

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**



**“EXPRESIÓN GÉNICA DE FLAVANONA 3-hidroxilasa y p-cumaril
éster 3-hidroxilasa EN EL FRUTO DE *Solanum caripense* Dunal
MEDIANTE RT-PCR y RT-qPCR”**

Presentada por:

JUAN MARCELO MORALES SEGOVIA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**Lima - Perú
2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

**“EXPRESIÓN GÉNICA DE FLAVANONA 3-hidroxilasa y p-cumaril
ester 3-hidroxilasa EN EL FRUTO DE *Solanum caripense* Dunal
MEDIANTE RT-PCR y RT-qPCR”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER
SCIENTIAE**

**Presentada por:
JUAN MARCELO MORALES SEGOVIA**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Julián Chura Chuquiya
PRESIDENTE

Dr. Raúl Blas Sevillano
PATROCINADOR

M. Biol. Viviana Chiluisa Utreras
CO-PATROCINADOR

Mg. Sc. Rolando Egúsquiza Bayona
MIEMBRO

Ph. D. William Roca Pizzini
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis padres por enseñarme el camino hacia la superación y por todo su apoyo

A mis hermanos por su bondad, fortaleza y gran corazón

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud y reconocimiento:

A mi Asesor Dr. Raúl Blas Sevillano, por sus sabios consejos y la disposición para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi Co-asesora M.Biol. Viviana Chiluisa Utreras, por su entusiasmo y la cooperación recibida durante todo el proceso.

A los Miembros del Jurado Mg.Sc. Julián Chura Chuquiya, Mg.Sc. Rolando Egúsquiza Bayona y Ph.D. William Roca Pizzini, por su gentileza y los conocimientos impartidos.

A Mg.Sc. Joel Flores y Mg.Sc. Inés Torres, por su compañerismo y la asistencia técnica en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Biotecnología.

A Mg.Sc. Alberto Salas, Ph.D. Marco Cerna, Ing. Felipe Vinueza, Ing. Geovanny Ortega, agricultores Stanley Vilca, Javier Muñoz y Emerita, por su colaboración correspondiente al material vegetal.

A Fabiola Catalán, Maribel Vargas, Isamar Bazo y Javier Wither, por su apoyo y colaboración durante todo el periodo académico.

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC).

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. LA ESPECIE <i>SOLANUM CARIPENSE</i>	3
2.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	3
2.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	5
2.1.3 IMPORTANCIA Y USOS.....	5
2.2 ESTRUCTURA TAXONÓMICA.....	7
2.2.1. MÉTODOS DE AGRUPAMIENTO.....	7
2.2.1.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS.....	8
2.2.2. MÉTODOS DE ORDENAMIENTO.....	11
2.2.2.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	11
2.3. EXPRESIÓN GÉNICA.....	13
2.3.1 EXPRESIÓN GÉNICA ABSOLUTA.....	13
2.3.2 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA.....	13
2.3.3 ANÁLISIS COMPARATIVOS.....	17
2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	17
2.4.1 GENERALIDADES ACERCA DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	17
2.4.2 EXTRACCIÓN DE ARN.....	18
2.4.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA.....	19
2.4.4 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA.....	19
2.4.5 ELECTROFORESIS EN GEL.....	20
2.5 MECANISMO BIOSINTÉTICO DE ANTOCIANINAS Y GENES ASOCIADOS.....	22

2.6 MECANISMO BIOSINTÉTICO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO Y GENES ASOCIADOS.....	25
2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	29
3.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	29
3.2.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS.....	31
3.2.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	33
3.3 SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	34
3.4 EXTRACCIÓN DE ARN.....	34
3.5 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA.....	35
3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA.....	35
3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	38
4.1.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS.....	39
4.1.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	41
4.2 EXTRACCIÓN DE ARN.....	44
4.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA.....	44
4.4 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA.....	44
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
V. CONCLUSIONES.....	52
VI. RECOMENDACIONES.....	53
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
VIII. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Concentración de sacarosa y ácido ascórbico en el fruto de <i>S. caripense</i> , <i>S. muricatum</i> e híbridos interespecíficos.....	6
Cuadro 2: Concentración de macro y microminerales en el fruto de <i>S. caripense</i> , <i>S. muricatum</i> y especies silvestres relacionadas de la serie <i>Caripensia</i>	6
Cuadro 3: Material vegetal correspondiente a <i>Solanum caripense</i> Dunal de la familia SOLANACEAE.....	30
Cuadro 4: Matriz de distancia para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i> obtenida mediante el coeficiente MCD.....	38
Cuadro 5: Cuadro 4. Agrupamiento por enlace promedio para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	39
Cuadro 6: Análisis de componentes principales (valor eigen) para descriptores cuantitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	41
Cuadro 7: Coeficientes de contribución relativa para descriptores cuantitativos entre individuos de <i>S. caripense</i> en los cuatro primeros componentes principales..	42
Cuadro 8: ANVA para expresión génica de ANS en el fruto de <i>S. caripense</i> BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1.....	47
Cuadro 9: ANVA relacionado al término $2^{-\Delta C^T}$ para expresión génica de ARNr 5.8S en el fruto de <i>S. caripense</i> IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	49
Cuadro 10: Valor medio del cambio en expresión génica de C3H en el fruto de <i>S. caripense</i> IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	49
Cuadro 11: ANVA para expresión génica de C3H en el fruto de <i>S. caripense</i> IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Semilla, inflorescencia, flor y fruto de <i>S. caripense</i>	5
Figura 2: Esquema ilustrativo relacionado a solanáceas de la posible ruta biosintética de antocianinas en estados iniciales.....	24
Figura 3: Esquema ilustrativo relacionado a solanáceas de la posible ruta biosintética de ácido clorogénico (1, 2 y 3).....	26
Figura 4: Fenograma correspondiente al análisis de conglomerados para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	39
Figura 5: Diagrama correspondiente al análisis de componentes principales para descriptores cuantitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	42
Figura 6: Expresión génica de CHS (207 pb), F3H (212 pb) y ANS (145 pb) asociados a la ruta biosintética de antocianinas en el fruto de <i>S. melongena</i> , <i>S. muricatum</i> y <i>S. caripense</i>	45
Figura 7: Expresión génica de F3H (212 pb) en el fruto de <i>S. caripense</i> BIO-Ltg1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	46
Figura 8: Expresión génica de ANS (145 pb) en el fruto <i>S. caripense</i> BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	47
Figura 9: Expresión génica de C3H (media \pm E.E., n = 4) asociado a la ruta biosintética de ácido clorogénico en el fruto de <i>S. caripense</i> IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de correspondencia para la especie <i>Solanum caripense</i> Dunal de la familia SOLANACEAE.....	69
ANEXO 2: Descriptores morfológicos usados en ecotipos de <i>S. caripense</i>	70
ANEXO 3: Coeficiente de correlación para descriptores cuantitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	72
ANEXO 4: Análisis de componentes principales (valor eigen) para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	73
ANEXO 5: Coeficientes de contribución relativa para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i> en los cinco primeros componentes principales...	74
ANEXO 6. Diagrama correspondiente al análisis de componentes principales para descriptores cualitativos entre individuos de <i>S. caripense</i>	75
ANEXO 7: Protocolo 1 para extracción de ARN.....	76
ANEXO 8: Protocolo 2 para extracción de ARN.....	77
ANEXO 9: Calidad y concentración de las muestras de ARN total.....	78
ANEXO 10: Calidad y concentración de las muestras de ADN complementario...	79

RESUMEN

La presente investigación morfológica y molecular de tzímbalo (*Solanum caripense* Dunal) enfatiza la expresión de genes involucrados en la calidad del fruto. Los objetivos fueron: 1) describir la variación morfológica en ecotipos de tzímbalo; 2) identificar la expresión génica de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y antocianidina sintasa (ANS) asociados a antocianinas; 3) analizar la expresión del gen p-cumaril ester 3-hidroxilasa (C3H) asociado al ácido clorogénico. Para ello, se utilizaron seis muestras de Ecuador (BIO) y tres de Perú (IBT). La descripción morfológica se realizó usando descriptores para *S. muricatum*; se extrajo ARN total del fruto para la identificación de transcritos F3H y ANS en BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1 mediante retrotranscripción seguido de PCR semicuantitativa (RT-PCR); se analizó la expresión relativa de C3H en IBT-Lib1 durante cero, cinco y catorce días bajo influencia de temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados vía retrotranscripción seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR). La correlación cofenética (0.88) del análisis de conglomerados (AC) indicó buena similitud entre todos los ecotipos ecuatorianos y dos subgrupos distintos en ecotipos peruanos. Los tres primeros componentes principales (CP) explican cualitativamente 71.39% y cuantitativamente 81.34% de la variación total; los caracteres de mayor aporte a la variabilidad fueron sabor de fruto, diámetro de semilla, color de corola, rayas en fruto, longitud de fruto, longitud y ancho de área placentar interna. El nivel de transcritos ANS fue similar (48.20 y 36.19 ng/ μ L). El valor del cambio medio en expresión de C3H fue 3.32, 4.52 y 6.24 para cero, cinco y catorce días en condiciones poscosecha. El nivel de transcritos C3H se diferenció significativamente e incrementó 2.92 unidades tras catorce días. Éstos resultados demuestran la expresión de F3H y ANS en BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1, la expresión diferencial de C3H en IBT-Lib1, y enfocan el valor nutricional del fruto de tzímbalo.

Palabras clave: genes, transcritos, F3H, ANS, C3H, tzímbalo

ABSTRACT

The current research, about tziimbalo (*Solanum caripense* Dunal), studied the expression of genes involved in fruit quality. Then, the main objectives were to: 1) describe morphological variation on *S. caripense* ecotypes; 2) identify gene expression of flavanone 3-hydroxylase (F3H) and anthocyanidin synthase (ANS) associated to anthocyanins; 3) analyse expression of the gene p-coumaroyl ester 3-hydroxylase (C3H) associated to chlorogenic acid. For that, six samples from Ecuador (BIO) and three from Peru (IBT) were utilized. Morphological description was carried out using descriptors for *S. muricatum*; total RNA was isolated from fruit for identification of F3H and ANS transcripts in BIO-Ltg1 and BIO-Cyb1 through retrotranscription followed by semiquantitative PCR (RT-PCR). C3H relative expression was analysed in IBT-Lib1 during zero, five and fourteen days under influence of controlled temperature (10 ± 2 °C) and photoperiod (16 h light/8 h darkness) via retrotranscription followed by quantitative PCR (RT-qPCR). The cophenetic correlation (0.88) of conglomerate analysis (CA) denoted good similarity between all Ecuadorian ecotypes and two distinct subgroups in Peruvian ecotypes. The first three principal components (PC) explained qualitatively 71.39% and quantitatively 81.34% of total variation. Fruit flavour, seed diameter, corolla colour, fruit stripes, fruit length, inner placental area length and breadth were characters that contribute more to the variability. The level of ANS transcripts was similar on BIO samples and (Ltg1→48.20 ng/μL Cyb1→36.19 ng/μL). The value of the mean fold change in C3H expression was 3.32, 4.52 and 6.24 at time zero, five and fourteen days in postharvest conditions. The level of C3H transcripts was significantly differentiated and increased 2.92 units after fourteen days. These results demonstrate expression of F3H and ANS in BIO-Ltg1 and BIO-Cyb1, differential expression of C3H in IBT-Lib1, and focus the nutritional value of tziimbalo fruit.

Keywords: genes, transcripts, F3H, ANS, C3H, tziimbalo

I. INTRODUCCIÓN

Solanum caripense Dunal es una planta en su mayor parte silvestre, filogenéticamente compleja (Zuriaga 2009), y ampliamente distribuida en Ecuador y Perú (Jørgensen y León 1999; Correll 1967), también presente en Colombia, Bolivia y Venezuela, Costa Rica y Panamá (Särkinen *et al.* 2015); es compacta con tendencia a producir ramas verticales, similar a la morfología de *S. muricatum* (Heiser 1969), pues parece ser su ancestro (Murray *et al.* 1992), debido a similitudes de cariotipo y la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos fértiles (Anderson 1979; Heiser 1964). El fruto de *S. caripense* contiene muchas semillas, el elevado porcentaje de germinación (Morales y Vaca 2016; Prohens *et al.* 1999) permite descartar la presencia de dormancia primaria y letargo físico (Bithell *et al.* 2002), distinto a lo mencionado para semillas de las especies silvestres *S. khasianum*, *S. torvum*, *S. indicum* (Ibrahim *et al.* 2001), y *S. nigrum* (Taab 2009).

El fruto de *S. caripense* contiene más sacarosa, vitamina C (Prohens *et al.* 2005), y algunos minerales (Prohens *et al.* 2016), comparado con variedades modernas de *S. muricatum* y especies silvestres de la serie *Caripensia*. Pese al gran potencial que posee *S. caripense* para el flujo de genes intraespecífico y hacia cultivos comerciales relacionados tales como *S. tuberosum*, *S. lycopersicon* y *S. muricatum*, los estudios genómicos de ésta especie son limitados (Herraiz *et al.* 2015; Herraiz *et al.* 2016). No obstante, algunas plantas del género *Solanum* responden fundamentalmente a técnicas modernas que ayudan a superar limitaciones de producción, comercialización y exportación, por ejemplo transferencia de genes (Arias 2007; Mantilla 2008), y análisis de expresión génica (Lucca 2011; Rivas 2010).

Se incluye a *S. caripense* en un inventario taxonómico preliminar de la subfamilia Solanoideae que analiza la biodiversidad de especies alimenticias (Samuels 2015), también constituye parte del acervo genético terciario de cultivos trascendentales como *S. tuberosum* y *S. lycopersicon* (Herraiz *et al.* 2016). Dado que, *S. caripense* se distingue morfológica y molecularmente del resto de plantas del complejo Caripense, a pesar de coexistir en ciertas áreas y ser capaces de hibridar, la utilidad práctica justifica su mantenimiento como especies distintas (Zuriaga 2009).

Además, la Universidad de Costa Rica (UCR) confirma su interés al notificar que accesiones de *S. caripense* están siendo estudiadas a nivel molecular para determinar resistencia a plagas y enfermedades, y otras características agronómicas. Por último, se entiende que semillas costarricenses de *S. caripense* fueron enviadas a la Bóveda Global de Semillas, en el archipiélago de Svalbard, Noruega (Marín 2015).

El objetivo general del presente trabajo comprende el análisis de expresión génica asociada a la ruta biosintética de antocianinas y ácido clorogénico para la mejora de la calidad del fruto en *S. caripense* mediante RT-PCR y RT-qPCR, con el propósito a futuro de innovar la producción interna y convertir a ésta especie en una novedosa alternativa para consumo y usos derivados; el estudio pretende contribuir con herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de plantas silvestres andinas y cultivos relacionados de importancia comercial. Los objetivos específicos abarcan: 1) describir la variación morfológica en ecotipos de *S. caripense*; 2) identificar la expresión génica de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) y antocianidina sintasa (ANS) asociados a antocianinas; y 3) analizar la expresión génica de p-cumaril ester 3-hidroxilasa (C3H) asociado al ácido clorogénico. La descripción morfológica se realizó usando descriptores para *S. muricatum*. Se extrajo ARN total del fruto para la identificación de la expresión de F3H y ANS por medio de retrotranscripción seguido de PCR semicuantitativa (RT-PCR). Además, se analizó la expresión relativa de C3H bajo influencia de temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados mediante retrotranscripción seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Los genes en estudio forman parte de caminos que codifican para enzimas con actividades biológicas y propiedades antioxidantes beneficiosas para el hombre y la industria.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA ESPECIE *SOLANUM CARIPENSE*

La especie *Solanum caripense* Dunal es conocida en Perú con el nombre común “ambuyuco” (Särkinen *et al.* 2015); mientras que, en Ecuador la planta es denominada “chinpalu” (de la Torre *et al.* 2008), “simbailo” (Van den Eynden *et al.* 1998), “chímbalo” (Gallardo 2011), “samboshuyo”, “tzímbalo” (INIAP 2003), y otros. Se la define como un bejuco o hierba terrestre nativa de los Andes (de la Torre *et al.* 2008), que generalmente habita lugares húmedos de zonas altas, desde 2200 a 3000 msnm (Van den Eynden *et al.* 1998), pudiendo también encontrarse entre 800 y 3800 msnm (Correll 1967). Crece cerca de asentamientos humanos, de modo que no puede considerarse como una planta adventicia en sentido estricto (Heiser 1964); es miembro de la familia Solanaceae y del género *Solanum*, pertenece a la sección *Basarthrum* y se ubica en la serie *Caripensia* (Anderson *et al.* 2006). Además, forma parte del complejo Caripense, el cual incluye a *S. filiforme*, *S. fraxinifolium*, *S. heiseri*, y *S. caripense* (Anderson y Bernardello 1991; Anderson *et al.* 2006; Zuriaga 2009).

2.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La especie *S. caripense* se define como un bejuco o hierba terrestre nativa de los Andes (de la Torre *et al.* 2008), también se describe como arbusto trepador cuyo crecimiento se extiende hasta 2 m de altura o una longitud superior, más o menos pilosa densamente a lo largo del tallo ramificado que es leñoso o herbáceo grueso, hirsuto, y con pelos de color rubio oscuro sin brillo o plateado brillante; hojas enteras a trilobuladas o con un segundo par de folíolos laterales muy reducidos, raramente mayores a 12 cm de longitud y con peciolo de hasta 5.5 cm; hoja o folíolos de forma ovada a ovado-elíptica, o elíptico-lanceolada a lanceolada, cuneada a ampliamente redonda o cordada en la base, en general obtusa a poco acuminada en el ápice, hirsuta densamente; folíolos laterales sésiles, a ligeramente peciolados, en su mayoría asimétricos y a veces basiscópicamente subauriculados en la base; folíolos terminales más largos que los laterales, de hasta 10 cm

de longitud y 5 cm de ancho, usualmente mucho menores; y hojas pseudoestipulares ampliamente reniformes, lunadas, cercanas a 2 cm de longitud.

La inflorescencia de *S. caripense* es pseudoterminal y/o lateral, con racimos simples de pocas flores (hasta 10) y muy raramente paniculada; pedúnculo desnudo o sostenido por un par de brácteas en la base o cerca de ella, de hasta 8 cm de longitud, simple o a veces bifurcado una o dos veces en la parte superior; los pedicelos son delgados o robustos, cercanos a 1 cm de longitud, articulados en la base o cerca de ella, hispido-pubescentes y frecuentemente glandulares; flores comúnmente de color púrpura a lavanda o algo teñido azulado, ocasionalmente blanco o blanquecino marcado con púrpura o lavanda, y agrupadas (Van den Eynden *et al.* 1998); cáliz acampanado verde oscuro, usualmente piloso densamente, de 4 a 6 cm de longitud, dividido cerca a la mitad en lanceolado o ampliamente redondo y abruptamente acuminado a lóbulos agudos, los lóbulos lanceolados terminados en 5 dientes triangulares; corola rotada-pentagonal a rotada-estrellada o estrellada (en var. *stellatum*), de 1.3 a 2.3 cm de diámetro; anteras amarillas (Quilo 2012; Reinoso 2009), elípticas en general, de 3 a 4 mm de longitud, raramente pilosas dorsalmente en el centro, cuya producción de polen es elevada (Herraiz *et al.* 2015); filamentos usualmente unidos cerca a la mitad o por encima de la unión con la corola, hirsutos; estilo de 6 a 7 mm de longitud más o menos papiloso, y estigma solo alargado ligeramente (Correll 1967).

El fruto de *S. caripense* es globoso a ovoide o ovoide-elipsoide, verde claro con rayas verde oscuras o púrpura (Correll 1967), alcanza hasta 4 cm de longitud y contiene muchas semillas (Van den Eynden *et al.* 1998; Herraiz *et al.* 2015) (Figura 1).

La pubescencia de la mayoría de especímenes de *S. caripense* es característicamente de tono rubio oscuro y opaco, no obstante algunas plantas poseen pelos densos brillantes y plateados, lo cual varía en casi todas las plantas, o al menos colección. Una planta típica representativa de *S. caripense* tiene aspecto predominantemente trifoliado, sin embargo un segundo grupo de foliolos laterales muy reducidos puede presentarse, o la hoja puede ser simple y sin división; mientras que la corola es rotada-pentagonal a algo rotada-subestrellada o incluso estrellada (Correll 1967).



Figura 1. Semilla, inflorescencia, flor y fruto de *S. caripense*.

2.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La especie *S. caripense* se encuentra ampliamente distribuida en Perú y Ecuador (Correll 1967; Jørgensen y León 1999); también presente en Colombia, Bolivia y Venezuela, Costa Rica y Panamá (Särkinen *et al.* 2015).

En Perú la planta se ubica en regiones con mayor diversidad, riqueza de especies, y endemismo del género *Solanum*, siendo éstas Cajamarca, Amazonas, La Libertad y Cusco, principalmente (Särkinen *et al.* 2015); y estribaciones de Azuay, Cañar y Loja, consideradas áreas geográficas de alta agrobiodiversidad en Ecuador, pudiendo hallarse ecotipos aún desconocidos en el país y en el mundo (INIAP 2003). La especie también se encuentra en los departamentos peruanos de Ancash, Apurímac, Huancavelica, Junín, Lambayeque, Lima, Piura y San Martín (Särkinen *et al.* 2015); adicionalmente, puede ser localizada en las provincias ecuatorianas de Bolívar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Morona Santiago, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe (Jørgensen y León 1999).

