



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VÍCTOR ALZAMORA CASTRO

**PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS CON
LA RESPUESTA A RESTRICCIÓN HÍDRICA DE 6
POBLACIONES DEL TOMATE SILVESTRE *SOLANUM
PIMPINELLIFOLIUM* DE LAS REGIONES LIMA Y PIURA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER EN
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

LORENA YLIANA RAMIREZ GONZALES

LIMA – PERÚ

2016

Presidente

Dr. Wilfredo Gonzales Lozada

Vocal

Dr. Luis De Stefano Beltrán

Secretario

Msc. Irene Delgado de la Flor Montauban

Asesor

Dr. Daniel Clark Leza

Agradecimiento

“Te conocí joven pero no sabía aún que ibas a ser una persona tan importante en mi vida. Primero eran tus lecciones hasta quizá tus represiones. Después fueron tus múltiples historias tanto propias como ajenas. Tu pasión por los trazos ya inventados. Lo tienes todo, no te hace falta más nada que una letra tras otra. Transmites calma y sabiduría. Y como no mencionar esas risas tan tuyas: burlonas incontroladas. Que nos hace olvidar por un instante la edad que te corresponde”

(Dedicado a Sra Castillo Tello Morán).

SUMARIO

Solanum pimpinellifolium es una especie silvestre de tomate de comportamiento anual que se distribuye en Sudamérica a lo largo de la costa de Ecuador, Perú y Chile, donde crece bajo distintas condiciones de disponibilidad hídrica. Un estudio previo caracterizó a nivel fenotípico la respuesta de dos poblaciones de *S. pimpinellifolium* de la región Lima (Azipitia y Universidad Nacional Agraria La Molina-UNALM) y dos de la región Piura (Tambogrande y Morante) al estrés hídrico. Este nuevo estudio se propuso evaluar la posible relación entre la expresión de los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1*, involucrados en la respuesta a estrés hídrico, y las respuestas fenotípicas observadas en el estudio anterior. La evaluación incluyó dos poblaciones adicionales respecto del estudio anterior, Pantanos de Villa en la región Lima y Colán en la región Piura. Los aspectos fenotípicos más relevantes de la respuesta a la disminución de riego observada en el estudio anterior (contenido de pigmentos fotosintéticos, eficiencia fotosintética, contenido de materia seca, contenido relativo de agua, capacidad antioxidante, área foliar, evaluación del crecimiento) fueron evaluados en las seis poblaciones.

Los resultados demuestran que la expresión relativa de los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* en *S. pimpinellifolium* es sensible al estrés hídrico, aunque ello varía de acuerdo a la población examinada. La expresión relativa del gen *CBF1* mostró una tendencia a aumentar en todas las poblaciones bajo ambos modelos de estrés hídrico, y en la reducción de riego se asoció con una menor altura de las plantas. Este aumento solo pudo asociarse con un mantenimiento de la eficiencia fotosintética en las poblaciones de Piura y en la de Pantanos de Villa. Por otro lado, la imposibilidad de establecer una relación entre la expresión relativa de *CRTLb* y los niveles de carotenoides totales en plantas con riego reducido sugiere que otros genes influirían de forma significativa en la regulación de la concentración de estos pigmentos durante la restricción hídrica en esta especie. En cuanto a *SIERF1*, los experimentos de reducción de riego solo permitieron observar un aumento de su expresión relativa en la población de UNALM, que coincidió con una tendencia de dicha población a incrementar su contenido relativo de agua y con una caída de su densidad estomática. Las respuestas fenotípica y molecular al estrés hídrico distinguieron a la población de Pantanos de Villa del resto de poblaciones, por lo que es recomendable analizar en mayor profundidad su situación filogenética dentro de la especie.

SUMMARY

Solanum pimpinellifolium is an annual wild tomato species from South America, distributed along the coast of Ecuador, Perú and Chile where it grows under different conditions of water availability. A previous study characterized the phenotypic response of two populations of *S. pimpinellifolium* from Lima (Azpitia and Universidad Nacional Agraria La Molina-UNALM) and two populations from Piura (Tambogrande and Morante) under water stress. The present study aimed to evaluate a putative relationship between the expression of *CBF1*, *CRTLb* and *SIERF1*, three genes involved in the response to water stress, and the phenotypic responses previously reported. Aside from the populations previously studied, two additional populations were included: Pantanos de Villa from Lima and Colán from Piura. The most relevant phenotypic parameters examined in the previous study in response to reduced watering (content of photosynthetic pigments, photosynthetic efficiency, dry matter content, relative water content, antioxidant capacity, leaf area, plant stature) were evaluated in the six populations.

The relative expression of *CBF1* showed a tendency to increase in all populations with both water stress models, and was associated with a diminished plant stature when watering was reduced. This increase in *CBF1* relative expression was associated with maintenance of photosynthetic efficiency only in the populations of Piura and in the Pantanos de Villa population. On the other hand, the absence of an association between *CRTLb* relative expression and total carotenoids content in plants under reduced watering suggests that other genes might be involved in the regulation of this variable. As for *SIERF1*, an increase in its relative expression could only be observed in the UNALM population under reduced watering, which concurs with a trend of this population to increase its relative water content.

The phenotypic and molecular responses to water stress of the Pantanos de Villa population distinguished it from other populations, and therefore it is recommended to examine in-depth its position within the phylogeny of the species

Índice

Pág

I.	Introducción.....	1-15
II.	Objetivos.....	16
III.	Material y Métodos.....	17-29
1.	Material vegetal.....	17-18
2.	Germinación de las semillas.....	19
3.	Metodología utilizada para el análisis de expresión de genes.....	19-25
	3.1 Disminución de disponibilidad hídrica.....	19-21
	3.2 Aislamiento de ARN y síntesis de cADN.....	22
	3.3 Amplificación de cADN por PCR.....	22-23
	3.4 Estimación semi-cuantitativa de ARN mensajeros y análisis de resultados..	24
	3.5 Secuenciamiento de los productos de amplificación.....	25
4.	Metodología para el análisis fenotípico.....	26-29
4.1	Tratamiento: Disminución de disponibilidad hídrica.....	26
4.2	Mediciones de variables fenotípicas.....	26
	4.2.1 Evaluación de crecimiento.....	26
	4.2.2 Área del foliolo.....	26
	4.2.3 Contenido de materia seca en la hoja.....	26
	4.2.4 Contenido relativo de agua.....	27
	4.2.5 Fluorescencia de la clorofila.....	27
	4.2.6 Contenido de clorofila a y b, y carotenoides.....	27
	4.2.7 Capacidad antioxidante.....	28
4.3	Análisis de resultados.....	29
IV.	Resultados.....	30-43
V.	Discusión.....	44-55
VI.	Conclusión.....	56
VII.	Recomendaciones.....	57
VIII.	Referencias bibliográficas.....	58-61
IX.	Anexos.....	62-88

I. Introducción

El tomate cultivable, *Solanum lycopersicum*, es considerado a nivel mundial la segunda hortaliza en importancia después de la papa (*S. tuberosum*), con una producción de 159 millones de toneladas de fruto fresco en 4.7 millones de hectáreas durante el año 2011 (FAOSTAT, 2012). En el Perú, el tomate se encuentra dentro de las 5 hortalizas de mayor producción (MINAG, 2013).

La reducción de disponibilidad hídrica ocasiona una disminución en la producción y la calidad de los cultivos en todo el mundo. Este problema genera cambios fisiológicos, morfológicos y en los procesos bioquímicos de las plantas.

La tolerancia de las plantas cultivables al estrés hídrico varía dependiendo de la especie, así como del estadio del cultivo. Existen especies tolerantes al estrés hídrico como el trigo (*Triticum aestivum*), la cebada (*Hordeum vulgare*), el sorgo (*Sorghum bicolor*), la alfalfa (*Medicago sativa*) y la avena (*Avena sativa*); otras especies como el girasol (*Helianthus annuus*), el maíz (*Zea mays*), la soya (*Glycine max*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la arveja (*Pisum sativum*) poseen una sensibilidad moderada; mientras que el tomate (*Solanum lycopersicum*), la papa (*Solanum tuberosum*) y el arroz (*Oryza sativa*) constituyen un grupo de alta sensibilidad a la sequía (Heszky, 2007).

No obstante estas diferencias, los incrementos de las temperaturas y los niveles de sequía que se estima se producirán en los distintos continentes durante los próximos 20 a 30 años (Figura 1) afectarán incluso a las especies más tolerantes. La FAO (2013) prevé que los

Estados Unidos tendrán una caída significativa en la producción de alimentos hacia el año 2050, y en particular el estado de California disminuirá su producción de maíz, tomate, arroz, algodón y trigo entre un 10 y un 30%. De acuerdo a estas predicciones, la producción de soya en Brasil caerá en un 20%, así como la de otros cultivos como el arroz, el frijol, el maíz, el café y la yuca. En Oriente Medio, la producción de trigo disminuirá hasta un 20%, la de arroz en un 30% y la de maíz en un 47%. La China, por su parte, no contará con suministros de alimentos suficientes para el año 2030, entre otras cosas por una pronunciada caída en la producción de trigo asociada a las altas temperaturas y la sequía, con lo que dependerá de los mercados internacionales para abastecerse. Por último, se anticipa que el África será el continente más afectado por el cambio climático debido a fenómenos naturales como ciclones, sequías e inundaciones. En este continente se prevé que experimentará una fuerte caída en la producción de cultivos como maíz y trigo (Vidal, 2013).

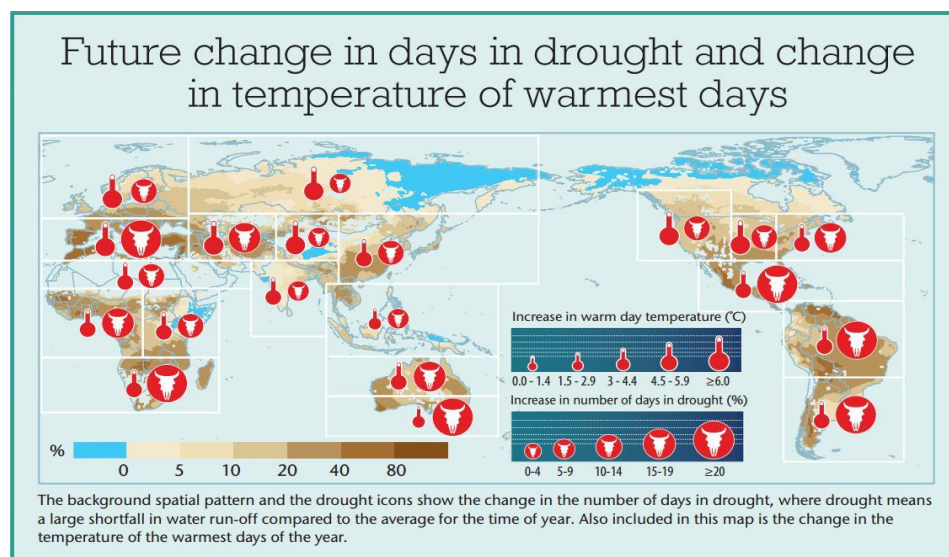


Figura 1. Cambios a futuro en el número de días de sequía y en la temperatura. Imagen tomada de Human Dynamics of Climate Change, by British Foreign and Commonwealth Office (FCO) and UK Met Office (<http://iccc.hk/background>).

El tomate pertenece a una especie susceptible al estrés hídrico y como tal se ha observado que una reducción en el potencial hídrico de la planta causa perjuicios a nivel de crecimiento (reducción del tamaño, reducción de la biomasa y retraso del florecimiento). Todos estos cambios repercuten en la calidad del fruto al incrementarse la concentración de ácido cítrico y hexosas (Costa et al., 2007; Mitchell y Shennan., 1991; Patane et al., 2010). En el contexto previsto de incremento de temperaturas y periodos de sequía, se anticipa que este cultivo quedará en una posición de extrema vulnerabilidad, y de no generarse variedades con mayor tolerancia, su producción se verá seriamente comprometida y con ello la disponibilidad de una fuente importante de carotenoides, tocoferoles y otros antioxidantes como el ácido ascórbico y los flavonoides (Borguini y Torres, 2009; Moco et al., 2006).

Respuestas fisiológicas, bioquímicas y morfológicas de las plantas frente al estrés hídrico

Se han realizado numerosas investigaciones para determinar las estrategias que utilizan las plantas para controlar su contenido de agua. Durante el estrés hídrico la mayor parte de plantas no regulan adecuadamente su tasa de transpiración, lo que ocasiona una pérdida de turgencia y afecta los órganos de la planta. Sin embargo, se han descrito al menos tres estrategias que le permiten a algunas especies sobrevivir frente a una baja disponibilidad de agua:

1. El escape, por el cual las plantas ajustan su ciclo de vida y su reproducción a los periodos de disponibilidad de agua para asegurar la sobrevivencia. Esta

característica está relacionada con un incremento en el contenido de peso fresco con respecto al peso seco (Anjum et al., 2011; Ansquer et al., 2009).

2. La evasión de la deshidratación, una estrategia intermedia para mantener una actividad metabólica que permita un crecimiento normal. Un ejemplo de ello es el control estomático y la disminución del ratio tallo: raíz. Ello implica el logro de una mayor eficiencia radicular (aumento de la longitud y el grosor de las raíces) y una minimización de la tasa de transpiración a través del cierre estomático (Farooq et al., 2008; Verslues et al., 2011).
3. La tolerancia a la deshidratación, por la cual, bajo condiciones extremas de estrés hídrico, las plantas entran a un estado de dormancia o semi-dormancia, inactivando por completo su metabolismo (Farooq et al., 2008; Verslues et al., 2011).

Al margen de estas respuestas especializadas, las plantas tienen un patrón general de respuestas que incluye la inmediata producción de ácido abscísico (ABA) y etileno, hormonas que regulan el estatus hídrico de la planta y el crecimiento vegetativo. El ABA se transporta a través del xilema desde las raíces hacia las hojas, donde determina el cierre estomático por disminución de la concentración de los iones K^+ y salida de agua del citoplasma de las células guarda (Schroeder et al., 2001).

Al cerrarse los estomas, la eficiencia fotosintética se ve afectada por una pobre asimilación de CO_2 y la acumulación de NADPH no utilizado que provoca una sobrecarga de electrones en la cadena de transporte. Este exceso de electrones que no puede canalizarse hacia la

reducción del NADP^+ tiende a reaccionar con el oxígeno molecular y con ello a formar especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS pueden comprometer la función del cloroplasto por peroxidación lipídica de sus membranas, además de modificar irreversiblemente sus ácidos nucleicos y proteínas, entre estas últimas las que participan en la misma maquinaria fotosintética (Lambers et al., 2008; Reddy et al., 2004).

Para neutralizar las ROS y minimizar el daño celular, las plantas cuentan con enzimas antioxidantes como catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas diversas, entre otras. También juegan un papel importante en esta función compuestos no enzimáticos, entre ellos pigmentos fotosintéticos como los carotenoides. Estos últimos son, junto a las clorofilas a y b, elementos esenciales en la maquinaria fotosintética de las plantas. La clorofila a es responsable de iniciar el flujo de electrones a partir de los fotosistemas I y II durante la fase luminosa de la fotosíntesis. Mientras que la clorofila b y los carotenoides son los componentes principales de las antenas de los fotosistemas que permiten captar la energía luminosa. Los carotenoides pueden secuestrar los tripletes de clorofila a, que se producen por una sobre-exitación de la molécula de clorofila, y con ello prevenir la formación posterior de singletes de oxígeno (Cheruth et al., 2009; Krieger-Liszkay, 2005; Telfer et al., 1994; Unyayar et al., 1990).

Las plantas también pueden realizar cambios en su composición bioquímica para aumentar su capacidad de retener agua, los que dan como resultado la acumulación de compuestos osmoprotectores en el citosol y en el cloroplasto. (Nemeskéri et al., 2009, Rontein et al., 2002). Éstos pueden provenir, por ejemplo, de la conversión del almidón en azúcares libres o de la inhibición de la síntesis de proteínas que promueve la acumulación de aminoácidos

libres (Rabe, 1990). Algunos osmoprotectores, como la prolina, poseen además propiedades antioxidantes que les permitirían contribuir al control del daño oxidativo bajo estrés hídrico (Signorelli et al., 2014).

Las respuestas especializadas están relacionadas con cambios estructurales más tardíos y complejos. Por ejemplo, las plantas pueden disminuir su densidad estomática o bien reducir el tamaño de los estomas. Más compleja aún es la disminución del área foliar, el aumento de densidad de tricomas, la formación de cera, la disminución del ratio tallo: raíz o el ajuste del ciclo reproductivo. Algunos de estos cambios tienen por finalidad limitar el exceso de transpiración, ya sea restringiendo el área vegetal, reduciendo el número de estomas por unidad de área o acumulando cera en la superficie de las hojas; otros buscan priorizar el alargamiento de la raíz. En cuanto al ajuste del desarrollo de estructuras reproductivas este incrementa la probabilidad de sobrevivencia a pesar de representar un gasto energético para la planta. Por último, el incremento de tricomas puede resultar una defensa contra la sequía porque aminora la absorción de la radiación solar (Anjum et al., 2011; Blum, 2003; Dalin et al., 2008; Vendramini et al., 2002; Xu y Zhou, 2008).

En el caso de las especies silvestres de tomate, se ha reportado que éstas muestran una diversidad de estrategias frente a la baja disponibilidad hídrica. Por ejemplo, *S. pennellii*, especie silvestre resistente a la sequía y con hojas suculentas similares a las de las cactáceas, hace un uso más eficiente del agua (WUE) debido a una reducción de su área foliar y una menor densidad estomática que minimiza la pérdida de dicha molécula (Easlon y Richards, 2009; Kebede et al., 1994; Martin y Thorstenson, 1988; Torrecillas et al., 1995). Otra especie silvestre, *S. chilense*, desarrolla raíces muy largas para absorber el agua

almacenada en los suelos profundos de inundación ocasional (Rick, 1973; Cheruth et al., 2009). Especies de tomate como *S. cheesmaniae*, *S. neoriskii*, *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* difieren en sus valores de SLA (área foliar específica), una medida de la relación área/peso seco de la hoja que, en valores elevados, se asocia con la pérdida de agua; además, muestran baja densidad estomática y cierre estomático (Easlon y Richards, 2009).

Las respuestas a la restricción hídrica resultan de una percepción del estrés osmótico en la membrana que puede ser señalizada por la vía dependiente de ácido abscísico (ABA), por la vía independiente de ABA o por el etileno. En lo que respecta a la vía dependiente de ABA, se conoce que la producción de esta hormona induce el cierre estomático y la disminución de la transpiración. Esta vía puede activar genes estructurales tales como los que codifican las acuaporinas y las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), o genes regulatorios que codifican factores de transcripción (*NAC RD26*, *AREB/ABF*, *MYB2*, *MYC2*) (Chaves et al., 2003; Golldack et al., 2011; Hussain et al., 2011; Nakashima et al., 2014). En cuanto a la vía independiente de ABA, los genes involucrados que se han identificado hasta el momento codifican factores de transcripción (*DREB2*, *NAC HD-ZIP*), aunque aún no está de todo claro cómo son activados (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Lindemose et al., 2013). Se ha postulado que, a pesar de ser consideradas vías independientes una de la otra, existiría una fuerte conexión entre ambas (Kizis et al., 2001). En relación a la respuesta mediada por etileno, ésta depende de la expresión de genes que codifican los denominados factores de respuesta a etileno (*ERF*) (Elklund et al., 1992).

Cambios en la expresión de genes asociados a la respuesta al estrés hídrico

Debido a que el ajuste de los niveles de factores de transcripción es una respuesta temprana en individuos sometidos a cambios en su entorno, sus niveles de expresión han sido evaluados en especies vegetales bajo diferentes tipos de estrés. En el caso de estrés hídrico, se han observado cambios en los niveles de expresión de algunos de estos genes que han sido asociados a tolerancia en variedades silvestres y cultivables de tomate, y que se reflejan en el fenotipo de la planta, sea a nivel bioquímico, fisiológico o morfológico.

El grupo de factores de transcripción codificados por los genes *DREB* pertenece a la familia AP2/ERF y posee dos subfamilias, *DREB1* y *DREB2*. Ambas subfamilias forman parte de la vía independiente de ABA e interactúan con el elemento cis DREB/CRT. La mayoría de miembros de *DREB1* es inducida por estrés térmico, mientras que los miembros de *DREB2* son inducidos por estrés hídrico y salinidad. Sin embargo, algunos miembros de la subfamilia *DREB1* son inducidos por estrés hídrico y otros por estrés salino, lo cual sugiere una conexión entre las subfamilias *DREB1* y *DREB2* (Sakuma et al., 2006). Así, el factor de transcripción *CBF1/DREB1b* de la subfamilia *DREB1* es inducido por estrés térmico en *Arabidopsis*, pero no por restricción hídrica (Shinozaki et al., 2007). Sin embargo, estudios han revelado que hay un incremento de la expresión del gen *CBF1* que se genera de forma natural frente a sequía en especies silvestres como en *S. lycopersicoides* y *S. habrochaites* (Zhang et al., 2014; Li et al., 2014). A su vez, estudios donde se ha sobre-expresado el gen *CBF1* artificialmente han dado como resultado fenotipos más tolerantes a sequía que el de las plantas no transformadas. Por ejemplo, cuando el gen *CBF1* de *Arabidopsis* se sobre-expresa en plantas transgénicas de tomate, éstas mantienen los valores de eficiencia

fotosintética en comparación a las plantas no transformadas en las cuales se observa más bien un descenso de este parámetro (Hsieh et al., 2002). Estos resultados sugieren entonces que *CBF1* podría estar también involucrado en la respuesta a estrés hídrico, aunque su papel debe aclararse todavía. Si bien la información sobre las respuestas a nivel bioquímico y fisiológico con las cuales la expresión de los genes de la familia *DREB* está asociada es escasa, es interesante notar que la sobre-expresión del gen *GhDREB* de algodón en plantas transgénicas de trigo resultó en una mayor tolerancia a estrés hídrico, bajas temperaturas o alta salinidad a través de la acumulación de azúcares solubles y clorofila en las hojas (Gao et al., 2009; Kasuga et al., 2001). Asimismo, Cong et al., (2008) determinaron que la sobre-expresión en tabaco del gen *DREB1b* proveniente de *Brassica juncea* generaba plantas más tolerantes al estrés hídrico. Las plantas transformadas redujeron la pérdida de agua en comparación con las plantas no transformadas, lo que podría estar ligado a un mayor cierre estomático. Además, al someter las plantas transformadas a estrés salino, un tipo de estrés fuertemente relacionado con el estrés hídrico, encontraron mayores niveles de prolina, un mecanismo descrito de tolerancia al estrés hídrico, y también mayores niveles de clorofila en comparación a las plantas no transformadas.

Otros factores de transcripción que participan en la respuesta a distintos tipos de estrés son los que pertenecen a la familia ERF. Esta familia posee un motivo estructural que reconoce una secuencia reguladora en los promotores de los genes que responden a etileno. El etileno participa en la maduración del fruto, la senescencia, la abscisión y también en las respuestas a estrés abiótico y biótico (Abeles et al., 1992). En relación a su influencia en la arquitectura del tallo y su crecimiento una vez superado el estadio de plántula, se han reportado efectos estimulatorios e inhibitorios, algunas veces en una misma especie

(Vandenbussche y Van Der Straete, 2012). Se ha demostrado, además, que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con etileno induce la formación de conglomerados de estomas en la cara adaxial de las hojas (Serna y Fenoll, 1997). No obstante, en otro estudio realizado en esta misma especie, el etileno induce el cierre estomático. En tanto que bajo estrés hídrico, la aplicación del etileno junto con el ácido abscísico inhibe el cierre estomático, por lo que sus efectos a este respecto parecen ser determinados por el contexto fisiológico (Desikan et al., 2006; Tanaka et al., 2005).

Se ha demostrado que la sobre-expresión del gen que codifica uno de los miembros de la familia ERF, *SlERF1*, y que actúa como un activador de la expresión génica, confiere una mayor tolerancia al estrés hídrico en plantas transgénicas de *S. lycopersicum* (Lu et al., 2010). Se encontró que esta tolerancia estaba asociada a un mayor contenido relativo de agua (RWC), una acumulación de prolina y azúcares solubles, así como menores niveles de malondialdehído, un producto de la peroxidación lipídica inducida por especies activas de oxígeno. Este último resultado sugiere que la expresión de *SlERF1* bajo condiciones de restricción hídrica podría resultar en una menor generación de especies activas de oxígeno, un aumento de la capacidad antioxidante, o una combinación de ambos. En otro estudio realizado en tabaco donde se sobre-expresó *SodErf3*, un miembro de la familia ERF identificado en caña de azúcar y que también actuaría como un activador de la expresión génica, se observó un mayor tamaño en las plantas transgénicas que en los controles no transgénicos bajo estrés hídrico. Las plantas transgénicas llegaron incluso a florecer cuando se extendió su crecimiento bajo estas condiciones (Trujillo et al., 2008).

