. Por otra parte, al no expresarse variaciones genéticas restringidas por el ambiente único de evaluación (Boada-Higuera et al., 2010), las caracterizaciones morfológicas pueden perder precisión en la estimación de la variación al confundir los efectos tanto genéticos como los de la interacción genotipo x ambiente como lo sugiere Sultan (2000), quien indica que debido a la plasticidad fenotípica, un genotipo puede alterar su desarrollo y fisiología de acuerdo con las condiciones ambientales en donde crece.

Las coincidencias encontradas en este trabajo ocurrieron sólo en el grupo 2 de morfológicos y el grupo 2 de moleculares, las colectas comparten el tipo de fruto cereza, y aunque no todas son de la misma región del país, son originarias de lugares con condiciones ambientales similares, lo que determina la similitud genética de estas colectas: C12 (Oaxaca, Cereza), C25 (Oaxaca, Cereza), C24 (Chiapas, Cereza), C18 (S.L.P., Riñón), C17 (Oaxaca, Cereza), C2 (Puebla, Cereza), C26 (Veracruz, Cereza), C28 (Chiapas, Cereza), C29 (Oaxaca, Cereza), C27 (Veracruz, Cereza). Benor et al. (2008) generaron una agrupación inicial basada en las coincidencias moleculares; en un segundo nivel, se conformaron subgrupos de líneas con orígenes similares, lo que asociaron a las similitudes genéticas.

Aunque las colectas fueron ubicadas en grupos morfológicos diferentes a los generados por los

Although the collections were placed in morphological groups different from those generated by molecular groups, the results suggest that the ISSR markers are of great help in differentiating materials and determining the collections repeated in a seedbank, avoiding the storage of materials with the same characteristics that are not expressed in the same assessment environment (González-Aguilera et al., 2011; Zuriaga et al., 2009). For example, collections 19, 20 and 21 have the same type of fruit and are from the same place; thus, it is possible to make a decision on the collection to conserve based on the greater polymorphism obtained.

The morphological characterization lasted nine months under greenhouse conditions with 62 variables recorded, while the molecular characterization was performed in only three months based on plant material obtained from seedlings. Since they did not follow the same clustering pattern, performing both resulted in a 37.5 % increase in the efficiency of differentiating the genotypes, so they should be considered complementary and indispensable. This improves the ability to detect differences between genotypes and increases accuracy by generating conservation groups with greater genetic variability.

Conservation strategy

The results of the morphological characterization were due to a set of phenotypic variables, mainly associated with fruit shape; this allowed differentiating collections and placing them into three groups homogenous inside and heterogeneous among them (Group 1 kidneys, Group 2 cherry and Group 3 cylindrical or round). Choosing which genotypes to conserve within each set can be based on other qualities such as: origins, fruit color, fruit shape, anthropocentric use, etc.

By contrast, when there is only a molecular characterization, it is not possible to weight or differentiate the collections that make up a group, since the markers are random and dominant and the accuracy of the genetic variation estimate may be lost. Another consideration in this discussion is that collections are usually composed of several genotypes, so by using mixtures of DNA from the evaluated plants in order to save resources, the possibility of individually identifying them is lost; thus, the choosing of collections to conserve within each group would be random.

In the present study the morphological characterization detected less diversity than the molecular one and generated different clustering patterns, confirming that they are complementary studies as demonstrated by Demey, Zambrano, Fuenmayor, and Segovia (2003).

When both characterizations were combined, group 1 of the morphological characterization, with kidney-type fruits, was divided into seven subgroups by the

grupos moleculares, los resultados sugieren que los marcadores ISSR son de gran ayuda para diferenciar los materiales y determinar las colectas repetidas en un banco de germoplasma, evitando el almacenamiento de materiales con las mismas características que no son expresadas en un mismo ambiente de evaluación (González-Aguilera et al., 2011; Zuriaga et al., 2009). Por ejemplo, las colectas 19, 20 y 21 tienen el mismo tipo de fruto y son originarias del mismo lugar; así, es posible tomar la decisión sobre la colecta a conservar con base al mayor polimorfismo obtenido.

La caracterización morfológica tuvo una duración de nueve meses en condiciones de invernadero con el registro de 62 variables; en tanto, la molecular se realizó solo en tres meses a partir de material vegetal proveniente de plántulas. Debido a que no siguieron el mismo patrón de agrupación, la realización de ambas representó un incremento de 37.5 % en la eficiencia de la discriminación de genotipos, por lo que deben ser consideradas como complementarias e indispensables. Con ello se mejora la capacidad de detectar diferencias entre genotipos y se incrementa la precisión al generar grupos de conservación con mayor variabilidad genética.

