



Review

Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals?

Philippe Monneveux^{a,*}, David A. Ramírez^a, María-Teresa Pino^b^a International Potato Center, Lima 12, Peru^b Fisiología & Genética Vegetal, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Santa Rosa 11610, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2012

Received in revised form 23 January 2013

Accepted 31 January 2013

Available online 6 February 2013

Keywords:

Cereals

Drought tolerance

Potato (*S. tuberosum* L.)

ABSTRACT

Drought tolerance is a complex trait of increasing importance in potato. Our knowledge is summarized concerning drought tolerance and water use efficiency in this crop. We describe the effects of water restriction on physiological characteristics, examine the main traits involved, report the attempts to improve drought tolerance through *in vitro* screening and marker assisted selection, list the main genes involved and analyze the potential interest of native and wild potatoes to improve drought tolerance. Drought tolerance has received more attention in cereals than in potato. The review compares these crops for indirect selection methods available for assessment of drought tolerance related traits, use of genetic resources, progress in genomics, application of water saving techniques and availability of models to anticipate the effects of climate change on yield. It is concluded that drought tolerance improvement in potato could greatly benefit from the transfer of research achievements in cereals. Several promising research directions are presented, such as the use of fluorescence, reflectance, color and thermal imaging and stable isotope techniques to assess drought tolerance related traits, the application of the partial root-zone drying technique to improve efficiency of water supply and the exploitation of stressful memory to enhance hardiness.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	77
2. Drought tolerance in potato	77
2.1. Potato, an efficient water user but drought susceptible crop	77
2.2. Drought effects on the potato crop	77
2.3. Measurement of drought tolerance related traits	78
2.3.1. Gas exchange	78
2.3.2. Fluorescence	78
2.3.3. Color imaging	78
2.3.4. Carbon isotope discrimination	78
2.3.5. Plant water status	78
2.3.6. Root traits	79
2.3.7. Infrared thermometry	79
2.3.8. Canopy reflectance	79
2.4. <i>In vitro</i> screening	79
2.5. Marker assisted selection	79
2.6. Gene expression	79
2.7. Utilization of native and wild potatoes for improving drought tolerance	80
3. Specificity of drought tolerance research in potato compared to cereals	80
3.1. What do we know about drought tolerance in potato compared to cereals?	80
3.2. Are drought tolerance related traits assessment methods equally applicable to potato and cereals?	81

* Corresponding author. Tel.: +51 1 349 6017x3133; fax: +51 1 317 5354.

E-mail addresses: p.monneveux@cgiar.org (P. Monneveux), d.ramirez@cgiar.org (D.A. Ramírez), mtpino@inia.cl (M.-T. Pino).

3.3.	The use of genetic resources in potato and cereals	81
3.4.	Comparative progress of genomics in potato and cereals	82
3.5.	Advances in generating drought tolerant germplasm in potato and cereals	82
3.6.	Advances in the application of water saving techniques in potato and cereals	82
3.7.	Potato and cereals in the face of climate change	82
4.	Research perspectives	82
4.1.	Crop management	82
4.2.	Crop improvement	82
	Acknowledgment	84
	References	84

1. Introduction

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important food crop in the world. It is cultivated on 19 million ha and its annual production is around 325 million tons [1]. Developing countries produce more than half of the total world potato production [2]. Potato is often cultivated by resource-poor farmers in remote, often marginal areas with limited access to farm inputs [3]. It accounts for large quantities of dietary daily energy intake compared to other crops [4] and contributes to hunger reduction and improved nutrition [5]. Potato is also progressively fetching higher market value thus contributing to poverty reduction [4]. An increasing part of the production is transformed by industry (French fries, chips) particularly in Asia [6].

Potato regularly suffers transient water deficit in most of the rainfed growing regions due to erratic rainfall or inadequate supplemental irrigation techniques [5]. This is the case in temperate northern China which accounts for 45% of the Chinese production and around 10% of the world production [6] and has experienced severe and prolonged dry periods since the late 1990s [7]. Sub-tropical lowlands potato is normally produced in the short days of the winter season between harvesting and planting of rice. Grown with residual moisture following the monsoon it would often need supplementary irrigation, a resource unavailable at many locations [8].

The impacts of water restriction on potato production will likely increase over the next decades, due to climate change and the extension of potato cultivation in drought prone areas. The potato growing area considerably expanded in tropical and sub-tropical environments [1] as a winter crop exposed to drought events. Climate change is likely to increase the frequency of drought events in many regions, affecting drought-sensitive crops [9]. Severity and duration of water scarcity periods may vary more from year to year making it difficult for plants to adapt [10]. Potato yield losses in the world due to climate change are expected to range between 18 and 32% during the first three decades of this century [11]. Enhancement of transient drought tolerance in potato through conventional breeding and biotechnology should therefore receive high priority. For this purpose, it may be advisable to learn from the experience gained in crops such as cereals for which drought tolerance improvement has received more attention. Thus, the objectives of the present review are to (i) examine our present knowledge of drought tolerance in potato, (ii) compare the research advances made in this crop to those in cereals and (iii) propose novel research oriented to improve drought tolerance in potato.

2. Drought tolerance in potato

2.1. Potato, an efficient water user but drought susceptible crop

Potato, under rainfed conditions, yields more food per unit of water than other major crops [2]. For every m³ of water applied to the crop, potato produces 5600 kcal of dietary energy, compared

to 3860 in maize, 2300 in wheat and 2000 in rice [12]. Because of its high nutritional productivity, potato is gaining support among policymakers and land use planners as a substitute for less water efficient cereal crops. Water use efficiency (WUE) in potato is in fact widely variable, depending on environmental conditions and temporal and spatial scales of measurement (Table 1). A substantial increase of the efficiency of applied water has been achieved by implementing different irrigation methods, like drip irrigation or the partial root-zone drying technique which consists of an alternated irrigation of the root-zone by watering of one furrow and keeping the adjacent one dry until the next watering cycle (Fig. 1). Partial root-zone drying can allow a 29–50% of water saving with a similar tuber yield and a concomitant water use efficiency increase [14,16,17,22]. Potato is however a drought-sensitive crop [24]. Its drought vulnerability has been mainly attributed to its shallow root system and low capacity of recuperation after a period of water stress [25].

2.2. Drought effects on the potato crop

The magnitude of drought effects on potato production depends on the phenological timing, duration and severity of the stress [26]. Emergence and tuberization (sink strength) are two critical periods where water stress most affects final tuber yield [27]. Drought decreases plant growth [28], shortens the growth cycle [29] and reduces the number [30] and size [31] of tubers. Short periods of drought during tuber bulking lead to dumbbell-shaped, knobby, or

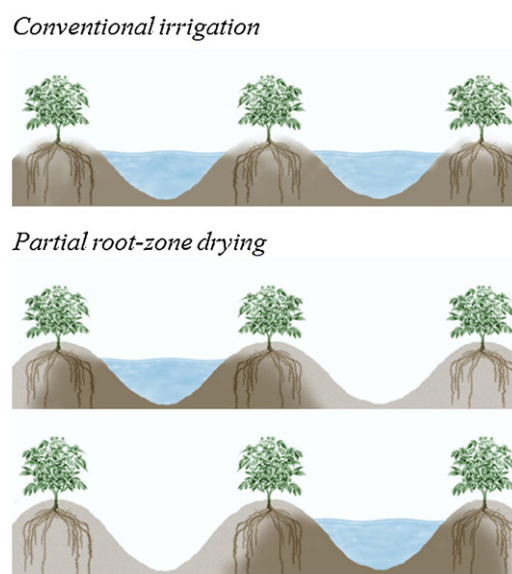


Fig. 1. Description of the partial root-zone drying (PRD) irrigation technique (compared to the conventional irrigation technique) which consists in an alternated irrigation of the root-zone by watering of one furrow and keeping dry the adjacent one until the next watering cycle.

Table 1
Range of values and kinds of water use efficiency (WUE) assessed at different scales in potato.

Scale	WUE type	Calculation	Range	Authors	Country
Leaves	Intrinsic WUE	A/g_s (mmol mol^{-1})	9.0–38.4	[13]	Denmark
	Transpiration efficiency	A/E ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	2.2–11.4	[14]	Denmark
				0.9–1.0	[15]
Individual plants	Transpiration efficiency	Y/T (kg m^{-3})	4.3–5.1	Yactayo (<i>pers. comm.</i>)	Peru
	Transpiration efficiency	Y/W (kg m^{-3})	5.4–8.0	[16]	UK
Crop	Crop or irrigation WUE	Y/W (kg m^{-3})	0.6–2.5	[17]	China
			2.2–2.6	[18]	Peru
	Crop or irrigation WUE	Y/ET (kg m^{-3})	1.9–5.3	[19]	Iran USA
			4.9–9.3 5.0–9.8	[20] [13,14]	Denmark
			6.0–14.0	[21]	Tunisia
			7.7–15.6	Yactayo (<i>pers. comm.</i>)	Peru
			19.6–37.8	[22]	Denmark
Crop or irrigation WUE	SB/T (kg m^{-3})	3.6–5.5	[23]	USA	

A = net photosynthesis, g_s = stomatal conductance, E = transpiration rate, T = individual transpiration, W = amount of water applied, ET = evapotranspiration or plant water used, Y = yield. SB = shoot biomass.

pointed-end tubers [32]. Water limitation reduces leaf growth [33], leaf area index [22], ground coverage [34], rate of photosynthesis per unit of leaf area ($\mu\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) [35] and harvest index [36].