El metabolismo de los carotenoides también ha sido implicado en la respuesta a la restricción hídrica. En términos generales, se ha asociado una mayor tolerancia al estrés hídrico y salino en individuos capaces de acumular mayores concentraciones de carotenoides tales como el β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina, neoxantina (Chen et al., 2011; Kim et al., 2014; Shi et al., 2015). La enzima licopeno beta ciclasa, codificada por el gen *CRTLb*, cataliza la conversión del licopeno en β -caroteno para dar origen a la rama β de la vía de síntesis de carotenoides. Los carotenoides de esta rama, y en particular el β -caroteno, son componentes importantes de la maquinaria fotosintética que participan en la captación de la energía solar y protegen la célula al secuestrar los tripletes de clorofila y reducir los niveles de ROS (Collins y Roberts, 2006; Mimuro y Katoh, 1991). El beta caroteno sirve a su vez de sustrato para la producción de las xantófilas, importantes en los mecanismos de disipación del exceso de energía y entre las que se encuentra la neoxantina, que juega un papel crítico en la preservación del fotosistema II. La rama β conduce por último a la biosíntesis de ABA, hormona que induce el inicio de la cascada señalización de las plantas como respuesta a diferentes tipos de estrés (Cunningham et al., 1996; Cazzonelli et al., 2011; D'Ambrosio et al., 2004; Chen et al., 2011).

Si bien existe evidencia sólida de que la sobre-expresión de un gen *CRTLb* ectópico induce tolerancia a estrés hídrico y salino en distintas especies, entre ellas el tomate (D'Ambrosio et al., 2004; Chen et al., 2011; Shi et al., 2015), la información respecto de los cambios de la expresión del gen endógeno en respuesta a estos tipos de estrés en solanáceas difiere según las especies. En el tomate cultivable *S. lycopersicum* cv. M82 y en líneas de introgresión tolerantes a sequía, obtenidas a partir de cruces con la especie silvestre *S.*

pennellii, se observó una disminución de la expresión del gen *CRTLb* en plantas sometidas a restricción de riego (Gong et al., 2010), mientras que en plantas de tabaco bajo un régimen similar de restricción hídrica se ha reportado más bien una inducción de la expresión de dicho gen (Shi et al., 2015). No se ha podido encontrar en la literatura científica antecedentes sobre la expresión de *CRTLb* en la especie silvestre *S. pimpinellifolium* bajo condiciones de estrés hídrico.

Planteamiento de problema

El mejoramiento genético del tomate cultivable a partir de atributos de especies silvestres de tomate como *S. pennelli*, *S. chilensis* y *S. pimpinellifolium* ha sido objeto de numerosos estudios. *S. pennellii* se adapta a climas semi-áridos de acantilados costeros y tiene la habilidad de absorber y retener la humedad atmosférica, en tanto *S. chilense* se adapta a climas áridos y se caracteriza por desarrollar un sistema radicular profundo (Martin y Thorstenson et al., 1988; Rick et al., 1973). Se han anotado en el Genbank algunos genes relacionados con estrés hídrico en estas dos especies, entre ellos el que codifica una endoquitinasa ácida de *S. chilensis* inducida por ABA, y los que codifican proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), involucradas en la formación de ceras y cutina en *S. pennellii* (Chen et al., 1994; Trevino et al., 1998).

En cuanto a *S. pimpinellifolium*, se trata de una especie utilizada con mucha frecuencia en los esfuerzos de mejoramiento, ya sea mediante cruzamiento convencional o a través de manipulación genética (Ellis et al., 1971; Mahuad et al., 2013). Ello se debe a su elevada compatibilidad con las variedades cultivables, cercanía filogenética, características

aprovechables del fruto (color) y al hecho de que algunas poblaciones han mostrado tolerancia a sequía, salinidad y resistencia a diversos patógenos (Boissot et al., 2008; Foolad et al., 2003; Rose et al., 2007; Vidavski et al., 2008). Debido a que su distribución se da mayormente a lo largo de la costa de Perú y Ecuador, donde la disponibilidad de agua muestra una gran heterogeneidad espacial y temporal, se ha establecido una fuerte asociación entre la precipitación de los lugares de origen de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* y la tolerancia de la planta a la sequía (Nakazato et al., 2008; Zuriaga et al., 2008).

En el Perú, *S. pimpinellifolium* se distribuye en una diversidad de condiciones ambientales, lo que podría estar asociado a un alto nivel de plasticidad (Moyle et al., 2008). Se encuentra en regiones como Lima y Piura, que tienen diferencias climáticas marcadas en parámetros como la precipitación anual (Lima: 50 mm, Piura: 100 mm), la humedad relativa (Lima: 99%, Piura: 71%) y la temperatura media de verano (Lima: 28 °C, Piura: 35 °C). Estas diferencias del entorno de la planta sugieren que dichas poblaciones podrían tener respuestas distintas ante cambios en la disponibilidad de agua.

En este sentido, un estudio realizado en el Laboratorio de Ecología evolutiva de la UPCH en el que se midieron los cambios en un grupo de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en respuesta a la restricción hídrica mostró patrones de respuesta diferentes en dos poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Lima (Azpitia y UNALM) y dos poblaciones de Piura (Morante y Tambogrande). Los resultados indicaron que todas las poblaciones estudiadas responden a la reducción de agua. Algunas respuestas ocurrieron en el mismo sentido en todas las poblaciones: se redujo la tasa de transpiración, la altura, el LDMC y la

relación clorofila a/b. Otras variaron de acuerdo a la región: el potencial xilemático disminuyó en Piura pero no cambió en las poblaciones de Lima; la eficiencia fotosintética cayó en las poblaciones de Lima pero no varió en las poblaciones de Piura; las concentraciones de clorofila total y carotenoides se incrementaron en las poblaciones de Piura, alcanzando valores similares a las poblaciones de Lima las cuales no variaron; y el número de estructuras reproductivas se incrementó únicamente en las poblaciones de Piura. Por último, algunas respuestas difirieron a nivel de población: la densidad estomática abaxial disminuyó en las poblaciones de Tambogrande y UNALM, y el área foliar disminuyó solo en la población Tambogrande.

Resulta entonces de interés investigar si estas variaciones en la respuesta al estrés hídrico se ven reflejadas en los patrones de expresión de genes vinculados a los parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos estudiados. En este trabajo se evalúan seis poblaciones de *S. pimpinellifolium* (tres de Lima y tres de Piura) respecto del comportamiento del gen *SIERF1*, cuya expresión se ha reportado influye en el estado de hidratación del tejido (RWC) asociado a la densidad estomática, disminuye el ratio peso fresco: peso seco (LDMC) y promueve el aumento del contenido de prolina y de azúcares solubles que contribuirán a la retención de agua y a la remoción de ROS (Lu et al., 2010; Rejeb et al., 2014; Signorelli et al., 2014; Trujillo et al., 2008). Asimismo, las diferencias reportadas en la capacidad de acumular pigmentos como clorofila y carotenoides, así como los cambios en la eficiencia fotosintética en respuesta a la restricción hídrica entre las poblaciones de las regiones Lima y Piura, podrían tener un correlato en las variaciones de la expresión de los genes *CBF1* y *CRTLb*, por lo que también se incluyen estos genes en la

evaluación (Hsieh et al., 2002; Lu et al., 2010; Chen et al., 2011; Shi et al., 2015; Gong et al., 2010).

De esta manera, el estudio exploratorio realizado se propone contribuir a un mejor entendimiento, desde la perspectiva molecular, de la diversidad de las respuestas fenotípicas observadas en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Lima y Piura frente a una disminución de riego. La menor disponibilidad de agua en un futuro, prevista como consecuencia del avance del cambio climático, plantea la necesidad de contar con cultivos que sean tolerantes a la sequía. Por ello, anticipamos que el conocimiento de la diversidad de respuestas de las poblaciones peruanas de *S. pimpinellifolium* a este tipo de estrés será una herramienta útil para futuros programas de mejoramiento genético del tomate cultivable orientados a la generación de líneas con menores requerimientos de riego.

II. Objetivos

Objetivo General

Explorar los ajustes en la expresión de genes en respuesta a los cambios de disponibilidad hídrica en 6 poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de Piura y Lima.

Objetivos específicos

- Determinar los niveles de expresión relativa de los genes *CBF1*, *SIERF1* y *CRTLb* en 6 poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de Lima y Piura sometidas a restricción hídrica.
- Evaluar en las 6 poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de Lima y Piura, sometidas a restricción hídrica, las siguientes variaciones fenotípicas: contenido de pigmentos fotosintéticos, eficiencia fotosintética, número de hojas totales y contenido de peso seco (LDMC), contenido relativo de agua (RWC), área foliar y capacidad antioxidante.
- Analizar las posibles correspondencias entre los niveles de expresión relativa de los genes mencionados y las respuestas fenotípicas de las 6 poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de Lima y Piura

III. Material y Métodos

1. Material vegetal

Solanum pimpinellifolium es una especie de tomate silvestre originaria de Sudamérica, que se distribuye a lo largo de la costa de Ecuador, Perú y Chile (Cheruth et al., 2009; Peralta et al., 2008). Crece como una planta herbácea de comportamiento anual, que puede alcanzar hasta los 80-100 cm de altura. A nivel morfológico, presenta tricomas pequeños de 1 mm de largo, hojas con pubescencia, corola estrellada, frutos rojos de 1 cm de diámetro, inflorescencia unípara con pedicelos separados, hojas pinnadas con el margen dentado o entero, y flores que pueden ser autogámicas o bien alogámicas (Galiano, 1959; Sifres et al., 2007).

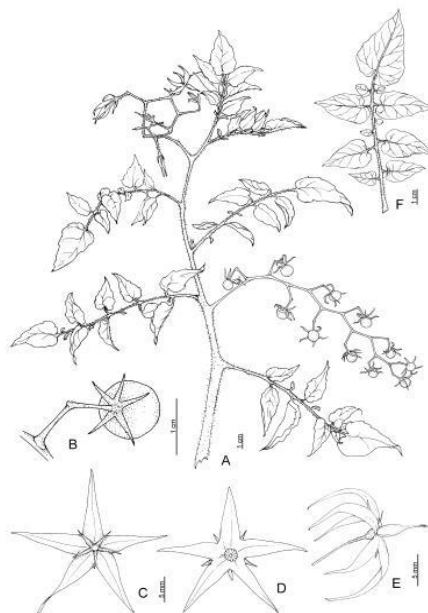


Figura 1. A. Branch; B. Fruto; C. Vista abaxial de la flor; D. Vista adaxial de la flor; E. Vista de lado de la flor; F. Hoja (Peralta et al. 2008).

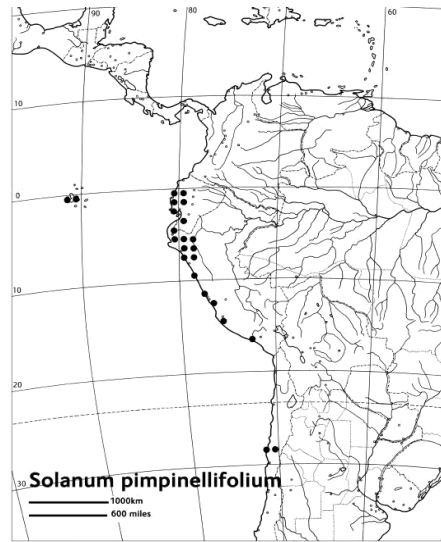


Figura 2. Distribución geográfica de *Solanum pimpinellifolium* (Peralta et al. 2008).

Las poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* con las cuales se trabajó fueron las siguientes:

Población	Región	Latitud sur	Longitud O	Altitud (msnm)	T° media de verano (°C)	Precipitación anual (mm)	Humedad relativa (%)
Morante		5°25.45'	80°14.85'	246			
Colán	Piura	4° 53.80'	80° 59.83'	45	35	100	71
Tambogrande		5°06.25'	80°36.02'	68			
Azpitia		12°35.30'	76°37.47'	171	28		
Pantanos	Lima	12°13.12'	76° 58.93'	15	18.6	50	100
UNALM		12°4.95'	76°56.81'	155	28		

Tabla 1. Ubicación geográfica de los puntos de colección de semillas de *Solanum pimpinellifolium* durante marzo del 2009 (Piura) y diciembre del 2010 (Lima).

2. Germinación de las semillas

Se esterilizaron las semillas con 2.7% de hipoclorito de sodio por 15 min y luego se lavaron con agua destilada estéril 3 veces (Amini y Ehsanpour, 2006). Las semillas esterilizadas se colocaron en frascos de vidrio que contenían medio líquido preparado con sales Murashige y Skoog 0.5X (Murashige y Skoog, 1962); los frascos fueron tapados y sellados con Parafilm M[®], y se mantuvieron en agitación (Anexo 1). Se colocaron 25 semillas por frasco y éstos fueron mantenidos en un cuarto de cultivo por 1 semana a una temperatura constante de 24°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad.

3. Metodología utilizada para el análisis de expresión de genes

3.1 Disminución de disponibilidad hídrica

Para disminuir la disponibilidad hídrica se trabajó con dos aproximaciones: un tratamiento de plantas en macetas (ver sección “Resultados”) y un tratamiento en cultivo *in vitro* (ver Anexo 7). En ambos casos se consideró que los cambios en la expresión de algunos genes en respuesta al estrés pueden desencadenarse en periodos cortos, mientras que los de otros pueden ocurrir en periodos más largos (Ramanjulu y Bartel, 2002).

En el tratamiento de plantas en macetas, plántulas obtenidas 1 semana después de producida la germinación fueron sembradas en almácigos con tierra enraizante para fortalecer su crecimiento. Luego de 3 semanas se transfirieron a macetas de plástico de 2 L de capacidad que contenían tierra preparada en una proporción 3:2 de tierra de hoja y arena,

y se mantuvieron por 2 semanas en el tinglado de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID; 20 m x 12 m) bajo las mismas condiciones de temperatura (20-35 °C) y luz. Durante el periodo inicial de 5 semanas (almácigo y maceta) las plantas fueron regadas cada dos días con un volumen de 50 mL de agua. Para iniciar el tratamiento de estrés hídrico se consideró como tiempo 0 h el día que hubiese correspondido regar (dos días después del último riego) pero en el que se suspendió el riego. A partir de ese momento, las plantas continuaron sin riego y se colectaron muestras de hojas a las 0, 24 y 32 h que fueron almacenadas en RNAlater® para la posterior extracción de ARN (Maskin et al., 2001; Sun et al., 2010; Weiss y Egea-Cortines, 2009; Yáñez et al., 2009). Las plantas del grupo control continuaron con el régimen regular de riego de 50 mL de agua cada dos días. El número de muestras fue el siguiente: (3 réplicas + 2 controles) x 6 poblaciones, N =30 plantas.



Figura 3. Plantas de *S. pimpinellifolium* provenientes de Azpitia, Colán, Morante, Tambogrande y UNALM utilizadas para el tratamiento en macetas.

En el tratamiento en cultivo *in vitro*, plántulas de 1 semana se transfirieron a placas Petri con medio sólido MS (0.5X), tampón MES 6 mM y agar (1.5%), pH 5.7, equilibradas con una solución de polietilenglicol (PEG, 250 g/L), un polímero que no es absorbido por las

raíces de las plantas y que por lo tanto actúa como agente osmótico (Anexo 2). Se optó por una concentración de PEG de 250 g/L porque daba lugar a manifestaciones menos drásticas en cuanto a marchitez y amarillamiento que las concentraciones mayores, permitiendo a la vez observar un retraso en el crecimiento que se tradujo en una menor longitud de las plantas y sus raíces, así como en un menor número de hojas (Figura 4). Las placas se mantuvieron en posición vertical en un cuarto de cultivo a una temperatura constante de 24°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad (Verslues et al., 2006). La extracción de ARN se realizó en plántulas de 14 días y para el análisis de expresión genética se tomaron “pools” de 5 plántulas cada uno a las 0, 12 y 24 h de iniciado el tratamiento (Hsieh et al., 2010). En el caso de los grupos control, las placas fueron equilibradas con una solución compuesta de los mismos elementos que la utilizada con las placas de los grupos de tratamiento, con la sola excepción del PEG que estuvo ausente. El número de muestras que se utilizó fue el siguiente: (3 réplicas de 5 plántulas c/u + 2 controles de 5 plántulas c/u) x 3 tiempos x 6 poblaciones, N =450 plántulas.



Figura 4. Tratamiento en cultivo *in vitro*. Izquierda: Placa control. Derecha: Placas con tratamiento (medio con PEG, 250 g/L). Las fotografías se tomaron luego de 20 días de iniciado el tratamiento.

3.2 Aislamiento de ARN y síntesis de cADN

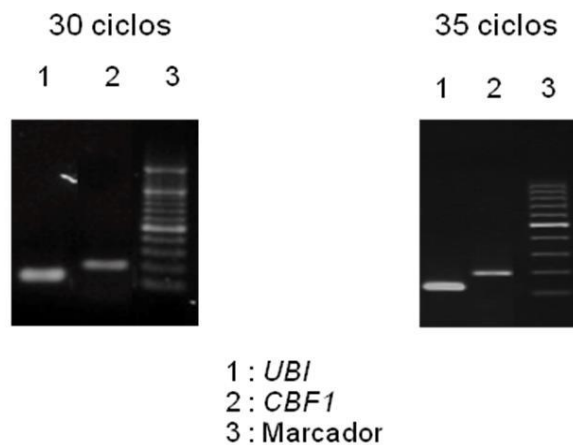
El ARN total se extrajo de tejido foliar de individuos sometidos a estrés hídrico, así como de los controles, utilizando el reactivo de TRI Reagent® de acuerdo a un protocolo establecido en la Unidad de Genómica del LID (Anexo 3). Se utilizó una cantidad de 1 µg de ARN total para llevar a cabo las reacciones de síntesis de cADN a partir de ARN mensajeros. Estas últimas se realizaron por transcripción reversa con el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen), utilizando oligo(dT)₂₀ como cebador en una reacción a 50°C por 50 min, de acuerdo al manual del fabricante (Anexo 4). Una vez obtenido el cADN, se procedió a realizar las reacciones de PCR para los 3 genes de estudio y del gen normalizador.

Para verificar que el ARN total no contuviese ADN genómico contaminante que pudiera interferir con las reacciones de PCR posteriores, se realizó un control negativo en la reacción de retrotranscripción, en el cual la única variación fue la no adición de la enzima transcriptasa reversa. La reacción de PCR con el control negativo no mostró bandas de amplificación con ninguno de los 3 genes de estudio y tampoco con el gen normalizador (Anexo 4).

3.3 Amplificación de cADN por PCR

Se realizaron reacciones de PCR para los genes *UBI*, *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* en un volumen final de 25 µL, de acuerdo a una variante elaborada a partir del manual del kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) (Anexo 4). Para determinar el número de ciclos de amplificación se tomó en cuenta las recomendaciones del fabricante que define un

rango de 20 a 40 ciclos de acuerdo a la abundancia de los ARN mensajeros. En este caso, se identificó al gen de normalización *UBI* como el que mostraba los mayores niveles de expresión en promedio y se determinó que con 30 ciclos era relativamente frecuente que los niveles de los mensajeros de los genes de interés, en particular *SIERF1*, no fuesen detectables por su limitada abundancia. Por ello, se decidió llevar el ensayo a 35 ciclos y validar que se estuviese todavía en la parte exponencial de la curva de acumulación del producto de amplificación de los genes. La validación se hizo comparando los ratios (ver abajo, método de estimación semi-cuantitativa de ARN mensajeros) obtenidos con una misma muestra de cADN amplificada en 30 y 35 ciclos. La obtención de ratios (expresión relativa) muy similares a pesar de las diferencias en las densidades de las bandas, como se muestra en el ejemplo a continuación, permite afirmar que es altamente improbable que se haya llegado a la región constante de la curva de acumulación, tanto en el caso del gen de interés como en el del gen de normalización.



	Densidad (intensidad/área)
<i>UBI</i>	25656
<i>CBF1</i>	203207
Ratio (<i>CBF1/UBI</i>)	0.79

	Densidad (intensidad/área)
<i>UBI</i>	48241
<i>CBF1</i>	38892
Ratio (<i>CBF1/UBI</i>)	0.806

Los cebadores que amplifican los genes de *UBI*, *CBF1* y *SIERF1* fueron tomados de referencias bibliográficas, en tanto que para el gen *CRTLb* se realizó el diseño de cebadores en *S. pimpinellifolium* (<http://solgenomics.net/>) utilizando el programa de libre acceso Primer3 (Anexo 5).

3.4 Estimación semi-cuantitativa de ARN mensajeros y análisis de resultados

Los productos obtenidos en las distintas reacciones se visualizaron por electroforesis (80V por 45 min) en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El análisis de los niveles de expresión se llevó a cabo con el programa myImage Analysis, que estima las intensidades de las señales de fluorescencia de las bandas por densitometría (intensidad/área). Para el procesamiento de datos, se calculó primero el ratio del valor obtenido para el gen de interés entre el valor correspondiente para el gen normalizador (gen de interés/gen normalizador). Luego, se calculó el cociente entre el ratio obtenido para el tratamiento y el obtenido para el control (gen de interés tratamiento/gen normalizador tratamiento) / (gen de interés control/ gen normalizador control), haciendo todas las combinaciones posibles con las réplicas disponibles. Para la evaluación estadística se realizó la prueba paramétrica ANOVA de una sola vía luego de determinarse que los datos presentaron una distribución normal según la prueba de homogeneidad de varianza del programa Statistica 7.0. Las diferencias entre las medias del control y el tratamiento de riego se hallaron mediante la prueba LSD de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de $P \leq 0.05$.

3.5 Secuenciamiento de los productos de amplificación

Para corroborar que se estaba amplificando los 3 genes de estudio, se realizó el secuenciamiento de los productos de amplificación de la reacción de PCR en las 6 poblaciones de *S. pimpinellifolium*. Para ello, se purificó el ADN a partir de las bandas de los geles mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), según el protocolo del fabricante. Las muestras fueron llevadas a secuenciar a la empresa Macrogen Korea. Los resultados del secuenciamiento fueron curados manualmente utilizando el programa BioEdit (v7.2.5) a partir de los electroferogramas recibidos. Una vez obtenidas las secuencias curadas, se utilizó el programa BLAST para identificar la correspondencia de dichas secuencias en toda la base de datos del Genbank. Asimismo, para realizar el análisis de polimorfismos, se eliminaron las secuencias nucleotídicas de los cebadores y se hizo el alineamiento de las secuencias resultantes mediante el programa gratuito ClustalW. Las secuencias alineadas fueron luego analizadas con el programa gratuito DNAsp5 para obtener los resultados de los polimorfismos más relevantes. Las secuencias proteicas derivadas también fueron alineadas utilizando el programa ClustalW y se realizó la búsqueda de los dominios conservados mediante la base de datos del NCBI. En ambos alineamientos (nucleótidos y proteínas) se incluyeron las secuencias de los 3 genes de interés reportadas en la base de datos del NCBI para *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* como referencia.

4. Metodología utilizada para el Análisis Fenotípico

4.1 Tratamiento: Disminución de disponibilidad hídrica

Se realizaron dos experimentos. Uno en el cual se incluyó 5 poblaciones (Morante, Colán, Azpitia, Pantanos de Villa y UNALM) y otro en el cual se incluyó solo 4 poblaciones (Morante, Colán, Pantanos de Villa y UNALM). En ambos casos las plantas se sometieron a uno de dos niveles de riego interdiario: (1) control, en el cual se utilizó un volumen de 50 mL y (2) riego limitado, que fue de 20 mL. Las plantas se mantuvieron bajo las condiciones del tinglado del LID mencionadas anteriormente y todas recibieron 50 mL de solución de nutrientes NPK (nitrógeno, fósforo y potasio) semanalmente. La duración de los experimentos fue de 5 semanas y el número de muestras que se utilizó en cada uno fue: 2 controles + 3 tratamientos x 5 ó 4 poblaciones, N = 25 plantas para el primer experimento y N=20 plantas para el segundo.

4.2 Mediciones de variables fenotípicas:

4.2.1 Evaluación de crecimiento: Se realizó el conteo del número de hojas, tanto maduras como jóvenes, al final del experimento en todos los individuos.

4.2.2 Área del foliolo: El área foliar se calculó a partir del foliolo mediante el programa ImageTool 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Se utilizó el foliolo terminal de la hoja (sin el peciolo) de la hoja madura más próxima a la zona apical en todos los individuos, al final del experimento.

4.2.3 Contenido de materia seca en la hoja (LDMC): El LDMC se obtuvo del cociente entre peso seco (PS) y peso fresco (PF) (mg/g) del foliolo terminal de la hoja madura más

próxima a la zona apical (Tester y Langridge, 2010; Renquist y Reid, 2001). El peso seco del foliolo terminal fue obtenido después de que éstas fueran colocadas a 65°C durante 4 días. Esta evaluación se realizó el último día de riego del experimento en todos los individuos.