2.1.3 IMPORTANCIA Y USOS

El fruto maduro de *S. caripense* (Figura 1) es una baya jugosa verde-amarilla con rayas longitudinales de color violáceo (Reinoso 2009), representa un aporte nutricional importante debido al contenido de sacarosa, vitamina C (Cuadro 1) (Prohens *et al.* 2005), y algunos minerales (Cuadro 2) (Prohens *et al.* 2016), presentes en mayor cantidad al ser comparados con variedades modernas de *S. muricatum* y especies silvestres de la serie *Caripensia*. En accesiones de *S. caripense* se aplica el método de cruza y retrocruza con pepino dulce, el cual permite la estimación de heredabilidad para descriptores de relevancia agronómica como la concentración de sacarosa y ácido ascórbico (Rodríguez *et al.* 2003), y otros caracteres determinados por genes candidatos destinados a la mejora de la calidad del fruto tales como el contenido de antocianinas, ácido clorogénico, etc. (Herraiz *et al.* 2016).

Cuadro 1: Concentración de sacarosa y ácido ascórbico en frutos de *S. caripense*, *S. muricatum* e híbridos interespecíficos.

Accesión	Sacarosa (g/100g)	Ácido ascórbico (mg/100g)
<i>S. caripense</i> (EC-40)	1.71	31.1
<i>S. muricatum</i> (EC-37)	0.91	11.8
<i>S. muricatum</i> (EC-37) x <i>S. caripense</i> (EC-40)	1.82	37.2

Nota: Tomado y adaptado de Prohens *et al.* (2005)

Cuadro 2: Concentración de macro y microminerales en el fruto de *S. caripense*, *S. muricatum* y especies silvestres relacionadas de la serie *Caripensia*.

Accesión	P (mg/100g)	K (mg/100g)	Ca (mg/100g)	Mg (mg/100g)	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Zn (mg/100g)
<i>S. caripense</i>							
BIRM/S1034	41.20	320.8	9.94	6.90	0.365	0.084	0.387
E-7	36.58	212.2	13.53	6.76	0.587	0.123	0.411
EC-40	36.01	354.7	12.91	7.86	0.303	0.059	0.229
QL-03	46.44	336.2	9.24	7.41	0.531	0.13	0.475
<i>S. muricatum</i>							
El Camino	15.38	67.6	8.62	3.78	0.301	0.036	0.078
Puzol	12.34	49.9	8.12	3.49	0.292	0.033	0.075
Quito	12.19	119.1	3.20	3.46	0.119	0.008	0.072
Valencia	13.88	60.9	7.37	3.52	0.249	0.043	0.063
Sweet Long	9.79	115.1	5.04	3.19	0.123	0.007	0.059
<i>S. tabanoense</i>							
E-257	40.84	320.9	9.39	7.76	0.371	0.054	0.296
<i>S. trachycarpum</i>							
E-34	48.17	432.1	15.13	11.70	0.528	0.065	0.532

Fuente: Tomado y adaptado de Prohens *et al.* (2016)

En Ecuador, el fruto de *S. caripense* se usa para calmar la sed. También en ceremonias curativas, con éste se elaboran collares que los indígenas colocan en sus hijos tiernos para curarlos del “espanto” (de la Torre *et al.* 2008). Además, *S. caripense* se utiliza como cuajo en la elaboración de quesillo (INIAP 2003), para quitar manchas y pecas de la piel (Peñañiel 2003), y tratar dolores de garganta, gripe y diarrea en niños (Quilo 2012).

En Perú, la especie *S. caripense* está incluida en un listado de plantas medicinales con virtudes conocidas por indios brujos de la zona norte, en el distrito de Suyo (Municipalidad Distrital de Suyo).

2.2. ESTRUCTURA TAXONÓMICA

La estructura taxonómica se refiere a la síntesis de información de una matriz de similitud a fin de permitir el reconocimiento de relaciones entre todas las unidades taxonómicas operacionales (UTOs); los métodos más usados para el estudio de matrices de similitud se basan en técnicas de agrupamiento para el análisis de conglomerados (AC) y técnicas de ordenamiento para el análisis de componentes principales (ACP) (Crisci y López 1983).

2.2.1. MÉTODOS DE AGRUPAMIENTO

Los métodos y la selección de algoritmos para agrupación de objetos dependen de la cantidad y tipo de datos disponibles, y el propósito de su aplicación. El agrupamiento para AC se categoriza en (Elguera 2018):

- Métodos jerárquicos

Los métodos jerárquicos abarcan un proceso secuencial para la formación de grupos o conglomerados (clúster), que establece jerarquías entre objetos o individuos; se usan técnicas aglomerativas o divisivas.

La técnica aglomerativa de agrupamiento inicia con un número de grupos igual al total de objetos en estudio, que se unen en forma aglomerativa de acuerdo a una métrica de distancias, y al final forman un clúster con la totalidad de los objetos. Algunos ligamientos para formación de conglomerados se realizan a través de enlace simple (vecino más cercano), enlace completo (vecino más alejado), enlace promedio, enlace Ward, otros

La técnica divisiva de agrupamiento aplica un proceso secuencial de formación de clúster contrario al aglomerativo; se inicia con un solo grupo que contiene el total de objetos, luego se dividen en subgrupos considerando los más alejados, hasta llegar a n grupos de un solo objeto.

- Métodos no jerárquicos

Los métodos no jerárquicos se basan en particiones donde el número de clúster a formarse es un valor (parámetro) conocido, empiezan repartiendo n observaciones en k grupos, minimizando distancias entre objetos dentro del grupo con respecto a su centroide (media, mediana, moda, otros.); la primera asignación se puede hacer aleatoriamente, en cada uno de los grupos se obtiene el vector de medias (centro del grupo) y se asigna secuencialmente

cada observación al grupo cuyo centro esté más cercano; en cada etapa se recalcula el centro del grupo al que se añade una observación y el centro del grupo del que se elimina esa observación. Algunos algoritmos son k -medias, k -medianas, otros.

2.2.1.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

El AC agrupa variables cercanas entre sí, se crea conglomerados para reducir el número de variables y simplificar datos, que en estudios con predominancia de descriptores multiestado se estandarizan, y se utiliza coeficientes de distancia y correlación; los coeficientes de distancia se aplican sobre matrices básicas que poseen datos doble-estado o multiestado, o ambos tipos de datos (Crisci y López 1983).

Un coeficiente usado comúnmente al medir distancias entre UTOs es el “*mean character difference*” (MCD), propuesto como medida taxonómica (Cain y Harrison 1958), que expresa la sumatoria del valor absoluto de la diferencia entre cada estado de los descriptores de las UTOs, dividido por el número de descriptores:

$$MCD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |(x_{ij} - x_{ik})|$$

donde: x_{ij} = valor del descriptor i en la UTO j ; x_{ik} = valor del descriptor i en la UTO k ; n = número de descriptores. Éste coeficiente recibe el nombre de “*Manhattan distance*” cuando no se divide por el número de descriptores.

Otro coeficiente de distancia muy usado es el denominado “*taxonomic distance*” (TD) (Sokal 1961); debido a que el número de descriptores influye en la estimación de la distancia se utiliza la distancia promedio (MTD):

$$TD = \left[\sum_{i=1}^n (x_{ij} - x_{ik})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$MTD = \sqrt{\frac{(TD)^2}{n}}$$

La distancia euclídea (d_{ij}) para el parecido entre unidades de análisis evaluadas en un conjunto de variables, mide la distancia geométrica entre vectores:

$$d(x_i, x_j) = \sqrt{\sum_{c=1}^p (x_{ic} - x_{jc})^2}$$

Los valores obtenidos a partir de los coeficientes de distancia varían de cero a infinito, cero es la máxima similitud. La técnica aglomerativa de agrupamiento parte de n UTOs separadas, las agrupa en conjuntos sucesivos para llegar finalmente a un solo conjunto con n unidades. La técnica operativa de agrupamiento examina la matriz de similitud para localizar el mayor valor de similitud existente.

Se identifica dos UTOs que forman el núcleo del primer grupo; núcleo es todo conjunto formado por dos UTOs y grupo es todo conjunto formado por más de dos UTOs; puede haber más de un valor máximo de similitud, en ese caso, se construyen a ese nivel dos o más núcleos separados. Se busca el próximo valor de mayor similitud, el nuevo valor lleva a la formación de nuevos núcleos, la incorporación de una UTO a un núcleo ya existente para formar un grupo, o a la fusión de núcleos existentes. El primer paso es común, el segundo que incorpora nuevas UTOs a núcleos y grupos existentes se realiza por caminos diferentes, por ejemplo enlace simple (vecino más cercano), enlace completo (vecino más lejano), enlace promedio, enlace Ward.

- Enlace simple

El agrupamiento de enlace simple (*Single linkage clustering*) o del vecino más próximo (*Nearest neighbor clustering*) (Gower 1967), comienza al seleccionar y unir los dos UTOs de la matriz de distancias que se encuentran más próximos. La distancia de este nuevo núcleo (conglomerado) respecto a los restantes UTOs de la matriz se calcula como la menor de las distancias entre cada UTO del conglomerado y el resto de UTOs de la matriz. En los pasos sucesivos, la distancia entre dos grupos (conglomerados) se calcula como la distancia entre sus dos UTOs más próximos.

- Enlace completo

El agrupamiento de enlace completo (*Complete linkage clustering*) o del vecino más lejano (*Furthest neighbor clustering*) (Sorensen 1948), se comporta de manera opuesta al anterior; la distancia entre dos conglomerados se calcula como la distancia entre sus dos UTOs más alejados.

- Enlace promedio

El agrupamiento promedio (*Average linkage clustering*) o vinculación inter-grupo (*Unweighted pair-group arithmetic averages* (UPGMA)) (Sneath y Sokal 1973), ventajosamente aprovecha la información de todos los miembros de dos conglomerados que se comparan. La distancia entre dos conglomerados se calcula como la distancia promedio existente entre todos los pares de UTOs de ambos conglomerados.

- Enlace Ward

En el enlace de varianza mínima (*Minimum variance clustering*), los conglomerados se constituyen procurando la pérdida mínima de información al fusionarse dos UTOs; se cuantifica la información como suma de distancias al cuadrado de cada UTO respecto al centroide del conglomerado al que pertenece ($SCE = \text{suma de cuadrados error}$). Se calcula en cada conglomerado el vector de medias de todas las variables, el centroide multivariante; a continuación, se obtiene distancias euclidianas al cuadrado entre cada UTO y centroides (vector de medias) de todos los conglomerados; y se suma distancias correspondientes a todas las UTOs. En cada paso se unen conglomerados que dan lugar a un menor incremento de SCE, se reduce la suma de cuadrados de distancias intra conglomerado. Aprovecha la información de todos los miembros de conglomerados que se comparan previamente, la distancia entre dos conglomerados es el promedio existente entre todos los miembros del conglomerado (Ward 1963).

La estructura taxonómica obtenida a partir de la matriz de similitud mediante AC se representa gráficamente con fenogramas o diagramas arborescentes que muestran la relación en grado de similitud entre dos UTOs o grupos de UTOs. La terminología distingue entre fenograma basado en relaciones fenéticas, y cladograma donde las ramificaciones se basan en conexiones filogenéticas entre UTOs; el término dendograma incluye a fenogramas y cladogramas (Sokal y Camin 1965; Mayr 1965; Wiley 1981).

La construcción de una nueva matriz de similitud a partir de valores usados en el fenograma se denomina matriz cofenética; el coeficiente de correlación cofenético (r_{xy}) se determina utilizando matrices de los coeficientes de similitud, un alto coeficiente de correlación cofenética es señal de escasa distorsión; generalmente los valores oscilan entre 0.6 y 0.95, empíricamente un valor superior a 0.8 indica buena representación de la matriz de similitud por parte del fenograma (Sokal y Rohlf 1962); con el enlace promedio suele originarse menor distorsión (Sneath y Sokal 1973).

Un coeficiente de correlación cofenético con valor mayor a 0.9 puede interpretarse como el de un ajuste muy bueno, es decir, existe una clara estructura jerárquica entre UTOs analizadas; valores entre 0.8 y 0.9 son considerados buenos, valores entre 0.7 y 0.8, y valores menores a 0.7 son pobres o muy pobres, respectivamente, e indican distorsión notable entre similaridades iniciales y aquellas que resultan de la representación con dendogramas (Sokal y Rohlf 1962).

$$r_{xy} = \frac{\sum x_{ij}y_{ij}}{\sqrt{\sum x_{ij}^2 \sum y_{ij}^2}}$$

Donde x_{ij} , y_{ij} son los elementos de las dos matrices de similitud X y Y , respectivamente.

2.2.2. MÉTODOS DE ORDENAMIENTO

Los métodos de ordenación encuentran un patrón de relaciones entre la totalidad de UTOs, reducen sin gran pérdida de información el número de dimensiones correspondiente a los descriptores empleados, y facilitan la representación de UTOs y sus relaciones en función de los descriptores; existen varias técnicas para el ordenamiento (Whittaker 1973; Sneath y Sokal 1973), destacando el ACP, análisis de coordenadas principales (ACo), otros.

2.2.2.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El ACP es un método de análisis multivariante que estudia la diversidad genética de una colección de individuos, añadiendo la posibilidad de conocer los descriptores que más contribuyen a la variabilidad (Fundora *et al.* 1988), pues no todas las variables usadas contribuyen con la misma eficiencia al establecimiento de semejanzas entre individuos. Coeficientes de correlación relativamente altos entre variables originales son indicador para la utilización de ACP, que resume variables en pocas dimensiones; correlaciones altas

implican dependencia lineal, y dan paso a la explicación del problema con menor número de componentes principales (CP); la tipificación de datos homogeniza unidades de medidas, y busca que todas pesen por igual en el análisis (Borrego *et al.* 1999; León *et al.* 2008).

En el ACP se forma un nuevo grupo de variables a partir de las originales, y son totalmente independientes entre sí; abarca la obtención de matriz de varianzas, valores de los componentes principales (CP) y matriz de coeficiente de contribución; los coeficientes tienen signo positivo o negativo, para la interpretación se toma el valor absoluto (Chavarry 2014). El ACP representa, según un modelo lineal, un conjunto numeroso de descriptores mediante un número reducido de variables hipotéticas denominadas CP, las cuales no se correlacionan entre sí, y se interpretan independientemente (Hotelling 1933).

Las interrelaciones exhibidas por correlación de descriptores se usan en la construcción de un nuevo conjunto de variables, los CP que son ortogonales entre sí, y por lo tanto no correlacionados. La contribución individual de un descriptor a un CP está dada por el coeficiente de regresión del componente con respecto a ese descriptor; el cuadrado de la contribución de un descriptor para un componente representa la varianza, la sumatoria de varianzas de todos los descriptores para un determinado CP se denomina valor eigen o raíz latente; la suma de valores eigen constituye la varianza total de las UTOs, y puede establecerse el porcentaje de variación (porcentaje de traza) en cada CP que es independiente de los otros (Crisci y López 1983).

- Criterios para determinación del número de componentes principales

Los criterios para selección del número de CP recogen la mayor variabilidad de las variables originales estandarizadas; los más extendidos son *screen* y porcentajes acumulados de varianza.

Según el primer criterio se utiliza una gráfica *screen* de los valores eigen, que se construye tomando como eje X el número de valor eigen y en el eje Y los valores propios.

Otro criterio consiste en retener tantos factores como sean necesarios para lograr un alto porcentaje de explicación de la varianza total; se usa porcentajes acumulados de los valores propios con base en la varianza total del problema, y criterio personal acerca de un buen porcentaje de explicación; para datos de tipo laboratorio puede explicarse más del 95% de

la variabilidad total con dos o tres componentes principales, y para datos de tipo personas, negocios, estudios de mercados, otros, corresponde entre 70% y 75% de la variación total.

Además, los valores eigen se relacionan con la varianza explicada y permiten determinar el número de componentes principales adecuado; en caso de valores tipificados, el número de componentes principales está dado por valores mayores que uno (León *et al.* 2008).

2.3. EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica posibilita la identificación de transcriptos relevantes para el mejoramiento de cultivos agronómicamente trascendentales. Refleja cambios en la transcripción ante una situación específica del tejido, tratamiento o estado de desarrollo; tales cambios son inducidos por una serie compleja de eventos de transducción de señales, muchos de los cuales no están esclarecidos (Zhu 2002). En el estudio de expresión génica se usa diferentes estrategias para el análisis diferencial de respuesta frente a estrés biótico o abiótico, heterogeneidad ecológica, otros. La cuantificación de expresión génica puede ser absoluta o relativa (Rivas 2010), o determinarse por análisis comparativos de muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel (Blas *et al.* 2010).

2.3.1 EXPRESIÓN GÉNICA ABSOLUTA

El método de expresión génica absoluta usa estándares diluidos de DNA de concentración conocida para construir una curva estándar que relaciona linealmente el ciclo umbral (C_T) y las cantidades iniciales de los genes, por consiguiente, del ARN mensajero (ARNm) inicial, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas en función de su valor C_T ; asume que estándares y muestras tienen eficiencias de amplificaciones aproximadas, además las concentraciones de las diluciones deben abarcar los niveles de expresión de las muestras desconocidas y permanecer dentro de un rango de cuantificación detectable para equipo y reactivos en cada ensayo (Wong y Medrano 2005).

2.3.2 EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

En el método de cuantificación relativa se realiza cálculos de la expresión génica en función de una muestra de referencia interna o externa, y una muestra control (calibrador). Existen numerosos modelos matemáticos para calcular la expresión génica normalizada en ensayos de cuantificación relativa, que utilizan diferentes metodologías para minimizar el error experimental (Wong y Medrano 2005).

Las posibilidades de comparar la expresión de ARNm del gen de interés son múltiples, implica que la expresión génica es relativa a un control endógeno como un gen de referencia expresado constantemente, u otro gen de interés (o relativa a un control exógeno universal y/o artificial de ARN o ADN, y otros); en éste proceso de cuantificación se adiciona otro parámetro relativo; comparando el nivel de expresión del gen de interés relativo a un punto cero en el tiempo (o relativo a un control sin tratamiento, individuos saludables, otros) (Dorak 2006). La cuantificación relativa o comparativa mide el cambio relativo en los niveles de expresión; determina el cambio en el nivel de ARNm de un gen de interés en determinado estado a través de múltiples muestras; no requiere curva de calibración o estándares de concentración conocida, y el gen de referencia puede provenir de cualquier transcripto de secuencia establecida (Bustin 2002). La unidad usada para expresar cantidades relativas es arbitraria, se puede comparar con otros experimentos RT-qPCR (Vandesompele *et al.* 2002); la cuantificación relativa es una herramienta adecuada para investigar pequeños cambios fisiológicos que producen efectos en los niveles de expresión génica. Se asume doblaje óptimo de ADN complementario (ADNc) de interés durante cada ciclo qPCR (Dorak 2006).

Algunos genes de referencia se expresan constantemente, coamplifican en el mismo tubo de reacción como control endógeno en ensayos *multiplex*, o en tubo separado como control exógeno (Livak 2001); el gen de referencia ideal para todas las condiciones experimentales no existe, por ende es necesario su selección apropiada para experimentos RT-qPCR en diferentes especies de plantas y distintas condiciones (Luo 2018); generalmente en plantas se usa el gen de referencia ARN ribosomal 5.8S (ARNr 5.8S) (Feng 2012), junto con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) (Zhang *et al.* 2014; Rivas 2010), actina (Act) (Ballou *et al.* 2007), ARN ribosomal 18S (ARNr 18S) (Nicot *et al.* 2005; Sapir *et al.* 2008), y otros como ARN nuclear pequeño U6 (U6 snRNA), tubulina (Tub) (Stommel *et al.* 2009), etc.; la utilización de ARNr requiere de iniciadores aleatorios, por ausencia de la cola poliadenilada (poli-A) de ARNm eucarionte.

El modelo de cuantificación relativa con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ se deriva de la característica exponencial de la PCR (Livak y Schmittgen 2001) (Ecuación 1):

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n, \quad 1)$$

donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de moléculas del gen X ; E_x es la eficiencia de amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR. El C_T es el ciclo fraccionario en el cual la fluorescencia del gen alcanza el umbral fijado; la ecuación queda de la siguiente forma (Ecuación 2):

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x, \quad 2)$$

donde X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_T ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_T del gen X y K_x es una constante; así mismo, se repite para el gen de referencia R (Ecuación 3):

$$R_T = X_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R, \quad 3)$$

donde R_T es el número de copias del gen R , R_0 es el número inicial de moléculas del gen R ; E_R es la eficiencia de amplificación del gen R ; $C_{T,R}$ es el ciclo C_T del gen R y K_R es una constante. Dividiendo la ecuación 1 para la ecuación 2, se genera la expresión (Ecuación 4):

$$\frac{X_0}{R_0} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K, \quad 4)$$

Asumiendo que la eficiencia del gen R es igual a la eficiencia del gen X (Ecuación 5 y 6):

$$E_x = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K, \quad 5)$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K, \quad 6)$$

donde X_N es la cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia de C_T entre gen objetivo y gen de referencia. Ordenando la ecuación queda de la forma (Ecuación 7):

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}, \quad 7)$$

El paso final es dividir X_N de cualquier muestra q , definido como el tratamiento a ser evaluado, para X_N de la muestra calibrador (cb) (Ecuación 8):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1+E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1+E)^{-\Delta\Delta C_T}, \quad 8)$$

$$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}).$$

La eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces la cantidad del gen objetivo se normaliza con una muestra de referencia y es relativa a una muestra calibrador; de la forma siguiente (Ecuación 9):

$$\text{cantidad objetivo} = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \quad 9)$$

Éste método permite el cálculo de expresión génica, asumiendo que las eficiencias de los genes de referencia y de interés son aproximadamente iguales; si difieren mucho entre sí, es necesario el análisis de eficiencias mediante una curva estándar, o un nuevo diseño de oligonucleótidos, y optimizar condiciones de reacción para equipararlas (Livak y Schmittgen 2001).