Decline in photosynthetic rate is fast and substantial, even at relatively high water potentials (-0.3 to -0.5 MPa [37]). By reducing transpiration, drought leads to an increase in plant temperature that in turn is detrimental to tuber formation [38]. Drought also decreases nitrate reductase activity and consequently affects nitrogen uptake [31]. Conversely, previous exposure to drought improves the response of potato plants to drought stress [39]. Pre-stressed plants exhibit higher relative water content at zero turgor potential than unstressed plants [40].

2.3. Measurement of drought tolerance related traits

The variation of putative drought tolerance related traits and their relationship with tuber yield under drought have been studied using diverse methods with the aim of better understanding the mechanisms underlying drought tolerance.

2.3.1. Gas exchange

Stomatal conductance is driven by abscisic acid (ABA) regulation under mild water stress conditions and is more sensible to water depletion than the rate of photosynthesis, relative water content, and leaf water potential [41]. Drought reduces stomatal conductance in potato when leaf water potential values fall below -0.6 MPa [42]. A range of photosynthetic rate values between 1 and $3.6 \mu\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ has been used to describe water stress condition in potted potato grown in greenhouses under natural light [43]. Seasonal integrated rate of photosynthesis and maximum net photosynthesis (estimated from light-curves response assessed before flowering) have a positive relationship with tuber yield in greenhouse [44] and field conditions [45]. In well-tuberized potatoes the response of photosynthetic rate to drought in potato depends on leaf sugar content [46], the strength of the demand of carbohydrates by the sink [46], mesophyll conductance [47], relative water content and light intensity [46].

2.3.2. Fluorescence

Knowing the kinetics of this variable allows the assessment of the state of photosynthetic apparatus *in vivo* and the dissipation of excess of light energy (by xanthophyll cycle, photorespiration or water–water cycle [48]). High dehydration resistance of photosystem II has been noted in potato, the maximum quantum yield being affected only at relative water content below 40% [49]. Variation in chlorophyll fluorescence among genotypes has also been reported [50]. However, in most studies carried out under water

stress, fluorescence parameters did not discriminate effectively between genotypes and consequently did not correlate with yield [31].

2.3.3. Color imaging

Images of individual plants taken in controlled environments with digital color cameras have been used to estimate biomass, quantify relative growth rates and quantify chlorophyll concentration and degree of senescence [51]. Reflectance spectral indices measure a general stress level of the plant canopy discriminating plant from background soil reflectance, which is important in early and late stages of growth when the plants do not entirely cover the ground [52]. Multispectral imaging (bands 550, 710 and 810 nm) has been successfully used in potato for determination of chlorophyll in leaves (linear relationship with $r^2 > 0.95$) [53].

2.3.4. Carbon isotope discrimination

Carbon isotope discrimination, calculated from the ratio of the two stable carbon isotopes ^{12}C and ^{13}C , negatively correlates with transpiration efficiency in C_3 species [54]. This allows an integrated measure of this trait during the entire period in which the sample tissue was growing. In cereals, an association was found between carbon isotope discrimination and yield [55]. In root and tuber crops, the variation of carbon isotope discrimination and its potential utilization for estimating transpiration efficiency or drought tolerance has been poorly explored. There is a positive correlation between carbon isotope discrimination and stomatal conductance among potato clones [56]. Carbon isotope discrimination also correlates to drought tolerance (defined as dry weight tuber yield under water limitation relative to dry weight tuber yield under irrigated conditions) suggesting the use of this trait for indirect selection for yield under drought [36].

2.3.5. Plant water status

The degree of osmotic adjustment in response to drought seems to be limited in potato and thus might not contribute efficiently to the maintenance of leaf expansion with increasing soil moisture deficit [57]. Potato varieties showing higher tuber yield under water restriction had a higher osmotic adjustment [45]. Accumulation of potential osmolytes has been poorly investigated in potato. Proline levels increase earlier in drought susceptible varieties than in more tolerant ones [58]. It has been suggested that proline could protect plants from dehydration by stabilizing proteins and membranes, and are a source of carbon, nitrogen and energy during cell rehydration [59].

2.3.6. Root traits

Improvement in root traits like root depth and root length density is important for developing drought tolerant genotypes [60]. Tolerant cultivars have deeper root systems [61] and higher root dry weight [62]. Measurement of root traits in field-grown plants is however laborious and time-consuming. Root pulling resistance has been proposed as a practical measure to quantify root development. This trait varies widely and its use was suggested as a quick way to select for drought avoidance [63]. A significant relationship between root pulling resistance and tuber yield was observed under moderate drought [63]. Root mass correlates well with leaf mass and tuber yield [64]. A selection for root mass in the low soil layer was developed, leading to the Konyu cultivars that had less reduction of leaf conductance and rate of photosynthesis, leaf area and tuber yield under drought stress than commercial cultivars [64]. High root mass was associated with low number of root branches and high leaf to stem ratio. They are characteristics of genotypes with high yield stability across drought prone environments [65]. Root volume and root length also correlated with drought recovery [66].

2.3.7. Infrared thermometry

Canopy temperature relative to air temperature is an indication of transpiration driven cooling of the leaves. The relationships between canopy and air temperatures and transpiration are not simple, involving atmospheric, soil and plant conditions. Relatively lower canopy temperature in a given genotype may indicate its relatively better capacity for taking up soil moisture and maintaining a relatively better plant water status [67]. Canopy temperature increase caused by water deficit varies among cultivars [50]. In potato, genotypes with warmer canopies under irrigated conditions were less susceptible to drought than genotypes with cooler canopies [68]. No information is available concerning variation of canopy temperature under drought conditions and its association with yield.

2.3.8. Canopy reflectance

Reflectance indices have been used in several crops, mostly to estimate biomass [69] and changes in leaf water content [70]. Indices calculated from the visible and near-infrared light reflected by vegetation have proved to be suitable to accurately assess some drought response traits. Relative vegetation index (reflectance at 800 nm/reflectance at 650 nm) and normalized difference vegetation index (NDVI) $([\text{reflectance at } 800 \text{ nm} - \text{reflectance at } 650 \text{ nm}]/[\text{reflectance at } 800 \text{ nm} + \text{reflectance at } 650 \text{ nm}])$ strongly correlate with leaf area index and biomass in potato [31]. Specifically designed NDVI spectrometers are commercially available. An advantage of these instruments is the ease of use and their wide application in the assessment of plant health in response to stress conditions [71]. As in early stages of crop growth, normalized difference vegetation index can be biased by soil reflectance, other indices such as the weighted difference vegetation index $(\text{NIR} - g \times R)$, where NIR and R are reflectance in the near infrared and red respectively, and g is the soil line slope) which corrects for soil background and differences in soil moisture content have been proposed [72].

2.4. In vitro screening

Evaluating the relative field performance of cultivars in sites under dry conditions highly depends on weather variability and is very cumbersome. Screening under *in vitro* conditions is consequently an attractive option, particularly in potato, a crop highly amenable to tissue culture [73]. It represents a highly controlled and homogeneous procedure to quickly induce osmotic stress [74]. The general effect of water stress on *in vitro* plant growth is similar

to the effects observed under field conditions (reduction of stem and foliage weight, root number and root-dry weight) [75]. *In vitro* osmotic stress, induced by polyethylene glycol, has been used to evaluate root and shoot traits at the juvenile stage and for recovery potential [76] even if no commercial variety has been bred until now using this technique. Polyethylene glycol is a non-ionic polymer produced in a range of molecular weights (ranging from 1500 to 8000), and its uptake rate into shoots and roots depend on the species, concentration and time exposure. Polyethylene glycol of large molecular weight is taken up slower by plants plant, thus representing a better osmoticum for use in hydroponics root medium [77,78]. Mannitol solution is also used for inducing drought stress in tissue culture. It is however taken up into plant tissues in maize [79], wheat, rape and potato [80], causing artifact effects.

2.5. Marker assisted selection

Selection for drought tolerance through visible phenotypic drought tolerance traits is time consuming. The use of molecular markers to identify and locate genomic regions that control drought tolerance traits may accelerate selection. The first potato genetic maps were constructed by following the segregation of restriction fragment length polymorphism markers in different genetic backgrounds [81,82]. As the large genome size and co-existence of several homoeologous genomes in cultivated wheats present a huge challenge for the genetic dissection of phenotype–genotype relationships, the efficiency of association mapping is much higher in diploid than in polyploid species. As a consequence, most of the quantitative trait loci (QTL) mapping studies in potato have been performed on diploid populations. Target traits included leaf senescence [83], tuberization [84] and tuber shape, eye depth and flesh color [85]. Recently, quantitative trait loci have also been identified in tetraploid populations for traits such as plant height, maturity, crop emergence, tuber size, and tuber quality traits [86,87]. Under *in vitro* osmotic stress (induced by polyethylene glycol), three quantitative trait loci involved in the control of root to shoot ratio were identified which explained 41.1% of the variance for this trait [88].

2.6. Gene expression

Changes in the gene expression profiles are induced in response to drought stress and several genes are regulated up or down with osmotic stress. A first category includes genes directly involved in protection against environmental stresses, encoding proteins with a role in biosynthesis of compatible osmolytes, chaperones, late embryogenesis abundant proteins, proteinases and enzymes involved in detoxification (Table 2).