4.2.4 Contenido relativo de agua (RWC): El contenido relativo de agua se calculó a partir de la siguiente fórmula: $RWC (\%) = [(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100$. El peso fresco (PF), peso seco (PS) y peso túrgido (PT) (mg/g) fueron obtenidos del foliolo terminal de la hoja madura más próxima a la zona apical. Primero, las muestras fueron pesadas al ser colectadas (PF), luego hidratadas por 4 horas y llevadas a pesar (PT), para finalmente ser colocadas en la estufa a 80°C durante 24 horas (PS). Este ensayo se realizó en todas las muestras y al final del experimento de disminución de riego.

4.2.5 Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm): Este ensayo se realizó en los folíolos terminales de la hoja madura más próxima a la zona apical, sometidos previamente a oscuridad, utilizando el fluorímetro (OS-30P Opti-Sciences, <http://www.optisci.com/30p.htm>), según el manual del fabricante. La medición se llevó a cabo dos semanas después de iniciado el tratamiento en todos los individuos.

4.2.6 Contenido de clorofila a y b, y carotenoides: Para medir estas variables se extrajeron 3 discos de tejido vegetal de un área 0.85 cm² por cada individuo, los cuales fueron colocados en un tubo eppendorf y secados durante 48 h a temperatura ambiente. Luego, se añadió un volumen de 2 mL de etanol 96% por tubo eppendorf para triturar la muestra y se dejó macerar en oscuridad a 4 °C durante 48 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 9250

rpm por 2 min y se recuperó el sobrenadante, retirando así todo el exceso de material vegetal.

Se colocaron 300 μ L del sobrenadante obtenido en una placa de Elisa para luego leer en el espectrofotómetro y determinar la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides a 470, 648.6 y 664.1 nm, respectivamente. Las absorbancias fueron corregidas con un blanco de etanol. Se expresó la concentración de clorofila a, b y carotenoides como peso por área de tejido (mg/cm^2) según las ecuaciones propuestas en la metodología espectrofotométrica de Litchenthaler y Buschmann (2001).

$$C_a = 13.36 A_{664.1} - 5.19 A_{648.6}$$

$$C_b = 27.43 A_{648.6} - 8.12 A_{664.1}$$

$$C_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 2.13 C_a - 97.64 C_b)/209$$

Las mediciones se realizaron al final del experimento en todos los individuos.

4.2.7 Capacidad antioxidante: Se evaluó la capacidad antioxidante de las hojas siguiendo el método descrito por Molyneux, utilizando para ello un extracto de tejido vegetal preparado tal como se describe en la sección anterior (4.2.4). El método consiste en medir la caída de la absorbancia a 517 nm ocasionada por la reducción del compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo ó DPPH (color azul-violeta). El DPPH contiene un electrón desapareado y este electrón es apareado por la substracción de un hidrógeno de la sustancia antioxidante, formando DPPH-H de color amarillo (Anjum et al., 2011; Xu y Zhou, 2008).

A partir de una solución de DPPH (20 mg/L de metanol) se prepararon las muestras (100 µL extracto+200 µL DPPH), así como sus respectivos blancos (100 µL extracto+200 µL etanol) y un patrón (100 µL etanol+200 µL DPPH). Las mediciones se realizaron al final del experimento en todos los individuos. El porcentaje de captación de radical libre (%CA) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$(\%CA) = (1 - ((\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) / \text{Abs patrón})) * 100.$$

4.3 Análisis de resultados

Los datos obtenidos a partir de las variables fenotípicas evaluadas fueron sometidos a un análisis de homogeneidad de varianzas para determinar si su distribución era normal. Una vez confirmada esta distribución, se realizó un análisis de varianza anidado de 3 vías que nos permitió distinguir el efecto de la región de origen (Lima o Piura) de la población específica (anidada a cada región) y del tratamiento con cada una de las variables medidas. Las diferencias entre las medias del control y el tratamiento de riego se hallaron mediante la prueba LSD de Fisher. Los análisis se realizaron con el programa Statistica 7.0. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $P \leq 0,05$.

IV. Resultados

Las plantas sometidas a tratamiento de riego disminuido en maceta mostraron cambios en los niveles de expresión relativa de los genes estudiados, principalmente incrementos luego de 24 h de iniciado el tratamiento. Algunos datos de la expresión relativa no han podido incluirse en este estudio debido a la no detección del gen *SIERF1* en algunas poblaciones.

Dado que en un estudio anterior, desarrollado con las poblaciones de Morante, Tambogrande, UNALM y Azpitia, se observaron ciertas tendencias en las respuestas fenotípicas al estrés hídrico, en este estudio se repitió la evaluación de aquellas respuestas fenotípicas que podían estar relacionadas con la expresión de los genes estudiados en el tratamiento de riego disminuido en macetas. Por ello, en el caso de los niveles de expresión del gen *CBF1*, se evaluó la eficiencia fotosintética, el promedio del número de hojas, el área foliar y el contenido de las clorofilas a y b. Por otra parte, para encontrar una relación con los niveles de expresión del gen *CRTLb* se midió el contenido de carotenoides. Finalmente, en lo que corresponde al gen *SIERF1*, se evaluó el contenido de materia seca, el contenido relativo de agua y la capacidad antioxidante. En este estudio se incluyeron, además de las poblaciones estudiadas anteriormente, las poblaciones de Colán en la región Piura y Pantanos de Villa en la región Lima.

Niveles de expresión relativa del gen *CBF1* y las respuestas fenotípicas posiblemente asociadas

La expresión relativa del gen *CBF1* pudo ser analizada en las 6 poblaciones. Las poblaciones de Azpitia, Colán, Morante, Tambogrande y UNALM incrementaron la

expresión del gen *CBF1* en un 43.5 %, 21 %, 66 %, 83 % y 30 %, respectivamente, a las 24 h. Estos incrementos fueron significativos a nivel estadístico. Además, las poblaciones de Azpitia, Morante y Tambogrande presentaron incrementos significativos del 18 %, 66 % y 35 % a las 32 h, respectivamente, respecto de la expresión a las 0 h. En el caso de Azpitia y Morante, el incremento de las 32 h fue menor que el de las 24 h. Por su parte, la población de Pantanos de Villa mostró una caída significativa de la expresión a las 24 h, seguida de un aumento significativo del 35 % a las 32 h respecto de las 0 h. En las poblaciones de Colán y UNALM, los valores de expresión del gen *CBF1* a las 0 h y 32 h no mostraron diferencias significativas. La mayor expresión relativa del gen *CBF1* se observó en la población de UNALM, seguida de Tambogrande y Pantanos de Villa (Tablas 2, 3 y 7; Gráfico 1).

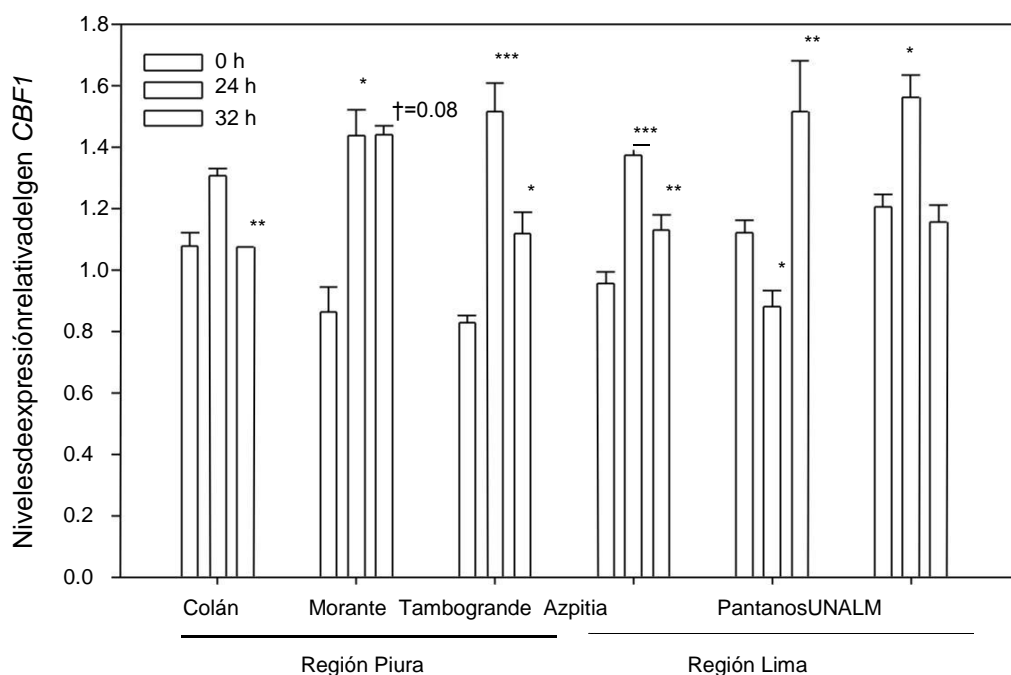


Gráfico 1. Niveles de expresión relativa el gen *CBF1* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Azpitia, Colán, Morante, Pantanos de Villa, Tambogrande y UNALM en respuesta a disminución de riego después de 0, 24 y 32 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05 , †=0.08, marginalmente significativo).

La medición de la tasa fotosintética, refleja el estado del funcionamiento del fotosistema II de la maquinaria fotosintética, la cual es susceptible a los cambios de estrés hídrico. Entre las poblaciones de la región Lima, la eficiencia fotosintética se redujo significativamente en respuesta al tratamiento de riego disminuido respecto del control en las poblaciones de Azpitia (38 %) y UNALM (20 %), mientras que la población de Pantanos de Villa no mostró diferencias significativas. En cuanto a la región Piura, ninguna de las poblaciones mostró variaciones significativas frente a una disminución de riego (Tabla 4; Gráfico 2).

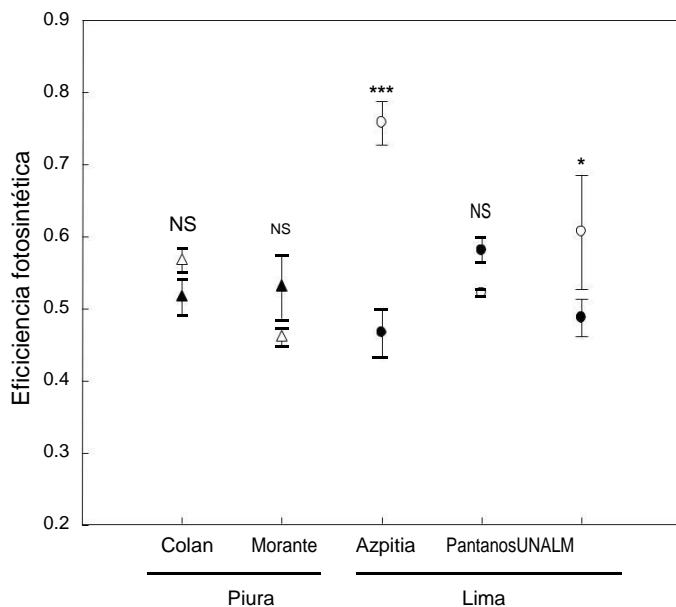


Gráfico 2. Eficiencia fotosintética de plantas de *S. pimpinellifolium* procedentes de las regiones Piura (triángulos) y Lima (círculos) sometidas a los tratamientos de riego: control (blanco) y riego disminuido (negro). Se muestra el promedio de 5 individuos por población (± 1 EE). Se reportan las diferencias entre los tratamientos de riego en cada población (prueba a posteriori LSD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS > 0.05).

Se ha relacionado un área foliar más grande en la planta con una mayor eficiencia fotosintética y crecimiento vegetativo. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento de disminución del riego. Sin embargo, los mayores valores promedio se observaron en las poblaciones de Piura (Tablas 4 y 5).

El contenido de las clorofilas a y b, forman parte de la maquinaria fotosintética. En nuestros resultados dos de las poblaciones de Lima (Azpitia y UNALM) mostraron una reducción significativa del contenido de clorofilas en respuesta a una disminución del riego. La población de Azpitia mostró una reducción significativa del 58 % mientras que para la población de UNALM fue de un 35 %. Por el contrario, la población de Pantanos de Villa que también pertenece a la región Lima mostró un aumento significativo de un 43 %. En la región Piura, las poblaciones de Colán y Morante no variaron de manera significativa el contenido de clorofilas en respuesta a una disminución de riego. El contenido de clorofilas fue mayor en las poblaciones de Lima en comparación con las de Piura, independientemente del tratamiento de riego (Gráfico 3; Tablas 4 y 5).

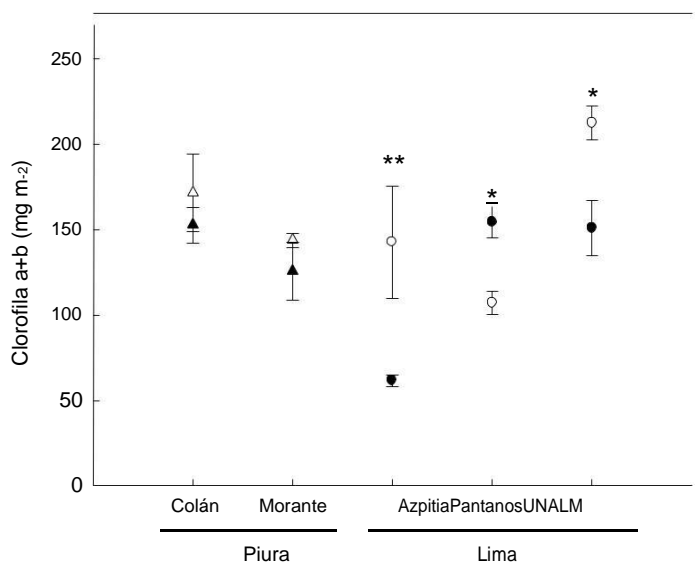


Gráfico 3. Contenido de clorofilas a y b de plantas de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de las regiones Piura (triángulos) y Lima (círculos) sometidas a los tratamientos de riego: control (blanco) y riego disminuido (negro). Se muestra el promedio de 5 individuos por población (± 1 EE). La diferencia estadística entre el promedio del tratamiento de riego y el control se estimó usando la prueba a posteriori LSD (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS >0.05).

El número de hojas, por su parte, está correlacionado con la tasa de crecimiento. Las poblaciones de Pantanos de Villa y UNALM de la región Lima mostraron una reducción significativa en el número de hojas frente al tratamiento de riego disminuido: la población de Pantanos de Villa disminuyó en un 33.5 %, mientras que la población de UNALM lo

hizo en un 31 %. Las poblaciones de Colán y Morante de la región Piura no mostraron diferencias significativas (Tablas 4 y 5; Gráfico 4).

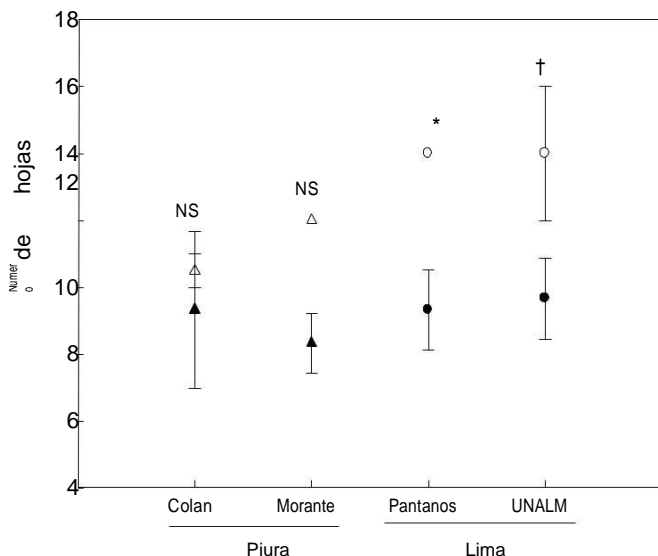


Gráfico 4. Número de hojas de plantas de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de las regiones Piura (triángulos) y Lima (círculos) sometidas a los tratamientos de riego: control (blanco) y riego disminuido (negro). Se muestra el promedio de 5 individuos por población (± 1 EE). Se reportan las diferencias entre los tratamientos de riego en cada población (prueba a posteriori LSD, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS > 0.05).

Niveles de expresión relativa del gen *CRTLb* y las respuestas fenotípicas posiblemente asociadas

Con relación a la expresión relativa del gen *CRTLb*, las poblaciones de Azpitia, Morante y Tambogrande la incrementaron significativamente en un 25 %, 18 % y 60 % a las 24 h, respectivamente, en tanto que la población de Colán solo mostró una tendencia similar que no llegó a ser significativa a nivel estadístico. Las poblaciones de Azpitia y Morante también incrementaron la expresión de *CRTLb* a las 32 h, en un 20 % y 30 % respectivamente, en relación a las 0 h. En el caso de la población de Morante, la expresión de *CRTLb* a las 32 h fue incluso mayor que la de las 24 h. Las poblaciones de Pantanos de Villa y UNALM, por su parte, incrementaron los niveles de expresión únicamente a las 32 h en un 20 % y 52 % respecto de los de las 0 h, respectivamente. El mayor nivel de

expresión relativa del gen *CRTLb* se observó en la población de UNALM, seguido por Tambogrande (Tablas 2, 3 y 7; Gráfico 5).

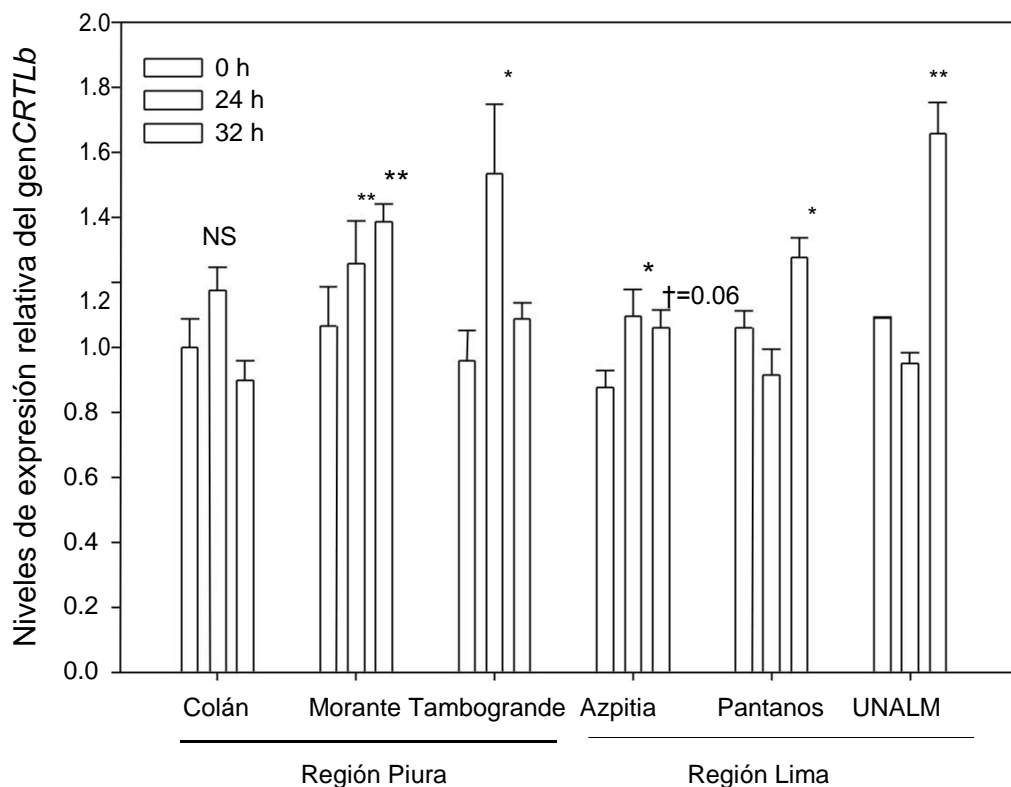


Gráfico 5. Niveles de expresión relativa del gen *CRTLb* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Azpitia, Colán, Morante, Pantanos de Villa, Tambogrande y UNALM en respuesta a disminución de riego después de 0, 24 y 32 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05 , †=marginamente significativo).

Los carotenoides forman parte de la maquinaria fotosintética y además juegan un papel importante como antioxidantes. Dentro de la región Lima, la población de Azpitia mostró una reducción significativa del 63 % y la población de UNALM mostró una caída de un 35 %, en tanto que la población de Pantanos de Villa mostró una tendencia a aumentar su contenido de carotenoides. En lo que se refiere a la región Piura, las poblaciones de Colán y Morante no variaron de manera significativa su contenido de carotenoides. Sin embargo, en la población de Colán se observó una tendencia a aumentar su contenido de carotenoides. El

contenido de carotenoides fue mayor en las poblaciones de Lima en comparación con las de Piura, independientemente del tratamiento de riego (Gráfico 6; Tablas 4 y 5).

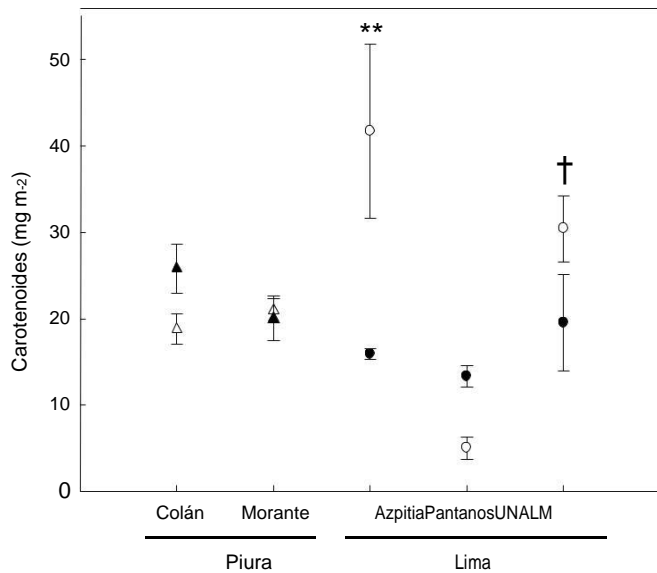


Gráfico 6. Contenido de carotenoides de plantas de *Solanum pimpinellifolium* procedentes de las regiones Piura (triángulos) y Lima (círculos) sometidas a los tratamientos de riego: control (blanco) y riego disminuido (negro). Se muestra el promedio de 5 individuos por población (± 1 EE). La diferencia estadística entre el promedio del tratamiento de riego y el control se estimó usando la prueba a posteriori LSD (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, NS>0.05). †=0.06, marginalmente significativo.

Niveles de expresión relativa del gen *SIERF1* y las respuestas fenotípicas posiblemente asociadas

Por último, el análisis de expresión relativa del gen *SIERF1* reveló como única variación un incremento significativo en la población de UNALM a las 32 h. Las poblaciones de Azpitia y Colán no mostraron cambios significativos en los niveles de expresión del gen a lo largo del periodo evaluado. Las otras tres poblaciones no pudieron ser incluidas en el análisis al no ser detectable la expresión relativa del gen *SIERF1* (Tablas 2, 3 y 7; Gráfico 7).

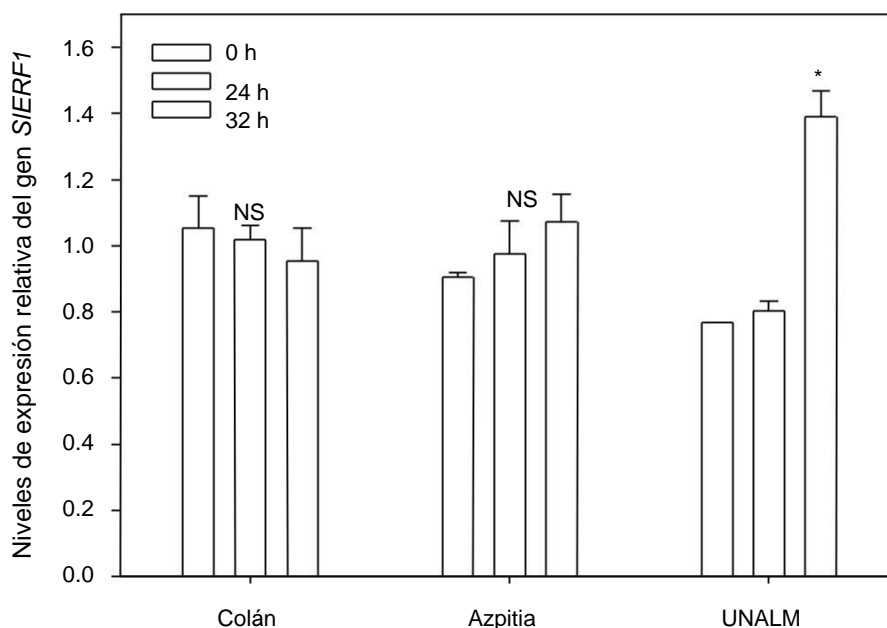


Gráfico 7. Niveles de expresión relativa del gen *SIERF1* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Azpitia, Colán y UNALM en respuesta a disminución de riego después de 0, 24 y 32 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05).