La amplificación de control sin templado (NTC) es más común debido a error humano, se sugiere dejar pocillos libres alrededor, o por contaminación de reactivos con productos PCR; la amplificación tardía en NTC es tolerable si el valor C_T más bajo para el templado se encuentra alejado más de cinco valores C_T (regla de cinco C_T de diferencia). Los amplicones del ADNc de interés deben ser cortos, aproximadamente 200 pb, no menores a 75 pb para diferenciarlos de la formación de dímeros entre iniciadores (Dorak 2012). Fluctuaciones en la variación del valor C_T entre corridas usualmente aún se subestiman, algunos programas no procesan datos crudos provenientes de una o múltiples corridas, otros sí (Hellemans *et al.* 2006); incluso repeticiones técnicas pueden resultar en curvas de fluorescencia significativamente diferentes debido a la variación muestra a muestra (Dorak 2006).

No obstante, las réplicas técnicas mejoran la precisión del experimento, principalmente se incluyen para detección de reacciones aberrantes que resultan en valores C_T atípicos e incorrecta estimación de los niveles de expresión relativa; con tres o más réplicas, se detecta valores atípicos y se excluyen de cálculos posteriores; además permiten la evaluación de calidad total de las mediciones e identificación de malas réplicas, las diferentes vías para tratar malos duplicados son la exclusión de mediciones, conservación de mediciones

afectando a los resultados (largas barras de error), o remoción de réplicas sí información adicional precisa la mala réplica (error de pipeteo, curva de disociación anormal o valor C_T anormalmente alto para ese ensayo) (Dorak 2006).

2.3.3 ANÁLISIS COMPARATIVOS

Muestras coloreadas con bromuro de etidio en gel, forman un complejo con el ADN que al ser expuesto a luz ultravioleta emite fluorescencia. Se toma 1 μL de muestra extraída con 9 μL de tampón de carga SALB 1X, se carga en gel y paralelamente se carga el marcador de referencia de peso molecular, con el fin de estimar la concentración de las muestras, comparando la intensidad de bandas usando como referencia la concentración para la banda de mayor peso molecular. La corrida electroforética se realiza con tampón TBE 1X, se captura la imagen mediante una caja que emite luz ultravioleta con una cámara digital y un filtro de color marrón para el lente, para la posterior cuantificación (Blas *et al.* 2010).

2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis de expresión génica mediante la aplicación de técnicas moleculares desarrolladas y estandarizadas de manera óptima y con alta precisión, incluye diseño y síntesis de oligonucleótidos, extracción y cuantificación de ARN, síntesis de ADN complementario (ADNc) con retrotranscriptasa, retrotranscripción seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR), otras (Chiluisa-Utreras *et al.* 2017; Kumari 2012; López 2008; Lucca 2011; Rivas 2010; Tello 2016).

2.4.1 GENERALIDADES ACERCA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos, también conocidos como detonadores, cebadores, primadores, amplímeros o *primers*, son moléculas de ADN de cadena individual y longitud corta, de unos 10 a 30 nucleótidos; se hibridan complementariamente a una cadena sencilla de ADN patrón (molde o substrato) mediante amplificación, utilizando la enzima catalizadora ADN polimerasa y obteniendo como resultado la síntesis de cadenas largas de polinucleótidos al incorporar monómeros de trifosfato de desoxinucleósido al grupo libre 3'-hidroxilo del detonador en dirección 5'—>3' (Camarena *et al.* 2012).

Hibridación se entiende como la asociación específica y complementaria de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos, la cual responde a un proceso físico de anillamiento, alineamiento, ensamblaje o anclaje de los detonadores (dos cadenas individuales forman

enlaces de hidrógeno entre sus bases complementarias) para la formación de una doble cadena helicoidal y complementaria a la secuencia patrón. La temperatura de fusión (T_m , 50% de los pares de bases son hibridados) de un detonador depende de su contenido de G + C, las condiciones físico químicas y de la longitud de las secuencias implicadas. Una manera usual de calcular T_m es (Pinzón 2007):

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Originalmente calculada en una concentración salina 1.0 M para pruebas de hibridación de oligonucleótidos. Sin embargo, es inexacta con iniciadores mayores de 20 nucleótidos (nt) y requiere de correcciones para la concentración salina (Camarena *et al.* 2012)). Por su parte, la temperatura de anillamiento (T_a) depende de la longitud y composición de los detonadores; es común utilizar temperaturas de anillamiento 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) más baja del par de *primers* utilizados (Innis y Gelfand 1990; Pinzón 2007). Para el diseño y síntesis de oligonucleótidos se debe considerar algunos parámetros esenciales (Camarena *et al.* 2012):

- Longitud corta de 10 a 30 nucleótidos
- Hibridación estable de un oligonucleótido con la región objetivo del ADN patrón
- Estabilidad interna del oligonucleótido
- Ausencia de complementariedad interna en el oligonucleótido
- Ausencia de complementariedad con otro oligonucleótido
- Contenido de G + C entre 40 y 60%
- No deben ser palindrómicos

2.4.2 EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN es muy lábil, se degrada fácilmente a causa de ARNasas y alta temperatura, la adecuada extracción y purificación de ARN total o ARNm, mediante inhibidores de ARNasas, temperaturas inferiores a 4 °C, guantes para su manipulación, y otros, es fundamental para continuar con la síntesis de ADNc (Maniatis *et al.* 1982). No obstante, a menudo reducidas concentraciones de ARN se deben a pérdida de una parte apreciable tras el proceso de aislamiento (Díaz-Alonso 2013).

La extracción de ARN es un suceso clave en el análisis de expresión génica, ya que se necesita un ARN de alta calidad y estable para este tipo de ensayos experimentales (Rivas 2010). Por lo general, el método de extracción para ARN total se basa en la tecnología de adsorción y desorción sobre membranas de sílice; se tritura, y después se homogeniza cada muestra en presencia de una solución salina (tiocianato de guanidina) con gran cantidad de iones caotrópicos, la cual crea un entorno hidrofóbico alrededor del ARN que le permite unirse a una membrana de sílice tras el centrifugado con etanol, y que además posee actividad inhibidora de ARNasas (Chirgwin *et al.* 1979; Maniatis *et al.* 1982); posteriormente, se remueve impurezas mediante varios lavados (Vogelstein y Gillespie 1979), y se eluye el ARN en agua libre de ARNasas. Otros métodos incluyen la extracción de ARN mediante uso de fenol-cloroformo, y aplicación de sustancias como dodecil sulfato de sodio (SDS) (Araujo-Burgos y Rao 2013).

El ARN se encuentra disponible para una variedad de aplicaciones, que incluye ensayos de protección contra nucleasas, análisis de expresión génica, librerías de ADNc, secuenciación de ARNm, otros. A fin de eliminar restos contaminantes en las muestras de ARN, se aplica ADNasa I que evita amplificación de ADN genómico (ADNg) coeluido (Stephenson 2012), y minimiza sobreestimación de la expresión génica (falsos positivos) debido a fragmentos amplificados de origen distinto al ADNc de interés (Rivas 2010; Lucca 2011).

2.4.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA

Las moléculas de ARNm son copiadas a ADNc por medio una enzima retrotranscriptasa junto con un detonador; las más difundidas son la enzima del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV) y la enzima del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) (Kubista *et al.* 2006). En algunos casos, con la adición de un oligo (dT) de unos 18 a 20 nucleótidos que contiene solo timinas, se logra hibridar el detonador con la cola poli-A de ARNm de la mayoría de organismos eucariontes, facilitando la síntesis de ADNc y su posterior amplificación (Kubista *et al.* 2006; Malo *et al.* 2015). Las cantidades producidas de ADNc son un reflejo del ARNm inicial (Roche 2010).

2.4.4 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA

Retrotranscripción seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR) (en tiempo real) conserva el principio básico de retrotranscripción seguido de PCR semicuantitativa (RT-PCR)

(convencional o de punto final), a diferencia que la amplificación puede ser monitoreada en cada ciclo por medio de una sustancia afín (fluoróforo) a la molécula de ADN, colorante que se añade e intercala en el surco menor de la doble cadena (Fernández 2011), y emite fluorescencia cada vez que se lleva a cabo una nueva síntesis (Primrose y Twyman 2006). RT-qPCR es una técnica de alta sensibilidad que utiliza muestras con poca cantidad de hebra patrón inicial (Deepak *et al.* 2007; Gachon *et al.* 2004). Generalmente, las reacciones en tiempo real se ensamblan con reactivos (reversibles) que se unen a ADN de doble hebra *SYBR® Green*, *EvaGreen™*, *BrightGreen®*, cuyas longitudes de onda para absorbancia máxima y emisión máxima de fluorescencia son 497 nm y 525 nm, respectivamente, u otras sustancias químicas; el producto específico se verifica mediante la temperatura de fusión (T_m) del amplicón, que depende de su composición nucleotídica y posibilita la identificación de señales del producto correcto a través del pico de fluorescencia, en la curva de disociación. También se utiliza sondas específicas (irreversibles) para la secuencia de interés, Taqman que contiene reporteros (fluoróforo) en el extremo 5' y apagadores en el extremo 3', para cada ensayo de qPCR; el reportero se libera por hidrólisis de la sonda y emite fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado; sondas Scorpions, otras (Bustin 2002).

Los pasos que conforman el proceso de qPCR son una fase inicial con fluorescencia mínima que no rebasa el ruido de fondo (*background*) del medio circundante en los primeros ciclos, en la cual se calcula la línea base; continuando con una fase exponencial temprana y emisión de fluorescencia que rebasa el umbral definido, el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral se conoce como C_T (*threshold cycle* o ciclo umbral), el producto dobla su cantidad en cada ciclo, es representativo de la cantidad inicial de hebra molde y usado en cálculos posteriores; una fase lineal de amplificación enlentecida acompañado de agotamiento de componentes y degradación de productos; y al final una fase estacionaria en la que reactivos y equipo llegan al límite de detección (Wong y Medrano 2005).

2.4.5 ELECTROFORESIS EN GEL

La verificación de la integridad de ácidos nucleicos por electroforesis separa macromoléculas cargadas a causa de la diferente movilidad que éstas presentan al estar influenciadas por un campo eléctrico; ADN y ARN son macromoléculas cargadas negativamente debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura (Camarena *et al.* 2012). La separación efectiva de los fragmentos de ADN o ARN (resolución) depende de

masa y carga de los fragmentos (Técnicas Avanzadas en Biología Molecular 2001); se lleva a cabo en geles de agarosa o poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida son efectivos para separar fragmentos pequeños (5 a 500 pb) debido a su alto poder de resolución, con concentraciones entre 3.5 y 20.0% (p/v) y bajo condiciones apropiadas fragmentos diferenciados en su longitud por un solo par de bases son resueltos fácilmente (Camarena *et al.* 2012); mientras que, los geles agarosa separan fragmentos más grandes (2 a 60 kb), tienen menor poder de resolución y son empleados en concentraciones típicas comprendidas entre 0.5 y 2.0% (p/v). En adición, se emplean marcadores de peso molecular (tamaño estándar conocido) para estimar peso y número de pares de bases de los fragmentos que migraron (Sambrook y Ruseell 2001).

La migración de una molécula de ADN tiene una tasa inversamente proporcional al \log_{10} del número de pares de bases y su velocidad es proporcional a la fuerza del campo eléctrico aplicado; se recomienda un voltaje de 5 a 8 V cm^{-1} para geles de agarosa. La composición y cantidad del tampón de corrida también afecta la migración, un déficit en volumen retrasa la movilidad; mientras que, altas concentraciones de sales aumentan drásticamente la velocidad y temperatura fundiendo el gel y desnaturalizando el ADN. Los tampones más empleados son TAE (Tris-Acetato-EDTA), TBE (Tris-Borato-EDTA) y TPE (Tris-Fosfato) (Sambrook y Ruseell 2001).

El revelado del gel de agarosa se hace a través de la adición de bromuro de etidio, esta molécula se intercala en los surcos de la doble hélice del ADN y en presencia de rayos UV se visualiza bandas de distintas intensidades dependiendo de la concentración del ácido nucleico (Sambrook y Ruseell 2001); se puede comprobar tamaño de productos amplificados y estimar concentración en base a intensidad de bandas (Pensabene 2009).

La electroforesis en gel de agarosa se emplea para evaluar integridad del ARN; así se sugiere en estudios sobre papa y olluco, en los cuales se utiliza agarosa en concentraciones de 0.7 y 1.2% (p/v), respectivamente (Romero y Estrada 2005; Araujo y Rao 2013). El tampón para electroforesis TAE (Tris-Acetato-EDTA) con pH 8.0 (alcalino) ioniza grupos fosfato y mantiene la carga negativa del ARN. El bromuro de etidio 1% (v/v) tiñe el ARN pues interacciona favorablemente con la región hidrófoba de ácidos nucleicos y permite observar bajo luz UV, bandas correspondientes a ARN (López 2008). Se menciona investigaciones en las cuales la integridad de ARN total, para tomate (Rivas 2010), chile

(Gasca *et al.* 2008) y olluco (Romero y Estrada 2005), permite observar bandas correspondientes a ARNr 28S y ARNr 18S.

En organismos eucariontes la subunidad mayor de ARN ribosomal (60S, PM = 2800000) consta de ARNr 28S, ARNr 5S, ARNr 5.8S y la subunidad menor (40S, PM= 1400000) con ARNr 18S, presentan 4700, 120, 160 y 1900 nucleótidos, respectivamente (Watson *et al.* 2008). La mayoría del contenido de ARN forma parte de los ribosomas, contrario al ADN, es muy inestable una vez obtenido de tejidos debido a presencia de ARNasas celulares; usualmente se congela tejidos u homogeniza en solución desnaturizante (Macías *et al.* 2014). Por otra parte, se manifiesta que ARN parcialmente degradado tiene un aspecto manchado sin bandas fuertes, y aquel que se encuentra totalmente degradado aparece como una mancha de muy bajo peso molecular (Almansa 2013).

2.5 MECANISMO BIOSINTÉTICO DE ANTOCIANINAS Y GENES ASOCIADOS

La familia SOLANACEAE contiene a varias especies de importancia económica, incluyendo a *S. lycopersicon*, *S. melongena*, *S. tuberosum*, *Capsicum spp.*, y otras, algunas producen antocianinas (Dhar *et al.* 2015). Las antocianinas son estables una vez sintetizadas en tubérculo de *S. tuberosum*; el nivel de antocianinas en *S. melongena* y *Capsicum spp.* es mayor en fruto inmaduro y decrece durante la maduración, incluso hasta desaparecer; en general las antocianinas se acumulan en flores, hojas, tallos y frutos de plantas solanáceas, específicamente en cáscara del fruto de *S. melongena* (Matsubara *et al.* 2005), *S. lycopersicon* (Sapir *et al.* 2008), y *Capsicum spp.* (Lightbourn *et al.* 2008), cáscara del tubérculo de *S. tuberosum*, y también en la pulpa del tubérculo de algunos genotipos de variedades nativas (Egúsqüiza 2000, 2008). El contenido de antocianinas depende del balance entre biosíntesis y degradación; la biosíntesis de antocianinas se ha estudiado extensamente, mientras que el conocimiento respecto a su degradación es limitado (Holton y Cornish 1995; Liu *et al.* 2018).

Las antocianinas son una diversa clase de flavonoides que se componen de un esqueleto de antocianidina con grupos azúcar y acilo conjugados (Stommel *et al.* 2009); las antocianidinas presentan dos anillos aromáticos de benceno separados por un compuesto heterocíclico oxigenado (Tanaka *et al.* 2008); se ha descubierto más de veinte antocianidinas, de las cuales solo seis prevalecen en plantas (Zhao *et al.* 2014). Las antocianidinas primarias pelargonidina, cianidina y delfinidina difieren una de otra por el

número de grupos hidroxilo en su anillo B, muestran tonos naranja/rojo, rojo/magenta y violeta/azul, respectivamente (Tanaka y Ohmiya 2008); peonidina se deriva de cianidina por metilación-O simple; la metilación simple o doble de delphinidina resulta en petunidina y malvidina, respectivamente. Las antocianinas basadas en delphinidina como estructura principal se encuentran en tejidos púrpura de solanáceas como *S. melongena* y *Capsicum spp.*, las derivadas de pelargonidina en tubérculos rojos de *S. tuberosum*, y en tubérculos púrpura predomina las antocianinas derivadas de petunidina (Liu *et al.* 2018). La ruta de biosíntesis de antocianinas se encuentra caracterizada y comprende un mecanismo muy conservado en algunas plantas (Holton y Cornish 1995).

El mecanismo biosintético de antocianinas es una extensión de la ruta general de flavonoides (Figura 2), que comienza con la síntesis de chalcona naringenina a partir de 4-cumaril-CoA y 3-malonil-CoA mediado por chalcona sintasa (CHS); luego chalcona naringenina se isomeriza por chalcona isomerasa (CHI) a naringenina. Flavanona 3-hidroxilasa (F3H) convierte naringenina a dihidrokaempferol que se hidroxila por flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) o flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en otros dihidroflavonoles, dihidroquercetina o dihidromiricetina, respectivamente. Seguidamente, los tres dihidroflavonoles se convierten en leucoantocianidinas incoloras por dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y subsecuentemente a antocianidinas coloreadas por antocianidina sintasa (ANS). Finalmente, se adjuntan moléculas de azúcar a las antocianidinas por medio de enzimas de la familia de la glicosiltransferasa, por ejemplo flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (UFGT), y luego se unen a grupos aromáticos acilo por medio de aciltransferasas (Liu *et al.* 2018).

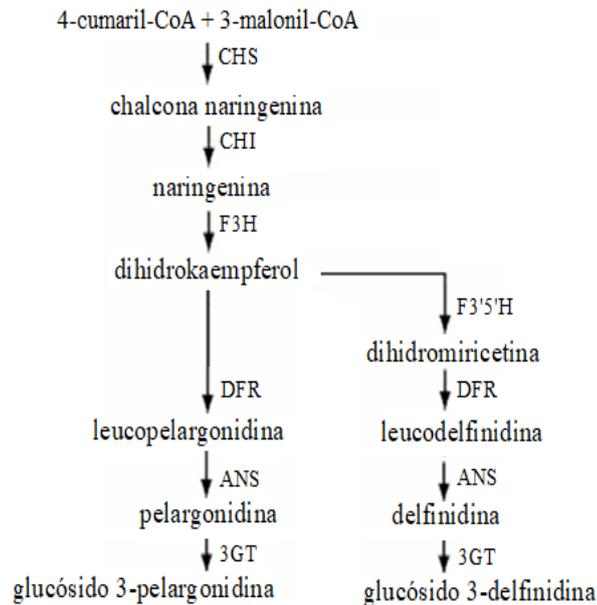


Figura 2. Esquema ilustrativo relacionado a solanáceas de la posible ruta biosintética de antocianinas en estados iniciales. Abreviaciones: CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa; ANS, antocianidina sintasa; 3GT, UDP-glucosa antocianidina 3-O-glucosiltransferasa.

Fuente: Tomado y adaptado de Qi-Neng y Qing (2006)

La expresión de genes implicados en la acumulación de antocianinas en tejidos específicos durante determinadas etapas del desarrollo de especies tales como *S. pinnatisectum* (Qi-Neng y Qing 2006), *S. melongena* (Jiang *et al.* 2016) y *S. muricatum* (Herraiz *et al.* 2016), puede ser estimulada mediante la exposición prolongada a luz blanca y baja temperatura. Las antocianinas son compuestos fenólicos o metabolitos secundarios de la subclase de los flavonoides, solubles en agua e importantes por su capacidad antioxidante; además inhiben el crecimiento de células cancerígenas, previenen enfermedades del corazón y pueden ser usadas en el diseño de alimentos nutraceuticos (Martínez-Cruz *et al.* 2011).

CHS, F3H, y ANS correspondientes a unigenes de *S. muricatum* presentan 9, 12, y 34 variantes de un solo nucleótido (SNVs) entre pepino dulce (Sweet Long) y *S. caripense* (EC-40), respectivamente; y valor-E = 0.00 relacionado a homología de secuencias (Herraiz *et al.* 2016). Los genes CHS y F3H en *S. pinnatisectum* comparten 96 y 93% de identidad con las secuencias correspondientes al mismo gen en *S. tuberosum* (Qi-Neng y Qing 2006).