A second category refers to genes which regulate other genes involved in drought response, including the synthesis of protein kinases and transcription factors such as dehydration responsive element binding, Basic Leucine Zipper Domain, or myeloblastosis oncogene [102,103]. Several studies also reported genes associated to compatible solutes (sugars, proline, and glycine-betaine) biosynthesis. Andean potatoes adapted to drought stress show higher expression of genes inducing antioxidants, flavonoid genes, heat shock protein and late embryogenesis abundant proteins [39,58]. Some studies suggested that $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase over-expression was associated with better root development [59,104]. Stress-responsive dehydrins have been associated to drought stress. Dehydrins act as chaperones stabilizing vesicles, proteins, and membrane structures in stressed plants [105,106]. Most dehydrins are induced by drought or abscisic acid, like the barley dehydrins DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6 and DHN9 [107]. Early dehydrin like gene expression has been associated to drought tolerance in wheat [108] and cold-regulated gene expression in potato [109].

Table 2
Genes for drought tolerance tested in transgenic potato plants.

Gene	Gene function	Abiotic stress tolerance	Reference
(a) Genes involved in Regulation with role in drought tolerance			
CaPF1	ERF/AP2-type pepper transcription factor gene	Oxidative stress and others	[89]
NDPK1	Nucleoside diphosphate kinase 2	Multiple stress resistance	[90]
StMYB1R-1	MYB-Like Domain Transcription Factor, activation of drought-related genes	Drought resistance via reduced water loss	[91]
DREB1B	Transcription factor	Enhanced drought and freezing tolerance	[92]
(b) Genes involved in metabolites and osmolytes biosynthesis in drought stress			
SST/FFT	Fructan accumulation	Reduced proline accumulation at low water status	[93]
TPS1	Trehalose synthesis	Delayed wilting under drought	[94]
TaSTRG	Fructan accumulation	Increased proline accumulation under drought stress	[93]
codA	Synthesize GB in chloroplast	Enhanced oxidative, salt, and drought tolerance	[95]
BADH	GN synthesis	Enhanced drought and salinity tolerance	[96]
(c) Other genes participating in drought stress			
StPPI1	Proton pump interactor from <i>Solanum tuberosum</i> involved in several physiological processes	Drought and others abiotic stresses	[97]
Tomato Cu, Zn superoxide dismutases	Enhanced oxidative stress defense	Enhanced drought-osmotic tolerance	[98]
Cu/Zn SOD and APX (SWPA2 promoter)	Enhanced antioxidative mechanism of chloroplasts	Enhanced oxidative stress and heat stress tolerance	[99]
AtDHAR1	Membrane integrity, protecting chlorophyll against degradation, and allowing faster removal of H ₂ O ₂	Enhanced herbicide, drought and salt stress tolerance	[100]
AtGR1	Elevation GSH contents	Enhanced tolerance to multiple environmental stresses, including drought stress	[101]

The last group of genes includes transcription factors such as C-repeat binding factors/dehydration responsive element binding. In *Arabidopsis thaliana*, C-repeat binding factors bind to the cold/dehydration responsive regulatory motif, presents also in the promoter of many drought and cold responsive genes such as those associated with osmo-protectant biosynthesis-protein [110,111]. Thus, C-repeat binding factors over-expression has been associated to proline synthesis in rice [112] and potato [113,114]. Over-expression of the C-repeat binding factors regulon increases cold, salinity and drought tolerances in different plant species [115]. Transgenic potato plants over-expressing *Arabidopsis* C-repeat binding factors 3/dehydration responsive element binding 1A under a stress-inducible responsive to dehydration 29A promoter exhibits tolerance to drought and other abiotic stresses [116]. Recent studies confirmed the existence of the C-repeat binding factors regulon in *Solanum commersonii*, a wild potato species highly tolerant to abiotic stress. *S. commersonii* C-repeat binding factors induced genes similar to those induced by C-repeat binding factors transcription factors from *Arabidopsis* [117,118]. Over-expression of potato R1-type myeloblastosis oncogene transcription factor gene reduces water loss (Table 2) and enhances the expression of other drought regulated genes [91]. These findings, however, have not yet translated in the development of transformed clones with improved drought tolerance.

2.7. Utilization of native and wild potatoes for improving drought tolerance

The modern *S. tuberosum* L. potato varieties are highly susceptible to drought stress [119]. In contrast, landraces of Andean potato species and wild potatoes occurring in the Americas, from Colorado (United States) to Chile and Uruguay [120], are predominantly better adapted to harsh environments and regularly exposed to water-scarce conditions [58]. Genes from this germplasm should contribute to the improvement of potato for current and future needs [121]. However, information about drought tolerance of Andean native potatoes and wild potatoes is still scarce (Table 3).

The relatively limited use of native potatoes in breeding programs is largely due to undesirable effects of genes linked to the introgressed trait or gene (phenomenon generally referred to as linkage drag) and to the fact that some of the traits contributing to drought tolerance in native and wild potatoes are themselves associated with low yield potential [124]. Also, photoperiod requirements of modern varieties and native potato are different, which could explain why plants from inter-crosses and back-crosses often have undesirable agronomic characteristics such as lower yield, small tuber number, late maturity, poorer foliage and tuber appearance when grown under non suitable photoperiods [127].

3. Specificity of drought tolerance research in potato compared to cereals

3.1. What do we know about drought tolerance in potato compared to cereals?

Research and selection for enhanced drought tolerance started much earlier in cereals than in potato. The first agricultural scientists who addressed drought adaptation in wheat and maize were R. Gaus and M.T. Jenkins respectively, both working at the beginning of the 20th century, and the first dissection of drought tolerance in cereals, in terms of crop physiology, was done by J.H. Martin in 1930 [128].

Conversely, research on drought tolerance in potato only started in the 60–80's with the pioneer works of Steckel and Gray [61], Burton [129,130] and Tanner [23]. This is probably because drought was not considered as a major yield limiting factor in potato for a long time [5]. Potato was not considered as a crop of major importance in drought prone production systems [131,132]. The situation drastically changed over the last few years due to the increasing importance of drought for potato production and the recognized interest in developing potato cultivars able to perform well in drought prone areas. Our knowledge of physiological mechanisms underlying drought tolerance in potato (e.g., role of abscisic

Table 3
Drought tolerant potato landraces and wild species.

Target trait	Species	Accession	Reference
Landraces			
Tuber yield	<i>Solanum juzepczukii</i> Bukasov		[122]
Tuberization	Andigenum group of <i>S. tuberosum</i>	Sipancachi	[123]
Senescence	Stenotomum group of <i>S. tuberosum</i>	Yema de Huevo	[123]
Drought susceptibility	<i>Solanum juzepczukii</i> Bukasov	–	[124]
Combination low drought susceptibility and high irrigated yield	<i>Solanum curtilobum</i> Juz. & Bukasov	Choquepito	[124]
Combination low drought susceptibility and high irrigated yield	Stenotomum group of <i>S. tuberosum</i>	Titerite	[124]
Combination low drought susceptibility and high irrigated yield	Andigenum group of <i>S. tuberosum</i>	Puca Allqu, Venancia, Rosita, Renacimiento, Chava Negra, Calvache, Criolla	[124]
Combination low drought susceptibility and high irrigated yield	Chaucha group of <i>S. tuberosum</i>	Color Unkhuña, Muru Warkatina, Puqya, Puca Botijuela, Yana Rucunag	[124]
Wild species			
Tuber yield	<i>Solanum cardiophyllum</i>	–	[125]
Transpiration vegetative growth	<i>Solanum gandarrillasii</i>	–	[126]
Tuber yield	<i>Solanum tarjense</i>	CLS 1802 Norte	[123]

acid, osmotic adjustment, or rooting patterns) is however still poor compared with cereals.

3.2. Are drought tolerance related traits assessment methods equally applicable to potato and cereals?

In cereals selection for drought tolerance has been first carried out by selecting for high-yielding lines in the field. However, direct selection for yield may select for a myriad of secondary traits that have little to do with drought-tolerance *per se*. Developing a better understanding of traits that are required for adaptation to a certain type of drought is therefore paramount. The mechanisms underlying drought tolerance are quite well elucidated in cereals, the importance of intensity and timing of stress have been highlighted [55] and the contribution of different traits to grain yield under different environments and drought scenarios well described [133]. Indirect selection for yield, based on the use of secondary traits genetically associated with grain yield under drought and highly heritable, has been initiated several decades ago [134]. Conversely, most of the selection for drought tolerance in potato has been carried out based on direct selection for yield [124]. Secondary traits have been generally analyzed on limited number of genotypes and their genetic variation and heritability poorly studied [88].

Drought tolerance related trait assessment methods actually available and used in cereals are applicable to potato. They include fluorescence, thermometry, reflectance and the use of stable isotopes. However, most of them have still been scarcely applied to potato. Fluorescence techniques have been mainly used in potato to analyze the effects of thermal stresses on photosystem II [135] but remains poorly investigated thereafter as a tool for high throughput phenotyping under drought and/or heat conditions. Canopy temperature, widely used to screen for drought tolerance in cereals [136], has been used in potato more for scheduling irrigation than for detecting genotypic differences [137]. As a consequence, information about genetic variation for this trait is scarce [50]. Despite promising results [31], the use of reflectance measurements techniques is still modest in potato, while this method is widely used in cereals and particularly in wheat [138]. Tolerance to photo-inhibition (caused by light excess and water stress) driven by xanthophylls cycle could be assessed by some reflectance indexes taking account some recent experiences in rice [139]. Carbon isotope discrimination has been poorly investigated in potato, compared to cereals. Most studies concerned a limited number of genotypes and no information is available about carbon isotope discrimination variation associated to the type of stress, sampled organs and stage of sampling while these factors considerably influence the association between carbon isotope discrimination and

yield. In cereals for example, the strongest association was found between carbon isotope discrimination of the grain at maturity and yield under post-anthesis water stress [55].