Un menor contenido de materia seca (LDMC) se ha relacionado con un ingreso precoz de la planta al periodo reproductivo y un aumento de la probabilidad de perpetuación de la especie en medios hostiles. Los resultados muestran una tendencia a disminuir el LDMC en casi todas las poblaciones, excepto en la de Pantanos de Villa que más bien incrementa

ligeramente sus valores de LDMC en respuesta a la disminución de riego. En cuanto al contenido relativo de agua (RWC), éste representa una medida del estado de hidratación de la hoja, de manera tal que valores mayores corresponden a hojas túrgidas. Los resultados permitieron observar solo diferencias regionales, independientemente del tratamiento, siendo las poblaciones de la región Piura las que mostraron los valores más altos. Todas las poblaciones mostraron una tendencia a disminuir su RWC en respuesta a la disminución de riego, excepto la población de UNALM que incrementó sus valores, aunque no de manera significativa (Tablas 4 y 5).

La capacidad antioxidante también fue evaluada, pero no se obtuvieron cambios significativos en respuesta al tratamiento de disminución de riego y tampoco se observaron diferencias entre las regiones (Tablas 4 y 5).

Secuenciamiento de los productos de amplificación

Las secuencias de los productos de amplificación de los tres 3 genes cuya expresión se analizó en las 6 poblaciones de estudio se alinearon con las secuencias pertenecientes a los genes respectivos en la base de datos del BLASTN y mostraron un alto porcentaje de identidad, un alto porcentaje de cobertura y bajos valores de E value.

Gen *CBF1*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum CBF1 protein (CBF1). mRNA	272	272	95%	1e-69	99%	NM_001247194.2
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum chromosome.ch03.complete genome	272	522	95%	1e-69	99%	HG975515.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum cDNA clone: LEFL2053O18. HTC in fruit	272	272	95%	1e-69	99%	AK328401.1
<input type="checkbox"/> Solanum pimpinellifolium cultivar LA1589 CRT binding factor 3 and CBF1-2 fusion protein genes. complete cds	272	272	95%	1e-69	99%	EU365382.1
<input type="checkbox"/> Lycopersicon esculentum C-repeat binding factor gene locus. complete sequence	272	522	95%	1e-69	99%	AY497899.1
<input type="checkbox"/> Lycopersicon esculentum clone 13496R mRNA sequence	272	272	95%	1e-69	99%	BT013291.1

Gen *CRLTb*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum pennellii lycopene beta cyclase, chloroplast (LOC10702371), mRNA	213	213	93%	7e-52	95%	XM_015200360.1
<input type="checkbox"/> Solanum pennellii chromosome ch10, complete genome	213	213	93%	7e-52	95%	HG975449.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum lycopersicum lycopene beta cyclase, chloroplast (LOC101267662), mRNA	207	207	93%	3e-50	94%	XM_010313794.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum chromosome ch10, complete genome	207	207	93%	3e-50	94%	HG975522.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone sle-39i8 map 10, complete sequence	207	207	93%	3e-50	94%	AC245360.3
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone hba-35a7 map 10, complete sequence	207	207	93%	3e-50	94%	AC244599.4
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 10 clone hba-57g1 map 10, complete sequence	207	207	93%	3e-50	94%	AC233134.8
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum cDNA clone: LEFL1057CD09, HTC in leaf	207	207	93%	3e-50	94%	AK323472.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum tuberosum lycopene beta cyclase, chloroplast (LOC102597428), transcript variant X2, mRNA	191	191	93%	3e-45	92%	XM_006351204.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum tuberosum lycopene beta cyclase, chloroplast (LOC102597428), transcript variant X1, mRNA	191	191	93%	3e-45	92%	XM_006351202.2
<input type="checkbox"/> Solanum sparsipilum lycopene cyclase (LCYB) gene, partial cds	191	191	93%	3e-45	92%	JX548327.1

Gen *SIERF1*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Solanum pennellii ethylene-responsive transcription factor ERF003-like (LOC107021879), mRNA	135	135	92%	6e-29	100%	XM_015222599.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum chromosome ch06, complete genome	135	135	92%	6e-29	100%	HG975518.1
<input type="checkbox"/> Solanum pennellii chromosome ch06, complete genome	135	135	92%	6e-29	100%	HG975445.1
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum ethylene response factor 3-like (ERF3-like), mRNA	135	135	92%	6e-29	100%	NM_001247919.2
<input type="checkbox"/> Solanum lycopersicum chromosome 6 clone C06Hba0103N18, complete sequence	135	135	92%	6e-29	100%	AC209510.1
<input type="checkbox"/> S. lycopersicum DNA sequence from clone SL_Mbol-30C9 on chromosome 4, complete sequence	135	135	92%	6e-29	100%	CU326372.3
<input type="checkbox"/> Lycopersicon esculentum ethylene response factor 1 (ERF1) mRNA, complete cds	135	135	92%	6e-29	100%	AY077626.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana glauca ethylene-responsive transcription factor ERF003-like (LOC104222177), mRNA	108	108	92%	1e-20	93%	XM_009773368.1

Alineamiento nucleotídico

Gen *CBF1*

```

UNALM          GTTTGTGAAGTCAGAGAACCCCATACTAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
AZPITIA        GTTTGTGAAGTCAGAGGCCCCCATACTAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
SP             GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACGAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACT
COLAN          GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
PANTANOS      GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
SL            GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
MORANTE       GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACAAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
TAMBOGRANDE   GTTTGTGAAGTCAGAGAACCAAATAAGAAGACCAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCCTACG
*****

```

```

UNALM          GCTCAAAATGGCTGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTACATTACAGGCCGTTCTGC
AZPITIA        GCAAAATGCCAGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTGTATCATTACAGGACGGTTCCGC
SP             GCTGAAATGGCGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTATAGCATTAAGAGGCGTTCAGC
COLAN          GCTGAAATGGCGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTAGCATTAAGAGGCGTTCTGC
PANTANOS      GCTGAAATGGCGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTAGCATTAAGAGGCGTTCTGC
SL            GCTGAAATGGCGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTAGCATTAAGAGGCGTTCTGC
MORANTE       GCCTTTATGACGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTACATTACAGGCCGTTCTGC
TAMBOGRANDE   GCCTTTATGACGGCTAGAGCTCATGACGTGGCGGCTTTAGCATTACAGGCCGTTCTGC
**      :.*** * ***** ** ***** ** .***** **

```

```

UNALM          TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
AZPITIA        TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
SP             TTGTTTGAATTTTGCTGACTCTGCT
COLAN          TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
PANTANOS      TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
SL            TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
MORANTE       TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
TAMBOGRANDE   TTGTTTGAATTTCTCTGATTCTGCT
*****

```

Gen *CRTLb*

SL TTCCCATCTTAATAACAATGTGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
AZPITIA TT**T**CCCATCTTAATAACAAT**A**TGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
MORANTE TTCCCATCTTAATAACAATGTGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
SP TTCCCATCTTAATAACAAT**A**TGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
PANTANOS TT**T**CCCATCTTAATAACAAT**T**TGAAGCTGAAAG**T**GAGGAACAGAAAAGTT**T**CCAACCTTTT
COLAN TTCCCATCTTAATAACAAT**A**TGAAGCTGAAAG**T**GAGGAACAGAAAAGTT**T**CCAACCTTTT
UNALM TTCCCATCTTAATAACAATGTGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
TAMBOGRANDE TTCCCATCTTAATAACAATGTGAAGCTGAAAG**A**TAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTT
* * * * * : * * * * *

SL CTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
AZPITIA CT**G**TATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
MORANTE CTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
SP CTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
PANTANOS CT**T**TATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
COLAN CTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
UNALM CTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
TAMBOGRANDE CTCTAT**T**CCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTG
* * * * * : * * * * *

SL TAGCTCGT
AZPITIA TAGCTCGT
MORANTE TAGCTCGT
SP TAGCTCGT
PANTANOS TAGCTCGT
COLAN TAGCTCGT
UNALM TAGCTCGT
TAMBOGRANDE TAGCTCGT
* * * * *

Gen *SIERF1*

SL GGAGCAGCA**AGG**CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
UNALM **G**AAGCAGCAGG-CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
SP **G**AAGCAGCA**AGG**CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
colan GTAGCAGCAGG-CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
azpitia GTAGCAGCA**AGG**CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
Morante **G****T**CGCAGCAGG-CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
Pantanos GTAGCAGCAGG-CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
Tambogrande GT**T**GCAGCAGG-CTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAAC
* * * * * : * * * * *

SL ATGCCACAAACATCTT
UNALM ATGCCACAAACATCTT
SP ATGCCACAAACATCTT
colan ATGCCACAAACATCTT
azpitia ATGCCACAAACATCT**A**
Morante ATGCCACAAACATCTT
Pantanos ATGCCACAAACATCTT
Tambogrande ATGCCACAAACATCTT
* * * * * : * * * * *

*SL=*S. lycopersicum* (*SIERF1*: AY077626.1, *CBF1*: NM_001247194.2, *CRTLb*: XM_010313794.1), SP=*S. pimpinellifolium*, secuencias reportadas del NCBI y del Solgenomics respectivamente (Ver Anexo 5).

Análisis de polimorfismos

	Largo (pb)	Gaps	Sitios variables polimórficos	N° cambios sinónimos	N° cambios no sinónimos	Inserciones/Delecciones	Diversidad nucleotídica Pi
CBF1	153	0	17	7	10	0	0.0674
CRTLb	142	0	9	3	6	0	0.02420
SIERF1	76	0	2	0	2	1	0.01429

De los 3 genes de estudio, el gen *CBF1* mostró la mayor variación de nucleótidos entre las secuencias analizadas, seguido del gen *CRTLb* y finalmente del gen *SIERF1*.

N° de diferencias de nucleótidos

		<i>CBF1</i>	<i>CRTLb</i>	<i>SIERF1</i>
SL *	SP	8	1	1
SL	COLAN	0	3	1
SL	MORANTE	8	0	2
SL	PANTANOS	0	5	1
SL	TAMBOGRANDE	7	2	2
SL	UNALM	8	0	1
SL	AZPITIA	15	3	2
SP *	COLAN	8	2	1
SP	MORANTE	15	1	2
SP	PANTANOS	8	5	1
SP	TAMBOGRANDE	14	3	2
SP	UNALM	16	1	0
SP	AZPITIA	19	2	2
COLAN	MORANTE	8	3	1
COLAN	PANTANOS	0	3	0
COLAN	TAMBOGRANDE	7	5	1
COLAN	UNALM	8	3	1
COLAN	AZPITIA	15	4	1
MORANTE	PANTANOS	8	5	1
MORANTE	TAMBOGRANDE	4	2	1
MORANTE	UNALM	11	0	2
MORANTE	AZPITIA	17	3	2
PANTANOS	TAMBOGRANDE	7	0	1
PANTANOS	UNALM	8	5	1
PANTANOS	AZPITIA	15	4	1
TAMBOGRANDE	UNALM	1	2	2
TAMBOGRANDE	AZPITIA	17	5	2
UNALM	AZPITIA	10	3	2

En rojo se señalan los mayores valores de diferencias de nucleótidos entre 2 poblaciones.

*SL=*S. lycopersicum* (*SIERF1*: AY077626.1, *CBF1*: NM_001247194.2, *CRTLb*: XM_010313794.1), SP=*S. pimpinellifolium*, secuencias reportadas del NCBI y del Solgenomics respectivamente (Ver Anexo 5).

El porcentaje promedio de diferencias de nucleótidos para los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* fueron de 6 %, 1.8% y 1.73 %, respectivamente. El mayor porcentaje de diferencias de nucleótidos para el gen *CBF1* fue en la población de Azpitia en un 9.8 % (15 nt), en un 3.5 % (5 nt) en la población de Pantanos de Villa para el gen *CRTLb* y en la población de Azpitia 3.94 % (3 nt) para el gen *SIERF1*.

Resultados de alineamiento proteico

Proteína *CBF1*

MORANTE	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTAFMTARAHDVAALTLTGRSACLNFSDSA
TAMBOGRANDE	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTALMTARAHDVAALALTGRSACLNFSDSA
COLAN	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFSDSA
PANTANOS	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFSDSA
SL	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFSDSA
SP	VCEVREPNNKTRIWLGTFFPTAEMAARAHDVAALALRGRSACLNFSDSA
UNALM	VCEVREPHTKTRIWLGTFFPTAQMAARAHDVAALTLTGRSACLNFSDSA
AZPITIA	VCEVRGPHTKTRIWLGTFFPTAKMPARAHDVAAVSLTGRSACLNFSDSA
	***** * : .***** ***** * .***** : : * ***** : **

Proteína *CRTLb*

SL	SHLNNNVKLNKERNRKVPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
PANTANO	SHLNNNVKLNKERNRKVPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
MORANTE	SHLNNNVKLNKERNRKVPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
TAMBOGRANDE	SHLNNNVKLNKDRNRKVPTFLYSMPFSSNRIFLEETSLVAR
SP	SHLNNNMKLNKERNRKVPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
AZPITIA	FHLNNNMKLNKERNRKVPTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
COLAN	SHLNNNMKLNKVRNRKVSTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
PANTANOS	FHLNNNLKLNKVRNRKVSTFLYAMPFSSNRIFLEETSLVAR
	***** : ** ***** . ***** : *****

Proteína *SIERF1*

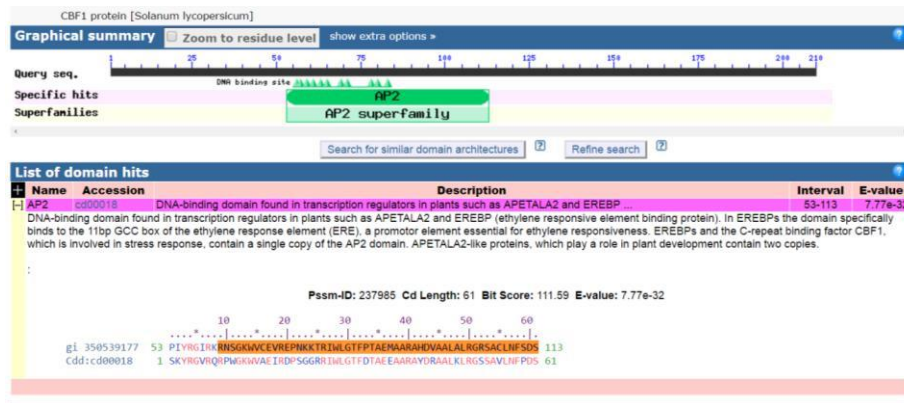
PANTANOS	SSRLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
UNALM	SSRLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
COLAN	SSRLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
Tambogrande	CSRLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
MORANTE	RSRLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
SL	AARLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
SP	AARLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
AZPITIA	AARLMCGPRARTNFPYNPMPQTS
	: *****

*SL=*S. lycopersicum* (*SIERF1*: AAL75809, *CBF1*: NP_001234123, *CRTLb*: XP_010312096), SP=*S. pimpinellifolium*, secuencias reportadas del NCBI y del Solgenomics respectivamente.

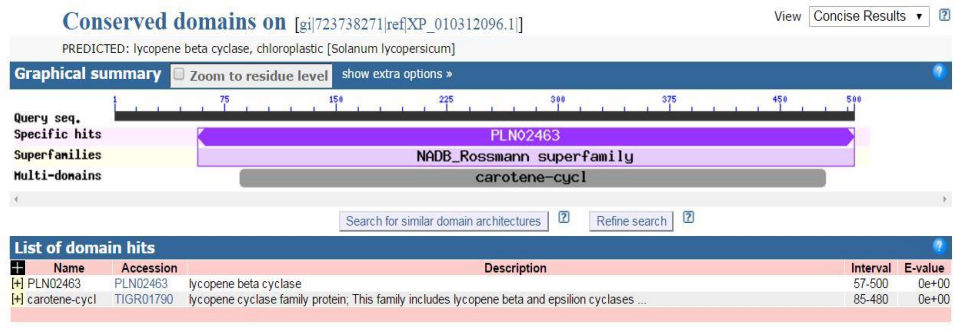
En los resultados de alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas derivadas de los 3 genes de estudio se observa que poseen regiones muy conservadas.

Resultados de dominios conservados

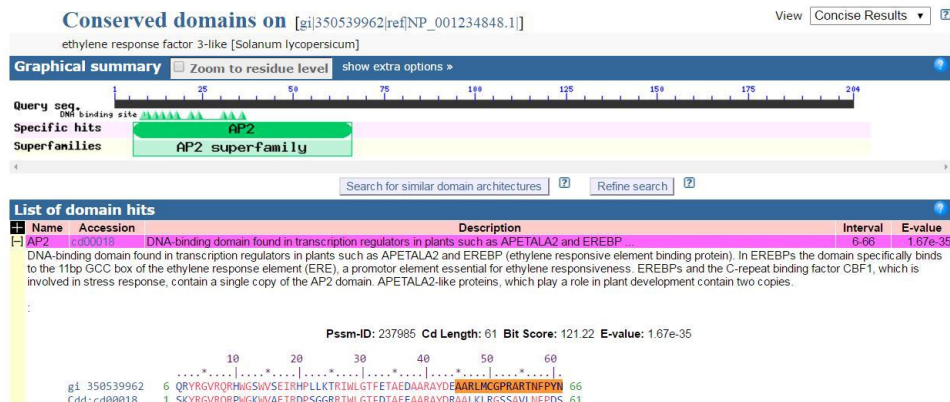
Gen *CBF1*



Gen *CRTLb*



Gen *SIERF1*



Las regiones de amplificación de los genes *CBF1* y *SIERF1* pertenecen al dominio AP2, un dominio de unión al ADN, y la del gen *CRTLb* al dominio NADB-Rossmann, implicado en la catálisis de reacciones de enzimáticas (ver sección Discusión).

V. Discusión

En un trabajo anterior realizado con cuatro poblaciones de *S. pimpinellifolium* de las regiones Lima y Piura se demostró la ocurrencia de variaciones fenotípicas en respuesta al estrés hídrico. Más aún, no todas las variaciones observadas se dieron de igual manera en las poblaciones estudiadas, con lo que se demostró, además, que existía una diversidad de respuestas a este tipo de estrés según el origen de la población. Por ello, se decidió evaluar patrones de expresión de 3 genes que podrían tener un correlato con las respuestas fenotípicas más relevantes en seis poblaciones de *S. pimpinellifolium* sometidas a tratamientos de restricción hídrica en macetas.

Los cambios en la expresión de dichos genes se cuantificaron en relación a la expresión del gen de ubiquitina (*UBI*), utilizado como gen de normalización en tomate y otras especies vegetales por su expresión constante bajo distintos tipos de estrés (Czechowski et al., 2005; Pfaffl et al., 2004; Yáñez et al., 2009). Para determinar los tiempos en los que se evaluaría la expresión de los genes en el tratamiento de plantas en macetas, se midió la expresión relativa en los tiempos 0, 10, 24 y 32 h después de interrumpido el riego, tomando al gen *CBFI* como referencia. La mayor expresión ocurrió a las 24 h, seguida de un descenso a las 32 h. A partir de estos resultados, se optó por tomar las muestras en los tiempos 0, 24 y 32 h.

Niveles de expresión relativa del gen *CBF1* y su relación con el análisis fenotípico

La inducción de la expresión del gen *CBF1* ha sido relacionada en un principio al estrés por bajas temperaturas en *Arabidopsis* (Jagglo-Ottosen et al., 1998; Terol et al., 1999). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la expresión de *CBF1* como transgen en papa y tomate induce en estas especies una respuesta protectora frente al estrés hídrico (Movahedi et al., 2012; Hsieh et al., 2002). Los experimentos realizados en este trabajo demuestran por primera vez que la expresión del gen *CBF1* se induce en *S. pimpinellifolium* ante un estrés hídrico. Estos resultados apoyan la idea de que, al menos en algunas especies vegetales, los niveles de expresión del gen *CBF1* no solo aumentan en respuesta al estrés por bajas temperaturas, sino que también lo hacen en respuesta al estrés hídrico.

De hecho, en especies silvestres de tomate tolerantes a bajas temperaturas como *S. lycopersicoides* y *S. habrochaites*, la expresión del gen *CBF1* no solo se induce a bajas temperaturas sino también bajo condiciones de sequía (Zhang et al., 2014; Li et al., 2014). Más aún, la expresión ectópica de los genes *CBF1* de estas especies en *Arabidopsis* induce tolerancia, no solo a estrés por bajas temperaturas, sino también a estrés por alta salinidad. Ello sugiere que en las especies silvestres de tomate, la inducción de la expresión de estos genes también podría estar relacionada con la tolerancia a estrés salino y a estrés hídrico. Por el contrario, en tomate cultivable el gen *CBF1* solo se induce bajo estrés por bajas temperaturas y el aumento de la tolerancia a estrés hídrico se ha observado únicamente al sobre-expresar el gen *CBF1* de *Arabidopsis* (Lee et al., 2003; Hsieh et al., 2002). Tal como ocurre en *S. lycopersicoides* y en *S. habrochaites*, el estrés hídrico induce la expresión del

gen *CBF1* en *S. pimpinellifolium*, y queda por ver en esfuerzos futuros si la expresión ectópica de los genes *CBF1* de estas especies silvestres en el tomate cultivable inducen tolerancia a este tipo de estrés. De ser ese el caso, la transferencia de estas versiones “silvestres” de los genes podría ser una herramienta útil para el mejoramiento genético del tomate cultivable.

El incremento de la expresión del gen *CBF1* en *Arabidopsis* está relacionado a una mayor expresión de las proteínas DELLA por inducción de la oxidasa GA2, una enzima que inactiva al ácido giberélico. La acumulación de las proteínas DELLA determinan un fenotipo de menor altura y un retraso de la floración en las plantas (Achard et al., 2008). Es interesante notar que en los resultados del trabajo anterior en el que se analizaron las respuestas fenotípicas de *S. pimpinellifolium* a sequía, las cuatro poblaciones incluidas mostraron una menor altura en respuesta a la disminución del riego en comparación a la plantas del grupo control. Ello sugiere que en *S. pimpinellifolium* podría operar un mecanismo similar al descrito en *Arabidopsis*, dado que en este trabajo se ha encontrado que los niveles de expresión relativa del gen *CBF1* se incrementaron en las plantas adultas de las seis poblaciones sometidas a una disminución de riego.

En relación a la eficiencia fotosintética, un aspecto de la respuesta fenotípica evaluado en este trabajo, se encontró que en las poblaciones de la región Piura los valores se mantuvieron aproximadamente constantes en respuesta a la disminución del riego, confirmándose lo observado en el estudio anterior. Se ha demostrado que la sobre-expresión del gen *CBF1* de *Arabidopsis* en tomate cultivable reduce la caída de la eficiencia fotosintética bajo condiciones de estrés hídrico (Hsieh et al., 2002). De acuerdo a

los resultados obtenidos en el tratamiento de plantas en macetas del presente estudio, el incremento de la expresión del gen *CBF1* en las poblaciones de la región Piura podría explicar el mantenimiento de la eficiencia fotosintética. En cuanto a las poblaciones de la región Lima, el hecho de que, a excepción de la población de Pantanos de Villa, el aumento de la expresión del gen *CBF1* no vaya acompañado de un mantenimiento de la eficiencia fotosintética, podría indicar que en estas poblaciones existen otros genes que influyen fuertemente en el control de este atributo.

Niveles de expresión relativa del gen *CRTLb* y su relación con el análisis fenotípico

En lo que se refiere a la expresión del gen que codifica la licopeno beta ciclasa (*CRTLb*), la expresión de este gen se incrementó en respuesta a la restricción hídrica. Esta inducción de la expresión relativa bajo condiciones de estrés hídrico difiere de lo observado por Gong et al. (2010) en el cultivar M82 de *S. lycopersicum* y en cruces de esta línea con la especie silvestre *S. pennellii*, tolerante a sequía. Sin embargo, otros estudios han reportado incrementos y disminuciones en el contenido de licopeno en respuesta al estrés hídrico, dependiendo del cultivar de tomate estudiado (Dumas et al., 2003), lo que sugiere que el ajuste en la expresión y la actividad de la licopeno beta ciclasa varían según la especie silvestre o el cultivar de tomate con el que se trabaje. En este sentido es interesante señalar que en otras solanáceas como el tabaco, la expresión relativa de *CRTLb* se induce bajo un régimen similar de restricción hídrica (Shi et al., 2015). Hasta donde se ha podido explorar la información publicada, este sería el primer estudio en el que se reporta la inducción de la

expresión relativa del gen *CRTLb* en la especie silvestre *S. pimpinellifolium* en respuesta al estrés hídrico.