2.6 MECANISMO BIOSINTÉTICO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO Y GENES ASOCIADOS

Los constituyentes bioactivos más nutricionalmente importantes del fruto de *S. melongena* (Gramazio *et al.* 2014), y tubérculo de *S. tuberosum* (Payyavula *et al.* 2015), son compuestos fenólicos responsables de su elevada actividad antioxidante; los fenoles más abundantes en *S. melongena* y *S. tuberosum* son conjugados de ácido hidroxicinámico (HCA), los cuales se sintetizan por conversión de fenilalanina a ácido cinámico; entre los conjugados de HCA, el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoil-quinico; CGA) alcanza 70% y llega a superar 95% del contenido total de fenoles. Se observa gran diversidad en el contenido fenólico total y concentración de CGA, a causa de factores genéticos y ambientales.

Algunas especies silvestres relacionadas a *S. melongena*, por ejemplo *S. incanum*, poseen niveles altos de CGA, forman parte del acervo genético del cultivo y posibilitan su uso en programas de fitomejoramiento para el desarrollo de variedades con elevado contenido fenólico; no obstante, el incremento de fenoles en *S. melongena* puede causar efectos negativos en la calidad aparente del fruto; al cortar la pulpa, los compuestos fenólicos almacenados principalmente en vacuolas se tornan disponibles para enzimas polifenol oxidadas (PPOs) presentes en cloroplastos; las enzimas PPOs catalizan la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales reaccionan con oxígeno del aire y resultan en compuestos que causan pardeamiento en pulpa del fruto (Gramazio *et al.* 2014).

El mejoramiento genético molecular para elevado contenido de CGA y baja actividad PPO contribuye al desarrollo de variedades con propiedades bioactivas superiores, combinando alta actividad antioxidante y bajo grado de pardeamiento; para el propósito, el abordaje de genes candidatos se muestra prometedor, ya que los genes involucrados en el mecanismo biosintético de CGA se encuentran caracterizados (Figura 3), incluye a fenilalanina amonía liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-hidroxicinamoil-CoA ligasa (4CL), hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa (HCT), p-cumaril ester 3-hidroxilasa (C3H), hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferasa (HQT), en adición a los genes PPOs. En la familia SOLANACEAE la abundancia de CGA se asocia fuertemente con diferentes genes de la ruta biosintética; HQT parece el contribuidor más importante para síntesis de CGA en *S. lycopersicon* y *Nicotiana benthamiana* (Niggeweg *et al.*, 2004); mientras que, la expresión génica de C3H es más relevante en tubérculo de *S. tuberosum* variedad Huata Colorada y otras, expuesto a condiciones de estrés abiótico (André *et al.* 2009).

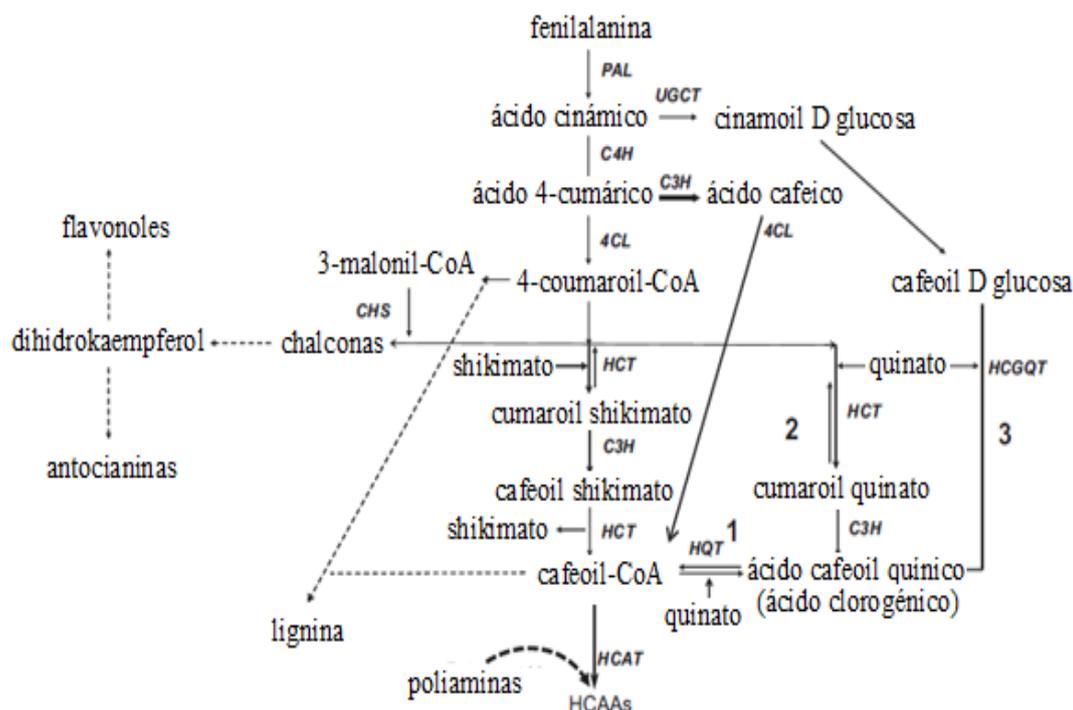


Figura 3. Esquema ilustrativo relacionado a solanáceas de la posible ruta biosintética de ácido clorogénico (1, 2 y 3). Abreviaturas: 4CL, 4-coumaroil-CoA ligasa; C3H, p-cumaril ester 3-hidroxilasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; CHS, chalcona sintasa; HCAA, amidas de ácido hidroxicinámico; HCAT, hidroxicinamoil transferasa; HCGQT, hidroxicinamoil glucosa:quinato hidroxicinamoil transferasa; HCT, hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa; HQT, hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferasa; PAL, fenilalanina amonía liasa; UGCT, UDP glucosa:cinamato glucosiltransferasa.

Fuente: Tomado de Payyavula *et al.* (2015)

La expresión génica de C3H interviene en la síntesis de CGA en solanáceas; el CGA es el principal fenilpropanoide en *S. tuberosum* (Payyavula *et al.* 2015), *S. melongena* (Stommel y Whitaker 2003; Zaro *et al.* 2016), *S. lycopersicon*, *Coffee arabica* y otros, mientras que en *Arabidopsis* no se presenta en cantidades apreciables; los fenilpropanoides difieren en estructura y concentración entre especies, y participan en el desarrollo y defensa de las plantas (Yu y Jez 2008); el CGA abunda en la dieta humana (Niggeweg *et al.* 2004), su interés radica en diversas actividades biológicas y propiedades antioxidantes con efectos beneficiosos para la salud (Sato *et al.* 2011; Plazas *et al.* 2013). Las condiciones pre y poscosecha de cultivo afectan considerablemente la expresión génica y el contenido fenólico, de tal forma que algunos antioxidantes son influenciados por grado de desarrollo y almacenamiento (Robbins 2003); generalmente, en condiciones poscosecha se pretende extender la vida en estante y aumentar la calidad agronómica del producto comercial.

C3H correspondiente al unigen de *S. muricatum* presenta una variante de un solo nucleótido (SNVs) entre pepino dulce (Sweet Long) y *S. caripense* (EC-40); y valor-E = 0.00 relacionado a homología de secuencias (Herraiz *et al.* 2016); el unigen que involucra a C3H (YFR01I20A) en *S. melongena* es identificado usando una secuencia ortóloga de tomate (SGN: Solyc01g096670.2) de aproximadamente 3 kb que contiene tres exones y dos intrones (Gramazio *et al.* 2014). En efecto, *S. caripense* es parte del acervo génico terciario de *S. tuberosum* y *S. lycopersicon*, comparten el mismo número básico de cromosomas ($x = 12$), aunque la mayoría de variedades cultivadas de papa son poliploides, se toma a *S. bulbocastanum* como referencia diploide ($2n = 2x = 24$) (Matsubayashi 1991). La cercana relación filogenética entre éstas especies permite el uso de recursos genómicos de papa, berenjena y tomate para el mejoramiento de pepino dulce y tzimbaló, y viceversa (Herraiz *et al.* 2016; Prohens *et al.* 2003).

En *S. tuberosum* tipo silvestre (WT, *wild type*) la expresión de C3H en pulpa del tubérculo puede considerarse mayor y el pardeamiento más notorio 12 horas después de realizar un corte longitudinal; en contraste a plantas transgénicas de tubérculo con pulpa blanca (Bannock Russet, Gemstar y Norkotah Russet), y púrpura (Purple Pelisse), cuya expresión del gen HQT correlacionado a biosíntesis de CGA se suprime por silenciamiento con ARN interferente (ARNi), en las cuales el pardeamiento es marcadamente menor, debido a la reducida expresión génica de fenilpropanoides que impide el acceso al CGA a enzimas polifenol oxidasas (PPOs) catalizadoras de su oxidación a quinonas en presencia de oxígeno, responsables del pardeamiento (Payyavula *et al.* 2015). Adicionalmente, la actividad PPO varía entre cultivares de *S. melongena*; en ese sentido, investigaciones relacionadas a la obtención de variedades con elevado contenido de ácido clorogénico se enfocan en la selección simultánea de plantas con alto contenido de antioxidantes y baja o moderada actividad PPO, para lograr características agronómicas avanzadas en programas de mejoramiento genético vegetal (Plazas *et al.* 2013).

En la evaluación de la influencia del estado de desarrollo y condiciones de almacenamiento sobre el nivel de antioxidantes fenólicos en *S. melongena* cultivares Monarca y Perla Negra, se determina que en pulpa del fruto estado I de desarrollo el CGA alcanza alta concentración (2000 mg kg^{-1}), en estado III y IV calibre comercial el contenido disminuye marcadamente ($700\text{-}1200 \text{ mg kg}^{-1}$), hasta llegar al nivel más bajo en estado V ($600\text{-}1000 \text{ mg kg}^{-1}$); mientras que, en el fruto estado IV de *S. melongena* cultivar Lucía durante

almacenamiento a 10 °C, después de cinco días no se produce síntomas de daños por frío (DF), es decir ausencia de picado, escaldaduras superficiales y pardeamiento, y la cantidad de CGA sufre cambios moderados, sin embargo al final del periodo de conservación tras catorce días se observa un incremento considerable de CGA que alcanza concentración superior a la de cosecha (Zaro *et al.* 2016).

2.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño completamente al azar (DCA) tiene criterio de clasificación única, los tratamientos son aplicados completamente al azar en las unidades experimentales, es empleado cuando el material experimental y las condiciones del ambiente son homogéneas; se usa preferentemente en investigaciones que se realizan en laboratorio o invernadero. El análisis de varianza (ANVA) corresponde al modelo lineal aditivo; se resuelve por suma de cuadrados (Sánchez-Otero 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú; en enlace con el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador.

3.1 MATERIAL VEGETAL

Para la identificación y descripción de *S. caripense* (Cuadro 3), y colecta de frutos en estado IV de desarrollo, se toma como referencia regiones, departamentos y provincias mencionadas anteriormente en relación a la distribución geográfica de la especie (Jørgensen y León 1999; Särkinen *et al.* 2015).

3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Se identificó y describió *in situ* plantas individuales en distintos ecotipos de *S. caripense* (Anexo 1), en su mayoría silvestres; se usó descriptores morfológicos para *S. muricatum* y especies silvestres relacionadas (IPGRI y COMAV 2004; Herraiz 2015; Torrent 2014) (Anexo 2); se obtuvo valores de moda y media para tres observaciones por planta y se evaluó caracteres vegetativos, así como descriptores de inflorescencia, fruto y semilla, diferenciando entre variables cualitativas y cuantitativas (Madroñero *et al.* 2013; Morales *et al.* 2014); se realizó análisis de conglomerados (AC) y análisis de componentes principales (ACP).

Cuadro 3: Material vegetal correspondiente a *Solanum caripense* Dunal de la familia SOLANACEAE.

Numeración	Identificación/ Colaboradores	Nombre común	Distrito/ Parroquia	Provincia/ Cantón	Departamento/ Provincia	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Fruto
IBT-Ayb1	Marzo-2018 Emerita	Ambuyuco	Ayabaca	Suyo	Piura	4°38'03''S	79°43'05''W	2814	
IBT-Lim1	Mayo-2018 S. Vilca		Lucumani	Lima	Lima	11°56'29''S	76°29'44''W	2560	
IBT-Lib1	Septiembre-2018 J. Muñoz		Cerro Zango	Otuzco	La Libertad	8°00'49''S	78°24'38''W	3329	
BIO-Ltg1	Marzo-2018 J. Morales		Eloy Alfaro	Latacunga	Cotopaxi	0° 47'22''S	78° 33'59''W	3055	
BIO-Ltg2	Marzo-2018 J. Morales		Eloy Alfaro	Latacunga	Cotopaxi	0°58'19'' S	78°36'52'' W	2717	
BIO-Ltg3	Marzo-2018 F. Morales	Chímbalo Tsímbalo Símbalo Tzímبالو	Tanicuchí	Latacunga	Cotopaxi	0° 45'28''S	78° 45'28''W	3016	
BIO-Cyb1	Marzo-2018 J. Morales	Chinpalu Tzimbalo Samboshuyo	Sector Orongoloma	Cayambe	Pichincha	0° 01'01''N	78° 05'38''W	3298	
BIO-Cyb2	Marzo-2018 G. Ortega		Ayora	Cayambe	Pichincha	0° 02'38''N	78° 07'28''W	2950	
BIO-Cyb3	Marzo-2018 F. Vinuesa		Sector Orongoloma	Cayambe	Pichincha	0° 01'012''N	78° 05'51''W	3282	

Nota: Elaborado por J. Morales, 2019

3.2.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

Se realizó el AC con 16 descriptores cualitativos evaluados en *S. caripense*, los cuales presentan variación:

- Descriptores vegetativos

Altura de planta: por estimación visual, carácter fuertemente afectado por condiciones de crecimiento incluyendo el espacio, cultivares estándar deben ser usados para comparación (3 Bajo; 5 Medio (Sweet Long); 7 Alto (Puzol)).

Vigor de planta: escala (3 Débil; 5 Intermedio; 7 Fuerte).

Densidad pubescente de tallo: escala (0 Glabro; 3 Escaso; 5 Intermedio; 7 Denso).

Color de tallo: escala (1 Verde; 2 Verdoso con manchas moradas; 3 Morado verdoso; 4 Morado; 5 Morado oscuro)

Color de peciolo: escala (1 Verde; 2 Verdoso con manchas moradas; 3 Morado verdoso; 4 Morado; 5 Morado oscuro).

Color de hoja: observado en la superficie adaxial (1 Verde claro; 2 Verde; 3 Verde oscuro; 4 Morado verdoso; 5 Morado).

- Descriptores de inflorescencia

Color de corola: rango (1 Blanco; 2 Blanco >75%, morado <25%; 3 Blanco 50-75%, morado 25-50%; 4 Blanco 25-50%, morado 50-75%; 5 Blanco <25%, morado >75%; 6 Morado).

- Descriptores de fruto

Uniformidad de tamaño de fruto: escala (3 Baja; 5 Intermedia; 7 Alta)

Forma predominante de fruto: según la figura 3 (1 Aplastado; 2 redondo; 3 Elipsoide; 4 Obovado; 5 Ovado; 6 Cordiforme; 7 Cónico; 8 Alargado; 9 Otro)

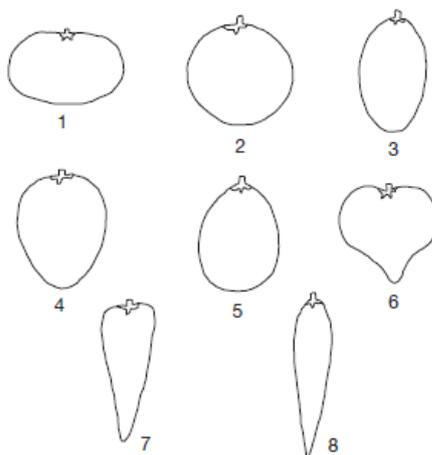


Figura 3. Forma predominante de fruto

Rayas en fruto: 0 Ausente; 1 Presente

Fruto con mancha: 0 Ausente; 1 Presente

Superficie de fruto cubierta por color adicional: rango (1 Menos de 10%; 2 Entre 10 y 30%; 3 Entre 30 y 50%).

Color de pulpa fresca de fruto: escala (1 Verde oscuro; 2 Verde claro; 3 Blanco cremoso; 4 Amarillo pálido; 5 Amarillo dorado; 6 Amarillo anaranjado; 7 Lila; 8 Morado; 9 Morado negruzco).

Sabor de fruto: escala (1 Muy ácido; 3 Ácido; 5 Moderadamente dulce; 7 Dulce; 9 Muy dulce).

- Descriptores de semilla

Color de semilla: escala (1 Blanco; 2 Amarillo claro; 3 Amarillo grisáceo; 4 Amarillo amarronado; 5 Marrón; 6 Marrón negruzco; 7 Negro).

Diámetro de semilla: rango (1 Pequeño < 1.5 mm; 2 Intermedio 1.5-2.5 mm; 3 Largo > 2.5 mm).

A partir de datos previamente estandarizados se obtuvo la matriz de similitud para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense*, tras aplicación del coeficiente de distancia MCD (Crisci y López 1983), procesando los datos con el paquete estadístico InfoStat 2018:

$$MCD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |(x_{ij} - x_{ik})|$$

donde: x_{ij} = valor del descriptor i en el OTU j ; x_{ik} = valor del descriptor i en el OTU k ; n = número de descriptores.

Se agrupó individuos de *S. caripense* mediante enlace promedio (UPGMA) (Sokal y Michener 1958; Quispe *et al.* 2015) para la formación de conglomerados, usando el paquete estadístico Community Analysis Package 1.2

3.2.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se realizó el ACP con 15 descriptores cuantitativos evaluados en *S. caripense*, los cuales presentan variación:

- Descriptores vegetativos

Longitud de entrenudos [mm]: medida a una distancia media entre la parte superior y la base del tallo principal; Longitud de peciolo [mm]; Longitud laminar de hoja [cm]; Ancho laminar de hoja [cm]; Radio longitud hoja/ancho de hoja; Número de folíolos: número promedio de folíolos en el tipo predominante de hojas observado en una planta adulta.

- Descriptores de inflorescencia

Número de flores por inflorescencia: mediante conteo; Longitud de sépalo [mm]; Longitud de estambre [mm]; Ejerción del estilo [mm]: por encima del cono de la antera.

- Descriptores de fruto

Longitud de fruto [cm]; Ancho de fruto [cm]; Radio longitud de fruto/ancho de fruto; Longitud de área placentar interna [cm]; Ancho de área placentar interna [cm].

Se obtuvo la matriz de correlación simple para descriptores cuantitativos de *S. caripense* (Anexo 3); así como los valores eigen (Cuadro 6), y los coeficientes contribución relativa en los CP (Cuadro 7), procesando los datos con Community Analysis Package 1.2. También se realizó ACP para descriptores cualitativos de *S. caripense* (Anexo 4, 5, 6).

3.3 SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES

En base a secuencias de *S. melongena* correspondientes a los genes CHS, F3H, ANS (Zhang *et al.* 2014; Herraiz *et al.* 2016), y C3H (Gramazio *et al.* 2014); junto con ARNr 5.8S (Feng 2012), se sintetizó oligonucleótidos iniciadores para utilizarlos en *S. caripense*. CHS-FW-Sca: tcc att acc aga agt cga aag; CHS-RV-Sca: ttc caa tca gaa atg cct aa; F3H-FW-Sca: aat gcg ata gtg tat ccg tta a; F3H-RV-Sca: caa gca aga att tcc tca atg; ANS-FW-Sca: gca ctg act ttc atc ctc cac; ANS-RV-Sca: tct tgt act ttc cgt tgc tta g; C3H-FW-Sca: tga aga cac tct cat tgg ctt ac; C3H-RV-Sca: cag cct tag tgc ttc ctt gg; ARNr 5.8S-FW: caa cgg ata tct cgg ctc tc; ARNr 5.8S-RV: ttg cgt tca aag act cga tg.

3.4 EXTRACCIÓN DE ARN

Se extrajo ARN total del fruto de *S. caripense* mediante el conjunto de reactivos *innuPREP Plant RNA* (Analytik Jena) (Anexo 7) y *PureLink® ARN Mini Kit* (Life) (Anexo 8), seguidamente se determinó su calidad y concentración.

La calidad o pureza de ácidos nucleicos se determinó mediante espectrofotometría, con el equipo NanoDrop One (Thermo Scientific™), mediante la razón entre densidad óptica (D.O.) medida a longitudes de onda de 260 y 280 nm para la relación entre absorbancias (Abs.) de ácidos nucleicos y proteínas en la muestra; así como, 260 y 230 nm para la relación entre absorbancias de ácidos nucleicos y otros contaminantes tales como fenoles o tiocianato de guanidina residuales. La concentración de ARN total y ADN complementario (ADNc) se determinó mediante el uso de fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher) y espectrofotómetro NanoDrop One, según especificaciones de los equipos.