3.3. The use of genetic resources in potato and cereals

Accessing genetic diversity in breeding programs is a way to capture new drought tolerance traits. Potato breeders have in theory access to a tremendous diversity. The International Potato Center genebank conserves around 4500 accessions of cultivated species, landraces and more than 2500 accessions of wild potatoes [140]. Drought tolerance accessions identified in Andean potatoes [122–124] have been barely used in breeding programs worldwide, because of their adaptation to the short-day conditions prevalent in the low latitudes [141]. Some attempts have been made to transfer drought tolerance genes from wild to cultivated potato species via traditional breeding. However, inserting the specific genes associated with drought tolerance is challenging. Gene introgression from wild to cultivated potato highly depends on the ploidy level and the endosperm balance number and many wild species are sexually incompatible with cultivated potato [142]. As an alternative, potato breeders have used somatic fusion, embryo rescue, and bridging strategies to overcome the natural barriers from interspecific crossing between wild and cultivated species. Also, linkage drag still limits the use of wild potatoes because many exotic genes and undesirable traits, e.g., high alkaloid content or long stolons, can be transferred along with the acquisition of drought tolerance and multiple cycles of backcrosses and selection are required to remove these traits. Therefore, successful breeding schemes require time-consuming backcrosses, evaluations, and phenotypic selections to obtain an improved cultivated phenotype [143,144].

Drought tolerance is a complex quantitative trait controlled by several, as yet unknown, combinations of genes and gene families which are not easy to select simultaneously. Thus, this trait and the potential yield over the back-cross cycles and the physiological and biochemical bases of potato drought tolerance need to be studied more to find reliable selection markers. Progenies derived from the interspecific hybrids between drought tolerant and sensitive potato species can provide valuable information on the mechanisms underlying drought tolerance in cultivated potato. Interspecific crosses have been more extensively used to enhance diversity and introgress useful traits in wheat. An example among others of the successful application of the creation of synthetic wheat cultivars is provided by the crossing between durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and the diploid ancestor *Aegilops tauschii* Coss. [145]. More than 60% of the new germplasm generated by the International Maize and Wheat Improvement Center today used

synthetic wheat as parents. Four synthetic-derived varieties have been released in the Sichuan province (China) since 2003. The variety Chuanmai 42 which out-yields a commercial check variety by 23% has been grown on more than 100 000 ha since 2006 [146].

3.4. Comparative progress of genomics in potato and cereals

Many more drought response genes have been identified in wheat, rice and maize than in potato. The majority of gene over-expression studies in response to drought stress have been reported in the mentioned cereals and significantly fewer studies have been reported in potato (Table 2). The identification of genes controlling drought responses in potato really started in 2007 with the somatostatin/fructosyltransferase genes increasing fructane accumulation under drought stress [93] and some progress has been made over the last few years. With the first results obtained by the potato genome sequencing consortium, 30% of potato sequences were completed and a total of 39,031 genes have been annotated in the doubled monoploid *Solanum phureja* clone (DM1-3516R44) genome [147]. Some microarrays transcriptional expression profiling studies have been reported for potato and genes driving potato tuber initiation and growth were identified based on Potato Oligo Chip Initiative array [148]. Several candidate genes in Andean potatoes are associated with osmotic adjustment and are involved in changes in carbohydrate metabolism, membrane modifications, strengthening of cuticle and cell rescue mechanisms [43,58].

3.5. Advances in generating drought tolerant germplasm in potato and cereals

The early-maturing wheat cultivars Bobs, Purple Straw and Federation developed by William James Farrer at the beginning of the 20th century allowed a considerable increase of yield in the drought-prone areas of Australia. Release of drought tolerant maize hybrids occurred as early 30's [149]. In potato, the first references to cultivars with enhanced tolerance are from the 70's [61]. The documented impact of drought tolerant germplasm has been reported even more recently, with the International Potato Center potato cultivar Tacna, selected under the drought conditions of Southern Peru, introduced in China in 1994, released in 2006 under the name of Jizhangshu 8 and now widely cultivated in drought-prone areas of that country [140].

A lot of information about drought tolerance in potato has been collected over the last two decades [124], but yield genetic gains obtained through selection are poorly documented. This situation dramatically contrasts with cereals. In maize for example, the yield genetic gains obtained under drought by combining the use of secondary traits and recurrent selection in populations with high diversity have been quantified and the variation of selected and non-selected traits has been described [134,150]. Some conceptual models and theoretical ideotypes for drought tolerance have been proposed in wheat [133] and maize [151] but not so far in potato.

3.6. Advances in the application of water saving techniques in potato and cereals

The recent application to irrigated potato of the partial root drying technique has proven to be an efficient mean to reduce water supply and increase water use efficiency (see above) and in some cases to even increase tuber yield [45]. In both irrigated and rain-fed potato, water use efficiency can also be improved by reducing soil evaporation through mulching and no-tillage. Significant effect of mulching on potato yield has been observed in drought prone areas [17]. In cereals, the application of water saving techniques has been considered long time ago, with the development of conservation agriculture techniques. Conservation agriculture defined as

minimal soil disturbance (no-till) and permanent soil cover (mulch) combined with rotation [152] is practiced on over 108 million ha globally under different production systems and ecologies [153]. In irrigated wheat cropping systems, additional techniques have also been proposed and implemented to increase irrigation efficiency, such as permanent raised bed planting [154]. However, potato occupies only a small proportion of conservation agriculture area, mainly in rice-potato cropping systems in South China. The benefits of the application of conservation agriculture in potato are still poorly documented and are largely focused on pest control [155].

3.7. Potato and cereals in the face of climate change

The modeling of the impact of climate change on wheat yield at the global level has been widely developed [156]. Conversely, such studies are scarce for potato [11] and most have been done at the regional level. These studies predict a strong impact of climate change on potato production, higher than in cereals. Potato production at low latitudes is expected to decrease from 18 to 32% without adaptation of planting date and varieties and from 9 to 18% with adaptation. Potato production in India is estimated to decline by 10 and 16% by 2020 and 2050, respectively, if no adaptation strategy is implemented [157].

4. Research perspectives

4.1. Crop management

A challenging aspect in the implementation of limited irrigation techniques in potato is to find the most appropriate definition of both the timing of water shortage initiation and its duration in order to promote the triggering of tolerance mechanisms (osmotic adjustment, xanthophyll cycle, antioxidant synthesis) without compromising tuber yield [45]. A better knowledge of the molecular and physiological mechanisms responsible for tuberization and drought tolerance in different genotypes and environments is needed to face this challenge. The partial root-zone drying technique is effective in potato. Notwithstanding, there are key unresolved issues. It is not clear when the alternation of the irrigation would optimize water savings and tuber yield in field conditions. In addition, it is not well established which variable or variable combinations (water soil condition, xylem-ABA concentration, root functioning performance) to use to decide when to switch the irrigation from the wet to the dry side to optimize tuber yield. Selection of cultivars with good adaptation to partial root drying should also be initiated. Partial root drying causes a mild or false water stress in crops [45]. Under this kind of controlled water supply, "opportunistic" or "risky" cultivars (*i.e.*, those able to maintain photosynthesis [158]) are likely to have better growth and tuber yield. Nonetheless, this hypothesis should be experimentally validated. In a similar vein, conservation agriculture would also benefit from clones selected for this management strategy.

4.2. Crop improvement

As mentioned above, there is a need to better know different traits respond to changes in timing, duration and intensities of water stress. The challenge is also, as in other cereals [159], to find the yield components that are critically affected by water stress and the combination of traits that enhance drought tolerance without penalizing tuber yield. Drought tolerance tends to be environment specific and dependent upon soil type, light intensity, and evaporative demands, among others [158]. Therefore, it is convenient to normalize the assessed trait values by the vapour pressure

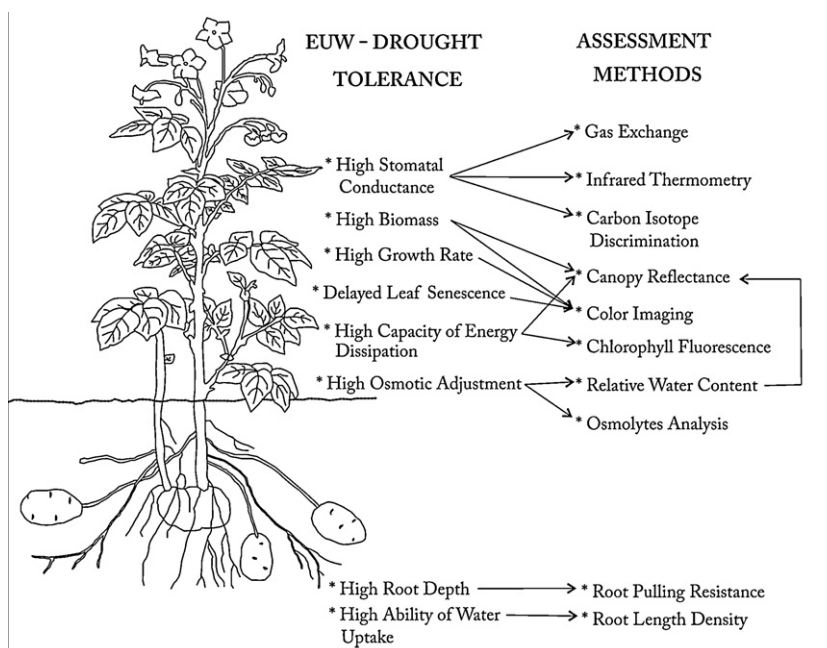


Fig. 2. Conceptual model for effective use of water (EUW) and drought tolerance in potato, showing related traits and methods used for their assessment.

deficit (e.g., transpiration in potato [130]) or leaf-meristem temperature (e.g., leaf elongation in some cereals using thermal time or degree days [160]), aiming at characterizing the expected drought response with respect to the target environments.