A diferencia de los trabajos de expresión ectópica de *CRTLb* en tabaco y *Arabidopsis*, en los que se reportó un aumento significativo de los niveles de carotenoides totales en las plantas transgénicas (Chen et al., 2011; Shi et al., 2015), en el presente estudio no se pudo establecer una relación entre dichos niveles y la expresión relativa del gen *CRTLb* endógeno en plantas mantenidas en macetas con riego restringido. Ello sugiere que, de no haber un incremento masivo en la expresión de *CRTLb*, otros genes influirían de manera significativa en la regulación del contenido total de carotenoides en respuesta a la disminución de riego. Queda por establecerse si las variaciones observadas en la expresión relativa de este gen en las poblaciones estudiadas bajo estrés hídrico tienen un efecto en los contenidos relativos de los distintos carotenoides, en particular del licopeno y el β -caroteno.

Niveles de expresión relativa del gen *SIERF1* y su relación con el análisis fenotípico

Los genes pertenecientes a la familia *ERF* han sido estudiados principalmente en relación a su función en el crecimiento y desarrollo, y en la regulación del metabolismo (Van der Fits y Memelink, 2000). El énfasis se ha puesto sobre todo en los cambios en sus niveles de expresión durante la maduración del fruto del tomate, dado que la expresión de estos genes es inducida por etileno (Pirrello et al., 2009). Sin embargo, también se ha reportado que ciertos miembros de la familia *ERF* están involucrados en las respuestas a estrés biótico y abiótico (Hussain et al., 2011; Chakravarthy et al., 2003; Qiao et al., 2008; Wu et al., 2007). En este trabajo se encontraron cambios significativos de los niveles de expresión relativa

del gen *SIERF1* en la respuesta de algunas de las poblaciones de *S. pimpinellifolium* estudiadas, lo cual sugiere que el factor de transcripción *SIERF1* participaría en la reconfiguración metabólica y fisiológica inducida en esta especie de tomate silvestre por la disminución en la disponibilidad de agua.

Algunos estudios previos sugieren una relación entre la expresión del gen *SIERF1* y el contenido relativo de agua (RWC). Por ejemplo, la sobre-expresión del transgen *LeERF1* en plantas de tomate bajo estrés hídrico provoca un incremento del contenido de agua relativa (Lu, et al., 2010), también se observó un mayor contenido relativo de agua en arroz, donde se sobre-expresó el gen *JERF1* en plantas expuestas a estrés hídrico (Zhang et al., 2010). En el presente estudio, la población de UNALM mostró un incremento de la expresión relativa de *SIERF1* en plantas adultas con restricción de riego, y coincidentemente ésta fue la única población de las evaluadas que reveló una tendencia a aumentar los valores promedio de RWC. Esta posible asociación se ve reforzada por resultados del estudio anterior de caracterización fenotípica según los cuales la población de UNALM disminuyó su densidad estomática abaxial de manera significativa en respuesta a la disminución del riego, fenómeno que se ha descrito promueve una mejor conservación de agua dentro de la planta (Kebede et al., 1994). Es de interés notar que en un estudio realizado en *Arabidopsis*, Serna y Fenoll (1997) atribuyeron al etileno la propiedad de inducir la formación de estomas en la cara adaxial de las hojas. El presente estudio y el anterior realizado en poblaciones de *S. pimpinellifolium* no incluyeron determinaciones de etileno en planta, pero al ser *SIERF1* un activador de la expresión de genes en respuesta a la hormona, es altamente probable que las plantas hayan aumentado sus niveles de etileno en respuesta a la disminución del riego. Ello sugiere que habría diferencias en los ajustes de la

densidad estomática en respuesta a etileno entre *Arabidopsis* y *S. pimpinellifolium*, o que las diferencias se dan según la hormona sea incrementada en su concentración en planta por aplicación de una molécula precursora o en respuesta a la restricción hídrica. Independientemente de las causas de estas diferencias, los resultados obtenidos en el presente estudio son congruentes con la relación directa reportada entre la expresión de *SIERFI* y la tolerancia a estrés osmótico en tomate por Huang et al. (2004).

Es de recalcar que algunos resultados obtenidos sugieren que la población de Pantanos de Villa posee singularidades en su respuesta a la restricción hídrica, tanto a nivel del conjunto de poblaciones analizadas como a nivel de las poblaciones de la región Lima. En términos generales, las plantas de esta población tendieron a mostrar respuestas más tardías en la expresión relativa de los genes que las observadas en las demás poblaciones. En cuanto a las respuestas fenotípicas evaluadas en este estudio, esta población fue la única entre las de la región Lima que mantuvo los niveles de eficiencia fotosintética y de carotenoides bajo un régimen de riego restringido, y fue la única entre todas las poblaciones que aumentó los valores de clorofila a y b. Es de destacar que esta misma población fue la que tendió a mostrar una mayor resistencia a un par de aislamientos peruanos de *P. infestans* en un estudio realizado en paralelo con el mismo grupo de poblaciones (Chang kee, tesis de maestría en curso).

Niveles de expresión relativa de los 3 genes de estudio bajo estrés hídrico inducido en cultivo *in vitro*.

En forma paralela a los experimentos de interrupción de riego en plantas adultas mantenidas en maceta, se analizó también los niveles de expresión relativa de los genes de interés al inducir estrés hídrico en plántulas de las 6 poblaciones de *S. pimpinellifolium* mantenidas bajo condiciones *in vitro* mediante un tratamiento osmótico con polietilenglicol-PEG (Anexo 7, Tabla 3). Esta aproximación se incluyó con la finalidad de evaluar la respuesta en estadios distintos de desarrollo y bajo modalidades distintas de inducción de estrés hídrico. Los resultados mostraron un incremento en la expresión relativa del gen *CBF1* frente a una menor disponibilidad de agua con PEG. Esto demuestra que la inducción de la expresión del gen *CBF1* es independiente del estadio del desarrollo de la planta y/o de la aproximación utilizada.

En cuanto a la expresión del gen *CRTLb*, se encontró un menor valor promedio en el tratamiento en cultivo *in vitro* con respecto al tratamiento de plantas en macetas ($p=0.005$) (Anexo 7, Tabla 3). De hecho, los mayores incrementos de dicha expresión en el tratamiento en cultivo *in vitro*, observados en las poblaciones de Colán y UNALM, no fueron tan marcados como los del tratamiento en macetas. Esta diferencia podría deberse a que las plántulas mantenidas bajo condiciones *in vitro* (baja irradiación, alta humedad, baja disponibilidad de CO₂ y elevados niveles de sucrosa en el medio) no son autótrofas y suelen tener solo una limitada capacidad fotosintética por la constitución anormal de sus hojas (Hazarika, 2006). En plantas que hacen fotosíntesis activa, como las plantas sometidas a tratamiento en macetas del presente estudio, los carotenoides juegan un papel

fundamental, tanto como pigmentos en la captación de energía como antioxidantes y disipadores del excedente energético en la protección de la maquinaria fotosintética (Cazzonelli et al., 2011). En particular, el β -caroteno y la violaxantina son considerados esenciales para estas funciones. El primero es parte de los centros de reacción de los fotosistemas y del núcleo de las antenas captadoras de energía, y la segunda es constituyente de las porciones periféricas de las antenas y de complejos con proteínas para la captación de energía luminosa (Trebst, 2003). La expresión del gen *CRTLb* y la consiguiente síntesis de la licopeno beta ciclasa es importante para la formación de ambas moléculas (Ronen et al., 2000), y por ello era de esperarse que esta variable fuese afectada de manera distinta según la respuesta al estrés por restricción hídrica se produjese bajo condiciones *in vitro* versus condiciones naturales, tal como se ha confirmado en este estudio.

En lo que respecta a la expresión relativa del gen *SIERFI* bajo tratamiento de plántulas *in vitro* los resultados mostraron ser diferentes en comparación al tratamiento de plantas en macetas (Anexo 7, Tabla 3). Si bien los valores promedio de la expresión relativa de este gen no mostraron una diferencia significativa entre las dos aproximaciones a nivel estadístico, la población de Colán aumentó la expresión relativa de *SIERFI* en el tratamiento *in vitro* mientras que en la restricción de riego en macetas los valores promedio se mantuvieron constantes. En cuanto a la población de UNALM incrementó su expresión en ambos casos, pero de manera más tardía y en menor magnitud en la reducción de riego en macetas.

Una característica del gen *SIERF1* en tomate es la elevada transcripción que se observa en la raíz de plántulas, una expresión bastante más elevada incluso que la que se observa durante la maduración del fruto en plantas adultas (Sharma, 2010). Es posible que, en las etapas tempranas del desarrollo de la planta, la expresión de *SIERF1* juegue un papel principal en el desarrollo de la raíz para asegurar el acceso a agua y nutrientes y mejorar la probabilidad de supervivencia. Estudios realizados en plántulas de tomate que sobre-expresaron *LeERF1* y *LeERF2* demostraron que las plántulas transformadas desarrollaban raíces más largas que las no transformadas bajo estrés salino (Hu et al., 2014). Si bien en este estudio no puede descartarse que las diferencias en la magnitud de la expresión relativa de *SIERF1* observadas entre las 2 aproximaciones utilizadas se deban a la forma de inducir el estrés hídrico, es muy probable que el estadio de desarrollo de la planta sea el factor principal.

Secuenciamiento de los productos de amplificación

Para corroborar que se estuviesen estimando las expresiones relativas de los 3 genes de interés, las secuencias de los productos de amplificación (cADN) fueron obtenidas a partir de las reacciones de PCR realizadas con muestras de las 6 poblaciones de *S. pimpinellifolium*. Los resultados mostraron que la región amplificada de los genes *CBF1* y *SIERF1* pertenecen al dominio AP2, secuencia asociada a un dominio de unión al ADN en factores de transcripción que regulan la expresión de múltiples genes en plantas, entre ellos los involucrados en respuesta a estrés (SMART, SM00380). Las diferencias de nucleótidos que se traducen en cambios de aminoácidos en *CBF1* y *SIERF1* podrían alterar la afinidad de estos factores de transcripción por su sitio de unión al ADN en los promotores de los

genes que regulan, y con ello explicar en parte las diferencias de respuesta fenotípica entre poblaciones. En cuanto a la región amplificada del gen *CRTLb*, ésta corresponde al dominio NADB-Rossmann. Este dominio se encuentra en proteínas deshidrogenasas, enzimas que catalizan reacciones a través del uso de coenzimas NAD y FAD. Este dominio posee una secuencia consenso GXGXXG donde las glicinas participan en la unión al NAD(P) (NCBI, cl09931). El gen *CRTLb* codifica una enzima que cataliza la conversión de licopeno a beta-caroteno, y el hecho de poseer un dominio NADB-Rossmann sugiere que el mecanismo de catálisis es similar al de las deshidrogenasas. Se ha reportado que el dominio NADB-Rossmann ha pasado por un proceso evolutivo desde las deshidrogenasas de cadena corta hasta las de cadena larga, cuya complejidad permitió la unión a coenzimas (Jörnvall et al., 2010). Las diferencias de nucleótidos entre los productos de amplificación del cADN de *CRTLb* de las distintas poblaciones estudiadas podrían verse reflejadas en la eficiencia de la catálisis de la enzima, y ello influir en las respuestas fenotípicas observadas bajo restricción hídrica.

El presente estudio presentó algunas limitaciones. En primer lugar, el carácter semi cuantitativo de la RT-PCR plantea restricciones de exactitud y precisión en la determinación de los niveles de expresión relativa de los genes evaluados, lo que debiera mejorarse con el uso de técnicas más sofisticadas como la PCR en tiempo real. En segundo lugar, la data generada no pudo completarse debido a la degradación del ARN o por la imposibilidad de detectar la expresión del gen *SIERF1* por RT-PCR en algunas muestras. En lo que corresponde a la degradación de ARN, la preparación de nuevas muestras no fue posible por haberse agotado el material vegetal y no disponerse de tiempo y recursos para realizar experimentos adicionales. Un tercer punto tuvo que ver con las dificultades para

realizar la evaluación fenotípica bajo condiciones relativamente constantes que solo podrían garantizarse con el uso de un invernadero. Ello determinó que las evaluaciones fenotípicas incluidas en el presente trabajo no pudieran realizarse bajo las mismas condiciones que las del estudio anterior, por haber ocurrido ambas en distintas épocas del año.

VI. Conclusiones

- Se observaron cambios en los niveles de expresión de los tres genes de estudio en la mayor parte de las poblaciones estudiadas de *S. pimpinellifolium* en respuesta al tratamiento de plantas en macetas.
- El incremento de la expresión relativa del gen *CBF1* coincidió con el mantenimiento de la eficiencia fotosintética en las poblaciones de la región Piura y la de Pantanos de Villa.
- No se encontró una asociación entre el contenido de carotenoides y la expresión relativa del gen *CRTLb* en respuesta a la restricción hídrica.
- En la población de UNALM, el incremento de la expresión del gen *SIERF1* coincide con una tendencia al aumento en los valores promedio del contenido relativo de agua y una caída en la densidad estomática.
- La población de Pantanos de Villa mostró cambios fenotípicos y de expresión de genes en respuesta al estrés hídrico que la distinguen del resto de las poblaciones estudiadas.

VII. Recomendaciones

- Hacer la anotación de los genes estudiados en el genoma reportado de *S. pimpinellifolium* (accesión LA1589), en base a la homología con el genoma ordenado y curado de *S. lycopersicum*.
- Evaluar la funcionalidad del gen *CBF1* de las poblaciones estudiadas en ensayos de transformación de tomate cultivable en los que se compruebe si su expresión induce una mayor tolerancia al estrés hídrico y al estrés salino.
- Evaluar en ensayos de transformación si la sobre-expresión del gen *SIERF1*, en particular el que se clone de la población de UNALM, disminuye la densidad estomática y aumenta el contenido relativo de agua de las plantas transformadas.
- Analizar la composición de carotenoides en plantas adultas de las poblaciones estudiadas de *S. pimpinellifolium* sometidas a restricción hídrica.
- Analizar la situación filogenética de la población de Pantanos de Villa dentro de la especie *S. pimpinellifolium*.

VIII. Referencias bibliográficas

- Abeles et al., 1992. Ethylene in Plant Biology 2nd edn. *Academic Press*. San Diego
- Achard P et al., 2008. *The Plant Cell*. 20(8), 2117–29.
- Amini F y Ehsapour AA. 2006. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9(1), 170–175.
- Anjum SA et al., 2011. *Journal of Agricultural Research*. 6(9), 2026–2032.
- Ansquer P et al, 2009. *Grass and Forage Science*. 64, 57–70.
- Blum A. 2003. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56, 1159–68.
- Boissot N et al., 2008. *Annals of Applied Biology*. 152(2), 263–269. Borguini R y Torres E. 2009. *Food Review International*. 25, 313–325.
- Cazzonelli CI. 2011. *Functional Plant Biology*. 38, 833–847.
- Chakravarthy S et al., 2003. *The Plant Cell*. 15, 3033–3050
- Chang kee. José. Caracterización de seis poblaciones de *Solanum pimpinellifolium* de las regiones Piura y Lima respecto de su resistencia a *Phytophthora infestans*. Tesis de maestría en curso.
- Chaves M., Maroco J y Pereira J. 2003. *Functional Plant Biology*. 30: 239–264.
- Chen RD et al., 1994. *Molecular Genetics and Genomics*. 245(2), 195–202.
- Chen X et al., 2011. *Plant and Cell Physiology*. 52(5), 909–921.
- Cheruth AJ et al., 2009. *International journal of agriculture y biology*. 11, 100–5
- Collins JK y Roberts W. 2006. *Horticulture Science*. 41(5).
- Cong L, Chai TY y Zhang YX. 2008. *Biochemical and biophysical research communications*. 371(4), 702–6.
- Costa M et al ., 2007. *Journal of integrative Plant Biology*. 49(10), 1421–1434
- Cunningham F. 1996. *American Society of Plant Physiologists*. 8, 1613–1626.
- Czechowski T et al., 2005. *Plant Physiology*. 139, 5–17
- D’Ambrosio et al., 2004. *Plant Science*. 166(1), 207–214
- Dalin P et al., 2008. *Springer Science*. 89–105.
- Dallman MJ et al., 1991. *Journal of Experimental. Medicine*. 493–496
- Desikan R et al., 2006. *For Cell and Molecular Biology*. 47(6), 907–16. Dumas Y et al., 2003. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(5), 369–382. Easlon HM y Richards JH. 2009. *American journal of botany*. 96, 605–611. Elklund L, Cienciala E y Hallgren JE. 1992. *Physiologia Plantarum*. 86, 297–300 Ellis PR y Maxon JW. 1971. *Euphytica*. 20, 93–101.
- Farooq M et al., 2009. *Spring Verlag*. 29, 185–212
- Fender SE, Bray EA y Connell MAO. 1993. *Plant Physiology*. 597–605.
- Foolad MR et al., 2003. *Euphytica*. 130, 199–206.
- Galiano E. 1959. *Systematic botany and pharmaceutical plants*. 25, 147–76.
- Gao SQ et al., 2009. *Plant cell reports*. 28, 301–11.
- Golldack D, Lüking I y Yang O. 2011. *Plant cell reports*. 1383–1391
- Gong, P. et al. 2010. *Journal of experimental botany*. 61, 3563–75.
- Hazarika BN. 2006. *Scientia Horticulturae*. 108(2), 105–120.
- Hsieh TH et al., 2002. *Plant Physiology*. 130(2), 618–626.
- Hsieh TH et al., 2010. *Planta*. 231(6), 1459–73.
- Hu N et al., 2014. *Acta Physiologiae Plantarum*. 36(7), 1703–1712.
- Huang Z et al., 2004. *FEBS Letters*. 573(1–3), 110–116

- Hussain SS, Kayani MA y Amjad M. 2011. *Biotechnology Progress*. 27(2), 297–306.
- Jagglo-Ottosen KR et al., 1998. *Science*. 280, 104–106
- Jörnvall et al., 2010. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396.125–130
- Kasuga M. 2001. *Nature Biotechnology*. 236, 176–89.
- Kebede H et al., 1994. *Crop Science*. 34,108– 113.
- Kim et al., 2014. *Molecular Biology Reports*. 41, 8137–8148
- Kizis D, Lumbreras V y Pagés M. 2001. *FEBS Letters*. 498, 187–189. Krieger-Liszkay A. 2005. *Journal of Experimental Botany*. 56(411), 337–46. Lambers H, Chapin F y Pons TL. 2008. *Plant Physiology Ecology*. Springer. 2nd edition
- Lee J et al., 2003. *Plant, Cell and Environment*. 26(7), 1181-1190.
- Li Z et al., 2014. *Plant Physiology and Biochemistry*. 74: 294–303.
- Lichtenthaler HK y Buschmann C. 2001. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.
- Lindemose et al., 2013. *International journal of molecular sciences*. 14(3)5842–78
- Lu C et al., 2010. *African Journal Biotechnology*. 9(38), 6294–6300.
- Lu C. et al., 2011. *Russian Journal of Plant Physiology*. 9, 6294–6300
- Lu CW et al., 2011. *Russian Journal of Plant Physiology*. 58, 118–125.
- Mahuad SL et al., 2013. *Journal of genetics*. 92, 195–203.
- Martin B, Thorstenson YR. 1988. *Plant Physiology*. 88, 213–217.
- Maskin L et al., 2001. *Plant Science*. 161, 739– 746.
- Mimuro M y Katoh T. 1991. *Pure Applied Chemistry*. 63,123-130.
- Mitchell JP y Shennan C. 1991. *Journal American Society Horticulture Science*. 116(2), 215–221.
- Moco S et al., 2006. *Plant Physiology*. 141, 1205–1218.
- Montgomery et al., 1997. *Cytokine*. 9, 717–726.
- Movahedi S et al., 2012. *Biologia Plantarum*. 56(1), 37–42.
- Moyle LC. 2008. *International Journal of Organic Evolution*. 62(12), 2995–3013.
- Murashige T y Skoog F. 1962. *Physiology Plant*. 15(3), 473-497.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2014. *Frontiers in Plant Science*. 5, 170.
- Nakazato T, Bogonovich M y Moyle LC. 2008. *Evolution*. 62(4), 774–92.
- Nemeskéri E et al., 2009. Advances in Selected Plant Physiology Aspects. Chapter 6. Intech. 134-158
- NCBI, cl09931. Link:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbin=8&maxaln=10&seltype=2&uid=277520&querygi=723738271&aln=2,56,1,338,394,341,106>
- Pagliara V et al., 2014. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 , 2631–2644
- Pan XQ et al., 2013. *Postharvest Biology and Technology*. 75, 28–36. Patane C et al., 2010. *Agricultural Water Management*. Volume. 97, 131-138
- Peralta L et al., 2008. *Systematic Botany Monographs*. 25, 186-186
- Pfaffl M et al., 2004. *Biotechnology Letters*. 26(6), 509–515.
- Pirrello J. 2009. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources*. 4(051), 1–14.
- Qiao ZX, Huang B y Liu JY. 2008. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1779(2), 122–7.

- Rabe ES. 1990. *Journal of Horticultural Science*. 65(3), 231-243.
- Ramanjulu S y Bartels D. 2002. *Plant, Cell & Environment*. 25(2), 141-151.
- Reddy A. 2004. *Journal of Plant Physiology*. 161(11), 1189-202.
- Rejeb KB, Abdelly C y Saviouré A. 2014. *Plant Physiology and Biochemistry*. 80, 278-84.
- Renquist AR y Reid JB. 2001. *Australian Journal of Agricultural Research*. 52, 793-799
- Rick C.M. 1973. Genes, Enzymes, and Populations. Springer US. 255-269.
- Ronen G et al., 2000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(20), 11102-7.
- Rontein, D et al., 2002. *Metabolic Engineering*. 4(1), 49-56
- Rose LE, Michelmore RW y Langley CH. 2007. *Genetics*. 175(3), 1307-19.
- Sakuma Y et al., 2006. *The plant Cell*. 18, 1292-1309.
- Schroeder JI, Kwak JM y Allen GJ. 2001. *Nature*. 410, 327-330
- Serna L y Noll CFE. 1995. *Plant Developmental Biology*. 123S-124S.
- Sharma MK et al., 2010. *Molecular Genetics and Genomics*. 284(6), 455-475.
- Shi et al., 2015. *International Journal of Molecular Science*. 16, 30438-30457
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. *Journal of experimental botany*. 58, 221-7.
- Sifres A et al., 2006. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 54, 359-377
- Signorelli S. 2014. *The journal of physical Chemistry*. 118, 37-47.
- SMART, accession number SM00380. Link: http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?ACC=SM00380
- Sun W et al., 2010. *Plant & Cell Physiology*. 51(6), 997-1006.
- Tanaka Y et al, 2005. *Plant Physiology*. 138, 2337-2343
- Tanaka K et al, 2000. *European Journal of Endocrinology*, 142 340-346
- Telfer A et al., 1994. *Beta-Biochemistry*. 33,14469-74
- Terol J, Pe M y Salinas J. 1999. *Plant Physiology*. 119, 463-469.
- Tester M y Langridge P. 2010. *Science*. 327(5967), 818-22.
- Torrecillas A et al., 1995. *Plant Science*. 105, 169-176
- Trebst A. 2003. *Z Naturforsch*, 58c, 609-620.
- Trevino MB et al., 1998. *Plant Physiology*. 116(4), 1461-8.
- Trujillo LE et al., 2008. *Plant Cell Physiology*. 49,512-515.
- Unyayar S et al., 2005. *Plant Soil Environmental Facultys*. 29, 211-216
- Van der Fits L y Memelink J. 2000. *Science*. 289,295-297
- Vandenbussche F y Van Der Straeten D. 2012. *Annual Plant Reviews*. 44 (44), 219-241.
- Vendramini F et al., 2002. *New Phytologist*. 147- 157.
- Verslues PE et al., 2006. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 45, 523-39
- Verslues PE y Juenger TE. 2011. *Current opinion in plant biology*. 14, 240-5
- Vidal John. 2013. Climate Change: How a warming world is a threat to our food supplies. <http://www.theguardian.com/environment/2013/apr/13/climate-change-threat-food-supplies>
- Vidavski F et al., 2008. *Plant Breeding*. 127(6), 625-631.
- Weiss J y Egea-Cortines M. 2009. *Journal of applied genetics*. 50, 311-9
- Wilkinson S y Davies WJ. 2010. *Plant, Cell & Environment*. 33(4), 510-25.

- Wu L et al., 2007. *Planta*. 226(4): 815–25.
- Xu Z y Zhou G. 2008. *Journal of experimental botany*. 59, 3317-3325
- Yáñez M et al., 2009. *Plant cell reports*. 28, 1497–507.
- Zhang Z et al., 2010. *Planta*. 232(3), 765–74.
- Zhang L et al., 2014. *PloS One*. 8(6): e61810
- Zuriaga, E. et al., 2008. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56, 39–51.