Estrategia de conservación

Los resultados de la caracterización morfológica obedecieron a un conjunto de variables fenotípicas, asociadas principalmente a la forma del fruto, esto permitió discriminar colectas y ubicarlas en tres grupos homogéneos en su interior y heterogéneos entre ellos (Grupo 1 riñones, Grupo 2 Cereza y Grupo 3 cilíndrico o redondo). La elección de genotipos a conservar dentro de cada conjunto puede realizarse mediante otras cualidades como: orígenes, color de fruto, forma de fruto, uso antropocéntrico, etc.

En cambio, cuando solo se cuenta con una caracterización molecular, no es posible ponderar o diferenciar las colectas que componen un grupo, ya que los marcadores son aleatorios y dominantes y es posible perder la precisión de la estimación de la variación genética. Otra consideración en esta discusión es que las colectas generalmente están compuestas por varios genotipos; por lo que al utilizar mezclas de ADN de las plantas evaluadas con el fin de ahorrar recursos, se pierde la posibilidad de identificarlas individualmente; así, la elección de colectas a conservar dentro de cada grupo sería aleatoria.

En el presente estudio la caracterización morfológica detectó menor diversidad que la molecular y generaron diferentes patrones de agrupamiento, corroborando que son estudios complementarios como lo demostraron Demey, Zambrano, Fuenmayor, y Segovia (2003).

Cuando se combinaron ambas caracterizaciones, el grupo 1 de la caracterización morfológica, con frutos

molecular characterization, whereas group 2, with cherry-type fruits, was divided into 6 subgroups and group 3, with cylindrical fruits, into 3 subgroups. This generated 16 subgroups (Table 3).

Under these considerations, molecular characterization greatly improves the efficiency involved in conserving genetic resources since it allows estimating within each group obtained in the morphological characterization the genetic variation not detected by the former; thus, it decreases the classification error and allows adequately analyzing the genetic variability studied by both characterizations as mentioned by Demey et al. (2003).

According to Rao et al. (2007), seed samples to be conserved should be genetically distinct from any other accession already registered in a seedbank. In the present situation this can be ensured by conserving one collection of each of the 16 subgroups identified in Table 3, or by a mixture of seeds of the genotypes comprising each subgroup.

Based on the above, in order to efficiently conserve the genetic variation studied, the selection of the genotypes of each subgroup (Table 3), for their safekeeping in the seedbank, will be based on maintaining different origins and differential fruit characters such as color and shape. If the number of collections is not reduced with the above criteria, the last selection criterion will be anthropocentric use.

Thus, the proposal for conserving the genetic variation in the 55 collections evaluated, and based on the criteria mentioned above, consists of safeguarding the 37 collections shown in Table 3, representing 67 % of the total number of collections evaluated, thereby eliminating genotype duplication.

In a more dramatic case, and based on the fact that the DNA characterized is a mixture from several individuals that make up a collection, the recommendation would be to maintain a balanced seed sample of the collections comprising a subgroup. Thus, in our case 16 samples would be conserved.

Conclusions

This research provides a basis for the efficient conservation of collections by avoiding the multiplicity of materials with similar characters.

The morphological and molecular characterizations are complementary in that together they more accurately assess the genetic variability of the populations studied, enabling a sustainable and more efficient conservation of the phylogenetic resources of tomato.

tipo riñón, fue dividido en siete subgrupos por la caracterización molecular; el grupo 2 con frutos tipo cereza en 6 subgrupos y el grupo 3, frutos cilíndricos, en 3 subgrupos. Esto generó 16 subgrupos (Cuadro 3).

Bajo estas consideraciones, la caracterización molecular mejora en gran medida la eficiencia de la conservación de los recursos genéticos ya que permite estimar dentro de cada grupo obtenido en la caracterización morfológica, variación genética no detectada por la primera; con ello se disminuye el error de clasificación y permite analizar de forma adecuada la variabilidad genética estudiada por ambas caracterizaciones como lo menciona Demey et al. (2003).

De acuerdo a Rao et al. (2007) las muestras de semillas que serán conservadas deben ser genéticamente distintas de cualquier otra accesión ya registrada en un banco de germoplasma. En la presente situación esto se puede garantizar al conservar una colecta de cada uno de los 16 subgrupos identificados en el Cuadro 3; o bien mediante una mezcla de semillas de los genotipos integrantes de cada subgroup.