Methods to assess the response of traits under drought stress, particularly those non-invasive and non-destructive techniques warrant special attention. Root growth, architecture and functionality in response to drought are measurements that must be incorporated in potato breeding programs [64]. *In situ* root imaging is a technology being used in other crops and in potato [161,162]. Magnetic resonance imaging (MRI) can be used to study root architecture in early stages of potato development (A. Posadas, *pers. comm.*). Color imaging and infrared thermometry could complement existing methods based on vegetation indices. Thermal cameras offer several benefits compared to infrared thermometers, particularly in terms of spatial resolution, precision of measurements and reduction of errors due to changing environmental conditions between measurements [163]. Attempts are actually made to apply thermal imaging in potato breeding [164]. Since noticeable changes in fluorescence only occur under severe water stress conditions, fluorescence imaging on its own does not seem suitable for the early detection of water stress. This technique has however the potential to complement other imaging techniques and provide information about responses to heat or severe drought. The use of carbon isotope discrimination assessments should be re-analyzed in the light of the experience in cereals. The variation of this trait in different organs and under different stress intensities and timings should be investigated, allowing a better definition of conditions in which it could be used as an indirect selection criterion for yield. It would be useful to develop conceptual models and theoretical ideotypes for potato in order to address critical drought tolerant related traits and implement corresponding assessment methods in an integrative way. A first attempt is proposed in Fig. 2. Selections based on *in vitro* experiments merit further development at least as a pre-screening method, to be validated against selection under field conditions.

Among the mechanisms that could determine drought tolerance improvement in plants, epigenetic stressful memory is an issue that is currently debated and formalized in the scientific community [165]. Plant memory and specifically “stressful memory”

involves some processes that allow an improved stressful response in individuals that previously have undergone acclimation and hardiness to the same stress driver [165]. Stressful memory is caused by epigenetic changes such as modification of DNA activation by methylation or acetylation, histones alteration and chromatin remodeling that result in gene silencing and/or gene activation [166]. Drought stress memory studies have been carried out in potato to test and compare water response and tolerance of some varieties [39,43]. Activation of genes that take part in abscisic acid biosynthesis metabolic pathways, heat-shock proteins, xanthophylls, anthocyanins and other anti-oxidants glutathione-related were detected. Nevertheless, there is a need to compare memory effects on seeds from fruits (botanic seeds), seedlings and adult plants, and investigate the potential of trans-generation memory of stress.

Modern potato varieties are generally highly susceptible to drought. Thus, there is an increased interest in exploring and exploiting the wide genetic variation that exists for abiotic stresses tolerance in native potatoes. Selecting for drought tolerance while maintaining maximum productivity under optimal conditions is difficult as plant attributes involved in drought tolerance can be counter-productive under favorable conditions. The exciting results obtained in increasing abiotic stress tolerance in wheat by introgressing genes from related species [145,146] should stimulate similar efforts in potato.

Recent biotechnological approaches offer new alternatives to improve drought tolerance in several plants species, including potato; in terms of the identification of signaling pathways and master genes regulating drought tolerance. Genomic tools for identifying genome regions and genes involved in the control of drought tolerance should be more extensively used in potato. More detailed information will become available in the future using the metabolomics and proteomics techniques together with integrated bioinformatics systems. These advances will facilitate the genetic engineering of single or multiple targets to create a cultivated phenotype with high-yielding potential under drought stress conditions. Although cereal drought research may indeed have taken of earlier in cereals than in potato, there are exciting opportunities to transfer the rich knowledge accumulated in cereals into potato research. Many traits and screening methodologies have

been developed over the years in cereals and these may be applied to potato research as well. Taking advantage of the experience in cereals, careful scrutiny is needed to define the environment and the type of drought stress potato crops are really experiencing.

Acknowledgment

The authors thank Victor Mares and Roberto Quiroz (Integrated Crop and Systems Research Program, CIP) for revising the manuscript. This research was partially funded by BMZ/GIZ Project “Improved potato varieties and water management technologies to enhance water use efficiency, resilience, cost-effectiveness, and productivity of smallholder farms in stress-prone Central Asian environments” under the CGIAR Research Programs on “Climate change, Agriculture and Food Security (CAAFS)” and “Roots, Tubers and Bananas”.