IX. Anexos

Anexo 1

Preparación de medio MS

Soluciones madre:

Macronutrientes		Micronutrientes (1 L, 100 X)	
NH ₄ NO ₃ (10 X)	16.5 g/L	H ₃ BO ₃	0.62 g
KNO ₃ (10 X)	19 g/L	KI	0.083 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (100 X)	44 g/L	MnSO ₄ .H ₂ O	2.23 g
MgSO ₄ (100 X)	18 g/L	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.86 g
KH ₂ PO ₄ (100 X)	17 g/L	Na ₂ MbO ₄ .2H ₂ O	0.025 g
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025 g
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025 g

Solución de Fe-EDTA (0.5 L, 100X)	
FeSO ₄ .7H ₂ O	1.4 g
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	1.8 g

Disolver cada sal por separado en 200 mL de H₂O. Calentar ambas soluciones y añadir lentamente la de EDTA a la de FeSO₄ con ayuda de un agitador magnético. Completar el volumen a 0.5 L con H₂O.

Vitaminas		Conservar las soluciones madre a 4°C, con excepción de las vitaminas que deben ser almacenadas a -10°C.
Tiamina (1000 X)	10 mg/10 mL	
Ácidonicotínico (1000 X)	100 mg/10 mL	
Piridoxina (1000X)	10 mg/10 mL	
Mio-inositol (10000 X)	10 mg/10 mL	

Para "A" L de medio MS 0.5 X (germinación):

Donde A =	1 L	500 mL	250 mL	125 mL	100 mL
NH ₄ NO ₃ (10 X)	50 mL	25 mL	12.5 mL	6.25 mL	5 mL
KNO ₃ (10 X)	50 mL	25 mL	12.5 mL	6.25 mL	5 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (100 X)	5 mL	2.5 mL	1.25 mL	0.625 mL	0.5 mL
MgSO ₄ (100 X)	5 mL	2.5 mL	1.25 mL	0.625 mL	0.5 mL
KH ₂ PO ₄ (100 X)	5 mL	2.5 mL	1.25 mL	0.625 mL	0.5 mL
Micronutrientes (100X)	5 mL	2.5 mL	1.25 mL	0.625 mL	0.5 mL
Fe-EDTA (100X)	5 mL	2.5 mL	1.25 mL	0.625 mL	0.5 mL
Bencilaminopurina (BAP) (después de autoclavar)	1 mL	0.5 mL	0.25 mL	0.125 mL	0.1 mL

Autoclavar medio y dejar enfriar hasta 60°C. Recordar siempre que la hormona debe añadirse luego de que la solución esté tibia o fría.

En ensayos preliminares se identificaron las condiciones para una germinación óptima utilizando la población de Morante. Para ello, se determinó el porcentaje de germinación para diferentes condiciones de germinación como se observa a continuación:

Condiciones	Porcentaje de germinación (%)
Agitación y sellado	95
Agitación y no sellado	55
Sin agitación y sellado	35
Sin agitación y no sellado	5



De izquierda a derecha: con agitación y con sellado, con agitación y sin sellado, sin agitación y con sellado, sin agitación y sin sellado. El grupo que presentó la mayor germinación fue el que se mantuvo en agitación y en el que las tapas fueron selladas.

A partir de estos resultados se consideró utilizar la condición de agitación y sellado.

Anexo 2

Preparación del medio PEG (-0.5 MPA potencial hídrico)

Para placas regulares 50 mL (100 mm de diámetro):
20 mL de medio sólido (agar)
30 mL del “overlay” (PEG o control)

Procedimiento:

1. Preparar solución madre MS 0.5X:

50 mL (1 placa)		
NH ₃ NO ₃	10X	2.5 mL
KNO ₃	100X	0.25 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	100X	0.25 mL
MgSO ₄	100X	0.25 mL
KH ₂ PO ₄	100X	0.25 mL
micronutriente	100X	0.25 mL
Solución de Fe-EDTA	100X	0.25 mL
Tampón MES		0.21 g

Una vez añadidos todos los componentes, incluido el tampón MES, colocar la mitad del volumen y añadir NaOH (1N) para llevar a pH 6. Luego completar el volumen total.

2. Separar en 3 fases:

Frasco1 (medio sólido 15g/L de agar) (1)	20 mL +0.33 g de agar
Frasco2 (“overlay”+PEG 250g/L) (2)	30 mL +7.5 g de PEG
Frasco3 (overlay control)	30 mL

- (1) El agar debe ser añadido antes de autoclavar.
- (2) Se autoclavan los 3 frascos. Se deja solidificar la solución con agar y mientras tanto se añade PEG en el frasco que corresponda para ser agitado
- (3) El PEG se debe añadir luego de autoclavar y en la cámara de flujo horizontal. Previamente se debe colocar en el frasco una pastilla magnética pues el PEG se añade en agitación.
- (4) Una vez sólido el agar en las placas (30 min), se añade 30 mL del “overlay” PEG o control.
- (5) Dejar equilibrando hasta el día siguiente a temperatura ambiente.
- (6) Antes de usar, eliminar el sobrenadante cuidando que no se salga la parte sólida.

Anexo 3

Extracción de ARN

1. Homogenizado:
 - Pulverizar las muestras en nitrógeno líquido
 - Inmediatamente homogenizar el pulverizado con TRI Reagent (1 mL por 50-100 mg)
 - Poner en hielo
2. Fase de separación:
 - Agregar 200 mL de cloroformo por cada mL de TRI Reagent® empleado
 - Incubar 5-10 minutos en hielo
 - Centrifugar a 12 000 g por 15 min a 4°C
 - Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo
3. Precipitación:
 - Agregar 500 µL de isopropanol (o volumen igual al transferido)
 - Dejar 1 hora a +20°C u overnight
 - Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C
 - Eliminar el sobrenadante
 - Agregar 1 mL de etanol al 75%
4. Lavado del “pellet”:
 - Centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C
 - Secar el “pellet” por 10 minutos
 - Agregar agua miliQ autoclavada
 - Guardar a -20°C

Control de calidad de ARN

Para determinar la calidad de ARN se realizó una corrida de electroforesis de agarosa al 1 % por 40 min a 90 V. Se consideró una muestra de buena calidad aquella que presenta la distinción de dos bandas 18 S y 28 S.

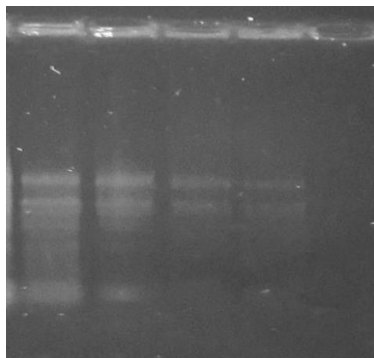


Figura 7. Gel de agarosa 1% de muestras de RNA. I: 5 plántulas (0.6 g), II: 0.3 g de hojas maduras, III: 0.5 g de hojas maduras, IV: 5 plántulas (0.6 g)

Concentración de ARN

Las concentraciones de las muestras fueron obtenidas mediante el espectrofotómetro a 260 nm. A partir de estos valores se tomaron diferentes volúmenes para la retrotranscripción de tal forma que todas las muestras posean 1 µg de ARN.

Anexo 4

Ensayo RT-PCR

Síntesis de cADN:

1. En un tubo de 0.2 mL, se combina lo siguiente con la muestra de ARN y se ajusta a un volumen de 6 μL :

Componentes	Volumen
Cebador Oligo(dT) ₂₀	0.5 μL
ARN (1 μg)	X μL
10 mM dNTP	1 μL
Agua tratada con dietilpirocarbonato (Agua DEPC)	2.5 μL
Total	6 μL

2. Desnaturalizar el ARN y el cebador incubando por 5 min a 65°C y colocar a 4°C por 5 min.
3. Preparar el master mix en hielo y agitar en vortex.

Componentes	1 reacción
Tampón 5X cADN	2 μL
DTT	0.5 μL
Rnase OUT	0.5 μL
DEPC	0.5 μL
Thermoscript RT	0.5 μL
Total	4 μL

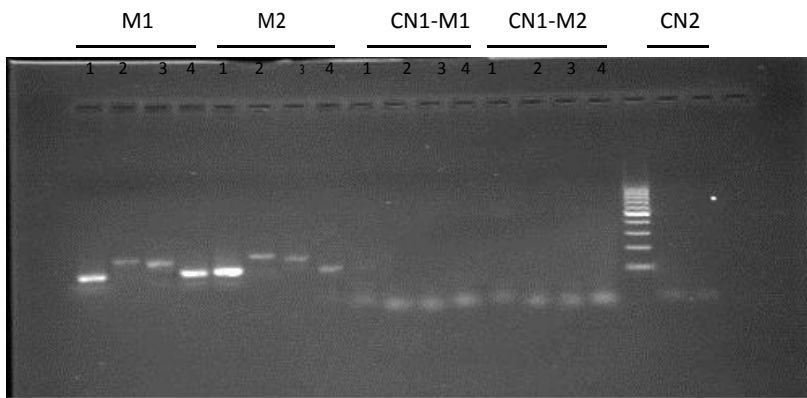
4. Colocar 8 μL de master mix en cada tubo de reacción y mantener en hielo.
5. Colocar la muestra e incubar por 50 min a 50°C.
6. Terminar la reacción incubando por 5 min a 85°C.
7. Almacenar a -80°C.

PCR con Taq ADN polimerasa:

Componentes	1 reacción	
Tampón 10X PCR Minus Mg	2.5	μL
50 mM MgCl ₂	2.5	μL
10 mM dNTP Mix	0.5	μL
10 μM cebador "forward"	0.5	μL
10 μM cebador "reverse"	0.5	μL
Platinum® Taq DNA polymerase (5 U/ μL)	0.2	μL
cADN	2	μL
Agua DEPC	Hasta 25	μL
Volumen final	25	μL

Ciclos	
94 °C x 5 min	
94 °C x 1 min	35 ciclos
56 °C x 1 min	
72 °C x 1 min	
72 °C x 7 min	

Control negativo de RT-PCR



1: *UBI*, 2: *CBF1*, 3: *CRTLb*, 4: *SIERF1*. M1: muestra 1, M2: muestra 2, CN1: control negativo de la retrotranscriptasa, CN2: control negativo del PCR (sin muestra)

Anexo 5

Para determinar el tamaño esperado de los productos de amplificación a partir de los cADNs derivados de los ARN mensajeros de *S. pimpinellifolium*, se utilizó como herramienta <http://plants.ensembl.org/index.html> para ubicar primero los exones e intrones de los genes de interés en el genoma de *S. lycopersicum* y el enlace <http://insilico.ehu.es/> permitió realizar una PCR *in silico*. Luego, para determinar que estos cebadores anclarían de forma correcta en *S. pimpinellifolium*, se realizó la búsqueda de los genes de esta especie en <http://solgenomics.net/>. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Genes	Cebadores	Tamaño (pb)	N° de exones (<i>S. lycopersicum</i>)	Regiones de amplificación (<i>S. lycopersicum</i>)	Referencia
UBI		123	1	Ambos cebadores están dentro del exon1	Yáñez, M. et al., 2009 (Trabajo realizado en <i>S. lycopersicum</i> , <i>S. chilensis</i> y <i>S. peruviana</i>)
Forward	GAAGAAGAAGACCTACCAAGCC				
	Reverse				
SIERF1		122	1	Ambos cebadores están dentro del exon1	Lu, C. et al., 2011 (Trabajo realizado en <i>S. lycopersicum</i>)
Forward	GTTAGGCACTTTTGAGACAGCAGA				
	Reverse				
CRTLb		182	1	Ambos cebadores están dentro del exon1	Diseñado en este estudio
Forward	GGCACAAGTGGAGGAACATC				
	Reverse				
CBF1		193	1	Ambos cebadores están dentro del exon1	Weiss J y Egea-Cortines, 2009 (Trabajo realizado en <i>S. lycopersicum</i>)
Forward	TCCGATATACAGGGGAATCA				
	Reverse				

Secuencias de los genes en *S. lycopersicum*:

En rojo se señalan los exones

En amarillo la posición de los cebadores

>UBI

CGAAATGTGACACCCGATCCATATTCTATCATGTTACCGGAACGTGGCACCCGATCTATATACTATCCTGGTG
 TCGAAACGTGACACTCCGATCCTCATTCTATCCTGGTGTGCGGAACGTGACACCCGATCCATATTCTATCCTGG
 TACCGGAATGTGGCACCTGATCCGTATACTATCCTGGTGTGCGGAACGTGACACCCGATCCACATACTATCCTG
 TGTTGGAATGTGACACTCAGATCCTCATTCTATCCTACTACCGGAACGTGGCACCCGATCCCCTAATCTCACT
 ACTTTTCGTCATCAAGCCTTCTTTTATACTAAGGCATCATCATTAACAAAGTAGATTAGGGTTTCTTTTTCAAG
 ATTTAGAATTCCATAGCTTCATCATGCTTATCTCATCACAATTATATAATCACAACATGCAAATACACAATTA
 AGCATATAGAAGGGTTTACAACACTACCCAATACATATCATTGCTATTAAGAGTTTACTACGAATAATGTAA
 AAAAATCATAACCTACCTCCACCGAAGAATTTTGATTAAGCAAGCAATTTCCCAAAGCTTTGTTCTCTCTTT
 CTCTTGATCGTACGT**TTCTCCCTCTCTTTATGTTCTTTTCTTTTTCTTATTCAAACCTCTTTCTTTTACCCT**
AATTAGCATATAATTTATCAACAAAAGAAACCCCTAGAAGCCGCGAGTGCCACTGATTTCTCTCCTCCAGACGAA
GATGCAGATCTTCGTGAAAACCCCTAACGGGGAAGACGATCACCTAGAGGTTGAGTCTTCCGACACCATCGAC
AATGTGAAAGCCAAGATCCAGGACAAGGAAGGGATTCCCCAGACCAGCAGCGTTTGATTTTCGCCGGAAAGC

TGTGAGAATTGGGGAAGAGGGGTTTGTGTTAAAGCTAGGAGTAGTACTCTTTTGGAGCTTGTACCTGAGATAA
AGAAGGAAAATCTTGATTTTGGAGCTTCCATGTATGACCCCTTCAAAGGGCTTGTGTAGATCTAGCTGTGGT
TGGTGGTGGACCTGCTGGGCTTGTGTTGCACAGCAGGTTTCGGAGGCTGGGTTATCGGTTTGTCTCGATTGAC
CCGTCCCCTAAATTGATATGGCCTAACAACTATGGTGTGGGTGGATGAATTTGAGGCCATGGATTTGTTGG
ATTGCTTGTATGCGACATGGTCAGGTGCTGTTGTTTATGTGATGATGATAAACTAAGAATCTTGATAGACC
TTATGGAAGGGTTAATAGGAAAAGCTTAAGTCGAAAATGATGCAGAAAATGCATACTAAATGGTGTAAATTT
CACCAAGCAAAAAGTTATAAAGGTAATTCATGAGGAAGCTAAATCTATGCTGATTTGCAGTGATGGTGTGACTA
TTCAGGCAACAGTGGTTCTTGATGCGACGGGATTCTCTAGATGTCTTGTTCAGTATGATAAGCCATATAATCC
TGGGTATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGGAGGAACATCCCTTCGATACAAGTAAGATGCTTTTT
ATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACAATGTGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACTTTTTC
TCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTTGAAGAAACCTCCCTTGTAGCTCGTCTGGATTACG
TATGGATGATATAACAAGAACGAATGGTGGCTCGTTTGTAGTCACTTGGGTATAAAAGTTACGAGCATTGAAGAA
GATGAGCAGTGTGTGATCCCAATGGGAGGCCCTTCCAGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGGAATTTGGTGGTA
CTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTTATATGGTAGCAAGGACACTAGCTGCAGCTCCTGTCTGTTGCTAA
TGCAATAGTTTCACTTGGTTCTGATAAGGACCATCTAGGTAATGAGTTATCGGCATCTGTTTGGAAAAGAT
TTGTGGCCCATAGAAAAGGAGACGTCAAAGAGAATTTCTTTTGGTATGGATATTCTTCTGAAGCTTGATT
TATCCGCTACAAGAAGTTTTTCGATGCCTTTTTTGTCTAGAACCTCGTTATTGGCATGGTTTTCTTGTCTATC
TCGGCTGTTTTCTTCTGAACCTCATGTTTTTTCGGTCTATCCCTTTTCTCTCATGCTTCAAATACTTCTAGATTA
GAGATAATGACCAAAGGAACTTTTCTTTGGTTACTATGATTAACAATTTGTTAAAGGATACAGAATGACTTA
TCAAGGATCTTGTTCATAGTACATCACATATATGTTAATACTGCTCATTGTGTTGCCAATTTACTTTGT
ATTGTGTTTTCTTCCCTTTTCA

>ERF

TACTTTTTTTCGGAACACACACACTTCAATTAACACTACATTTGTAAGATTGTCAATATTA TGGCTAGGGCACAAC
AAAGATATCGAGGAGTTTCGACAGAGACATTGGGGTCTTGGGTCTCCGAAATTCGCCATCCATTGTTGAAGAC
AAGAATTTGTTAGGCACTTTTGGAGACAGCAGAAGATGCAGCAAGAGCATATGATGAAGCAGCAAGGCTAATG
TGTGGTCCAAGAGCTAGAATAATTTCCATACAACCCAAACATGCCACAAACATCTTCTCTAAGCTACTCT
CAACTACATTAACAGCCAAGTTACACAAATGCTACATGGCTTCACTTCAAATGACCAAAACCTCACCACAAGG
ACAAAATTAGCAAAAATGCAACCAATGTTCAAGAAAGTGTATTAATTCCTATAAAAATGAAACAACAAATG
TTGGTACCAAAGCCATCAGTACTATTGACTCATCATGATCATGAGGAAGCTAAAGTAGTCAACTTGGGAG
TGGGAGTAATTAGGAAAGTTGAAGATCAAGTACTTGGGGTATACCACAATTTGTCAAGCCACTTGAAGATGA
TCACATTGAACAAATGATTGAAGAATTGTTGGATTATGGATCCATTGAGCTTTGCTCTAATGTTGTTCTTCT
CACCAAATCCAGTGAAGCTTGTCTCGTAAATCGACTATTGCCTAATACTTGTCTACATTTGATCAGTGCAGGTATT
AGATAACTCTTCTACTGATGTTCTCTCTCAGTAATTGTCTCTTTTTGGGTCTTACATTGTTCTGTACTAGAAA
GATACTCATTTTGTCTAATTTAACCCCATTTGTATAGCCGTTCCCGATTTGTTTGGGACTGAAGCTTAGTTATT
GTTGTATTAAGTCTTTAAGTAGTCTCCCTCTGTTTAAATCTATGTATCGTTAGTAGGTCTAGGCATTTTCT
CTTTTTGGTTCCTAGAGTTTTTACTCTAAGAGAACCTTCTACTAGTTGTAAAATTCATTATAATATAATCTT
TTCTCTCTTTTAAAAAAA

Secuencias de los genes en *S. pimpinellifolium*:

>UBI

GCTAAGAAGAGGAAGAAGAAGACCTACACCAAGCCAAAGAAGATCAAGCACAAGAAGAAGAAGGTTAAGC
TCGCTGTGTTGCAGTTCTATAAGGTTGATGACACTGGAAAGGTTTCAGAGGCTTCGTAAGGAGTGCCTAATGC
TGAGTGCAGGCTGCTGGAACCTTTATGGCTAACCATTTTACCCTGACTACTGTGGTAAGTGTGGGCTCACCTAC
GTTTACAACAAGGCTGGAGGCGATTGATTTAATGTTTAGCAATGCTCTATCAGATTTCTTTTTGTGCAATG
AACGGT

>CBF1

TTCTGACGAGGAAGTTATTTTAGCTTCAAATAATCCGAAGAAGCCAGCTGGCAGAAAAGAAGTTTCGAGAAAC
TCGACATCCAGTGTACAGGGGAGTGAGGAAGAGGAATTCTGGAAAATGGGTTTGTGAAGTCAGAGAACCCAAA
TAAGAAGACGAGGATTTGGCTTGGTACTTTTCTACGGTTTGTGAAGTCAGAGAACCCAAAATAAGAAGACGAG
GATTTGGCTTGGTACTTTTCTACTGCTGAAATGGCGGCTAGAGCTCATGATGTGGCGGCTATAGCATTAAG
AGGACGTTTCAGCTTGTGTTGAATTTTGCTGACTCTGCTTGGAGGCTGCCTACT

>CTRLb

GAGTAGTACTCTTTTGGAGCTTGTACCTGAGATAAAGAAGGAAAAATATTGATTTTGGAGCTTCCCTATGTATGAC
CCTTCAAAGGGCTTGTGTAGATCTAGCTGTGGTTGGTGGTGGACCTGCTGGGCTTGTCTGTTGCACAGCAGG
TTTCGGAGGCTGGGTTATCGGTTTGTCTCGATTGACCCGTCCCCTAAATTGATATGGCCTAACAACTATGGTGT
TTGGGTGGATGAATTTGAGGCCATGGATTTGTTGGATTGCCTTGATGCGACATGGTCAGGTGCTGTTGTTTAT
GTCGATGATGATAAAAATAAGAATCTTGATAGACCTTATGGAAGGGTTAATAGGAAACAGCTTAAGTCGAAAA
TGATGCAGAAATGCATACTAAATGGTGTAAATTTACCAAGCAAAAGTTATAAAGGTAATTCATGAGGAAGC
TAAATCTATGCTGATTTGCAGTGATGGTGTGACTATTCAGGCAACAGTGGTTCCTTGATGCGACGGGATTCTCT
AGATGTCTTGTTCAGTATGATAAGCCATATAATCCTGGGTATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGG
AGGAACATCCCTTCGATACAAGTAAGATGCTTTTTTATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACAATATGAA
GCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACTTTTCTCTATGCCATGCCATTTTCATCAAACAGAATATTTCTT
GAAGAAACCTCCCTTGTAGCTCGTCTGGATTACGTATGGATGATATACAAGAACGAATGGTGGCTCGTTTTGA
GTCACCTGGGTATAAAAAGTTACGAGCATTGAAGAAGATGAGCAGTGTGTGATCCCAATGGGAGGCCCTTCC
AGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGGAATTTGGTGGTACTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTTATATGGTA
GCAAGGACACTAGCTGCAGCTCCTGTCGTTGCTAATGCAGTAGTTCAGTACCTTGGTTCGTATAAGGACCATC
TAGGTAATGAGTTATCGGCATCTGTTTGGAAAGATTTGTGGCCCATAGAAAGGAGACGTCAAAGAGAATTCTT
TTGCTTTGGTATGGATATTCTTCTGAAGCTTGATTTATCCGCTACAAGAAGGTTTTTTCGATGCCTTTTTTGTAT
CTAGAACCTCGTTATTGGCATGGTTTTCTTGTCTATCTCGGCTGTTTTCTTCTGAACCTCATGTTTTTTCGGTCTAT
CCCTTTTCTCTCATGCTTCAAATACTTCTAGATTAGAGATAATGACCAAAGGAACTTTTCTTTGGTTACTAT
GATTAACAATTTGTTAAAGGATACAGAATGACTTATCAAGGATCTTGTTCATAGTACATCACATATATGTTA
ATATACTGCTCATTTTGTGTTGCCATTTTACTTTGTATTGTGTTTTCTTCCCTTTTACCAAGCTTGTAGCCAT
TAACAAGGGGGACAACGAACACTGATTTAGTTGGTCCAAC

>ERF

TAATAATAATAATAATAATAATGGGTGTGAACCAAAGGAATGAGGTTAGGGACACAATCACACAAAGTATCAT
TTACATGTTTGTAGTATGTTGATTTAAATTATCCAAAAATTAATTTGATGTCATCCAAAGAACACC
ACATATAGAGATGACTAAGGTTTAAATAAGCATAAAAATAGAAGTTAGCACATGTGGGAGAAACACTAAAGCATG
TTGTGTCCCAATGACCAAAAACAATTTAAAAGAATCACTAAACTAATTAACAACACTACACATGTATGTATATGTA
CCAACAATTTATAAATAGTGGGGTATAGCTTGGCGAGTACACTAATATCATATTCATTTGAATTTAATATTTT
TTATATAAAAAATAAAATTTATATATAAAAAATATACGACAATTAACAACATAAAAAATAAAATTTAAAATTAATTC
TTAAATTTAAATTTTGAACCCGCTTTTATTATCCAATCCCAAGAGCATGTAATTGCAAATTTATGAGACATTGC
ACATTAATTTGTGTCTTTCTCCTGGTACCCTGGCATATGACACTTTCTTTTTCTCTTTAAATTCAGAACCCA
ATGATGGGAGCAATGTGCTTTTTCGATTTAAATAAATCATGTCCAAAACAAAAATCTTCATTACTTGGAACATGC
ATTGAGGTAACCTCCACATTCAAATTTACCAAATTTATTTATAAAATTTATTTATTAATTTGAACCCATTTAAT
TTATATAAAACATGTTAAGAAATTTCAAATGGGAATTTTAAAAATATATAGTTTTTTGAAAATATTTACATCG
CGTTATTCAATATACAATTTGATAAAGCGTAATTTTTTTCATTGAATCTATATGTAGTGTCAATACCGCACTAG
TCCTAATTACTAGGTGTAATTTGCTCTACATGACGAGAAATTTTAAAAAACTAGTTACATATGAACAACCTTCA
ATTTTTTTTAAAAACTAATTCGATATCAACTGAGTGATCTGACGGTACAAAATATTTTTAAGTGCGCGTATATA
TAACTTTAACTTTTTTATATTTAGAAATGATTTAATTTTAAAGATTTTTATTTTTCCCTCACATAAAATGGAAG
AAAGGAGTTTATGCAATTTATTATATATAGATGAAAAGAGTAGAACACCAAATGTTTTTTTTTACGCCCTTTAT
TTTTCGGTCAAACCTTAAACGTTTTTGTATGTAACGTGTAATCATGGCCTCACACATTGATCTCACATCGTCTAT
TTGAATAATCATTAAGTTCAAATATTAATTAATATCATGGTTAATCATATCATACTTGTGTGATAGCCGTTAA
AAGATCATAAAATAAAATAAATACTTTGGACTAAATGTCAAATATATACTGTTGTTACATTTTGGGTATGAATC
ATATAAATTCATTCTTATTTAATTTGTTTATAAATCACATAGCTCAATGCGATAAGTTCAATTTGAGAATTGAGA
CTCTTATATAATACTCACTTATTAATCTACCTTACTTTATCCATAGATTTTTTAAAAAAGAATCATTTGCTCA