Con base en lo anterior, para realizar la conservación eficiente de la variación genética estudiada, la selección de los genotipos de cada subgroup (Cuadro 3), para su resguardo en el banco de germoplasma, se basará en el mantenimiento de orígenes diferentes y de caracteres diferenciales del fruto como color y forma. En caso de no disminuir el número de colectas con los criterios anteriores, el último criterio de selección será el uso antropocéntrico.

Así, la propuesta de conservación de la variación genética a partir de las 55 colectas evaluadas, y con base en los criterios mencionados anteriormente, consiste en el resguardo de 37 colectas indicadas en el Cuadro 3, lo que representa 67 % del total de colectas evaluadas, con lo cual se elimina la duplicidad de genotipos.

En un caso más drástico, y al basarse en que el ADN caracterizado es una mezcla proveniente de varios individuos que componen una colecta, la recomendación sería el conservar un compuesto balanceado de semilla de las colectas que conforman un subgroup. Así, en nuestro caso se conservarían 16 muestras.

Conclusiones

Esta investigación establece una base para la conservación eficiente de las colectas al evitar la multiplicidad de materiales con caracteres similares.

Las caracterizaciones morfológicas y moleculares son complementarias al valorar con mayor precisión la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas,

The evaluated collections from eight states of Mexico showed wide genetic variation identified through 16 conservation groups, which can be conserved by safeguarding 67 % of the collections studied.

Acknowledgments

This study was funded by Chapingo Autonomous University's Tomato Breeding program (key: DGIP145002001) and by SAGARPA, SNICS, SINAREFI and COFUPRO, through the Characterization, Pre-breeding and Sustainable Use of Tomato in Mexico project (key: HORT-JIT-13-1), attached to the Support Program for Investment in Equipment and Infrastructure, Agricultural Genetic Resources Component.

End of English version

References / Referencias

- Agudelo-Agudelo, A. G., Ceballos-Aguirre, N., & Orozco, F. J. (2011). Caracterización morfológica del tomate tipo cereza (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía*, 19(2), 44-53. Retrieved from <http://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2013/20133297549.pdf>
- Álvarez-Hernández, J. C., Cortés-Madrigal, H., & García-Ruiz, I. (2009). Exploración y caracterización de poblaciones silvestres de jitomate (Solanaceae) en tres regiones de Michoacán, México. *Revista Polibotánica*, 28, 139-159.
- Benavides-González, A., Cisne-Contreras, J., Querol-Lipovich, D., & Morán-Centeno, J. C. (2011). Germoplasma de tomate silvestre (*Lycopersicum* spp.) en la reserva de recurso genéticos de Apacunca (RRGA), Chinandera. *La calera*, 11(7), 33-40.
- Benor, S., Zhang, M., Wang, Z., & Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) inbred lines using SSR molecular markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(6), 373-379. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60054-5
- Boada-Higuera, M. Y., Mejía-Ramírez, J. L., Ceballos-Aguirre, N., & Orozco, F. J. (2010). Evaluación agronómica de treinta introducciones de tomate silvestre tipo cereza (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía*, 18(2), 59-67.
- Bonilla-Barrientos, O., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala, J. J., Cruz-Izquierdo, S., Reyes-López, D., Hernández-Leal, E., & Hernández-Bautista, A. (2014). Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimienta de uso local en Puebla y Oaxaca, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 37(2), 129-139. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61031068004>
- Cadahia-López, C. (2000). *Fertirrigación; cultivos hortícolas, frutales y ornamentales*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Carrillo-Rodríguez, J. C., & Chávez-Servia, J. L. (2010). Caracterización agromorfológica de muestras de

lo que permite conservar en forma sustentable y con mayor eficiencia los recursos fitogenéticos de tomate.

Las colectas evaluadas provenientes de ocho estados de México presentaron amplia variación genética identificada a través de 16 grupos de conservación, misma que puede ser conservada mediante el resguardo de 67 % de las colectas estudiadas.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el programa de Mejoramiento Genético de Jitomate de la Universidad Autónoma Chapingo (clave DGIP145002001) y por SAGARPA, SNICS, SINAREFI, COFUPRO, a través del proyecto Caracterización, Pre-mejoramiento y Aprovechamiento sustentable de Jitomate en México (clave: HORT-JIT-13-1), adscrito al Programa de Apoyo a la Inversión en Equipamiento e Infraestructura, Componente Recursos Genéticos Agrícolas.