References

- [1] FAO, statistical databases FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, 2012.
- [2] FAO, New light on a hidden treasure, FAO, Rome, 2009, 136 p.
- [3] G.J. Scott, Plants, people, and the conservation of biodiversity of potatoes in Peru, *Nat. Conservação* 9 (1985) 21–38.
- [4] G.J. Scott, M.W. Rosegrant, C. Ringler, Global projections for root and tuber crops to the year 2020, *Food Policy* 25 (2000) 561–597.
- [5] G. Thiele, K. Theisen, M. Bonierbale, T. Walker, Targeting the poor and hungry with potato science, *Potato J.* 37 (2010) 75–86.
- [6] S.H. Janski, L.P. Jin, K.Y. Xie, C.H. Xie, D.M. Spooner, Potato production and breeding in China, *Potato Res.* 52 (2009) 57–65.
- [7] X. Zou, P. Zhai, Q. Zhang, Variations in droughts over China: 1951–2003, *Geophys. Res. Lett.* 32 (2005) 1–4.
- [8] A.J. Haverkort, A. Verhagen, C. Grashoff, P.W.J. Uithol, Potato-zoning: a decision support system on expanding the potato industry through agro-ecological zoning using the LINTUL simulation approach, in: *Decision Support Systems in Potato Production*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2004, pp. 29–44.
- [9] E. Simelton, et al., The socioeconomics of food crop production and climate change vulnerability: a global scale quantitative analysis of how grain crops are sensitive to drought, *Food Secur.* 4 (2012) 163–179.
- [10] W.E. Easterling, et al., Food, fibre and forest products, in: M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden, C.E. Hanson (Eds.), *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007, pp. 273–313.
- [11] R.J. Hijmans, The effect of climate change on global potato production, *Am. J. Potato Res.* 80 (2003) 271–280.
- [12] D. Renault, W.W. Wallender, Nutritional water productivity and diets: from “crop per drop” towards “nutrition per drop”, *Agric. Water Manag.* 45 (2000) 275–296.
- [13] F.L. Liu, A. Shahnazari, M.N. Andersen, S.E. Jacobsen, C.R. Jensen, Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signaling, leaf gas exchange, and water use efficiency, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 3727–3735.
- [14] F.L. Liu, A. Shahnazari, M.N. Andersen, S.E. Jacobsen, C.R. Jensen, Effects of deficit irrigation (DI) and partial root drying (PRD) on gas exchange, biomass partitioning, and water use efficiency in potato, *Sci. Hort.* 109 (2006) 113–117.
- [15] J.J. Vacher, Responses of two main Andean crops, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and papa amarga (*Solanum juzepczukii* Buk.) to drought on the Bolivian Altiplano: significance of local adaptation, *Agric. Ecosyst. Environ.* 68 (1998) 99–108.
- [16] H. Saeed, I.G. Grove, P.S. Kettlewell, N.W. Hall, Potential of partial root zone drying as an alternative irrigation technique for potatoes (*Solanum tuberosum*), *Ann. Appl. Biol.* 152 (2008) 71–80.
- [17] K. Xie, et al., Partial root-zone drying irrigation and water utilization efficiency by the potato crop in semi-arid regions in China, *Sci. Hort.* 134 (2012) 20–25.
- [18] G. Rojas, A. Posadas, R. Quiroz, M. Holle, M. Málaga, Secado parcial de raíces: una promisoriosa técnica de riego en papa (*Solanum tuberosum* L.), *Zonas Áridas* 11 (2007) 206–218.
- [19] M. Rashidi, M. Gholami, Review of crop water productivity values for tomato, potato, melon, watermelon and cantaloupe in Iran, *Int. J. Agric. Biol.* 10 (2008) 432–436.
- [20] D.H. Fleisher, D.J. Timlin, V.R. Reddy, Elevated carbon dioxide and water stress effects on potato canopy gas exchange, water use, and productivity, *Agric. Forest Meteorol.* 148 (2008) 1109–1122.
- [21] K. Nagaz, M.M. Masmoudi, N.B. Mechli, Soil salinity and yield of drip-irrigated potato under different irrigation regimes with saline water in arid conditions of Southern Tunisia, *J. Agron.* 6 (2007) 324–330.
- [22] A. Shahnazari, F.L. Liu, M.N. Andersen, S.E. Jacobsen, C.R. Jensen, Effects of partial root-zone drying on yield, tuber size and water use efficiency in potato under field conditions, *Field Crops Res.* 100 (2007) 117–124.
- [23] C.B. Tanner, Transpiration efficiency of potato, *Agron. J.* 73 (1981) 59–64.
- [24] B.Z. Yuan, S. Nishiyama, Y. Kang, Effects of different irrigation regimes on the growth and yield of drip-irrigated potato, *Agric. Water Manag.* 63 (2003) 153–167.
- [25] K. Iwama, J. Yamaguchi, Abiotic stresses, in: J. Gopal, S.M. Paul Khurana (Eds.), *Handbook of Potato Production Improvement and Post Harvest Management*, Food Product Press, New York, 2006, pp. 231–278.
- [26] R.A. Jefferies, Physiology of crop response to drought, in: A.J. Haverkort, D.K.L. MacKerron (Eds.), *Potato Ecology and Modeling of Crops Under Conditions Limiting Growth*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 1995, pp. 61–74.
- [27] C.A. Martínez, U. Moreno, Expresiones fisiológicas de resistencia a sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico, *Rev. Brasil. de Fisiol. Veget.* 4 (1992) 33–38.
- [28] P.M.K. Deblonde, J.F. Ledent, Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars, *Eur. J. Agron.* 14 (2001) 31–41.
- [29] S. Kumar, R. Asrey, G. Mandal, Effect of differential irrigation regimes on potato (*Solanum tuberosum*) yield and post-harvest attributes, *Indian J. Agric. Sci.* 77 (2007) 366–368.
- [30] B.K. Eiasu, P. Soundy, P.S. Hammes, Response of potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield components to gelpolymer soil amendments and irrigation regimes, *N. Z. J. Crop Hort.* 35 (2007) 25–31.
- [31] R. Schafleitner, et al., Field screening for variation of drought tolerance in *Solanum tuberosum* L. by agronomical, physiological and genetic analysis, *Potato Res.* 50 (2007) 71–85.
- [32] D.K.L. MacKerron, R.A. Jefferies, The distribution of tuber sizes in droughted and irrigated crops of potato. I. Observations on the effect of water stress on graded yields from different cultivars, *Potato Res.* 31 (1988) 269–278.
- [33] J.L. Walworth, D.E. Carling, Tuber initiation and development in irrigated and non irrigated potatoes, *Am. J. Potato Res.* 79 (2002) 387–395.
- [34] J.C. Ojala, J.C. Stark, G.E. Kleinkopf, Influence of irrigation and nitrogen management on potato yield and quality, *Am. Potato J.* 67 (1990) 29–43.
- [35] J. Ta, S.K. Kaushik, J.S. Minhas, V. Bhardwaj, *The Potato: Breeding for Biotic and Abiotic Stress*, Mehta, New Delhi, 2003, 446 p.
- [36] P.M.K. Deblonde, A.J. Haverkort, J.F. Ledent, Responses of early and late potato cultivars to moderate drought conditions: agronomic parameters and carbon isotope discrimination, *Eur. J. Agron.* 11 (1999) 91–105.
- [37] P.S. Basu, A. Sharma, N.P. Sukumaran, Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress, *Photosynthetica* 35 (1998) 13–19.
- [38] A. Bustan, M. Sagi, Y. De Malach, D. Pasternak, Effects of saline irrigation water and heat waves on potato production in an arid environment, *Field Crops Res.* 90 (2004) 275–285.
- [39] J.I. Watkinson, et al., Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. andigena show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles, *Plant Sci.* 171 (2006) 745–758.
- [40] W.K. Coleman, Tuber age as a contributory factor in the water relations of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Am. J. Potato Res.* 65 (1988) 109–118.
- [41] F. Liu, C.R. Jensen, A. Shahanzari, M.N. Andersen, S.-E. Jacobsen, ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying, *Plant Sci.* 168 (2005) 831–836.
- [42] S.H. Ahmadi, et al., Effects of irrigation strategies and soils on field-grown potatoes: gas exchange and xylem ABA, *Agric. Water Manag.* 97 (2010) 1486–1494.
- [43] C. Vasquez-Robinet, et al., Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 2109–2123.
- [44] D.H. Fleisher, D.J. Timlin, V.R. Reddy, Elevated carbon dioxide and water stress effects on potato canopy gas exchange, water use, and productivity, *Agric. Forest Meteorol.* 148 (2008) 109–122.
- [45] H.L. Xu, F.F. Qin, Q.C. Xu, J.Y. Tan, G.M. Liu, Applications of xerophytophysiology in plant production—the potato crop improved by partial root zone drying of early season but not whole season, *Sci. Hort.* 129 (2011) 528–534.
- [46] P.S. Basu, A. Sharma, I.D. Garg, N.P. Sukumaran, Tuber sink modifies photosynthetic response in potato under water stress, *Environ. Exp. Bot.* 42 (1999) 25–39.
- [47] A.H.C.M. Schapendonk, C.J.T. Spitters, P.J. Groot, Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars, *Potato Res.* 32 (1989) 17–32.
- [48] M.C. Kato, K. Hikosaka, N. Hirotsu, A. Makino, T. Hirose, The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II, *Plant Cell Physiol.* 44 (3) (2003) 318–325.
- [49] C. Tourneux, A. Devaux, M.R. Camacho, P. Mamani, J.F. Ledent, Effects of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (II): water relations, physiological parameters, *Agronomie* 23 (2003) 180–190.
- [50] P. Ranalli, M. Di Candilo, M. Bagata, Drought tolerance screening for potato improvement, *Plant Breed.* 11 (1997) 290–292.
- [51] K. Rajendran, M. Tester, S.J. Roy, Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals, *Plant Cell Environ.* 32 (2009) 237–249.
- [52] D. Rodriguez, V.O. Sadras, L.K. Christensen, R. Belford, A canopy stress index (CSI) to spatially assess the physiological status of wheat crops as affected by water and nitrogen supply, *Aust. J. Agric. Res.* 56 (2005) 983–993.