Se obtuvo la calidad y concentración de las muestras de ARN total de *S. caripense* (Anexo 9); considerando que $D.O._{260} = 1.0$ equivale a aproximadamente 40 µg/mL de ARN y que 280 nm corresponde al pico máximo de absorción para proteínas; se menciona que la relación Abs_{260}/Abs_{280} con valor aproximado entre 2.0 y 2.2 indica que el ARN es de alta calidad (óptimo) y libre de impurezas (Almansa 2013; Lucca 2011), valores $Abs_{260}/Abs_{280} > 1.7$ corresponden a pureza aceptable, y $Abs_{260}/Abs_{280} < 1.7$ es indicativo de contaminación por presencia de compuestos aromáticos (bancoadn.org). Mientras que, la relación Abs_{260}/Abs_{230} con valor entre 2.0 y 2.2 sugiere que la muestra de ARN no contiene fenoles o tiocianato de guanidina residuales (Matlock 2015); generalmente es aceptable si $Abs_{260}/Abs_{230} > 1.5$ (bancoadn.org).

A fin de eliminar restos contaminantes en las muestras de ARN, se aplicó ADNasa I que evita amplificación de ADN genómico (ADNg) coeluido (Stephenson 2012), y minimiza sobreestimación de la expresión génica (falsos positivos) debido a fragmentos amplificados de origen distinto al ADNc de interés (Rivas 2010; Lucca 2011). El conjunto de reactivos *5X All-In-One RT MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit)* (Applied Biological Materials Inc.) incluye tratamiento con ADNasa I; se descongeló ARN y reactivos en hielo y a temperatura ambiente, respectivamente y se preparó reacciones con 5.0 µL de ARN, 2.0 µL de *AccuRT Reaction Mix (4X)* y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 8 µL. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se añadió 2.0 µL de *AccuRT Reaction Stopper (5X)*. Se obtuvo ARN purificado.

3.5 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA

La síntesis de ADNc mediante retrotranscripción a partir de ARN total de *S. caripense*, se llevó a cabo añadiendo al tubo 4 µL de *5X All-In-One RT MasterMix* que contiene la enzima *OneScript RTase*, 6 µL de agua libre de nucleasas, llegando a un volumen final de 20 µL. Se incubó en el termociclador a 25 °C por 10 minutos, luego a 42 °C durante 15 minutos, y se inactivó la reacción a 85 °C durante 5 minutos; se enfrió en hielo y almacenó la muestra a -20 °C.

Se obtuvo la calidad y concentración de las muestras de ADNc de *S. caripense* (Anexo 10); considerando que $D.O_{260} = 1.0$ equivale a aproximadamente 50 µg/mL de ADN bicatenario (Barbas III *et al.* 2001), según programa control de calidad, la relación Abs_{260}/Abs_{280} con valor entre 1.8 y 2.0 demuestra que el ADN es óptimo en pureza, si el valor es de al menos 1.6 es indicativo de calidad aceptable, si es menor a 1.6 posiblemente se debe a contaminación por compuestos aromáticos como proteínas, y $Abs_{260}/Abs_{280} > 2.1$ sugiere presencia de ARN en la muestra. Mientras que, para el ratio Abs_{260}/Abs_{230} un valor entre 1.5 y 2.2 se considera como ADN puro, y si el valor es menor a 1.5 se sugiere presencia de contaminantes tales como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos (bancoadn.org).

3.6 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA

RT-PCR en volumen final de 10 µL; en cada reacción se utilizó 1.0 y 2.0 µL de ADNc mezclado con 1.0 µL de buffer PCR 10X, 1.0 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0.4 µL de dNTPs (10 mM), 0.4 µL de iniciadores específicos sentido y antisentido (10 µM), 0.2 µL de *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN polimerasa y agua grado molecular. El programa de

amplificación (Eppendorf Thermocycler) comprende un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos; parámetros cíclicos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamientos a temperatura adecuada (52, 55 y 60 °C) por 30 segundos y extensión a 72 °C por 15 segundos, durante 40 ciclos; y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

RT-qPCR en volumen final de 10 µL; por reacción se utilizó 1.0 µL de ADNc (750 ng/µL) mezclado con 5.0 µL de *BrightGreen 2X qPCR MasterMix* (Applied Biological Materials Inc.), 0.3 µL de iniciadores (10 µM) y agua libre de nucleasas. Para la amplificación en el termociclador (QuantStudio® 3) se activó la enzima ADN polimerasa *HotStart* a 95 °C por 10 minutos; seguido de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y alineamientos a temperatura adecuada (60 °C) por 60 segundos durante 40 ciclos. Al final de la reacción, se verificó la amplificación específica de fragmentos génicos mediante curva de disociación. Se exportó el valor C_T de las muestras (QuantStudio™ Design & Analysis Software) a una hoja para el cálculo en Microsoft Excel®, y la expresión relativa se determinó con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen 2001; Dorak 2006; Rivas 2010); donde $\Delta\Delta C_T = (C_{T,C3H} - C_{T,ARNr})_{tiempo\ x} - (C_{T,C3H} - C_{T,ARNr})_{tiempo\ 0}$; los valores de expresión de C3H se normalizaron con respecto al gen de referencia ARNr 5.8S, y se comparó los niveles de expresión del gen de interés relativo a un punto cero en el tiempo. La expresión relativa en cada nivel corresponde al promedio obtenido con cuatro repeticiones biológicas (\pm E.E., $n = 4$) (Zhang *et al.* 2014; Ballou *et al.* 2007; Payyavula *et al.* 2015), y tres réplicas técnicas, en las cuales los valores C_T se controlaron manualmente para D.E. > 0.5 (Stommel 2009).

3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La muestra para análisis de expresión del gen ANS en *S. caripense* consiste en 7 frutos de BIO-Ltg1 y 7 frutos de BIO-Cyb1, conservados en enfriamiento (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) proveniente de lámparas fluorescentes (1250 lx) durante catorce días; se extrajo ARN a partir de láminas finas de cáscara. La unidad experimental consiste en un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 45 µL de ARN. Los datos se disponen bajo un DCA con dos tratamientos (BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1) y siete observaciones por tratamiento; y el modelo estadístico lineal aditivo (Montgomery 2004). Se usó los paquetes estadísticos GelAnalyzer 2010 para análisis comparativos y Minitab 17 en el procesamiento de datos.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} es el valor observado en el i -ésimo tratamiento y la j -ésima repetición; μ el efecto de la media general; τ_i el efecto del i -ésimo tratamiento; ε_{ij} el efecto del error experimental en el i -ésimo tratamiento y la j -ésima repetición.

La muestra para análisis de expresión del gen C3H en *S. caripense* consiste en 12 frutos de IBT-Lib1, conservados a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados durante catorce días; se removi6 láminas delgadas de pulpa para extraer ARN. La unidad experimental consiste en un tubo eppendorf de 1.5 mL conteniendo 45 μ L de ARN. Los datos se disponen bajo un DCA, el experimento se ensay6 primero con tres tratamientos (cero, cinco y catorce días) y cuatro repeticiones biol6gicas, y luego tres r6plicas t6cnicas para el análisis con los valores promedio; el modelo estadístico corresponde al usado para el análisis anterior. Se us6 los paquetes estadísticos InfoStat 2018, Minitab 17 y RStudio 1.2.1335.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

A partir de datos previamente estandarizados, se muestra la matriz de similitud para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense* (Cuadro 4), tras aplicación del coeficiente de distancia MCD (Crisci y López 1983):

Cuadro 4. Matriz de distancia para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense* obtenida mediante el coeficiente MCD.

	Cyb1	Cyb2	Cyb3	Ltg1	Ltg2	Ltg3	Ayb1	Lib1	Lim1
Cyb1	0.00								
Cyb2	0.69	0.00							
Cyb3	0.46	0.49	0.00						
Ltg1	0.59	0.89	0.81	0.00					
Ltg2	0.55	0.27	0.34	0.62	0.00				
Ltg3	0.97	0.85	0.76	1.04	0.70	0.00			
Ayb1	1.10	1.28	1.21	1.35	1.55	1.57	0.00		
Lib1	0.96	1.18	0.94	1.32	1.03	1.14	1.40	0.00	
Lim1	0.83	1.52	1.04	1.05	1.25	1.12	1.03	1.50	0.00

El agrupamiento mediante enlace promedio (UPGMA) para la formación de conglomerados indica en el primer paso el mayor valor de similitud en el núcleo formado entre *S. caripense* BIO-Cyb2 y BIO-Ltg2, según la matriz de proximidades existe la menor distancia (0.27). A continuación se forma un grupo con el núcleo BIO-Cyb2 y BIO-Cyb3 en el segundo paso (0.41). En el tercer paso se incorpora BIO-Cyb1 al grupo BIO-Cyb2 (0.57). En el cuarto paso se une el grupo BIO-Cyb1 a BIO-Ltg1 (0.73). La unión del grupo BIO-Cyb1 con IBT-Ltg3 se realiza en el quinto paso (0.86). Posteriormente, se junta IBT-Ayb1 e IBT-Lim1 (1.03) formando otro núcleo, y el grupo BIO-Cyb1 se une con IBT-Lib1 (1.10) para el sexto y séptimo paso, respectivamente. Al final, el núcleo IBT-Ayb1 se incorpora al grupo BIO-Cyb1 del paso anterior (1.27) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Agrupamiento mediante enlace promedio para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense*.

Paso	Nivel de distancia	Unión de conglomerados	Nuevo conglomerado	Nº obs. nuevo conglomerado
1	0.27	Cyb2 - Ltg2	núcleo-Cyb2	2
2	0.41	n-Cyb2 - Cyb3	grupo-Cyb2	3
3	0.57	Cyb1 - g-Cyb2	grupo-Cyb1	4
4	0.73	g-Cyb1 - Ltg1	grupo-Cyb1	5
5	0.86	g-Cyb1 - Ltg3	grupo-Cyb1	6
6	1.03	Ayb1 - Lim1	núcleo-Ayb1	2
7	1.10	g-Cyb1 - Lib1	grupo-Cyb1	7
8	1.27	n-Ayb1 - g-Cyb1	grupo-Ayb1	9

Nota: Correlación cofenética = 0.88

El coeficiente de correlación cofenética (r_{xy}) con valor superior a 0.8 indica buena representación de la matriz de similitud por parte del fenograma (Sokal y Rohlf 1962).

4.1.1 ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

El fenograma correspondiente al análisis de conglomerados muestra que *S. caripense* BIO-Cyb2, BIO-Ltg2, BIO-Cyb3, BIO-Cyb1, BIO-Ltg1 y BIO-Ltg3 forman un conglomerado a un nivel de 0.86; mientras que, IBT-Ayb1 e IBT-Lim1 forman un núcleo a un nivel de 1.03; por su parte, IBT-Lib1 se incorpora al conglomerado anterior a un nivel de 1.10; y al final el núcleo se une al conglomerado con IBT-Lib1 al nivel 1.27 de distancia (Figura 4).

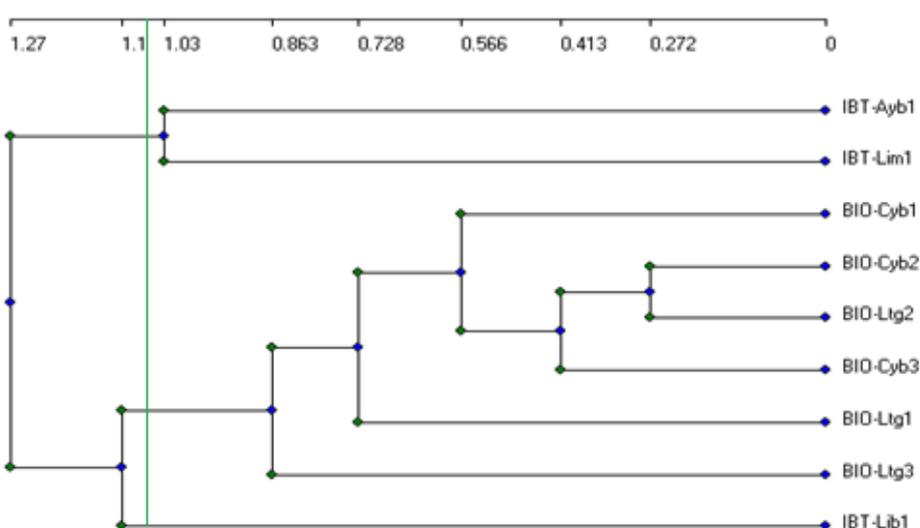


Figura 4. Fenograma correspondiente al análisis de conglomerados para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense*.

Los descriptores cualitativos que aportan más a la variabilidad en *S. caripense* son sabor de fruto, color de semilla, diámetro de semilla, color de corola, rayas en fruto, otros (Anexo 4, 5, 6); dichos caracteres representan fuentes de variación para el mejoramiento de especies cultivadas económicamente relevantes y estudios relacionados; la intervención de efectos tipo dominante (no aditivo) no regulados por el ambiente en la expresión fenotípica cualitativa corresponde a un modo de acción monogénico u oligogénico, y de alta heredabilidad (Camarena *et al.* 2012).

Se observa una separación de *S. caripense* IBT-Lib1 con respecto a las demás plantas, descrito por ausencia de rayas y mínima superficie de fruto cubierta por color adicional; por su parte, IBT-Ayb1 posee mayor densidad de pubescencia en el tallo, y color de hoja oscuro. BIO-Cyb2 presenta vigor y amplia superficie de fruto cubierta por color adicional, sabor dulce de fruto, de igual modo BIO-Ltg2. BIO-Ltg3 posee mayor dulzura en el fruto, menor superficie de fruto cubierta por color adicional, y semillas de menor tamaño comparado a BIO-Cyb3, BIO-Ltg2 y BIO-Cyb2 con semillas de mayor diámetro. BIO-Ltg1 se caracteriza por amplia superficie de fruto cubierta por color adicional, sabor moderadamente dulce, y corola morada en su mayor parte. IBT-Lim1 presenta fruto con mancha como consecuencia de plagas o enfermedades, sabor ácido y baja uniformidad en tamaño de fruto.

En la presente investigación el descriptor altura evaluado en plantas de *S. caripense*, se asemeja a lo mencionado previamente para accesiones de tzimbalo BIRM/S 1034, E-7, EC-40 y QL-013 (Herraiz 2015; Torrent 2014), es por ende similar en promedio y algo mayor a la altura de *S. catilliflorum* (P-80), *S. perlongistylum* (P-62), *S. tabanoense* (E-257) y *S. trachycarpum* (E-34), y superior si se compara con variedades cultivadas de pepino dulce (Sweet Long, Puzol, principalmente). Además, en *S. caripense* se observa escasas de protuberancia radicular en nódulo, mayor densidad pubescente de tallo, y más hojas compuestas, similar a las especies silvestres relacionadas (Herraiz 2015; Torrent 2014), y en el estudio presente se percibe que no todos los individuos de *S. caripense* presentan rayas en el fruto, un descriptor de amplia variabilidad, agronómicamente importante según lo mencionado para *S. muricatum* y especies silvestres relacionadas; las especies silvestres son fuente de variación para el mejoramiento genético de plantas cultivadas y para estudios acerca del proceso de domesticación (Herraiz 2015; Torrent 2014).

Los descriptores de reproducción sexual de *S. caripense* indican mayor ejerción del estilo, así como alta producción de polen y muchas semillas por fruto, así mismo en las especies silvestres relacionadas, lo cual contribuye a la polinización cruzada y dispersión de germoplasma, a diferencia de variedades cultivadas de pepino dulce (Herraiz 2015; Torrent 2014).

4.1.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

La matriz de correlación simple para descriptores cuantitativos de *S. caripense* muestra correlación alta entre longitud de nudos y longitud de peciolo, longitud de nudos y número de flores por inflorescencia, longitud de hoja y ancho de hoja, longitud de sépalo y ancho de fruto, longitud de estambre y ejerción del estilo, otros (Anexo 3). El acercamiento al ACP para descriptores cuantitativos de *S. caripense* explica el 91.88% de la varianza total hasta el cuarto CP, con valores eigen mayores a uno (Cuadro 6).

Cuadro 6: Análisis de componentes principales (valor eigen) para descriptores cuantitativos entre individuos de *S. caripense*.

Componente principal (CP)	Valor eigen	Total Acumulado	Varianza total (%)	Varianza total acumulada (%)
CP1	6.46	6.46	43.05	43.05
CP2	4.01	10.47	26.75	69.80
CP3	1.73	12.20	11.54	81.34
CP4	1.58	13.78	10.55	91.88
CP5	0.56	14.34	3.71	95.59
CP6	0.39	14.73	2.61	98.20
CP7	0.19	14.92	1.24	99.44
CP8	0.08	15	0.56	100
CP9	3.26E-7	15	2.17E-6	100
CP10	1.33E-7	15	8.86E-7	100
CP11	7.15E-7	15	4.76E-7	100
CP12	4.16E-8	15	2.77E-7	100
CP13	-1.17E-8	15	-7.79E-8	100
CP14	-1.66E-7	15	-1.10E-6	100
CP15	-4.06E-7	15	-2.70E-6	100

El primer y segundo componente del ACP para descriptores cuantitativos de *S. caripense* (Figura 5), representan el 43.05% y 26.75% del total de la variación, respectivamente.

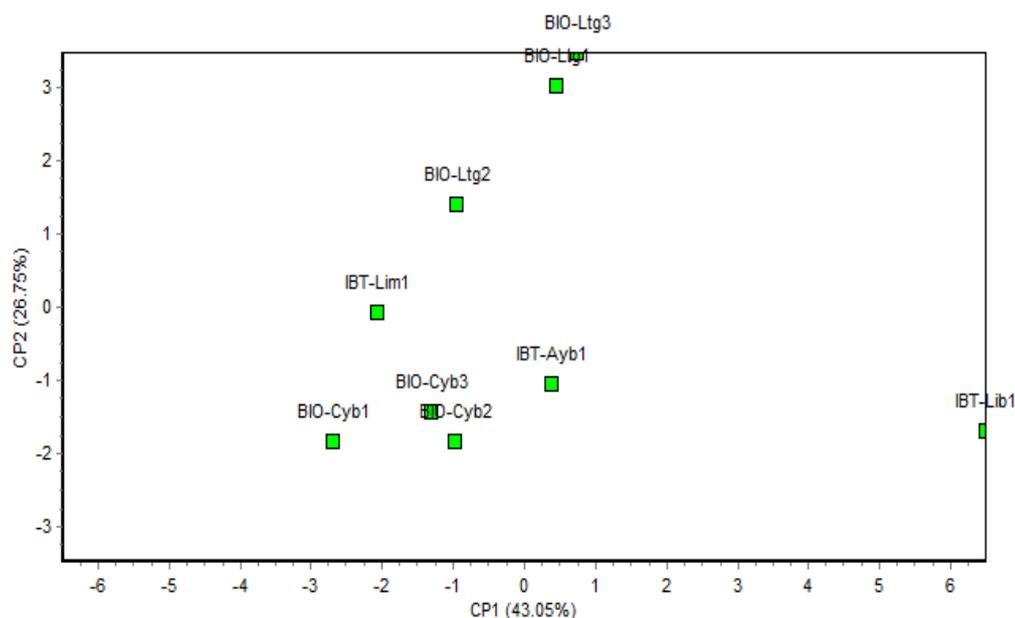


Figura 5. Diagrama correspondiente al análisis de componentes principales para descriptores cuantitativos entre individuos de *S. caripense*.

A continuación se muestra los descriptores cuantitativos analizados y su contribución relativa en los CP (Cuadro7). También se realizó ACP para descriptores cualitativos de *S. caripense* (Anexo 4, 5, 6).

Cuadro 7: Coeficientes de contribución relativa para descriptores cuantitativos entre individuos de *S. caripense* en los cuatro primeros componentes principales.

Descriptor	CP1	CP2	CP3	CP4
LongNudos	-0.21	-0.36	0.04	-0.29
LongPeciole	-0.26	-0.14	0.12	-0.48
LongHoja	0.03	-0.41	-0.15	0.37
AnchHoja	-0.11	-0.40	-0.33	0.24
LongH/AnchH	0.27	0.10	0.41	0.15
LongSepalo	0.21	-0.35	0.29	-0.03
LongEstamb	-0.21	-0.31	0.37	0.17
Exerción	-0.29	-0.10	0.19	0.40
LongFruto	0.35	-0.23	0.03	-0.06
AnchFruto	0.27	-0.28	-0.04	-0.32
LongF/AnchF	0.32	-0.10	0.16	0.32
LongPlac	0.37	-0.11	0.04	-0.07
AnchPlac	0.35	-0.06	0.05	-0.20
NumFoliolos	-0.22	0.00	0.61	-0.09
NumFlorInflor	-0.17	-0.35	-0.13	-0.15

El primer CP se correlaciona positivamente (valores ≥ 0.15) con radio longitud de hoja/ancho de hoja, (0.27), longitud de sépalo (0.21), longitud de fruto (0.35), ancho de fruto (0.27), radio longitud de fruto/ancho de fruto (0.32), longitud de área placentar interna (0.37) y ancho de área placentar interna (0.35); y negativamente con longitud de entrenudos (-0.21), longitud de peciolo (-0.26), longitud de estambre (-0.21) y ejerción del estilo (-0.29). El segundo componente no se correlaciona positivamente; y negativamente se correlaciona con longitud de entrenudos (-0.36), longitud laminar de hoja (-0.41), ancho laminar de hoja (-0.40), longitud de sépalo (-0.35), longitud de estambre (-0.31), longitud de fruto (-0.23), ancho de fruto (-0.28) y número de flores pro inflorescencia (-0.35) para valores absolutos ≥ 0.15 .