Fin de la versión en español

- tomate de Oaxaca. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 33(4), 1-6. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61014255001>
- Chávez-Servia, J. L., Carrillo-Rodríguez, J. C., Vera-Guzmán, A. M., Rodríguez-Guzmán, E., & Lobato-Ortiz, R. (2011). *Utilización actual y potencial del jitomate silvestre mexicano*. México: Subsistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. CIIDIR- Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.
- Crisanto-Juárez, A. U., Vera-Guzmán, A. M., Chávez-Servia, J. L., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2010). Calidad de frutos de tomates silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Dunal) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 33(4), 7-13. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61014255002>
- Demey, R. J., Zambrano, Y. A., Fuenmayor, F., & Segovia, V. (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia* 28(12), 684-689.
- Eingenbrode, S. D., Trumble, J. T., & Jones, R. A. (1993). Resistance to beet armyworm, *Hemipterans* and *Lyriomyza* spp. in *Lycopersicum* accessions. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 118, 525-530. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/118/4/525.full.pdf+html>
- González-Aguilera, J., Pessoni, L. A., Belfort-Rodrigues, G., Elsayed, A. Y., Henriques-da Silva, D. J., & Gonçalves-de Barros, E. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Revista Brasileira de Ciencias Agrarias*, 6(2), 243-252. doi: 10.5039/agraria.v6i2a998

- Hotelling, H. (1951). *A generalized t test and measure of multivariate dispersion*. Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley, California: University of California Press. Retrieved from https://projecteuclid.org/download/pdf_1/euclid.bsm.1951.000217
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (1996). *Descriptores para el tomate Lycopersicon spp.* Roma, Italia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos.
- Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist*, 11(2), 37-50. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x/epdf>
- Johnson, E. D. (1998). *Applied Multivariate, Methods for data Analysts*. USA: Cole Publishing Company.
- Lobato-Ortiz, R., Rodríguez-Guzmán, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chávez-Servia, J. L., Sánchez-Peña, P., & Aguilar-Méndez, A. (2012). *Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la red de jitomate*. Texcoco, México: Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Colegio de Postgraduados.
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto de análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415-427. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43722407018>
- Pacheco-Triste, I. A., Chávez-Servia, J. L., & Carrillo-Rodríguez, J. C. (2014). Relación entre variación ecológica-orográfica y variabilidad morfológica de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Oaxaca. *Revistas Mexicana de Agroecosistemas*, 1(1), 28-39. Retrieved from http://www.itvalleoaxaca.edu.mx/posgrado/itvo/RevistaPosgrado/docs/RMAE%20vol%201_1_2014/RMAE_04-2014_Extenso.pdf
- Park, Y. H., West, M. A., & St-Clair, D. A. (2004). Evaluation of AFLPs for germoplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.). *Genome*, 47(3), 510-518. Retrieved from <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g06-016#V0Oo7PnhCM->
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic Improvement of Solanaceous Crop*, 2, 1-24. doi: 10.1201/b10744-2
- Pérez-Grajales, M., Márquez-Sánchez, F., & Peña-Lomelí, A. (1997). *Mejoramiento genético de hortalizas*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M. E., Ghosh, K., Novell, D., & Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma*. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Roma, Italia: Bioversity International. Retrieved from http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Manual_para_el_manejo_de_semillas_en_bancos_de_germoplasma_1261_01.pdf
- Robinson, J., & Harris, S. A. (2000). A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acacieae, Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 132(3), 195-222. doi: 10.1006/bojl.1999.0301
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (1983). *SAS technical report A108. Cubic clustering criterion*. Cary, N.C. USA: Author. Retrieved from https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/v82/techreport_a108.pdf
- Sultan, E. S. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science*, 5(12), 537-542. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01797-0
- Tikunov, Y. M., Khrustaleva, L. I., & Karlov, G. I. (2003). Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica*, 131(1), 71-8. doi: 10.1023/A:1023090318492
- Vásquez-Ortiz, R., Carrillo-Rodríguez, J. C., & Ramírez-Vallejo, P. (2010). Evaluación morfo-agronómica de una muestra del jitomate nativo del Centro y Sureste de México. *Naturaleza y Desarrollo*, 8(2), 49-64. Retrieved from http://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/files/pdf/vol8num2/NatyDes_Vol-8-2-Art4.pdf
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marooof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., & Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pine and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 2097-100. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/84/7/2097.full.pdf>
- Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R., & Nuez, F. (2009). Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinillifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), 39-51. doi: 10.1007/s10722-008-9340-z