- [53] M. Borhan, S. Panigrahi, J. Lorenzen, H. Gu, Multispectral and color imaging techniques for nitrate and chlorophyll determination of potato leaves in a controlled environment, *Trans. Am. Soc. Agric. Eng.* 47 (2004) 599–608.
- [54] D.A. Johnson, K.H. Asay, L.L. Tieszen, J.R. Ehleringer, P.G. Jefferson, Carbon isotope discrimination: potential in screening cool-season grasses for water-limited environments, *Crop Sci.* 30 (1990) 338–343.
- [55] P. Monneveux, et al., Relationship between grain yield and carbon isotope discrimination in bread wheat under four water regimes, *Eur. J. Agron.* 22 (2005) 231–242.
- [56] R.A. Jefferies, Physiological determinants of genotypic differences in carbon isotope discrimination in potato grown in well-watered conditions, *Ann. Appl. Biol.* 127 (1995) 585–592.
- [57] R.A. Jefferies, Responses of potato genotypes to drought. I. Expansion of individual leaves and osmotic adjustment, *Ann. Appl. Biol.* 122 (1993) 93–104.
- [58] R. Schaffleitner, A. Gaudin, R.O. Gutierrez Rosales, C.A. Alvarado Aliaga, M. Bonierbale, Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato, *Acta Physiol. Plant.* 29 (2007) 19–26.
- [59] P.B. Kavi-Kishor, et al., Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Curr. Sci.* 88 (2005) 424–438.
- [60] O. Lahlou, J.F. Ledent, Root mass and depth, stolons and roots formed on stolons in four cultivars of potato under water stress, *Eur. J. Agron.* 22 (2005) 159–173.
- [61] J.R.A. Steckel, D. Gray, Drought tolerance in potatoes, *J. Agric. Sci.* 92 (1979) 375–381.
- [62] F.T. Rossouw, J. Waghmarae, The effect of drought on growth and yield of two South African potato cultivars, *S. Afr. J. Sci.* 91 (1995) 149–150.
- [63] I.J. Ekanayake, D.J. Midmore, Root-pulling resistance of potatoes in a drought environment, *Am. Potato J.* 66 (1989) 519.
- [64] K. Iwama, Physiology of the potato: new insights into root system and repercussions for crop management, *Potato Res.* 51 (2008) 333–353.
- [65] T. Deguchi, et al., Aboveground characteristics, yield potential and drought tolerance in “Konyu” potato cultivars with large root mass, *Potato Res.* 53 (2010) 331–340.
- [66] J. Gabriel, et al., Resistencia genética de híbridos de papa (*Solanum tuberosum* L.) al estrés hídrico por sequía, *Rev. Latinoam. de la Papa* 17 (2012) 97–124.
- [67] A. Blum, Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress, *Field Crops Res.* 112 (2009) 119–123.
- [68] J.C. Stark, J.J. Pavek, I.R. McCann, Using canopy temperature measurements to evaluate drought tolerance of potato genotypes, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116 (1991) 412–415.
- [69] J. Peñuelas, I. Filella, Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status, *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 151–156.
- [70] I.M. François, M. De Proft, Reflectance indices indicative for changes in water contents of chicory leaves, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70 (2005) 135–138.
- [71] J. Peñuelas, J. Piñol, R. Ogaya, I. Filella, Estimation of plant water concentration by the reflectance water index Wi (R900/R970), *Int. J. Remote Sens.* 18 (1997) 2869–2875.
- [72] J.G.P.W. Clevers, Application of a weighted infrared-red vegetation index for estimating leaf area index by correcting for soil moisture, *Remote Sens. Environ.* 2 (1989) 25–37.
- [73] N.O. Espinoza, et al., The potato: a model crop plant for tissue culture, *Outlook Agric.* 15 (1986) 21–26.
- [74] K. Manoj, D. Uday, Gradient in vitro testing of tomato (*Solanum lycopersicum*) genotypes by inducing water deficit: a new approach to screen germplasm for drought tolerance, *Asian J. Plant Sci.* 6 (2007) 934–940.
- [75] J. Gopal, K. Iwama, In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol, *Plant Cell Rep.* 26 (2007) 693–700.
- [76] J. Gopal, K. Iwama, Y. Jitsuyama, Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44 (2008) 221–228.
- [77] E. Jacomini, A. Bertani, S. Mapelli, Accumulation of polyethylene glycol 6000 and its effects on water content and carbohydrate level in water-stressed tomato plant, *Can. J. Bot.* 66 (1988) 970–973.
- [78] Z. Yaniv, E. Werker, Absorption and secretion of polyethylene glycol by Solanaceous plants, *J. Exp. Bot.* 34 (1983) 1577–1584.
- [79] M. Fritz, R. Ehwald, Mannitol permeation and radial flow of water in maize roots, *New Phytol.* 188 (2010) 210–217.
- [80] H. Lipavská, D. Vreugdenhil, Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 45 (1996) 103–107.
- [81] M.W. Bonierbale, R.L. Plaisted, S.D. Tanksley, RFLP maps based on common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato, *Genetics* 120 (1988) 1095–1103.
- [82] C. Gebhardt, et al., RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*, *Theor. Appl. Genet.* 78 (1989) 65–75.
- [83] M. Malosetti, R.G.F. Visser, C. Celis-Gamboa, F.A. van Eeuwijk, QTL methodology for response curves on the basis of non-linear mixed models, with an illustration to senescence in potato, *Theor. Appl. Genet.* 113 (2006) 288–300.
- [84] A. Fernandez-Del-Carmen, C. Celis-Gamboa, R.G.F. Visser, C.W.B. Bachem, Targeted transcript mapping for agronomic traits in potato, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 2761–2774.
- [85] J. Sliwka, I. Wasilewicz-Flis, H. Jakuczun, C. Gebhardt, Tagging quantitative trait loci for dormancy, tuber shape, regularity of tuber shape, eye depth and flesh colour in diploid potato originated from six *Solanum* species, *Plant Breed.* 127 (2008) 49–55.
- [86] J.E. Bradshaw, C.A. Hackett, B. Pande, R. Waugh, G.J. Bryan, QTL mapping of yield, agronomic and quality traits in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*), *Theor. Appl. Genet.* 116 (2008) 193–211.
- [87] B.B. D’Hoop, et al., Population structure and linkage disequilibrium unraveled in tetraploid potato, *Theor. Appl. Genet.* 121 (2010) 1151–1170.
- [88] A.M. Anithakumari, O. Dolstra, B. Vosman, R.G.F. Visser, G. van der Linden, In vitro screening and QTL analysis for drought tolerance in diploid potato, *Euphytica* 181 (2011) 357–369.
- [89] J.W. Youm, et al., Ectopic expression of pepper CaPF1 in potato enhances multiple stresses tolerance and delays initiation of *in vitro* tuberization, *Planta* 228 (2008) 701–708.
- [90] L. Tang, et al., Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses, *Transgenic Res.* 17 (2008) 705–715.
- [91] D. Shin, et al., Expression of StMYB1R-1, a novel potato single MYB-like domain transcription factor increases drought tolerance, *Plant Physiol.* 155 (2011) 421–432.
- [92] S. Movahedi, et al., Constitutive expression of Arabidopsis DREB1B in transgenic potato enhances drought and freezing tolerance, *Biol. Plant.* 56 (1) (2012) 37–42.
- [93] G. Knipp, B. Honermeier, Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans, *J. Plant Physiol.* 163 (2006) 392–397.
- [94] L. Stiller, et al., Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalase-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Planta* 227 (2008) 299–308.
- [95] R. Ahmad, et al., Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses, *Plant Cell Rep.* 27 (4) (2008) 687–698.
- [96] N. Zhang, et al., Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach, *Plant Biotechnol. Rep.* 5 (2011) 71–77.
- [97] M.N. Muñiz García, S.M. País, M.T. Téllez-Iñón, D.A. Capiati, Characterization of StPPI1, a proton pump interactor from *Solanum tuberosum* L. that is up-regulated during tuber development and by abiotic stress, *Planta* 233 (2011) 661–674.
- [98] A. Perl, et al., Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases, *Theor. Appl. Genet.* 85 (5) (1993) 568–576.
- [99] L. Tang, et al., Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature, *Plant Cell Rep.* 25 (2006) 1380–1386.
- [100] A.E. Eltayeb, et al., Transgenic potato overexpressing Arabidopsis cytosolic AtDhAR1 showed higher tolerance to herbicide, drought and salt stresses, *Breed. Sci.* 61 (2011) 3–10.
- [101] A.E. Eltayeb, et al., Greater protection against oxidative damages imposed by various environmental stresses in transgenic potato with higher level of reduced glutathione, *Breed. Sci.* 60 (2010) 101–109.
- [102] K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, *Ann. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 781–803.
- [103] K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice, *Plant J.* 51 (2007) 617–630.
- [104] C. Taylor, Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs, *Plant Cell* 8 (1996) 1221–1224.
- [105] T.J. Close, Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature, *Physiol. Plant.* 100 (1997) 291–296.
- [106] M.C. Koag, R.D. Fenton, S. Wilkens, T.J. Close, The binding of maize DNH1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity, *Plant Physiol.* 131 (2003) 309–316.
- [107] C.R. Allagulova, F.R. Gimalov, F.M. Shakirova, V.A. Vakhitov, The plant dehydrins: structure and putative functions, *Biochemistry (Moscow)* 68 (2010) 945–951.
- [108] C.G. López, G.M. Banowetz, C.J. Peterson, W.E. Kronstad, Wheat dehydrin accumulation in response to drought stress during anthesis, *Funct. Plant Biol.* 29 (2002) 1417–1425.
- [109] T. Rorat, W. Irzykowski, W.J. Grygorowicz, Identification and isolation of novel cold induced genes in potato (*Solanum soganandinum*), *Plant Sci.* 124 (1997) 69–78.
- [110] E.J. Stockinger, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow, Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to cold and water deficit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 1035–1040.
- [111] Q. Liu, et al., Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transcription pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 10 (1998) 1391–1406.
- [112] Y. Ito, et al., Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice, *Plant Cell Physiol.* 47 (2006) 141–153.
- [113] M.T. Pino, et al., Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield, *Plant Biotechnol.* 5 (2007) 591–604.