El primer componente se correlaciona mayormente con longitud de fruto, longitud de área placentar interna, ancho de área placentar interna, longitud de sépalo, etc.; los descriptores evaluados tienen efecto de tipo aditivo, son cuantitativos y regulados por el ambiente de modo poligénico. Siendo entonces óptimo, la evaluación de éstos caracteres mediante descomposición de la varianza en sus efectos genotípicos, ambientales, e interacciones, según la forma de reproducción de las plantas, con un método de mejoramiento genético referente a la especie (Camarena *et al.* 2012); para accesiones de *S. caripense* se aplica el método de cruas y retrocruas con pepino dulce, pues permite la estimación de heredabilidad para descriptores de relevancia agronómica como el contenido de sólidos solubles y ácido ascórbico (Rodríguez *et al.* 2003), y otros caracteres destinados la mejora de la calidad del fruto determinados por genes candidatos (Herraiz *et al.* 2016).

En el ACP realizado en *S. muricatum* y especies silvestres relacionadas (Herraiz 2015; Torrent 2014), el primer componente principal representa 29.7% de la variación total; se correlaciona positivamente con características de crecimiento de la planta (longitud de tallo a la primera inflorescencia, longitud de entrenudos, número de hojas desde el suelo hasta la primera inflorescencia); y negativamente con caracteres de tamaño de fruto (longitud de fruto, ancho de fruto, longitud de área placentar interna y ancho de área placentar interna). El segundo componente principal representa 11.8% de la variación total y se correlaciona positivamente con ancho laminar de hoja; y negativamente con longitud laminar de hoja. El ACP representa un paso intermedio para análisis posteriores, siendo un método estadístico de simplificación y reducción de la dimensión de un conjunto de datos con numerosas variables (Vidal 2002).

4.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Se obtuvo la calidad y concentración de las muestras de ARN de *S. caripense* (Anexo 9). Se extrajo ARN total del fruto de *S. caripense*, pues al aislar ARNm es probable que la cola poli-A se contamine o degrade, y es complicado confirmarlo en gel de agarosa (Colonna-Romano *et al.* 1998). Sin embargo, el ARNm se observa como un barrido comprendido entre 1500 y 500 pb, correspondiente a diferentes fragmentos de expresión génica, y no presenta las dos bandas ribosomales, características de ARN total (González y López 2008). El ARN total eucarionte está constituido por aproximadamente 80% de ARNr (28S, 5S, 5.8S y 18S), 5% de ARNm y 15% de ARNt (Amaru *et al.* 2008).

La electroforesis en gel de agarosa se emplea para evaluar integridad del ARN; así se sugiere en estudios sobre papa y olluco, en los cuales se utiliza agarosa en concentraciones de 0.7 y 1.2% (p/v), respectivamente (Romero y Estrada 2005; Araujo y Rao 2013). El tampón para electroforesis TAE (Tris-Acetato-EDTA) con pH 8.0 (alcalino) ioniza grupos fosfato y mantiene la carga negativa del ARN. El bromuro de etidio 1% (v/v) tiñe el ARN pues interacciona favorablemente con la región hidrófoba de ácidos nucleicos y permite observar bajo luz UV, bandas correspondientes a ARN (López 2008). Se puede mencionar investigaciones en las cuales la integridad de ARN total, para tomate (Rivas 2010), chile (Gasca *et al.* 2008) y olluco (Romero y Estrada 2005), permite observar bandas correspondientes a ARNr 28S y ARNr 18S.

4.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO CON RETROTRANSCRIPTASA

Se obtuvo la calidad y concentración de las muestras de ADNc de *S. caripense* (Anexo 10).

4.4 RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR SEMICUANTITATIVA Y RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDO DE PCR CUANTITATIVA

Se analizó ARN total del fruto de *S. caripense* por medio de RT-PCR, utilizando 2 μ L ADNc (10 y 100 ng/ μ L), muestra a través de electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio visto bajo luz UV, fluorescencia correspondiente a transcritos CHS (207 pb), F3H (212 pb) y ANS (145 pb) asociados a la ruta a biosintética de antocianinas, y del gen de referencia ARNr 5.8S (100 pb), confirmado por el marcador de peso molecular (MP) 100 bp *Opti-DNA Marker* (Applied Biological Materials Inc.). Se observó que CHS, F3H y ANS se expresan preferencialmente en *S. melongena* y *S. muricatum* (Figura 6), y sus transcritos se detectan a determinadas concentraciones en *S. caripense*.

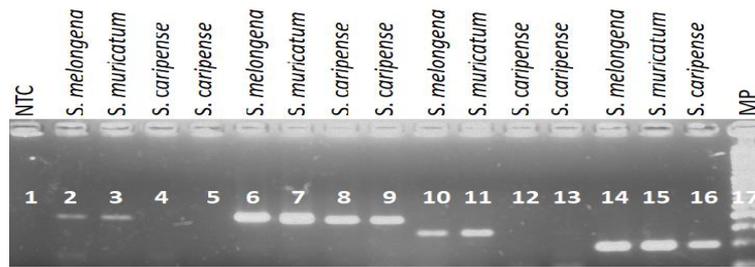


Figura 6. Expresión génica de CHS (207 pb), F3H (212 pb) y ANS (145 pb) asociados a la ruta biosintética de antocianinas en el fruto de *S. melongena*, *S. muricatum* y *S. caripense*. Carril 1: NTC; carriles 2-5: CHS; carriles 6-9: F3H; carriles 10-13: ANS; carriles 14-16: ARNr (100 bp); carril 17: MP.

La biosíntesis de antocianinas en plantas se estimula por factores como luz (Lancaster 1992), temperatura (Mori *et al.* 2005), fitohormonas (Mori *et al.* 1994), y otros; éstos factores influyen en el valor nutritivo de las plantas y usos derivados, y son objeto importante de investigación en *S. melongena*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicon* y especies relacionadas.

Los genes estructurales CHS, CHI y F3H se expresan tempranamente en respuesta a la inducción por enfriamiento, antes que los tardíos F3'H, F3'5'H, DFR, ANS y UFGT. La acumulación de chalconas en tejidos vegetales es rara, se isomerizan rápidamente por CHI para formar naringenina (Holton y Cornish 1995); en el fruto de *Capsicum annuum* línea 06C59 la expresión de CHS es notablemente menor respecto a DFR y ANS (Stommel *et al.* 2009). El mayor nivel de expresión génica en *S. melongena* se observa en cáscara del fruto, excepto por F3H que alcanza alto nivel de expresión en el tallo y no muestra correlación con el contenido de antocianinas (Jiang *et al.* 2016). En *S. pinnatisectum* silvestre el nivel de expresión de F3H es prominente en la flor, incrementa en cáscara del tubérculo en condiciones controladas de luz y temperatura, y se relaciona a la acumulación de antocianinas (Qi-Neng y Qing 2006). La expresión de CHI, F3'5'H, DFR y ANS depende totalmente de la luz (Jiang *et al.* 2016); los transcriptos DFR y ANS son requeridos para la producción de antocianinas (Stommel *et al.* 2009).

Se identificó la expresión génica de F3H en cáscara del fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1, utilizando en cada reacción 2 µL de ADNc (100 ng/µL) y alineamiento de iniciadores a 52 °C; la expresión en los días de exposición a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados se diferenció visualmente por definición e intensidad de fluorescencia en los transcriptos; se observó bandas de 212 pares de bases (pb) (Figura 7).



Figura 7. Expresión génica de F3H (212 pb) en el fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados. Carriles 1-7: 100 ng/ μ L ADNc; carril 8: 10 ng/ μ L ADNc día 14; carril 9: NTC; carril 10: MP.

La expresión génica de F3H en *S. caripense* BIO-Ltg1 parece aumentar levemente transcurridos cinco días de exposición a condiciones poscosecha, y después de catorce días se observó transcritos F3H definidos e intensos.

En forma similar, al mecanismo molecular inducido por luz (16 h día/8 h noche) y temperatura (8 °C) para acumulación de antocianinas en tubérculos de *S. pinnatisectum* (Qi-Neng y Qing 2006), mediante RT-PCR se muestra que la expresión de F3H incrementa gradualmente conforme avanza el tiempo en condiciones controladas, se mantiene tenue los tres primeros días y alcanza nivel de saturación en veinte días; sugiriendo que la expresión de F3H inducida por luz y baja temperatura se relaciona muy de cerca a la acumulación de pigmentos en cáscara del tubérculo de *S. pinnatisectum*, y que además F3H se trataría de un gen que codifica para una enzima estructuralmente estable.

No obstante, considerando un incremento de transcritos F3H en *S. caripense* BIO-Ltg1, se menciona que la expresión temprana del gen estructural F3H se correlaciona positivamente con el aumento del contenido de antocianinas en el tubérculo de *S. tuberosum*, y es distinto para el fruto de especies como *S. melongena*, *S. lycopersicon* y *Capsicum spp.* (Liu *et al.* 2018); indicativo de que llegado a F3H en la ruta metabólica, el accionar enzimático puede seguir o redirigirse y tomar otros caminos aparte de aquel destinado para la acumulación de antocianinas, como la formación de flavonoles (kaempferol) en presencia de flavonol sintasas (Tanaka *et al.* 2008).

Además, se identificó la expresión génica de ANS en cáscara del fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1, utilizando por cada reacción 1 μ L de ADNc (750 ng/ μ L) y alineamiento de iniciadores a 55 °C; la expresión en los días de exposición a temperatura y

fotoperiodo controlados se diferenci3 por definici3n e intensidad de los transcriptos; se observ3 bandas de 145 pb (Figura 8).

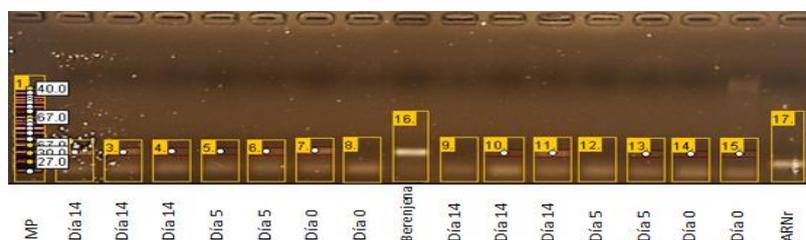


Figura 8. Expresi3n g3nica de ANS (145 pb) en el fruto *S. caripense* BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados. Carril 1: MP; carriles 2-8 y 9-15: 750 ng/ μ L ADNc; carril 16: *S. melongena*, 100 ng/ μ L ADNc d3a 0; carril 17: ARNr (100 pb).

Para amplicones menores a 150 bp, a veces se observa bandas d3biles y difusas que migran delante de la mayor3a de bandas espec3ficas en gel de agarosa, estas bandas son la versi3n superestructurada o de una sola cadena de los amplicones espec3ficos en estado de equilibrio, consideradas espec3ficas (Dorak 2006).

Por su parte, la expresi3n del gen estructural ANS se correlaciona positivamente con el aumento del contenido de antocianinas en tub3rculo de *S. tuberosum*, y en fruto de *S. lycopersicon*, *S. melongena* y *Capsicum spp.* (Liu *et al.* 2018), adem3s ANS es requerido para la producci3n de pigmentos caracter3sticos de antocianinas (Stommel *et al.* 2009).

4.5 AN3LISIS ESTAD3STICO

- An3lisis de varianza (ANVA)

El an3lisis comparativo de la intensidad de bandas en gel de agarosa, tomando como referencia bandas de concentraci3n conocida del MP (ng), permite la cuantificaci3n de la expresi3n g3nica de ANS en el fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1; el ANVA no diferenci3 significativamente la expresi3n g3nica de ANS, valor-p = 0.206 (Cuadro 8).

Cuadro 8: ANVA para expresi3n g3nica de ANS en el fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1.

Fuente de Variaci3n	G.L.	C.M.	Valor-p
Planta (<i>S. caripense</i>)	1	393.6	0.206
Error experimental	9	211.5	
Total	10		

Cuadro 8: Continuación

Comparación de medias			
<i>S. caripense</i>	Media	Bandas (n)	E.E.
BIO-Ltg1	48.20 A	6	6.50
BIO-Cby1	36.19 A	5	5.94

Nota: letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (valor-p < 0.05).

La naturaleza del gel en algunos casos interviene al no mostrar bandas definidas; geles de poliacrilamida aportarían mayor resolución; o podría tratarse de reacciones aberrantes que influyen en la identificación, cuantificación y análisis. RT-qPCR representa una herramienta de mayor especificidad.

Las plantas de ecotipos, BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1 de origen ecuatoriano son fenotípicamente aquellas con mayor cobertura de color adicional y rayas longitudinales en el fruto, correspondiente a expresión de pigmentos antociánicos identificados en *S. caripense* por medio de RT-PCR.

Se confirmó la expresión génica de C3H asociado a ruta biosintética de ácido clorogénico y del gen de referencia ARNr 5.8S en pulpa del fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 de origen peruano; con 1 µL de ADNc (750 ng/µL) y alineamiento de iniciadores a 60 °C, se observó bandas de transcritos C3H desprovistos del segundo intron, en línea de aproximadamente 250 pb (400 bp a partir de ADNg (Gramazio *et al.* 2014)). Después se realizó qPCR.

En el análisis de expresión génica de C3H en el fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 mediante RT-qPCR, se monitoreó los niveles de transcritos inducidos por exposición a condiciones de temperatura y fotoperiodo controlados. La expresión del gen de referencia ARNr 5.8S se evaluó mediante el término $2^{-\Delta C_T} = (C_{T, tiempo\ x} - C_{T, tiempo\ 0})$, y valor-p = 0.1649, indicando que la expresión no es significativamente diferente transcurridos cero, cinco y catorce días de exposición a condiciones controladas (Cuadro 9).

Cuadro 9: ANVA relacionado al término $2^{-\Delta C_T}$ para expresión génica de ARNr 5.8S en el fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.

Fuente de Variación	G.L.	C.M.	Valor-p
Temperatura y fotoperiodo (días)	2	0.25	0.1649
Error experimental	9	0.11	
Total	11		

El valor medio del cambio en expresión génica de C3H fue 1.08 en el día cero, 2.49 a los cinco días y 10.84 transcurridos catorce días (escala lineal, asimétrico); el valor medio del cambio en expresión génica en el punto cero debe ser cercano a la unidad, un valor muy diferente sugiere error en la hoja de cálculo o alto grado de variación experimental (Livak y Schmittgen 2001) (Cuadro 10).

Cuadro 10: Valor medio del cambio en expresión génica de C3H en el fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.

Gen	T y F (días)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Medio	Log2 Medio	Log2 E.E.	Log2 D.E.	C.V. (%)
C3H	0	1.08	3.32	0.33	0.66	19.96
C3H	5	2.49	4.52	0.34	0.68	15.01
C3H	14	10.84	6.24	0.73	1.46	23.47

El ANVA para valores log2-transformados (escala logarítmica, simétrico) (Hellemans y Vandesompele 2011; Little y Hills 1978), diferenció significativamente la influencia de condiciones poscosecha sobre los niveles de expresión génica de C3H en pulpa del fruto de *S. caripense* IBT-Lib1, valor-p = 0.0085 (Cuadro 11).

Cuadro 11: ANVA para expresión génica de C3H en el fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados.

Fuente de Variación	G.L.	C.M.	Valor-p
Temperatura y fotoperiodo (días)	2	8.60	0.0085
Error experimental	9	1.01	
Total	11		

- Prueba Shapiro-Wilks para normalidad de errores

H_p: Los errores presentan una distribución normal.

H_a: Los errores no presentan una distribución normal.

W = 0.9727; valor-p = 0.9377

Con valor-p de 0.9377 se acepta la hipótesis planteada y se puede afirmar que los errores presentan una distribución normal.

- Prueba Bartlett para homocedasticidad de varianzas

Hp: $s_1^2 = s_2^2 = \dots s_m^2 = s^2$

Existe homocedasticidad de varianzas.

Ha: $s_1^2 \neq s_2^2 \neq \dots s_m^2 \neq s^2$

No existe homocedasticidad de varianzas.

Bartlett's K-squared = 2.3034, df = 2, p-value = 0.3161

Con valor-p de 0.3161 se acepta la hipótesis planteada y se puede afirmar que existe homocedasticidad de varianzas entre los tratamientos o puntos experimentales.

- Prueba Tukey para comparación de medias

El valor medio del cambio en expresión génica de C3H en *S. caripense* IBT-Lib1 tras catorce días (6.24 ± 0.73) de exposición a temperatura y fotoperiodo controlados es significativamente diferente de aquel calculado para cero días (3.32 ± 0.33), y similar para cinco días (4.52 ± 0.34) (Figura 9); la expresión génica de C3H incrementa en 2.92 unidades transcurridos catorce días de exposición a condiciones poscosecha.

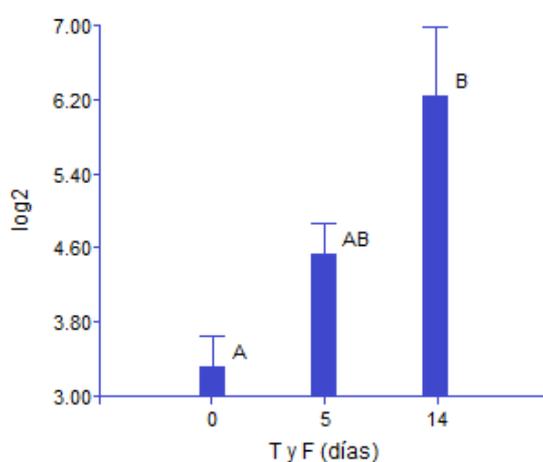


Figura 9. Expresión génica de C3H (media ± E.E., n = 4) en el fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 expuesto a temperatura (10 ± 2 °C) y fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) controlados. Valores log2-transformados, del análisis de cuantificación relativa basado en el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$; letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (valor-p < 0.05).

En investigaciones anteriores, se menciona que el nivel de transcritos C3H en tubérculo de *S. tuberosum* variedades andinas Sipancachi, SS-2613, Huata Colorada, Sullu y Guincho Negra incrementa drásticamente tras dos semanas de almacenamiento a 10 °C en oscuridad, luego de exposición a cincuenta y ocho días de estrés por sequía durante tuberización; el incremento de expresión del gen C3H en Huata Colorada concuerda con el contenido de CGA debido a sequía (André *et al.* 2009); además, el nivel de expresión génica de C3H en *S. tuberosum* incrementa en 2.4 unidades al inducirse la biosíntesis de CGA con sacarosa 120 mM (Payyavula *et al.* 2015).

V. CONCLUSIONES

La descripción morfológica de *S. caripense* a través de AC y ACP indica que los descriptores de mayor aporte a la variabilidad principalmente son sabor de fruto, diámetro de semilla, color de corola, rayas longitudinales en fruto, longitud de fruto, longitud y ancho de área placentar interna, los cuales muestran mayor variación entre plantas de *S. caripense* y son agronómicamente distintivos para utilizarlos en programas de fitomejoramiento.

La expresión génica de F3H y ANS identificada mediante RT-PCR en cáscara del fruto de *S. caripense* BIO-Ltg1 y BIO-Cyb1, y en pulpa del fruto de *S. caripense* IBT-Lib1, constituye un análisis aplicado a la exploración de genes candidatos para la posterior cuantificación de transcritos en tiempo real.

La expresión génica de C3H cuantificada por medio de RT-qPCR en pulpa del fruto de *S. caripense* IBT-Lib1 tras catorce días de exposición a temperatura y fotoperiodo controlados es significativamente diferente de aquella calculada para el día cero; posibilitando la selección de genotipos de buen comportamiento frente a distintas condiciones de cultivo.

Investigaciones previas en *S. tuberosum*, *S. melongena* y *S. muricatum* fundamentan los resultados obtenidos, para la mejora y desarrollo de modernas variedades; el abordaje de genes candidatos en trabajos de expresión génica para la introducción de *S. caripense* en programas de mejoramiento genético de plantas, representa una herramienta promisoriosa con enfoque en la conservación y aprovechamiento de los recursos andinos.

VI. RECOMENDACIONES

Al utilizar cámara de flujo laminar se reduce la contaminación en el aire, y se puede aplicar pretratamiento de luz UV a todo material dentro, a modo de evitar contaminación cruzada.

Existen factores de transcripción y genes que regulan la biosíntesis de antocianinas (MYB, bHLH y WD40, que forman el complejo MBW), se recomienda enfatizar en su estudio e investigación.

En el método de cuantificación relativa es recomendable probar varios genes de referencia.

El análisis de la factibilidad de proyectos relacionados a expresión de genes candidatos en *S. caripense* y especies relacionadas de interés comercial, industrial y biomédical.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almansa, R. 2013. Análisis del perfil de expresión génica en células de sangre periférica. *Epidemiología Molecular de enfermedades infecciosas*. En línea: <https://epidemiologiamolecular.com/analisis-perfil-expresion-genica-celulas-sangre-periferica>

Amaru, R., Peñaloza, R., Miguez, H., Torres, G. y Cuevas, H. 2008. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Revista – Cuadernos* 53(1):38-43

Anderson, G. J. 1979. Systematic and evolutionary consideration of *Solanum* section *Basarthrum*. En J. G. Hawkes, R. N. Lester, & A. D. Skelding (Eds.), *The biology and taxonomy of the Solanaceae* (págs. 549-562). Londres, Reino Unido: Linnean Society Symposium Series. 738 p.