AAATGTTGTATATTTATGTTAAGGGCTAATAATTCCATATAGATAATTGATCTCATATAATAGTAAACAAGA
TTTGGTTAAATGATTCAAATCTAATCAATAATTATGATGGTCTAAGATCATTATTCTGTGTGCTTTGTCCATA
CCTTGGACTCACTAATAATGTCTCATATAAGCTGCAATAATAATAATCATGATGTCCCTTAATTATTTTCCCT
CTAATATATTTTAATTTTCATTTTACAATCATAGGTTAATTAAGATTGAGATTATTATGGAACAAAAAGTATTA
TAATAATCATGGGGACTGCATCTGGTCACCCTTTTTGGAAAACCAATTTGTTACTATCACACATTTTAATTCT
TTAATCATTAAATATCTATAATAATACGCTTTTTATTGTAAGTAAAGTTGATGTACATGACCAATTATCTC
AATACAGGATACGATTGCGTACATTATACCCCTTATGATCCGATATCGAAAACCTTATTGAGTGTCTTTTTAAT
CAATTATGTCAATTTCAATTTAGCCAACCTGGTAACCTACTAATGATTAATAAAAAATAACCTTTGTAGGGTCCCTTTG
CTTAATTTGGTTGACAGACAAAAAAGCCTGGATTGGGAAAAAATAGCAATTTCACTATGAATGTTATCTCAA
TAAATCCCAACTACATAAAACCCCTCATACCTTCACACTTAACTAAATCTCCTTCCTCAACCAATTTCAATTTT
TATCTCATTACAGGCATTTCAACAAACACTTTTTTGGCAACACACACACTTCAATTAACCTACATTTGTAAGATT
GTCAATATTATGGCTAGGGCACAACAAAGATATCGAGGAGTTCGACAGAGACATTGGGGTTCTTGGGTCTCCG
AAATTGCCCATCCATTGTTGTAAGTCATATTCTATATTGAGATATGGTATCGTATGGCACTGTGATCATA
ATTATGAAATATATTAATATTAGGTCATTGCAGAAATCATAAACTTTAAATTCTGAATATCTGTCTTTGCCTC
TGCTATTAGTGTAACTTGACCTTGATGTGACATGTTGTCTACCTTTACTTTCAAATGACTAGTTCATGAACA
ATTATGCGTAGTTTTCTTTTAGGTGATCTGATCACGTGACTTTCTGTGAATTGAAATCATTATTTGTGAC
AATCCAACCTTAAGTAAGATATTGAGTATATAAGTAAGCAGACCTTACAAACTAGTGACGGACAATATTACTAG
TGGACTGGGCCGTTACAATATCCTTATCCTAGGCATAGCTCTGTCTCAAAGTTGTTGAGTAAGTAGTAAATGT
CTCTGTTTTGATTTTAGGAAGACAAGAATTTGGTTAGGCACCTTTGAGACAGCAGAAGATGCAGCAAGAGCAT
ATGATGAAGCAGCAAGGCTAATGTGTGGTCCAAGAGCTAGAACTAATTTCCCATACAACCCAAACATGCCACA
AACATCTTCTCTAAGCTACTCTCAACTACATTAACAGCCAAGTTACACAAATGCTACATGGCTTCACTTCAA
ATGACCAAAACCTCACCACAAGGACAAAAATAGCAAAAAATGCAACCAATGTTCAAGAAAAGTGTATTAAATT
CCTATAAAATGAAACAACAAATGTTGGTACCAAGCCATCAGTACTATTGACTCATCATGATCATCATGAGGA
AGCTAAAGTAGTCAACTTTGGGAGTGGGAGTAATTAGGAAAGTTGAAGATCAAGTACTTGAGGGTATAACCACAA
TTTGTCAAGCCACTTGAAGATGATCACATTGAACAAATGATTGAAGAATTGTTGGATTATGGATCCATTGAGC
TTTGTCTTAATGTTGTTCTTCTCACCAAATCCAGTGAGCTTGCTCGTAAATCGACTATTGCTCAATAATGCTC
TACATTTGATCAGTGCAGGTATTAGATAACTCTTCTACTGATGTTCTCTCTCAGTAATTGTCTCTTTTCGGGT
CCTACATTGTTCTGTACTAGAAAGATACTCATTTTGCTAATTTAACCCCATTTGTATAGCCGTTCCCGATTTG
TTTTGGGACTGAAGCTTAGTTATTGTTGTATTAAGTCTTTTTAAGTAGTCTCCCTCTGTTTAAAATCTATGTATC
TTTTAGTAGGTCTAGGCATTTTCTCTTTTTGGTTTCTAGAGTTTTTACTCTAAGAGAACCTTCTACTAGTTGTA
AAATTCCATTATAATATAATCTTTTCTCTTTTTAGAGCTCTTGCCACCATTACTCTATAAGTTCAATGACAT
ATAGCATTTTTATGTAATTACAAATCAAAAGGTAAAATATTACTTGTACAAATTCATTTTTTTTTTAGTTTTT
CATTTTTGTATCTGATATTCAAATTTGAACTCGACTAAATTCAGATTCATGTCAAAAATTTTTATAATAAGGGT
GAAATGCATCTTAATCCCCTTTATGCCCAAGACTAACTGGAGCGTGGACTAAAAGTCCAAATCGGGATGAGC
CTGACTGCAATACAATGTAAGAATATAATACCTAAGTCTAACTCAATCTCAAAAGTGATCATGAAAAGAGGAT
TGTTCAAGTTCAAATAAAGAGACTATCAATTCATTACTCAACTAACTAATGCGAAAACCTTTATCCACCGTAAT
ACTAAACAAAAACACAGTATCTACTATCTAGACGAAAAGAAATGAAAAGAAAGAAAAAAGTCTTTTTTCTTAA
ATATTGAACCGCCAATCACGGACGAGTAACGTTAGGCATGCACATGGAAGAAAGACTTTTTTTTTTCTCTCTAA
TAAGTTAACGAATAAATTTATCAAAAGAAAAAACCGCGTTTCTTAGTTCAATAAAATTTTATTTTTATTTTT
ATTAAGTGCCATGTACATCTTGCAAGCAATAAATATTGGATATTTGGTTTAAATAAATATTGAATATTTGGTTG
CTTCATAGTATCATAGTTTGGTCAAATACTAGAGAGTTTAAATTAGTTGGATTAATTTTTATTTGTTGTATTAAT
CAAATATGCAATTTATGAGTCTAGGATTTATTAATAACAATTTATTTATTTGAAATAAATTAAGGTAATAATTT
TTATACGTGGGATTATAATATTGAGTATATTATTGTGGTTAGACTTCTTGTATAATCAAGCATGTAGTCAAT
GTGACCTAAATTTGACAAGTAAAGTGACAATGTCACAATTCAACTTCACATGTCAAAGCATTGTTCAATTTGTC
TTAATAAATTTTATGAATTTTATTATTTAAATTAATAGTTGAAGTAACTAGGAATACTAATAAGGACCATGGAAAA
TTAACAAGATATATTCTTTATTGGAAAAATTAACAAGATACATATTTTATTGAAAAAATTACTTATATACACA
ACTTAAGTTTTCTTATTTTTCTATTTTTCTTAGCTTTTTTAAATATTTTCAAACCTCCTTTTTTATCTCAATTTCT
TATTACTTCTGGATATATAAATGAAACTTACGTTTGGCCACTTCTTTTTTAAATTTCTTTTTTCTCTCTCTAA
TTCTCTCAAATTTGTTAACAGTTATCAAGTTTCAATTTGAGAAGATTCTCTCTCAAATCAATCAATTTCAAACA
TTTGAATAGATAGGGGGCGTATTCTCCATTGTTCTCTTATTTCGAGTTTTTATTTTTGTTCAAATTTTGTTC
TGATATATATGAATAAGGGTGTCTTATAAGATTGGGGTACTCGACCAATTTCTTATAAGAATAATTGAAT
ACATAATTCTGACGGTGACAAATAGGCTGAAAACAGATTCAAATTTTGAACCACACAATAACAATCAAGAAG
AATCAAATATGTTTCATCCTCGAAATTAATGTTGTCAAAAAATCCAAAAAAGGAAAATAATACCGC
TAATCTCCTGGCTTTCACCGTCCAAAGTATGTATTTTTAGTTTTTTTTCTTCAAATTTTGGTGTGTTGATAACC
ATTTGGTATGTTGTATCTGAACACACTGATACATCATTTTATATGTGCTATGGTATATGGGTTATTCGGAGTA
AAAAATAATATGTTATTTTACATTACAATGTTCTCATATTTGTTTGGATACCAATCAATTTGTAAAGGGTTGAT
ACATTAATAATTTATGTTCTCATATGTATCAAATTACAAGTTTTTATAGGTGATCTTTTGTAGTTATATTCATA

ATATTGTATCATATACAATATATTATGTTTCATAATATATAATAAAGCCTTTCTGTATTGATTTGATGTTTTTT
GTTTCATGTATCATATACAATATAGAATGATCATGTTTCAACGTATTTTTATTATGTACAAGTGAATGTTAATTG
TATTCATCTGCTTTAATATTCTAGATCATCAAAGGATTTTCAGTTCCCTACTGGATTACCATGATATCTTGTA
ACGACGTTTACATTTCAATTAACGTGAATGAACAATTTCAATTAGATCTTGTGCAACATTGTTGTGGAGATATG
ACACCGACAAAGCCAATGATGGATACGTGAGCGAAAAATGATGATCCACCAAGGCTTAAGGGTCAATCCACAT
TTCCACACCACCTCGAAGACGATTTGATTTAATAGAATAGTCATTAAGTATATATGCATAAACGATATTTT
TATAGTTTTTATTTAAGATAATTTCACTTATATTTTAGATTGTTTTCTCTAAAACCTTATTCATCTTACAATAT
TTAATAATTTCCCTAAATTTTTGTTTTCAATACATGATTTGGTACATTATGTACCACCTTATTCTTAGAGTA
GTAATCGTTTTTTTATCTTCTTCAAATCCCTGACAAATATTGAAGATGTACAATTTTTTAGTCTTGTGTTGAC
ACAACGATTTTTAATTATGAAGATATTAGTTGAGCTAAACATATATCTAAGAACCTCATGATCCTTTAGTAAT
AATAGGTTAATATTGAAAAGTTGAATAAGGACGTCTTTCATCTTTGAAAAGCAAGAGGTTGTTAAAACACTCTA
GAAGAGGGATCACAATTTTGCTCGTGCAATTTCTCGATGATCCTTACCTCAATATGTTTTAGATAAAATTATAT
ATAGTTCTAGTAAGTATATGATACAAACACTTTGTGGCATGTTCAATGAGTATCATGTTAAATGTTGTATTAG
TAAACATCGTCTTGTGATGTTTCATTGAACATTCACATTTAATTTTGTAGCAGTCAAAAAATTTCTTCTGCAAT
ATGTGTATCAAATACATTATATCCAGTTAAATAAGTATCTGATACAACCATATTGTGTCATATTTAATGAGTA
TTATTTTCTATAAGAATTGTACACAAGATTGAAGATATTAACATGTCAATTTATTATATCAGAAATTTATCAT
CTAATAGTAACTTGTAATGTATATTAATATAACCAGTGGAAAAATTTAAAATTTGAATTGATCTTTAAACTTAAC
TTAATGTATATGAAGCATAACAGTAATCCAAAAAAGATTTATCAATCATCTTTCGAAAATAAATTACAAGTT
CTTCTATTGCGACCTTCTTGTCCATAATATCCACAACAATTTGTGTTTGTGCTTAGCTTTTCGTGTGAATTTT
CCTCTTTTTCTTGATCGTCTGGGCATCCTTTTTGTACCTATGTGGTAAGACAATTTCTTCCAAAATAAATTTTG
AAGCTGACCAATCGTCCTTATCCAACATTTATACCATTGTAACCTTAATATGTGTTTGTCAATGCATCTGATTT
TTAGTAATCATAGCAATAGAGATGTATATCTATGTTTTCTAGCTAATAGAGGTCTTCAATTTCCACCAATAAT
TATTCATAAACAACCTTATATATAGCTGCAATTTAATGATACATTATAAAAAGTTATTGTATCATGTGTCAT
TAAAAAATAGAGAAGAAAAATTAATACACATGCTAAATTTGGATAATATATACATTAAAAAGGTTTTGCTAA
AATATTAATAAATAAAGAAATTCACATACTAATAATTTGTTAAAAGTATAAATTCACAATATATGCGCTTAC
TTTAACATATGAAGTTGTATTCAATAATTTACATGATAAAAACCTACAAGTATATCATTTTTGTTAAAAGTATA
AATTCACAACATATGCGCTCACTTTAACTATATGAAGTTGTAAATTCAGTAATTTACATGTATAAAAATACAAGT
ATATTATTTTTTTCATTAATGTGTGTGTATATATATATATAAATAAATTTGCATGTATATGATAAATTATCT
AAACAACAATAAATAACTAATATATGCGAACCCATTACATGCGACTGTAGTATCTTATCAAATTTCTCCATTTT
ATGTCTTATATATCAATATACTAATTTAAAAAATAATGATTAATAATGAATAATGGATAAATTAATATTAATA
AGTAATTTAATTATTGATAAATTTAAAATTCAGAAAATCACATGTGATGATAACATTAAATTAAGTATGTA
AGCTATAATTGTATCAAATCAAGTTATAATTGTATCGATTTTTGTAGTCAGTAAAGTATCACGACATAAGATA
TTTTCGTCTAGTTGAAATTTTACATGTATCAAAGAATAATTGTGTGCGCGCAAGACACTTACCTAGCTGAAAT
TCCCACAATTACATGTTTTTTGTTCAAGGCTAATAATGTATCTTTTTTTCAAGAATAAATAATGTATCACGACTT
ATGTATCAAAAAAAAAAAAACTAACACATCTTAAGAACATGACAAAATACTTACTTCAATGCCTGAAGCATTG
AATCATCGCTGTTGCAAATCTATTTTTTTCAGACAATACATTACAAACTCTACAGAAAGATGAATAGCCTCCAT
AACTACAAGTTTAATTCGCTCAACTGTGATAATATCAAATAAGTCGCGCATAAAAAATTTCTGCTAATTATAT
TAAATCAATAACCTGCAACTTATGGATAAAGATATATCAAAAAGAAAAAATAAATTTTTAATATATCTATTA
TTCAATTTAGGCACACAGATATCTTAGACATTGTTTTTCCAACTTCGACACAAAATAATTTACCCGAATGTAG
CATCAAAAACAACAGATCTATCCAGCCATCTTGTCTGTTGCATCAATAACATATTTGAGATTCACTTCAACTGT
AATGACGGATTAGAGATTCGCAAAAGATATTATTTGTCCAACAACCTATTTTATCACTATTGCATCGTTCATTA
CTTTGATCGCACACTCAAATTTTTGAATATCTCAACAAAATTTGATATATTAATCTATTTTGAATCTGTTATGA
TTTTGGGATAGAAGAAGGAGAAGAAAGTTGAATTTTGAATTTTCTGAATTTGTTATAGATTAGAATAGATTGA
TATCAATCTGTTTTGTATGATTTGTGAGATCTGTTTTGCGTGATTTCTTGAAGTCTTATTATTTTACGTTTA
GACTCTTTTTTAAACACAACAATCAAGTTGTTTTATATATCAGGCGTTATATATCCAGTTGAATATAAATGTAT
CCAAATGCTACAACTTTTTAAGAAATATTGTAATAATAGAAAAGTAAAGGATAAGATGTAATATAAGTTTTTAC
ACTATGAGATTTATCTAAGTTATTTTTTTTTCGGATAAATACAAAAAATTTATTTATTTATTATCATTATCCCT
ATAAATTTTACAAATCTCCAAAATCCCTCATTTTTTCTTAAAAGTAAAAAATGTCATTAATGCATTCGACCCT
CTTTTTGATGTATCAGTGCATGTATTCACCTTCTTGTTCATGTATCAGCGCTTTGATCTTTTTGGCCATTAATG
TATCTGAACCCTCCATTAATGTATCCGACCCTCTTTAATGTATCAGCGCATGTATATAGGGGTGTGCATCGG
TCGATTCGGTTTTATATACTATCGATTTTTGATTTTTAAATATTCTAACCAATAACAAACCAATAAGATATTC
TTTATCGATTTTTCAATTTATCAATTTTTGATCATTATCGGTTTCGATTTTCGATTTACCCAATAAGAAAATTC
CATTAAATATTATATGCCTTCTCACTTCTCTAAATGCTTTGATAGTAAAACAAGAAATATAATGAGAAATTC
ATCAATAAGAGAAAATATAGTACGAATGCTTTAATTGCATGTTACCACCAAAACATAGTATGTAATTTCTTAT
GTTAATTAATAACGGACCTTTTCAAACCTACAAATGTTACAACCTACAATTACAATTTAAACTAAACTAAA
ATAGTTTTAAACAAGACTAAAATTAATAATCAAATTTGCTACAATTTGTGCACCTCTTGTTTTTAACTTTGTTCCACTC
TGCAAGAACCCCGAATCAGTCTTTTTGAAGCTCATCTTTTTTTCATCATAAAGGATCCGCTTGCCCCGAAATGAC

CTAGACCAATAGGGAAATCCCAATTCATTGGGTCTTTTCGATACAATCAAATAGAAAGCCCCGGAACCAAGACAA
 CCTATCTTACTAATAATAAGAAAGGGTTAAGGGCC

Diseño de cebadores *CRTLb*

SCORE 100. Contig (*S.pimpinellifolium*) y C (*S.lycopersicum*)

```

contig_unspecified_6592460_1_3      GATTTGCAGTGATGGTGTGACTATTCAAGCAACAGTGGTCTTGATGCCA 1000
c                                  GATTTGCAGTGATGGTGTGACTATTCAAGCAACAGTGGTCTTGATGCCA 500
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      CGGGATTCTCTAGATGCTTTGTTTCAGTATGATAAGCCATATAATCCTGGG 1050
c                                  CGGGATTCTCTAGATGCTTTGTTTCAGTATGATAAGCCATATAATCCTGGG 550
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGGAGGAACATCCCTTCGA 1100
c                                  TATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGGAGGAACATCCCTTCGA 600
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TACAAGTAAGATGCTTTTTATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACA 1150
c                                  TACAAGTAAGATGCTTTTTATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACA 650
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      ATATGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTCTCTATGCC 1200
c                                  ATATGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTCTCTATGCC 700
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      ATGCCATTTTCATCAAAACAGAATATTTCTTGAAGAACCCTCCCTTGTAGC 1250
c                                  ATGCCATTTTCATCAAAACAGAATATTTCTTGAAGAACCCTCCCTTGTAGC 750
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TCGTCTGGATTACGTATGGATGATATACAAGAACGAATGGTGGCTCGTT 1300
c                                  TCGTCTGGATTACGTATGGATGATATACAAGAACGAATGGTGGCTCGTT 800
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TGAGTCACTTGGGTATAAAAAGTTACGAGCATTGAAGAAGATGAGCAGTGT 1350
c                                  TGAGTCACTTGGGTATAAAAAGTTACGAGCATTGAAGAAGATGAGCAGTGT 850
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      GTGATCCCAATGGGAGGCCCCCTTCCAGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGG 1400
c                                  GTGATCCCAATGGGAGGCCCCCTTCCAGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGG 900
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      AATTGGTGTACTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTATATGGTAG 1450
c                                  AATTGGTGTACTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTATATGGTAG 950
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      CGGGATTCTCTAGATGCTTTGTTTCAGTATGATAAGCCATATAATCCTGGG 1050
c                                  CGGGATTCTCTAGATGCTTTGTTTCAGTATGATAAGCCATATAATCCTGGG 550
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGGAGGAACATCCCTTCGA 1100
c                                  TATCAAGTCGCTTATGGCATATTGGCACAAGTGGAGGAACATCCCTTCGA 600
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TACAAGTAAGATGCTTTTTATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACA 1150
c                                  TACAAGTAAGATGCTTTTTATGGATTGGCGAGATTCCCATCTTAATAACA 650
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      ATATGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTCTCTATGCC 1200
c                                  ATATGAAGCTGAAAGAGAGGAACAGAAAAGTTCCAACCTTTCTCTATGCC 700
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      ATGCCATTTTCATCAAAACAGAATATTTCTTGAAGAACCTCCCTTGTAGC 1250
c                                  ATGCCATTTTCATCAAAACAGAATATTTCTTGAAGAACCTCCCTTGTAGC 750
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TCGTCTGGATTACGTATGGATGATATACAAGAACGAATGGTGGCTCGTT 1300
c                                  TCGTCTGGATTACGTATGGATGATATACAAGAACGAATGGTGGCTCGTT 800
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      TGAGTCACTTGGGTATAAAAAGTTACGAGCATTGAAGAAGATGAGCAGTGT 1350
c                                  TGAGTCACTTGGGTATAAAAAGTTACGAGCATTGAAGAAGATGAGCAGTGT 850
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      GTGATCCCAATGGGAGGCCCCCTTCCAGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGG 1400
c                                  GTGATCCCAATGGGAGGCCCCCTTCCAGTAATACCTCAGAGGGTAGTTGG 900
*****

contig_unspecified_6592460_1_3      AATTGGTGTACTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTATATGGTAG 1450
c                                  AATTGGTGTACTGCTGGTATGGTTCATCCTTCTACGGGTATATGGTAG 950
*****

```

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>
LEFT PRIMER	430	20	58.83	55.00
GGCACAAGTGGAGGAACATC				
RIGHT PRIMER	611	20	59.10	55.00
GACGAGCTACAAGGGAGGTT				

Anexo 6

Tabla 1. Análisis de varianza de una vía de la expresión relativa de un grupo de genes (*CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1*) en 4 poblaciones de *S. pimpinellifolium* sometidas a tratamiento en cultivo *in vitro*

	gl	MS	F	P
Región Piura				
COLAN				
<i>CBF1</i>	2	0.112	7.892	0.009
Error	10	0.014		
<i>CRTLb</i>	2	0.139	5.369	0.024
Error	11	0.026		
<i>SIERF1</i>	2	0.147	10.877	0.002
Error	11	0.013		
TAMBOGRANDE				
<i>CBF1</i>	2	0.151	3.589	0.077
Error	8	0.042		
<i>CRTLb</i>	2	0.062	10.281	0.008
Error	7	0.006		
<i>SIERF1</i>	2	0.027	3.313	0.097
Error	7	0.008		
Región Lima				
AZPITIA				
<i>CBF1</i>	2	0.211	16.246	0.002
Error	7	0.013		
<i>CRTLb</i>	2	0.006	0.306	0.743
Error	9	0.019		
UNALM				
<i>CBF1</i>	2	0.789	24.682	<0.0001
Error	12	0.032		
<i>CRTLb</i>	2	0.088	4.213	0.041
Error	12	0.021		
<i>SIERF1</i>	2	0.333	4.49	0.044
Error	9	0.074		

Valores de $P < 0.05$ son mostrados en negrita

Tabla 2. Análisis de varianza de una vía de la expresión relativa de un grupo de genes (*CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1*) en 6 poblaciones de *S. pimpinellifolium* sometidas a tratamiento en macetas

	gl	MS	F	P
Región Piura				
COLAN				
<i>CBF1</i>	2	0.056	6.659	0.024
Error	7	0.008		
<i>CRTLb</i>	2	0.05	2.919	0.145
Error	5	0.017		
<i>SIERF1</i>	2	0.007	0.244	0.792
Error	5	0.027		
MORANTE				
<i>CBF1</i>	2	0.375	10.942	0.005
Error	8	0.032		
<i>CRTLb</i>	2	0.099	1.13	0.358
Error	11	0.087		
TAMBOGRANDE				
<i>CBF1</i>	2	0.714	28.299	<0.0001
Error	13	0.025		
<i>CRTLb</i>	2	0.534	4.154	0.04
Error	13	0.129		
Región Lima				
AZPITIA				
<i>CBF1</i>	2	0.207	22.718	<0.001
Error	13	0.009		
<i>CRTLb</i>	2	0.083	3.365	0.062
Error	15	0.025		
<i>SIERF1</i>	2	0.034	2.851	0.11
Error	9	0.012		
PANTANOS				
<i>CBF1</i>	2	0.485	13.792	0.001
Error	13	0.035		
<i>CRTLb</i>	2	0.159	6.74	0.01
Error	13	0.024		
UNALM				
<i>CBF1</i>	2	0.268	11.551	0.002
Error	13	0.023		
<i>CRTLb</i>	2	0.792	28.085	<0.0001
Error	11	0.028		
<i>SIERF1</i>	2	0.36	11.709	0.008
Error	6	0.031		

Valores de $P < 0.05$ son mostrados en negrita

Tabla 3. Estadísticas descriptivas de la expresión relativa de un grupo de genes (*CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1*) en 6 poblaciones de *S. pimpinellifolium* sometidas a tratamiento en cultivo *in vitro* y a tratamiento de plantas en macetas. Se reportan valores promedio \pm error estándar. *SD=sin datos.