Anderson, G. J. y Bernardello, L. M. 1991. The relationships of *Solanum cochoae* (Solanaceae), a new species from Peru. *Novon* 1:127-133

Anderson, G. J., Martine, C. T., Prohens, J., y Nuez, F. 2006. *Solanum perlongistylum* and *S. catilliflorum*, new endemic peruvian species of *Solanum*, section *Basarthrum*, are close relatives of the domesticated pepino, *S. muricatum*. *Novon*, 16(2):161-167

André, C., Schafleitner, R., Legay, S., Lefèvre, I., Alvarado, C., Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J., Larondelle, Y., y Evers. D. 2009. Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry* 70:1107–1116

Araujo, T. y Rao, R. 2013. Expresión del gen prosistemina de tomate en papa (*Solanum tuberosum*). *Agrociencias Amazonía* 1(1):11-25

Arias, A. 2007. Transformación Genética de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Tesis de grado). Quito, Ecuador, USFQ. 61 p.

Ballou, S., Yun, K., Cheng, C., y de los Reyes, B. 2007. Cold sensitivity gradient in tuber-bearing *Solanum* based on physiological and transcript profiles. *Crop Science* 47:2027-2035.

Banco Nacional de ADN Carlos III (bancoadn.org). Plataforma en red. Programa control de calidad de muestras. Salamanca, España: USAL. 6 p.

Barbas III, C., Burton, D., Scott, J y Silverman, G. 2001. Quantification of DNA and RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Bithell, S. L. *et al.* 2002. Germination requirements of laboratory stored seeds of *Solanum nigrum* and *Solanum physalifolium*. *New Zealand Plant Protection* 55:222-227

Blas, R. Gutiérrez, L., Flores, J. y Berrocal, A. 2010. Curso: Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de plantas. Lima, Perú. UNALM-IBT. 13 p.

Borrego, F., Fernández, J., López, A., Parga, V., Murillo, M., y Carvajal, A. 1999. Correlación y componentes principales de variación en variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomía Mesoamericana* 10(2):01-06

Bustin, S. 2002. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR: Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29(1):23–39

Camarena, F., Chura, J y Blas, R. 2012. Mejoramiento Genético y Biotecnológico de Plantas. UNALM/AGROBANCO. 278 p.

Chavarry, B. 2014. Caracterización morfológica de una muestra de accesiones de maíces peruanos del banco de germoplasma de maíz (*Zea mays* L.) de la UNALM. Tesis Mg. Sc. Mejoramiento genético de plantas, Univ. Nac. Agraria La Molina. Lima Perú. 100 p.

Chiluisa-Utreras, V., Vaca, I., Chicaiza, O y Peñaherrera, S. 2017. Analysis of the expression of β -actin, RuANS and RuMYB10 genes involved in the biosynthesis of anthocyanin using RT-qPCR in *Rubus niveus* in the Rumiñahui Canton. Journal of Berry Research 7(3):195-201

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., y Rutter, W. Z. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. Biochem. 18, 5294-5299

Crisci, J. y López, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, DC. 102 p.

Colonna-Romano, S., Leonte, A. y Maresca, B. 1998. Differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR). Edit Springer-Verlag. Berlin-Alemania. 108 p.

Correll, D.S. 1967. Flora of Perú. Field Museum of Natural History. Volume VIII, Parte V-B, Number 2. 458 p.

Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y. y Agrawal, G. 2007. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. Current Genomics 8:234-251

de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., y Balslev (Eds.). 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. 949 p.

Dhar, M., Sharma, R., Koul, A. y Kaul, S. 2014. Development of fruit color in Solanaceae: a story of two biosynthetic pathways. Briefings in Functional Genomics. 14(3):199-212

Díaz-Alonso, C. 2013. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 29(3):298-303

Dorak, M. (Ed.). 2006. Real-time PCR. Advanced methods. School of Clinical Medical Sciences (Child Health), Newcastle University, UK. Taylor & Francis Group. 333 p.

- Dorak, M. 2012. Real-time PCR troubleshooting. Florida International University. Florida, USA.
- Egúsqüiza, R. 2000. La papa, producción, transformación y comercialización. Proyecto MSP. UNALM/ADEX. USAID. Lima Perú. 192p.
- Egúsqüiza, R. 2008. La papa en el Perú: presente y futuro. En línea http://www.psi.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/biblioteca_exposiciones_Papa_En_EL_Peru.pdf
- Elguera, R. 2018. Segmentación de clientes de un casino utilizando el algoritmo partición alrededor de medoides (PAM) con datos mixtos. UNALM, Lima. 48 p.
- Fernández, P. 2011. Cuantificación mediante la técnica de PCR en tiempo real Usos y aplicaciones. Instituto de Biotecnología. CICVyA. INTA-Castelar.
- Feng, H., Huang, X., Zhang, Q., Wei, G., Wang, X. y Kang, Z. 2012. Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 51:116–122
- Fundora, Z., Díaz, M., Báez, M. y Soto, J. 1988. Análisis de los componentes principales de la variación en siete cultivares de cebolla. *Ciencias de la Agricultura* 33:78-81.
- Gachon, C., Mingam, A. y Charrier, B. 2004. Review Article: Real-time PCR: what relevance to plant studies?. *Journal of Experimental Botany* 55:1445-1454
- Gallardo, S. 2011. Evaluación de tres tipos de sustratos en la multiplicación de plantas endémicas con fines medicinales y el procesamiento en sobres de infusión. Obtenidas del sector de Buga Bajo comunidad Paquiestancia de la parroquia de Ayora (Tesis de grado). Cayambe, Ecuador, UPS. 117 p.
- Gasca, M., Rivera, Y., Torres, I., González, M., Guevara, L., Muñoz, C. y Guevara, R. 2008. Estudio del transcriptoma en *Capsicum chinense* jacq. resistente al virus huasteco vena amarilla del chile. *Agrociencia* 42:107-117

- González, C. y López, C. 2008. Construcción de una librería de ADNc en yuca: una herramienta para el desarrollo biotecnológico del cultivo. *Acta biol. Colomb.* 13(2):189-202
- Gower, J. 1967. A comparison of some methods of cluster analysis. *Biometrics* 23:623-628.
- Gramazio, P., Prohens, J., Plazas, M., Andjar, I., Herraiz, F., Castillo, E., Knapp, S., Meyer, R. y Vilanova, S. 2014. Location of chlorogenic acid biosynthesis pathway and polyphenol oxidase genes in a new interspecific anchored linkage map of eggplant. *BMC Plant Biology* 14:350
- Heiser, C. B. 1964. Origin and variability of the pepino (*Solanum muricatum*): A preliminary report. *Baileya* 12:151-158
- Heiser, C. B. 1969. *Solanum caripense* y el origen de *Solanum muricatum*. *Revista politécnica* 1(3):5-11
- Hellemans, J., Mortier, G., Coucke, P., De Paepe, A., Speleman, F. y Vandesompele, J. 2006. qBase: open source relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (submitted to *Biotechniques*).
- Hellemans, J. y Vandesompele, J. 2011. qPCR data analysis – unlocking the secret to successful results. *PCR troubleshooting and optimization: the essential guide*. Caister Academic Press 2011, ISBN 978-1-904455-72-1. 13 p.
- Herráiz, F. J. 2015. Desarrollo de herramientas morfológicas y genómicas para el estudio del pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies relacionadas. Caracterización de su valor nutracéutico (Tesis doctoral). Valencia, España, UPV. 229 p.
- Herraiz, F. J., Vilanova, S., Andújar, I., Torrent, D., Plazas, M., Gramazio, P. y Prohens, J. 2015. Morphological and molecular characterization of local varieties, modern cultivars and wild relatives of an emerging vegetable crop, the pepino (*Solanum muricatum*), provides insight into its diversity, relationships and breeding history. *Euphytica* 206(2):301-318
- Herraiz, F. J., Blanca, J., Ziarsolo, P., Gramazio, P., Plazas, M., Anderson, G., Prohens, J. y Vilanova, S. 2016. The first de novo transcriptome of pepino (*Solanum muricatum*):

assembly, comprehensive analysis and comparison with the closely related species *S. caripense*, potato and tomato. BMC Genomics 321:1-17

Holton, T., y Cornish, E. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7:1071-1083

Hotelling, J. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. J. Educ. Psychol. 24:417-498

Ibrahim, M. *et al.* 2001. Seed germination and graft compatibility of wild *Solanum* as rootstock of tomato. OnLine Journal of Biological Sciences 1(8):701-703

INIAP. 2003. Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae - Solanaceae, fenología, usos y recolección de germoplasma en el Sur del Ecuador. Estación Experimental Chuquipata, Granja Experimental Bullcay. 52 p.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., y White, T. J., editors. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc. pp. 315–322.

IPGRI, COMAV. 2004. Descriptors for pepino (*Solanum muricatum*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 48 p.

Jiang, M., Liu, Y., Ren, L. *et al.* 2016. Molecular cloning and characterization of anthocyanin biosynthesis genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). Acta Physiologiae Plantarum 38:163

Jørgensen, P. y León, S. 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Saint Louis, Missouri Botanical Garden Press. 1181 p.

Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthåhlberg, A., y Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27:95-125

Kumari, V. 2012. Molecular studies on soluble acid invertases in the potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. Tesis doctoral. India, Thapar University. 149 p.

- Lancaster, J. 1992. Regulation of skin color in apples. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:487-502
- León, A., Llinás H., y Tilano, J. 2008. Análisis multivariado aplicando componentes principales al caso de los desplazados. *Ingeniería y Desarrollo* 23:119-142
- Lightbourn, G., Griesbach, R., Novotny, J., Clevidence, B., Rao, D., y Stommel, J. 2008. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *Journal of Heredity* 99(2):105–111
- Little, T. y Hills, F. 1978. *Agricultural Experimentation: Design and Analysis*. Wiley.
- Livak, K. 2001. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. *User Bulletin #2*. PE Applied Biosystems.
- Livak, K. y Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402-408
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R., Marcelis, L., Visser, R. y Bovy, A. 2018. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry* 6:52
- López, J. 2008. Efecto de distintos niveles de luminosidad sobre la composición fenólica y la expresión génica de enzimas de la ruta fenilpropanoide de bayas de var. Carménere (Tesis de grado). Santiago, Chile, Universidad de Chile. 53 p.
- Lucca, A. 2011. Búsqueda de genes candidatos que controlen QTLs involucrados en la resistencia al estrés hídrico mediante el análisis de perfiles transcripcionales en especies silvestres de *Solanum* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. 183 p.
- Luo, M., Gao, Z., Li, H., Li, Q., Zhang, C., Xu, W., Song, S., Ma, C. y Wang, S. 2018. Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Scientific Reports* 8:4444
- Macías, K., Sánchez, F. y Aza, C. 2014. Laboratorio de biotecnología molecular. Reporte de prácticas: Extracción y purificación de ARN de plantas; Cuantificación de ARN por

espectrofotometría y visualización en gel de agarosa. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato.

Madroño, I., Rosero, J., Rodríguez, L., Navia, J. y Benavides, C. 2013. Caracterización morfoagronómica de genotipos promisorios de papa criolla (*Solanum tuberosum* L. Grupo Andigenum) en Nariño. *Temas Agrarios* 18(2):50-66

Malo, I., Bernacchia, G. y Arévalo, P. 2015. Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *Lycopersicon esculentum* L. a través de aplicación de sustancias químicas y naturales. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida* 21(1):61-68

Maniatis T, Fritsch EF y Sambrock, J. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Ed. 1982. Cold Spring Harbor. New York.

Mantilla, M. 2008. Transformación Genética de la Naranjilla, *Solanum quitoense*, mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Tesis de grado). Quito, Ecuador, USFQ. 69 p.

Marín, R. 2015. Semillas ticas de papa silvestre son preservadas en Noruega. Universidad de Costa Rica, Oficina de Divulgación e Información, Categoría: Agroalimentarias, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, CR, 16 dic.

Martínez-Cruz, N., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez González, A. y Morales-Rubio, M. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* schldl (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 42(4):66-71

Matlock, B. 2015. Assesment of nucleic acid purity. Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA. Technical Note 52646

Matsubara, K., Kaneyuki, T., Miyake, T., y Mori, M. 2005. Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *J. Agric. Food Chem.* 53:6272–6275

- Matsubayashi, M. 1991. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. In: Tsuchiya T, Gupta P (Eds.) Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Elsevier, Amsterdam, pp 93–118
- Mayr, E. 1965. Numerical phenetics and taxonomic theory. *Syst. Zool.* 14,73.
- Montgomery, D. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Universidad Estatal de Arizona. Editorial Limusa Wiley. 686 p.
- Morales, J. y Vaca, I. 2016. Propagación *in vitro* de tzímalo (*Solanum caripense* Dunal). *Revista Tecnológica ESPOL-RTE* 29(2):89-104
- Morales, M., Espinosa, G., Morales, R., Sánchez, B., Jiménez, A., Milián, Y. 2014. Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 16(1):62-73
- Mori, T., Sakurai, M., Seki, M. y Furusaki, S. 1994. Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *J. Food Agric.* 65:271-276
- Mori, K., Sugaya, S. y Gemma, H. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105:319-330
- Municipalidad Distrital de Suyo. Plan de desarrollo local del distrito de Suyo-Ayabaca al 2021. Situación actual y perspectivas de desarrollo bajo un enfoque estratégico. Disponible en www.munisuyo.gob.pe
- Murray, B. C., Hammett, K. R., y Grigg, F. D. 1992. Seed set and breeding system in the pepino *Solanum muricatum*, Ait., Solanaceae. *Scientia Horticulturae*, 49(1-2):83-92
- Nicot, N., Hausman, J., Hoffmann, L. y Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56(421):2907–2914

Niggeweg, R., Michael, A. y Martin, C. 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22:746–754

Payyavula, R., Shakya, R., Sengoda, V., Munyaneza, J., Swamy, P. y Navarre D. 2015. Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato: Rerouting phenylpropanoid flux in HQT-silenced lines. *Plant Biotechnology Journal* 13:551–564

Pensabene, G. 2009. Aplicación de la hibridación somática a la mejora de la citricultura española. Instituto Valenciano de Ciencias Agrarias, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

Peñañiel, M. 2003. Flora y vegetación de Cuicocha. Quito, Ecuador: Abya-Yala, UPS. 56 p.

Pinzón, A. 2007. Introducción al diseño “*in silico*” de primers. Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

Plazas, M., Andujar, I., Vilanova, S., Hurtado, M., Gramazio, P., Herraiz, F. y Prohens, J. 2013. Breeding for chlorogenic acid content in eggplant: interest and prospects. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 41(1):26-35

Primrose, S. B. y Twyman, R. M. 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics. Seventh Edition. Blackwell Publishing. 644 p.

Prohens, J., Soler, S., y Nuez, F. 1999. The effects of thermotherapy and sodium hypochlorite treatments on pepino seed germination, a crucial step in breeding programmes. *Annals of Applied Biology* 134(3):299-305

Prohens, J., Anderson, G. J., Rodriguez-Burruezo, A., y Nuez, F. 2003. Exploiting wild species for the genetic improvement of the pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Applied Botany* 77:21-27

Prohens, J., Rodriguez-Burruezo, A., Cámara, M., Torija, E. y Nuez, F. 2005. Morphological and physico-chemical characteristics of fruits of pepino (*Solanum muricatum*), wild relatives (*S.*

caripense and *S. tabanoense*) and interspecific hybrids: Implications in pepino breeding. *European Journal of Horticultural Science* 70(5):224-230

Prohens, J., Herraiz, F., Raigón, M., Vilanova, S., García-Martínez, M., Gramazio, Plazas, M., y Rodríguez-Burruezo, A. 2016. Fruit composition diversity in land races and modern pepino (*Solanum muricatum*) varieties and wild related species. *Food Chem.* 15(203):49-58

Qi-Neng, L. y Quing, Y. 2006. cDNA cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in wild potato (*Solanum pinnatisectum*). *African Journal of Biotechnology* 5(10):811-818

Quilo, M. 2012. Estudio de plantas medicinales en los sectores Rumiñahui y Atahualpa e implementación de un huerto demostrativo, Pijal-Imbabura. Tesis Ing. Agr. Ecuador, UPS. 110 p.

Quispe, C., Mansilla, R., Chacón, A. y Blas, R. 2015. Análisis de la variabilidad morfológica del “año” *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón procedente de nueve distritos de la región cusco. *Ecología Aplicada* 14(2):211-222

Reinoso, L. 2009. Especies botánicas de Latacunga: Descripción y usos. Quito, Ecuador: Herbario Alfredo Paredes (QAP), Escuela de Biología de la Universidad Central.

Rivas, F. 2010. Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis Ing. Biotecnología. Ecuador, ESPE. 101 p.

Robbins, R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51:2886–2887

Roche. 2010. Transcriptor universal cDNA master faster cDNA synthesis–On any RealTime-PCR instrument. Roche Diagnostics GmbH. Germany.

Rodríguez, A., Prohens, J. y Nuez, F. 2003. Wild relatives can contribute to the improvement of fruit quality in pepino (*Solanum muricatum*). *Euphytica* 129:311–318

Romero, M. y Estrada, R. 2005. Selección de fragmentos diferenciales de ADNc relacionados con estrés hídrico en *Ullucus tuberosus* Loz. (Bassellaceae) «olluco». Revista peruana de biología 12(1):135-140

Sambrook, J. y Ruseell, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. New Cork: CSHL press.

Samuels, J. 2015. Biodiversity of Food Species of the Solanaceae Family: A Preliminary Taxonomic Inventory of Subfamily Solanoideae. Resources 4:277-322

Sánchez-Otero, J. 2013. Introducción al Diseño Experimental. Quito, Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 254 p.

Sapir, M., Oren-Shamir, M., Ovadia, R., Reuveni, M., Evenor, D., Tadmor, Y., Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L., Meir, A. y Levin, I. 2008. Molecular aspects of anthocyanin fruit tomato in relation to high pigment-1. J. Hered. 99:292–303

Särkinen T., M. Baden, P. Gonzáles, M. Cueva, L.L. Giacomini, D.M. Spooner, R. Simon, H. Juárez, P. Nina, J. Molina y S. Knapp. 2015. Listado anotado de *Solanum* L. (Solanaceae) en el Perú. Revista peruana de biología 22(1):003-062

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M. e Iseki, K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int. J. Pharm. 403(1):136-138

Sneath, P. y Sokal., R. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification, Freeman, San Francisco, Ca., XV, 573 p.

Sokal, R. y Camin, J. 1965. The two taxonomies: áreas of agreement and conflict. Syst. Zool., 14,176

Sokal, R. y Michener, C. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38:1409-1438

Sokal, R. y Rohlf, F. 1962. The comparison on dendrograms by objective methods, Taxon 11, 33.

Sorensen, T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of vegetation on Danish commons. *Biologiske Skrifter*, 5:1-34.

Stephenson, F.H. 2012. Cálculo en biología molecular y biotecnología: guía de matemáticas para el laboratorio. Elsevier, Barcelona, segunda edición.

Stommel, J., Lightbourn, G., Winkel, B. y Griesbach, R. 2009. Transcription factor families regulate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134(2):244-251

Stommel, J. y Whitaker, B. 2003. Phenolic acid content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(5):704-710

Taab, A. 2009. Seed Dormancy and Germination in *Solanum nigrum* and *S. physalifolium* as Influenced by Temperature Conditions (Tesis doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences: Upsala

Tanaka, Y., y Ohmiya, A. 2008. Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:190–197

Tanaka, Y., Sasaki, N. y Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:733–749

Técnicas Avanzadas en Biología Molecular, ácidos nucleicos, extracción de ADN y ARN. 2001. Extraído el 16 de febrero, 2008 de: <http://www.upo.es/depa/webdex/biocel/Tecnicas/documentos/TAB-8.p>

Tello, V. 2016. Despliegue diferencial de genes candidatos del proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol (*Solanum betaceum* L.). Tesis Ing. Agr. Ecuador, UCE. 35 p.

Torrent, D. 2014. Caracterización morfológica y molecular en pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies silvestres relacionadas (Tesis de grado). Valencia, España: UPV. 48 p.

Van den Eynden, V., Cueva, E., y Cabrera, O. 1998. Plantas silvestres comestibles del sur del Ecuador. Quito, Ecuador: Abya-Yala, UPS. 220 p.

Vidal, C. 2002. El análisis de componentes principales como método de clasificación y visualización de tumores de partes blandas. IX Congreso Nacional de Informática Médica.

Vogelstein, B., y Gillespie, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619

Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. . J. Amer. Statist. Assoc. 58:236-244

Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., y Losick, R. 2014. Molecular biology of the gene. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Seventh Edition. 872 p.

Whittaker, R. (Ed.). Handbook of vegetation science. Part V. Dr. W. Junk b. v. Publishers, La Haya, Holanda, 737 p.

Wiley, E. 1981. Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics. Nueva York, N.Y., XV, 439 p.

Wong, M. y Medrano, J. 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, Biotechniques 39(1):1-11

Yu, O. y Jez, J. 2008. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. Plant J. 54:750–762

Zaro, M., Vicente, A., Chaves, A. y Concellón, A. 2016. Cambios en los antioxidantes fenólicos de berenjena violeta durante el desarrollo y almacenamiento refrigerado. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha 17(1):86-92

Zhang, Y., Hu, Z., Chu, G., Huang, C, Tian, S. Zhao, Z. y Chen, G. 2014. Anthocyanin accumulation and molecular analysis of anthocyanin biosynthesis-associated genes in eggplant (*Solanum melongena* L.). J. Agric. Food Chem. 62:2906–2912

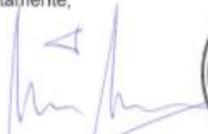
Zhao, C., Chen, Z., Bai, X., Ding, C., Long, T., Wei, F. y Miao, K. 2014. Structure-activity relationships of anthocyanidin glycosylation. *Mol. Divers.* 18:687–700

Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247–273

Zuriaga, E. 2009. Análisis de la variabilidad en poblaciones naturales de *Solanum*, secciones *Lycopersicon* y *Basarthurum* (Tesis doctoral). Valencia, España: UPV. 152 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Certificado de correspondencia para la especie *Solanum caripense* Dunal de la familia SOLANACEAE

	
Quito, 4 de julio del 2019	
CERTIFICACIÓN	
Mediante la presente certifico que las muestras:	
IBT-Ayb1	colectada en 4°38'03''S 79°43'05''W
IBT-Lim1	colectada en 11°56'29''S 76°29'44''W
IBT-Lib1	colectada en 8°00'49''S 78°24'38''W
BIO-Ltg1	colectada en 0° 47'22''S 78° 33'59''W
BIO-Ltg2	colectada en 0°58'19''S 78°36'52''W
BIO-Ltg3	colectada en 0° 45'28''S 78° 45'28''W
BIO-Cyb1	colectada en 0° 01'01''N 78° 05'38''W
BIO-Cyb2	colectada en 0° 02'38''N 78° 07'28''W
BIO-Cyb3	colectada en 0° 01'012''N 78° 05'51''W
Colectadas por el señor Juan Morales Segovia, corresponde a la especie:	
<i>Solanum caripense</i> Dunal	SOLANACEAE
Es todo cuanto puedo certificar y autorizo al Sr. Juan Morales hacer uso de este certificado.	
Atentamente,	
	
Marco Cerna Ph.D. BIOLOGO – BOTANICO DOCENTE INVESTIGADOR UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA	
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES	
Campus El Girón, Av. Isabel La Católica N23-52 y Madrid • Bloque B • Teléfono directo: 3962 878 • Teléfonos: 396 2800 / 396 2900 ext: 2217 • Correo electrónico: mguevarag@ups.edu.ec	

ANEXO 2. Descriptores morfológicos usados en ecotipos de *S. caripense*.

Descriptores	Codificación	Rango (escala)/unidades
Descriptores de planta		
Altura de planta	Altura	3 Bajo; 5 Medio; 7 Alto
Vigor de planta	Vigor	3 Débil; 5 Intermedio; 7 Fuerte
Grado de ramificación	Ramificación	3 Bajo; 5 Intermedio; 7 Alto
Protuberancia radicular en nódulo	ProtubRaíz	0 Ausente; 3 Débil; 5 Intermedio; 7 Intenso
Densidad pubescente de tallo	DensPubTallo	0 Glabro; 3 Escaso; 5 Intermedio; 7 Denso
Color de tallo	ColorTallo	1 Verde; 2 Verdoso con manchas moradas; 3 Morado verdoso; 4 Morado; 5 Morado oscuro
Longitud de entrenudos	LongNudos	Medido en mm
Longitud de peciolo	LongPeciolo	Medido en mm
Color de peciolo	ColorPeciolo	1 Verde; 2 Verdoso con manchas moradas; 3 Morado verdoso; 4 Morado; 5 Morado oscuro
Densidad foliar	DensFoliaje	3 Escasa; 5 Intermedia; 7 Densa
Postura de hojas	PostHojas	1 Semierecta; 2 Horizontal; 3 Caída
Longitud laminar de hoja	LongHoja	Medido en cm
Ancho laminar de hoja	AnchHoja	Medido en cm
Parte más ancha de hoja	PartAnchHoja	1 Base; 3 A 1/3 de la base; 5 Mitad; 7 A 1/3 de la parte superior
Radio longitud de hoja/ancho de hoja	LongH/AnchH	Adimensional
Tipo de hoja	TipoHoja	1 Simple; 2 Compuesta
Número de foliolos	NumFoliolos	Mediante conteo
Color de hoja	ColorHoja	1 Verde claro; 2 Verde; 3 Verde oscuro; 4 Morado verdoso; 5 Morado
Coloración antocianinas en venas	ColorAntVen	3 Verde; 5 Venas principales moradas y el resto verdes; 7 Morado
Postura de hoja	PostHoja	3 Flat; 5 Intermedia; 7 Muy convexa
Descriptores de flor		
Tipo de inflorescencia	TipoInflor	1 Generalmente unípara; 2 Ambas: parcialmente unípara, parcialmente múltipara; 3 Generalmente múltipara
Número de flores por inflorescencia	NumFlorInflor	Mediante conteo
Forma de corola	FormCorola	1 Estrellada; 2 Semiestrellada; 3 Rotada
Color de corola	ColorCorola	1 Blanco; 2 Blanco>75%, morado<25%; 3 Blanco 50-75%, morado 25-50%; 4 Blanco 25-50%, morado 50-75%; 5 Blanco<25%, morado>75%; 6 Morado

ANEXO 2. Continuación.

Longitud de sépalo	LongSepalo	Medido en mm
Longitud de estambre	LongEstamb	Medido en mm
Exerción del estilo	Exerción	Medido en mm
Producción de polen	ProdPolen	0 Ninguna; 3 Baja; 5 Media; 7 Alta
Descriptorios de fruto		
Uniformidad de tamaño de fruto	UnifTamFru	3 Baja; 5 Intermedia; 7 Alta
Longitud de fruto	LongFruto	Medido en cm
Ancho de fruto	AnchFruto	Medido en cm
Parte más ancha de fruto	PartAnchFruto	3 Menos de ¼; 5 Entre ¼ y ½; 7 Más de ½
Radio longitud de fruto/ancho de fruto	LongF/AnchF	Adimensional
Forma predominante de fruto	FormaPredtF	1 Aplastado; 2 Redondo; 3 Elipsoide; 4 Obovado; 5 Ovado; 6 Cordiforme; 7 Cónico; 8 Alargado; 9 Otro
Color primario de fruto	ColorPrFruto	1 Verde oscuro; 2 verde claro; 3 Blanco cremoso; 4 Amarillo pálido; 5 Amarillo dorado; 6 Amarillo anaranjado; 7 Lila; 8 Morado; 9 Morado negruzco
Rayas en fruto	RayaFruto	0 Ausente; 1 Presente
Fruto con manchas	FrutoManch	0 Ausente; 1 Presente
Superficie de fruto cubierta por color adicional	ColorAdFruto	1 Menos de 10%; 2 Entre 10 y 30%; 3 Entre 30 y 50%
Brillo epidérmico de fruto	BrillFruto	3 Mate; 5 Intermedio; 7 Brillante
Número de locus por fruto	NumLocuFru	Mediante conteo
Longitud de área placentar interna	LongPlac	Medido en cm
Ancho de área placentar interna	AnchPlac	Medido en cm
Color de pulpa fresca de fruto	ColorPulpFruto	1 Verde oscuro; 2 Verde claro; 3 Blanco; 4 Amarillo pálido; 5 Amarillo dorado; 6 Amarillo anaranjado; 7 Naranja; 8 Salmón
Sabor de fruto	SabFruto	1 Muy ácido; 3 Ácido; 5 Moderadamente dulce; 7 Dulce; 9 Muy dulce
Número de semillas por fruto	NumSemFruto	1 Muy pocas: 1-5; 2 Pocas: 6-25; 3 Intermedio: 26-75; 4 Muchas: 76-250; 5 Gran cantidad: >250
Color de semilla	ColorSem	1 Blanco; 2 Amarillo claro; 3 Amarillo grisáceo; 4 Amarillo amarronado; 5 Marrón; 6 Marrón negruzco; 7 Negro
Diámetro de semilla	DiamSem	1 Pequeño < 1.5 mm; 2 Intermedio 1.5-2.5 mm; 3 Largo > 2.5 mm
Tipo de semilla	TipoSem	1 No alada; 2 Intermedia; 3 Alada

Nota: Tomado y adaptado de IPGRI y COMAV (2004)

ANEXO 3: Correlaciones fenotípicas entre descriptores cuantitativos de *S. caripense*.

	LN	LP	LH	AH	LH/AH	LS	LE	EX	LF	AF	LF/AF	LPI	API	NF	NFI
LN	1.00														
LP	0.72	1.00													
LH	0.37	-0.11	1.00												
AH	0.59	0.17	0.88	1.00											
LH/AH	-0.59	-0.55	-0.07	-0.54	1.00										
LS	0.27	-0.04	0.55	0.24	0.43	1.00									
LE	0.71	0.50	0.46	0.51	-0.26	0.35	1.00								
EX	0.31	0.30	0.27	0.40	-0.32	-0.25	0.72	1.00							
LF	-0.11	-0.39	0.41	0.09	0.53	0.81	-0.18	-0.57	1.00						
AF	0.15	-0.02	0.38	0.17	0.32	0.77	-0.15	-0.59	0.90	1.00					
LF/AF	-0.38	-0.71	0.31	-0.04	0.62	0.63	-0.08	-0.30	0.79	0.44	1.00				
LPI	-0.27	-0.54	0.16	-0.13	0.56	0.61	-0.34	-0.63	0.92	0.75	0.83	1.00			
API	-0.28	-0.43	-0.02	-0.26	0.51	0.49	-0.41	-0.67	0.84	0.73	0.71	0.97	1.00		
NF	0.37	0.54	-0.27	-0.25	0.04	-0.04	0.64	0.58	-0.47	-0.39	-0.34	-0.45	-0.38	1.00	
NFI	0.79	0.49	0.45	0.66	-0.52	0.09	0.47	0.42	-0.05	0.17	-0.32	-0.17	-0.19	0.19	1.00

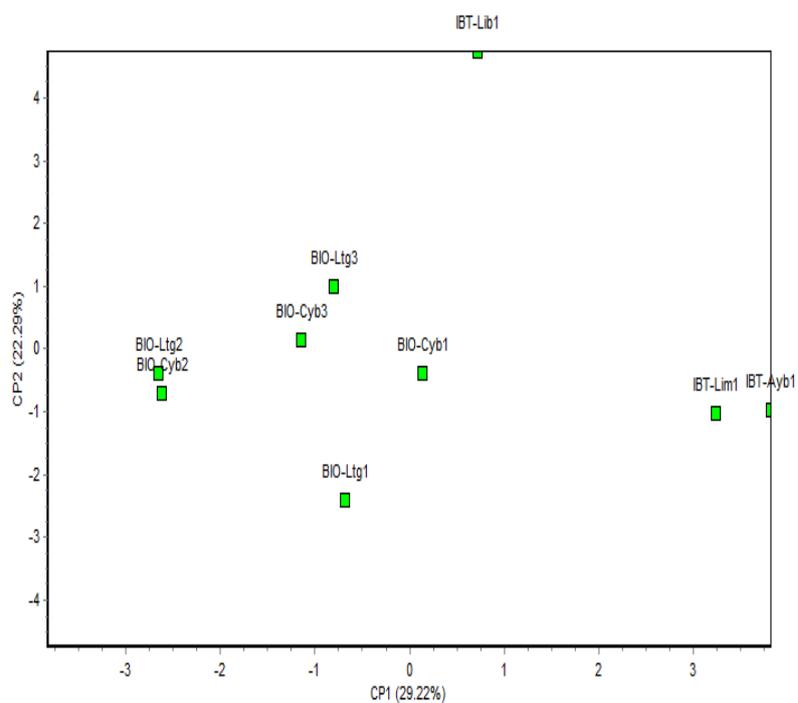
ANEXO 4. Análisis de componentes principales (valor eigen) para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense*.

Componente principal (CP)	Valor eigen	Total Acumulado	Varianza total (%)	Varianza total acumulada (%)
CP1	4.68	4.68	29.22	29.22
CP2	3.57	8.24	22.29	51.51
CP3	3.18	11.42	19.88	71.39
CP4	2.10	13.53	13.15	84.54
CP5	1.22	14.75	7.64	92.18
CP6	0.66	15.41	4.15	96.33
CP7	0.45	15.86	2.79	99.12
CP8	0.14	16	0.88	100
CP9	2.51E-7	16	1.57E-6	100
CP10	1.80E-7	16	1.13E-6	100
CP11	9.05E-8	16	5.66E-7	100
CP12	-1.54E-8	16	-9.63E-8	100
CP13	-2.70E-8	16	-1.69E-7	100
CP14	-1.75E-7	16	-1.09E-6	100
CP15	-2.10E-7	16	-1.31E-6	100
CP17	-4.68E-7	16	-2.92E-6	100

ANEXO 5. Coeficientes de contribución relativa para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense* en los cinco primeros componentes principales.

Descriptor	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Altura	0.09	0.11	0.26	0.21	-0.65
Vigor	-0.14	0.00	0.39	0.42	0.08
DensPubTallo	0.29	-0.10	0.37	-0.15	0.16
ColorTallo	-0.09	-0.04	0.50	-0.13	0.27
ColorPecíolo	0.02	-0.35	0.32	-0.26	-0.04
ColorHoja	0.26	0.28	0.29	0.05	0.26
ColorCorola	-0.14	-0.34	-0.33	0.15	0.11
UnifTamFru	-0.32	0.29	0.06	-0.05	-0.25
FormaPredtF	0.32	0.29	-0.17	-0.11	0.01
RayaFruto	-0.05	-0.47	-0.01	-0.22	-0.18
FrutoManch	0.30	-0.12	0.08	-0.13	-0.49
ColorAdFruto	-0.19	-0.39	0.12	0.22	-0.03
ColorPulpFruto	-0.31	0.30	0.06	-0.25	-0.17
SaborFruto	-0.38	0.09	-0.01	-0.29	0.15
ColorSem	-0.34	-0.04	-0.12	-0.39	-0.10
DiamSem	-0.32	0.07	0.1	0.47	-0.04

ANEXO 6. Diagrama correspondiente al análisis de componentes principales para descriptores cualitativos entre individuos de *S. caripense*.



ANEXO 7. Protocolo 1 para extracción de ARN.

Muestras de aproximadamente 100 mg se trituran con nitrógeno líquido en un mortero congelado hasta obtener una solución homogénea, la cual será colocada en un tubo de reacción de 1.5 mL. Inmediatamente, se agrega 450 μ L de solución de lisis RL, se agita la muestra continuamente y se centrifuga a máxima velocidad por 1 minuto. Tras el centrifugado se toma el sobrenadante.

A un tubo receptor de 2.0 mL se le coloca un filtro de rotación D (azul) y se agrega el sobrenadante de la muestra. Se centrifuga a 10000 x g (aproximadamente 12000 rpm) durante 2 minutos. Se toma el filtrado y se añade un volumen igual (aproximadamente 400 μ L) de etanol 70% (v/v). Se homogeniza la muestra mediante pipeteo y se transfiere a un nuevo tubo receptor que tiene colocado un filtro de rotación R (violeta), seguidamente se centrifuga a 10000 x g durante 2 minutos.

Se descarta el tubo receptor con el filtrado y se coloca el filtro de rotación R en un nuevo tubo receptor, se añade 500 μ L de solución de lavado HS y se centrifuga a 10000 x g durante 1 minuto. Se descarta el tubo con el filtrado y se coloca el filtro R en un nuevo tubo receptor. Posteriormente, se añade 650 μ L de solución de lavado LS y se centrifuga a 10000 x g durante 1 minuto. Se descarta el tubo con el filtrado y se repite el lavado con la solución LS, así mismo el centrifugado.

Se descarta el tubo con el filtrado, se coloca el filtro de rotación R en un nuevo tubo receptor y se centrifuga a 10000 x g durante 2 minutos para remover todas las trazas de etanol. Por último, se descarta el tubo, se coloca el filtro de rotación R en un tubo de elución de 1.5 mL y se añade de 45 μ L de agua libre de ARNasas. Se incuba a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifuga a 6000 x g (aproximadamente 8000 rpm) durante 1 minuto y se toma el tubo de elución con el ARN.

ANEXO 8. Protocolo 2 para extracción de ARN.

Muestras de aproximadamente 100 mg se trituran con nitrógeno líquido en un mortero congelado hasta obtener un polvo homogéneo, el cual se coloca en un tubo de reacción de 1.5 mL. Inmediatamente, se agrega 600 μ L de tampón de lisis de ARN, se agita la muestra continuamente y se centrifuga a 10000 x g durante 1 minuto.

A un tubo receptor de 2.0 mL se le coloca un filtro de rotación (amarillo), se agrega el sobrenadante de la muestra y se centrifuga a 10000 x g durante 1 minuto para remover la mayoría de ADNg. Se toma el filtrado y se añade un volumen igual de etanol 95 a 100% (v/v), se resuspende la muestra y se transfiere a un nuevo tubo receptor que tiene colocado una columna de rotación (verde); seguidamente, se centrifuga la muestra durante 30 segundos y se descarta el filtrado.

La columna de rotación se lava con 400 μ L de tampón de lavado de ARN, se centrifuga durante 30 segundos y se descarta el filtrado. Para cada muestra a ser tratada se prepara una mezcla de reacción con ADNasa I en un tubo libre de ARNasas, con 5 μ L de ADNasa I y 75 μ L de tampón de digestión de ADN. Por tanto, se añade 80 μ L de mezcla de reacción a la columna, se incuba a temperatura ambiente (20 a 30 °C) durante 15 minutos y luego se centrifuga durante 30 segundos.

Se añade a la columna 400 μ L de tampón de preparación de ARN, se centrifuga durante 30 segundos y se descarta el filtrado. Después se agregan 700 μ L de tampón de lavado de ARN, se centrifuga durante 30 segundos y se descarta el filtrado. Se realiza un lavado más con 400 μ L y se centrifuga la columna durante 2 minutos para asegurar la completa remoción del tampón de lavado. Posteriormente, se transfiere la columna a un tubo colector libre de ARNasas. Se añade de 45 μ L de agua libre de ADN/ARNasas, se centrifuga durante 30 segundos y el ARN eluído se usa inmediatamente o almacena a -70 °C.

ANEXO 9. Calidad y concentración de las muestras de ARN total.

Muestra ARN	Especie	Parte del fruto	Abs.₂₆₀/Abs.₂₈₀	Abs.₂₆₀/Abs.₂₃₀	ng/μL
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	94.0
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	51.2
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	66.8
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	76.0
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	175.0
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	19.9
BIO-Ltg1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	4.9
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	111.0
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	118.4
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	148.0
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	90.4
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	46.4
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	22.8
BIO-Cyb1	<i>S. caripense</i>	Cáscara	-	-	29.9
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.13	2.15	357.7
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	1.68	0.68	301.0
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.08	1.41	163.9
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.10	1.34	196.0
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.11	2.10	293.8
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.10	1.70	298.7
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.07	1.78	136.5
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.05	1.24	153.4
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.10	1.77	201.9
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.07	1.26	101.3
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.07	1.43	141.7
IBT-Lib1	<i>S. caripense</i>	Pulpa	2.10	2.00	156.9
BU	<i>S. melongena</i>	Cáscara	2.13	1.60	241.4
BU	<i>S. melongena</i>	Pulpa	2.11	2.06	145.9
P4/5	<i>S. muricatum</i>	Cáscara	2.13	1.65	174.5

ANEXO 10. Calidad y concentración de las muestras de ADN complementario.

Muestra ADNc	Abs.₂₆₀/Abs.₂₈₀	Abs.₂₆₀/Abs.₂₃₀	ng/μL
BIO-Ltg1	1.60	2.04	1647.0
BIO-Ltg1	1.47	1.58	891.0
BIO-Ltg1	1.53	1.83	788.6
BIO-Ltg1	1.61	1.86	2089.2
BIO-Ltg1	1.63	2.09	1993.9
BIO-Ltg1	1.55	1.88	901.9
BIO-Ltg1	1.58	1.96	1239.0
BIO-Cyb1	1.59	1.76	1142.0
BIO-Cyb1	1.54	1.81	725.8
BIO-Cyb1	1.58	1.96	1177.9
BIO-Cyb1	1.58	2.19	990.1
BIO-Cyb1	1.58	2.00	862.7
BIO-Cyb1	1.58	1.99	1362.2
BIO-Cyb1	1.57	1.86	1431.5
IBT-Lib1	1.61	1.91	1222.4
IBT-Lib1	1.60	1.78	1156.3
IBT-Lib1	1.57	1.82	1165.9
IBT-Lib1	1.60	1.88	1240.8
IBT-Lib1	1.61	1.87	1216.1
IBT-Lib1	1.61	1.85	1189.3
IBT-Lib1	1.59	1.89	1154.1
IBT-Lib1	1.60	1.93	1358.9
IBT-Lib1	1.61	1.87	1162.0
IBT-Lib1	1.61	1.90	1141.0
IBT-Lib1	1.61	1.89	1140.1
IBT-Lib1	1.60	1.90	1113.4
BU	1.60	1.94	1059.8
BU	1.61	1.91	1312.7
P4/5	1.59	1.77	1052.2