	Tratamiento en cultivo <i>in vitro</i>		Tratamiento en macetas	
	Tiempo (horas)		Tiempo (horas)	
Región de Piura				
COLAN				
<i>CBF1</i>	0	0.91 \pm 0.051	0	1.077 \pm 0.043
	12	1.206 \pm 0.071	24	1.308 \pm 0.021
	24	0.949 \pm 0.028	32	1.075 \pm 0
<i>CRTLb</i>	0	0.911 \pm 0.061	0	0.999 \pm 0.088
	12	1.247 \pm 0.062	24	1.175 \pm 0.073
	24	0.993 \pm 0.103	32	0.899 \pm 0.061
<i>SIERF1</i>	0	0.96 \pm 0.058	0	1.054 \pm 0.097
	12	1.282 \pm 0.104	24	1.019 \pm 0.043
	24	0.84 \pm 0.03	32	0.954 \pm 0.098
MORANTE				
<i>CBF1</i>	0	SD	0	0.865 \pm 0.08
	12	SD	24	1.436 \pm 0.086
	24	SD	32	1.441 \pm 0.029
<i>CRTLb</i>	0	SD	0	1.066 \pm 0.12
	12	SD	24	1.258 \pm 0.132
	24	SD	32	1.386 \pm 0.055
TAMBOGRANDE				
<i>CBF1</i>	0	1.082 \pm 0.033	0	0.828 \pm 0.025
	12	1.34 \pm 0.159	24	1.516 \pm 0.091
	24	0.79 \pm 0	32	1.118 \pm 0.07
<i>CRTLb</i>	0	1.072 \pm 0.069	0	0.959 \pm 0.094
	12	0.933 \pm 0.021	24	1.534 \pm 0.214
	24	0.671 \pm 0	32	1.088 \pm 0.048
<i>SIERF1</i>	0	0.894 \pm 0.055		
	12	0.965 \pm 0.036		
	24	0.722 \pm 0		
Región de Lima				
AZPITIA				
<i>CBF1</i>	0	0.843 \pm 0.061	0	0.956 \pm 0.037
	12	1.253 \pm 0.063	24	1.372 \pm 0.019
	24	0.824 \pm 0.059	32	1.13 \pm 0.05
<i>CRTLb</i>	0	0.912 \pm 0.11	0	0.877 \pm 0.052
	12	0.883 \pm 0.038	24	1.097 \pm 0.08
	24	0.825 \pm 0.1	32	1.059 \pm 0.057
<i>SIERF1</i>	0	SD	0	0.904 \pm 0.014
	12	SD	24	0.976 \pm 0.098
	24	SD	32	1.073 \pm 0.083

Tabla 3 (Continuación)

PANTANOS				
<i>CBF1</i>	0	SD	0	1.12 ± 0.041
	12	SD	24	0.88 ± 0.052
	24	SD	32	1.515 ± 0.164
<i>CRTLb</i>	0	SD	0	1.061 ± 0.05
	12	SD	24	0.914 ± 0.079
	24	SD	32	1.277 ± 0.059
UNALM				
<i>CBF1</i>	0	0.945 ± 0.055	0	1.206 ± 0.039
	12	1.608 ± 0.091	24	1.562 ± 0.072
	24	0.948 ± 0.085	32	1.155 ± 0.056
<i>CRTLb</i>	0	0.847 ± 0.02	0	1.091 ± 0.001
	12	1.109 ± 0.017	24	0.95 ± 0.034
	24	0.831 ± 0.089	32	1.658 ± 0.096
<i>SIERF1</i>	0	1.19 ± 0.139	0	0.767 ± 0
	12	1.592 ± 0.076	24	0.802 ± 0.03
	24	0.934 ± 0.093	32	1.39 ± 0.078

Tabla 4. Análisis de varianza de tres vías (anidado) de las variables morfológicas de *S. pimpinellifolium*. Los factores corresponden al tratamiento de riego, la región de origen y la población (anidada a región).

	gl	MS	F	p
Eficiencia fotosintética				
Tratamiento	1	0.019	6.775	<0.05
Región	1	0.015	5.38	<0.05
Población(Región)	3	0.006	2.091	0.144
Tratamiento x Región	1	0.023	8.084	<0.05
Tratamiento x Población(Región)	3	0.027	9.598	<0.001
Error	15	0.003		
Número de hojas totales				
Tratamiento	1	57.408	10.906	<0.01
Región	1	14.008	2.661	0.129
Población(Región)	2	0.108	0.021	0.98
Tratamiento x Región	1	5.208	0.989	0.34
Tratamiento x Población(Región)	2	1.908	0.363	0.703
Error	12	5.264		
a+b				
Tratamiento	1	3840.612	7.176	<0.05
Región	1	611.763	1.143	0.302
Población(Región)	3	5809.205	10.854	<0.001
Región*Tratamiento	1	255.657	0.478	0.5
Población*Tratamiento(Región)	3	3820.438	7.138	<0.01
Error	15	535.212		
Carotenoides				
Tratamiento	1	75.338	2.114	0.167
Región	1	0.921	0.026	0.874
Población(Región)	3	348.303	9.775	<0.01
Región*Tratamiento	1	223.93	6.285	<0.05
Población*Tratamiento(Región)	3	245.862	6.9	<0.01
Error	15	35.632		
Area foliar				
Tratamiento	1	0.131	1.242	0.276
Región	1	0.96	9.101	<0.05
Población(Región)	4	0.756	7.17	<0.001
Región*Tratamiento	1	0.001	0.013	0.911
Población*Tratamiento(Región)	4	0.086	0.812	0.53
Error	24	0.105		

Tabla 4. (Continuación)**Capacidad Antioxidante**

Tratamiento	1	69.38	2.259	0.159
Región	1	0.24	0.008	0.931
Población(Región)	2	45.16	1.47	0.268
Región*Tratamiento	1	45.46	1.48	0.247
Población*Tratamiento(Región)	2	17.92	0.583	0.573
Error	12	30.71		

LDMC

Tratamiento	1	5698.9	0.57	0.466
Región	1	9342.5	0.934	0.354
Población(Región)	2	2393.9	0.239	0.791
Región*Tratamiento	1	8963.9	0.896	0.364
Población*Tratamiento(Región)	2	10812.8	1.081	0.373
Error	11	10001.1		

RWC

Tratamiento	1	9	0.99	0.34
Región	1	64.1	7.04	0.022
Población(Región)	2	11.6	1.27	0.318
Región*Tratamiento	1	1.4	0.15	0.707
Población*Tratamiento(Región)	2	25	2.74	0.108
Error	11	9.1		

Valores de $P < 0.05$ son mostrados en negrita

Tabla 5. Estadísticas descriptivas de las variables fenotípicas de *S. pimpinelifolium*: eficiencia fotosintética (Fv/Fm), número de hojas totales, contenido de clorofila a y b, contenido de carotenoides, capacidad antioxidante (%), área foliar, LDMC (contenido de peso seco), RWC (contenido de agua relativa). Las plantas procedieron de las regiones Piura (Colán, Morante y Tambogrande) y Lima (Azpitia, Pantanos de Villa y UNALM). Se reportan valores promedio \pm error estándar. *SD=sin datos.

	Fv/Fm	Número de hojas totales	a+b	Carotenoides	Area foliar	Capacidad Antioxidante (%)
Control	0.583 \pm 0.036	12.625 \pm 0.68	155.519 \pm 13.250	23.373 \pm 4.399	1.309 \pm 0.100	61.720 \pm 2.248
Riego disminuido	0.517 \pm 0.016	9.167 \pm 0.661	129.017 \pm 10.527	18.913 \pm 1.624	1.033 \pm 0.131	61.500 \pm 1.596
Piura						
Control	0.514 \pm 0.032	11.25 \pm 0.479	154.061 \pm 21.568	25.707 \pm 7.406	1.516 \pm 0.174	62.082 \pm 2.334
Riego disminuido	0.524 \pm 0.023	8.833 \pm 1.138	122.230 \pm 16.157	16.259 \pm 1.892	1.383 \pm 0.1989	64.940 \pm 2.261
Lima						
Control	0.629 \pm 0.049	14.00 \pm 0.816	157.705 \pm 12.296	19.872 \pm 1.103	1.124 \pm 0.070	61.357 \pm 4.249
Riego disminuido	0.512 \pm 0.022	9.50 \pm 0.764	139.197 \pm 10.706	22.894 \pm 2.142	0.779 \pm 0.135	58.060 \pm 1.170
Control						
Región Piura						
Colán	0.568 \pm 0.017	10.5 \pm 0.50	171.530 \pm 22.525	18.808 \pm 1.776	1.701 \pm 0.240	64.934 \pm 3.739
Morante	0.461 \pm 0.013	12.00 \pm 0.00	143.880 \pm 4.177	20.936 \pm 1.370	1.711 \pm 0.230	59.230 \pm 1.561
Tambogrande	SD	SD	SD	SD	0.944 \pm 0.182	SD
Región Lima						
Azpitia	0.758 \pm 0.030	SD	142.565 \pm 32.935	41.679 \pm 10.084	0.877 \pm 0.056	SD
Pantanos	0.522 \pm 0.005	14.00 \pm 0.00	107.106 \pm 6.580	5.032 \pm 1.348	1.174 \pm 0.101	57.265 \pm 1.011
UNALM	0.607 \pm 0.079	14.00 \pm 2.00	212.513 \pm 9.805	30.412 \pm 3.827	1.210 \pm 0.104	65.450 \pm 8.590
Riego disminuido						
Región Piura						
Colán	0.517 \pm 0.025	9.333 \pm 2.333	152.669 \pm 10.392	25.763 \pm 2.839	1.890 \pm 0.213	65.327 \pm 2.170
Morante	0.531 \pm 0.044	8.333 \pm 0.882	125.726 \pm 16.842	20.025 \pm 2.581	1.322 \pm 0.189	64.548 \pm 4.549
Tambogrande	SD	SD	SD	SD	0.714 \pm 0.157	SD
Región Lima						
Azpitia	0.467 \pm 0.033	SD	61.498 \pm 3.516	15.912 \pm 0.635	0.550 \pm 0.081	SD
Pantanos	0.581 \pm 0.017	9.333 \pm 1.202	154.273 \pm 9.232	13.342 \pm 1.207	1.116 \pm 0.573	56.943 \pm 1.168
UNALM	0.488 \pm 0.025	9.667 \pm 1.202	150.918 \pm 16.304	19.523 \pm 5.607	1.244 \pm 0.156	59.174 \pm 2.058

Tabla 5. (Continuación)

	LDMC		RWC	
Control	237.745	± 44.183	96.288	± 1.226
Riego disminuido	202.949	± 19.112	94.546	± 1.157
Piura				
Control	282.489	± 70.188	97.888	± 0.650
Riego disminuido	204.119	± 23.815	96.716	± 1.606
Lima				
Control	193.001	± 53.375	94.688	± 2.210
Riego disminuido	201.974	± 30.996	92.737	± 1.321
Control				
<u>Región Piura</u>				
Colán	290.982	± 152.414	96.919	± 0.750
Morante	273.996	± 78.635	98.857	± 0.308
<u>Región Lima</u>				
Pantanos	124.330	± 1.631	97.933	± 1.458
UNALM	261.671	± 87.519	91.443	± 2.473
Riego disminuido				
<u>Región Piura</u>				
Colán	208.994	± 43.016	95.470	± 2.580
Morante	196.806	± 5.586	98.586	± 0.053
<u>Región Lima</u>				
Pantanos	228.201	± 61.805	91.456	± 2.223
UNALM	175.748	± 17.209	94.018	± 1.463

Tabla 6. Prueba de Fisher de los niveles de expresión relativa de los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* del tratamiento en cultivo *in vitro* a las 0, 12 y 24 horas. Los valores significativos $P < 0.05$ están en negrita.

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *CBF1*

Tiempo (horas)	Azpitia			Colan			Tambogrande			UNALM		
	0	12	24	0	12	24	0	12	24	0	12	24
0		0.002	0.842		0.003	0.652		0.087	0.225		<0.001	0.980
12	0.002		0.002	0.003		0.018	0.087		0.043	<0.001		<0.001
24	0.842	0.002		0.652	0.018		0.225	0.043		0.980	<0.001	

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *CRTLb*

Tiempo (horas)	Colán			Tambogrande			UNALM		
	0	12	24	0	12	24	0	12	24
0		0.008	0.449		0.039	0.003		0.025	0.850
12	0.008		0.047	0.039		0.017	0.025		0.019
24	0.449	0.047		0.003	0.017		0.850	0.019	

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *SIERF1*

Tiempo (horas)	Colán			Tambogrande			UNALM		
	0	12	24	0	12	24	0	12	24
0		0.006	0.100		0.301	0.141		0.066	0.216
12	0.006		0.001	0.301		0.041	0.066		0.016
24	0.100	0.001		0.141	0.041		0.216	0.016	

Tabla 7. Prueba de Fisher de los niveles de expresión relativa de los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* del tratamiento de plantas en macetas a las 0, 24 y 32 horas. Los valores significativos $P < 0.05$ están en negrita.

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *CBF1*

Tiempo (horas)	Azpitia			Colán			Morante			Pantanos			Tambogrande			UNALM		
	0	24	32	0	24	32	0	24	32	0	24	32	0	24	32	0	24	32
0		<0.001	0.007		0.009	0.990		0.024	0.088		0.045	0.006		<0.001	0.014		0.016	0.687
24	<0.001		0.002	0.009		0.065	0.024		0.982	0.045		<0.001	<0.001		0.002	0.016		0.001
32	0.007	0.002		0.990	0.065		0.088	0.982		0.006	<0.001		0.014	0.002		0.687	0.001	

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *CRTLb*

Tiempo (horas)	Azpitia			Morante			Pantanos			Tambogrande			UNALM		
	0	24	32	0	24	32	0	24	32	0	24	32	0	24	32
0		0.028	0.063		0.002	0.008		0.121	0.048		0.016	0.585		0.323	0.002
24	0.028		0.684	0.002		0.977	0.121		0.003	0.016		0.076	0.323		<0.001
32	0.063	0.684		0.008	0.977		0.048	0.003		0.585	0.076		0.002	<0.001	

Test de Fisher de los niveles de expresión relativa del gen *SIERF1*

Tiempo (horas)	UNALM		
	0	24	32
0		0.875	0.017
24	0.875		0.006
32	0.017	0.006	

Anexo 7

Resultados del tratamiento en cultivo *in vitro*

La mayor parte de las plántulas mostraron cambios en la expresión relativa de los genes *CBF1*, *CRTLb* y *SIERF1* a las 12 h en respuesta a la restricción hídrica inducida por PEG. La falta de datos se debió al deterioro del ARN total en un grupo de muestras, así como a la no detección del gen *SIERF1* en algunas poblaciones.

La literatura científica indica que la expresión genética en plántulas bajo tratamientos con PEG en el medio de cultivo se debe evaluar en tiempos más cortos (Fender et al., 1993; Hsieh et al., 2010). Se tomaron en consideración los tiempos evaluados en un estudio en el que se investigó los cambios de expresión de *CBF1* por exposición de plántulas de *Brassica juncea* a PEG (Cong et al., 2008). Además, se realizó un piloto previo para elegir los tiempos adecuados utilizando la expresión relativa del gen *CBF1*. Los tiempos evaluados fueron 0, 6, 12 y 24 h después de iniciada la exposición a PEG, y se observó un pico en el tiempo 12 h, seguido de una caída a las 24 h. Por ello, se decidió utilizar los puntos 0, 12 y 24 h.

Niveles de expresión relativa del gen *CBF1*:

Las poblaciones de Azpitia, Colán, Tambogrande y UNALM incrementaron la expresión relativa del gen *CBF1* a las 12 h en un 49 %, 32 %, 24 % y 70 %, respectivamente, si bien en el caso de Tambogrande este incremento no alcanzó una significación estadística. El mayor nivel de expresión relativa del gen *CBF1* se observó en la población de UNALM. En las poblaciones de Azpitia, Colán y UNALM, la expresión de este gen a las 24 h no se diferenció a nivel estadístico de la expresión a las 0 h. En el caso de la población de Tambogrande, la expresión a las 24 h disminuyó significativamente, en un 41 %, con respecto a las 12 h, pero como en las otras poblaciones, no se diferenció de la del tiempo 0 h (Tablas 1, 3 y 6; Gráfico 8). En el resto de poblaciones no se obtuvieron datos suficientes para realizar el análisis.

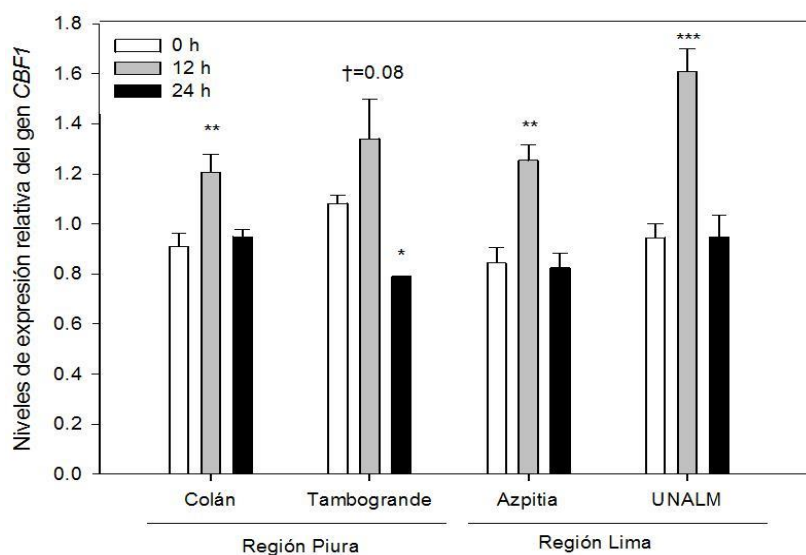


Gráfico 8. Niveles de expresión relativa del gen *CBF1* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Azpitia, Colán, Tambogrande y UNALM en respuesta al tratamiento con PEG en los tiempos 0, 12 y 24 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05 , †=0.08, marginalmente significativo).

Niveles de expresión relativa del gen *CRTLb*:

En cuanto a los cambios de expresión relativa del gen *CRTLb*, las poblaciones de Colán y UNALM aumentaron significativamente la expresión de este gen a las 12 h en un 37 % y 31 %, respectivamente, mientras que la población de Azpitia no mostró cambios significativos a nivel estadístico (Tablas 1, 3 y 6; Gráfico 2). La expresión relativa del gen *CRTLb* a las 24 h no fue diferente de la de 0 h en las poblaciones de Azpitia, Colán y UNALM. Por su parte, la población de Tambogrande mostró descensos estadísticamente significativos en la expresión de este gen a las 12 h (13%) y a las 24 h (37 %) con respecto al tiempo 0 h (Tablas 1 y 3; Gráfico 9). Las otras dos poblaciones, Pantanos de Villa y Morante, no pudieron analizarse por estar dañado el ARN total.

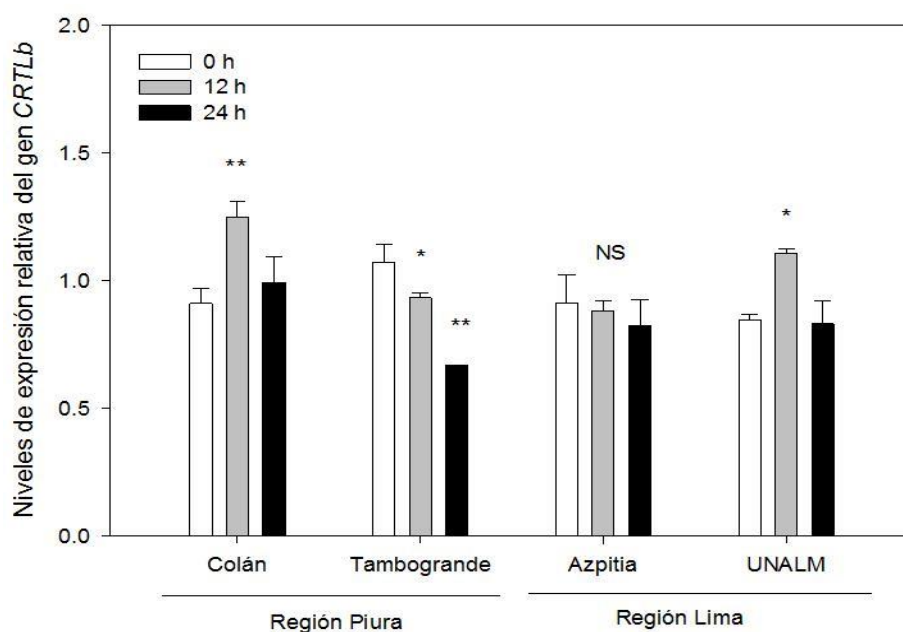


Gráfico 9. Niveles de expresión relativa del gen *CRTLb* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Azpitia, Colán, Tambogrande y UNALM en respuesta al tratamiento con PEG en los tiempos 0, 12 y 24 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05).

Niveles de expresión del gen *SIERF1*:

El análisis de expresión relativa del gen *SIERF1* mostró que las poblaciones de Colán y UNALM incrementan los niveles de expresión a las 12 h en un 33 % y un 34 %, respectivamente, mientras que en la población de Tambogrande no se observaron diferencias significativas en ese tiempo. En esta última población se observó más bien una disminución significativa en la expresión del gen a las 24 h con respecto a las 12 h, fenómeno que no ocurrió con las poblaciones de Colán y UNALM que tuvieron en ese tiempo niveles de expresión similares a los del tiempo 0 h (Tablas 1, 3 y 6; Gráfico 10). Los mayores valores en los niveles de expresión relativa del gen *SIERF1* se observaron en la población de UNALM. El resto de poblaciones no pudieron ser incluidas en el análisis. En el caso particular de Azpitia, esto último se debió a que la expresión de *SIERF1* no fue detectable con la metodología utilizada.

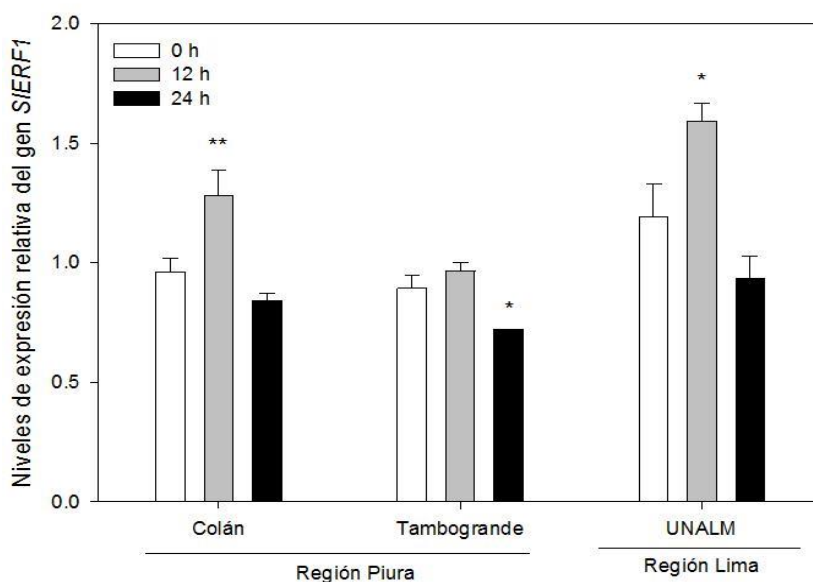


Gráfico 10. Niveles de expresión relativa del gen *SIERF1* en las poblaciones de *S. pimpinellifolium* de Colán, Tambogrande y UNALM en respuesta al tratamiento con PEG en los tiempos 0, 12 y 24 horas. Se reportan las diferencias entre los tiempos de exposición a estrés (prueba LSD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS > 0.05).