- [114] M.T. Pino, et al., Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato, *Plant Cell Environ.* 31 (2008) 393–406.
- [115] M.F. Thomashow, Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway, *Plant Physiol.* 154 (2010) 571–577.
- [116] B. Behnam, et al., The *Arabidopsis* DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*), *Plant Biotechnol.* 23 (2006) 169–177.
- [117] J.C. Pennycook, et al., The low temperature-responsive, *Solanum* CBF1 genes maintain high identity in their upstream regions in a genomic environment undergoing gene duplications, deletions, and rearrangements, *Plant Mol. Biol.* 67 (2008) 483–497.
- [118] M. Carvallo, et al., A comparison of the low temperature transcripts and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance—*Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 3807–3819.
- [119] R. Weisz, J. Kaminski, Z. Smilowitz, Water-deficit effects on potato leaf growth and transpiration: utilizing fraction extractable soil-water for comparison with other crops, *Am. Potato J.* 71 (1994) 829–840.
- [120] R.J. Hijmans, D.M. Spooner, Geographic distribution of wild potato species, *Am. J. Bot.* 88 (2001) 2101–2112.
- [121] E. Ritter, J.I. Ruiz de Galarreta, H.J. van Eck, I. Sanchez, Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique, *Theor. Appl. Genet.* 116 (2008) 1003–1013.
- [122] J.J. Vacher, M. García, Uso consuntivo y comportamiento hídrico de la papa amarga (*Solanum juzepczukii*) y de la papa dulce (*Solanum tuberosum* spp. *andigena*) en el altiplano boliviano, in: J. Rea, J.J. Vacher (Eds.), *La Papa Amarga*, ORSTOM, La Paz, 1992, pp. 69–76.
- [123] M.C. Bedogni, S. Capezio, M. Huarte, Comportamiento frente a estrés hídrico de variedades nativas y especies silvestres de papa, *Rev. Latinoam. de la Papa* 15 (2009) 72–74.
- [124] R. Cabello, E. Chujoy, F. Mendiburu, M. Bonierbale, P. Monneveux, Large-scale evaluation of potatoes improved varieties, pre-breeding material and landraces for drought tolerance, *Am. J. Potato Res.* 89 (2012) 400–410.
- [125] M. Soto-Hernandez, A. Larque Saavedra, Abscisic acid accumulation in an edible drought resistant wild potato (*Solanum cardiophyllum*), *Phyton* 2 (1987) 69–71.
- [126] W.K. Coleman, Evaluation of wild *Solanum* species for drought resistance: 1. *Solanum gandarrillasii* Cardenas, *Environ. Exp. Bot.* 62 (2008) 221–230.
- [127] J.C. Kalazich, R.L. Plaisted, Association between trichome characters and agronomic traits in *Solanum tuberosum* (L.) × *S. berthaultii* (Hawkes) hybrid, *Am. Potato J.* 68 (1991) 833–847.
- [128] M.P. Reynolds, A.J.D. Pask, D.M. Mullan, Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation, CIMMYT, Mexico, D.F., 2012, 188 p.
- [129] W.G. Burton, The Potato, a Survey of its History and of Factors Influencing its Yield, Nutritive Value, Quantity and Storage, H. Veeman & Zonen N.V, Wageningen, 1966, 382 p.
- [130] W.G. Burton, Challenges for stress physiology in potato, *Am. Potato J.* 58 (1981) 3–14.
- [131] G. Hyman, et al., Strategic approaches to targeting technology generation: assessing the coincidence of poverty and drought-prone crop production, *Agric. Syst.* 98 (2008) 50–61.
- [132] X. Li, S.R. Waddington, J. Dixon, A.K. Joshi, C. de Vicente, The relative importance of drought and other water-related constraints for major food crops in South Asian farming systems, *Food Secur.* 3 (2011) 19–33.
- [133] M. Reynolds, B. Skovmand, R. Trethowan, W. Pfeiffer, Evaluating a conceptual model for drought tolerance, in: J.M. Ribaut, S.D. Poland (Eds.), *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-Limited Environments*, CIMMYT, Mexico, 2000, pp. 49–53.
- [134] G.O. Edmeades, J. Bolaños, S.C. Chapman, H.R. Lafitte, M. Bänziger, Selection improves drought tolerance in tropical maize populations. I. Gains in biomass, grain yield and harvest index, *Crop Sci.* 39 (1999) 1306–1315.
- [135] M. Havaux, Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures, *Plant Cell Environ.* 16 (1993) 461–467.
- [136] M.S. Lopes, M.P. Reynolds, Partitioning of assimilates to deeper roots is associated with cooler canopies and increased yield under drought in wheat, *Funct. Plant Biol.* 37 (2010) 147–156.
- [137] T. Erdem, Y. Erdem, A.H. Orta, H. Okursoy, Water-yield relationships of potato under different irrigation methods and regimens, *Sci. Agric. (Piracicaba Brazil)* 63 (2006) 226–231.
- [138] B. Prasad, Spectral Reflectance Indices in Wheat Breeding, VDM Verlag, Saarbrücken, Germany, 2008, 112 p.
- [139] S. Shrestha, H. Brueck, F. Asch, Chlorophyll index, photochemical reflectance index and chlorophyll fluorescence measurements of rice leaves supplied with different N levels, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 113 (2012) 7–13.
- [140] CIP, Annual report, CIP, Lima, Peru, 2010, 121 p.
- [141] M. Ghislain, J. Núñez, M. Herrera, J. Pignataro, F. Guzman, M. Bonierbale, D. Spooner, Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato, *Mol. Breed.* 23 (2009) 377–388.
- [142] D.M. Spooner, R.J. Hijmans, Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000, *Am. J. Potato Res.* 78 (2001) 237–268.
- [143] J. Pavek, D.L. Corsini, Utilization of potato genetic resources in variety of development, *Am. J. Potato Res.* 78 (2001) 433–441.
- [144] M. Iovene, A. Barone, L. Frusciante, L. Monti, Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome content and resistance traits from *S. commersonii*, *Theor. Appl. Genet.* 109 (2004) 1139–1146.
- [145] A. Mujeeb-Kazi, Utilization of Genetic Resources for Bread Wheat Improvement, CRC, series, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2006, pp. 61–97.
- [146] M. van Ginkel, F. Ogonnaya, Novel genetic diversity from synthetic wheats in breeding cultivars for changing production conditions, *Field Crops Res.* 104 (2007) 86–94.
- [147] R.G.F. Visser, et al., Sequencing the potato genome: outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop, *Am. J. Potato Res.* 86 (2009) 417–429.
- [148] B. Kloosterman, et al., Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array, *Funct. Integr. Genomics* 8 (2008) 329–340.
- [149] M.T. Jenkins, Corn improvement, in: H.A. Wallace (Ed.), *Yearbook of Agriculture 1936*, Government Printing Office, USDA, Washington, DC, 1936.
- [150] P. Monneveux, C. Sanchez, D. Beck, G.O. Edmeades, Drought tolerance improvement in tropical maize source populations: evidence of progress, *Crop Sci.* 46 (2006) 180–191.
- [151] J.M. Ribaut, J. Betran, P. Monneveux, T. Setter, Drought tolerance in maize, in: J.L. Bennetzen, S.C. Hake (Eds.), *Handbook of Maize: Its Biology*, Springer, New York, 2009, pp. 311–344.
- [152] P.R. Hobbs, K. Sayre, R. Gupta, The role of conservation agriculture in sustainable agriculture, *Phil. Trans. R. Soc.* 363 (2008) 543–555.
- [153] R. Derpsch, T. Friedrich, Global overview of conservation agriculture adoption, in: *Proceedings, Lead Papers, 4th World Congress on Conservation Agriculture*, 4–7 February 2009, New Delhi, India, 2009, pp. 429–438.
- [154] K. Sayre, P. Hobbs, The raised-bed system of cultivation for irrigated production conditions, in: P. Lal, P. Hobbs, N. Uphoff, D.O. Hansen (Eds.), *Sustainable Agriculture and the Rice-Wheat system*, Ohio State University, Columbia, USA, 2004, pp. 337–355.
- [155] A. Ratnadass, P. Fernandes, J. Avelino, R. Habib, Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review, *Agron. Sust. Dev.* 32 (2012) 273–303.
- [156] A. Ghaffari, H.F. Cook, H.C. Lee, Climate change and winter wheat management: a modelling scenario for South-Eastern England, *Climatic Change* 55 (2002) 509–533.
- [157] J.P. Singh, S.S. Lal, P.M. Govindkrishnan, V.K. Dua, S.K. Pandey, Impact of climate change on potato in India, in: H.P. Singh, J.P. Singh, S.S. Lal (Eds.), *Challenges of Climate Change-India Horticulture*, Westville Publishing House, New Delhi, 2009, pp. 90–99.
- [158] F. Tardieu, Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 25–31.
- [159] R. Dolferus, J.I. Xuemei, R.A. Richards, Abiotic stress and control of grain number in cereals, *Plant Sci.* 181 (2011) 331–341.
- [160] B. Parent, O. Turc, Y. Gibon, M. Stitt, F. Tardieu, Modelling temperature-compensated physiological rates, based on the co-ordination of responses to temperature of developmental processes, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 2057–2069.
- [161] W. Richner, M. Liedgens, H. Bürgi, A. Soldati, P. Stamp, Root image analysis and interpretation, in: A.L. Smit, A.G. Bengough, C. Engels, M. van Noordwijk, S.S.C. Pellerin (Eds.), *Root Methods A Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, 2000, pp. 305–342.
- [162] H.E. Shashidhar, A. Henry, B. Hardy, Methodologies for Root Drought Studies in Rice, International Rice Research Institute, Philippines, 2012, p. 65.
- [163] B. Berger, B. Parent, M. Tester, High-throughput shoot imaging to study drought responses, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 3519–3528.
- [164] J. Berke, Z. Polgar, Z. Horvath, T. Nagy, Developing on exact quality and classification system for plant improvement, *J. Univers. Comput. Sci.* 12 (9) (2006) 1154–1164.
- [165] A. Trewavas, What is plant behaviour, *Plant Cell Environ.* 32 (2009) 606–616.
- [166] J.A. Bruce, M.C. Matthes, J.A. Napier, J.A. Pickett, Stressful, Stressful 'memories' of plants: evidence and possible mechanisms, *Plant Sci.* 173 (2007) 603–608.

RESEARCH PAPER

Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the *ScCBF1* gene

María Teresa Pino¹, Andrea Ávila¹, Andrea Molina¹, Zoran Jeknic², and Tony H.H. Chen²

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) P.O.BOX 439-9.Santiago, Chile.

²Department of Horticulture, ALS 4017, Oregon State University, Corvallis, OR 97331, USA.

Abstract

M.T. Pino, A. Ávila, A. Molina, Z. Jeknic, and T.H.H. Chen. 2013. Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the *ScCBF1* gene. Cien. Inv. Agr. 40(1):171-184. Cultivated potato crops are sensitive to drought stress, reducing yield and tuber quality when the soil water potential drops to -0.3 MPa. However, drought not only affects plant growth and physiological activity, but this stress also induces biochemical and molecular changes in the cellular gene expression profile, triggering genes that play a direct role in plant protection and gene regulation. The genes involved in regulation include C-repeat Binding Factors/Dehydration responsive element binding (CBF/DREB) transcription factors, which increase cold, drought and salt tolerance in different plant species. The aim of this research was to evaluate whether the overexpression of the *ScCBF1* gene from *Solanum commersonii* enhances drought stress tolerance in transgenic *Solanum tuberosum* and *S. commersonii* plantlets grown *in vitro* and induces drought adaptation mechanisms, such as osmoprotectors and genes for osmotic adjustment and membrane stability. Drought conditions were simulated through the addition of polyethylene glycol (PEG4000) to hormone-free MS medium. The vegetative growth, root development, proline content, and *ScCBF1*, $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) and Dehydrins like genes (*DNH10*) expression were evaluated. The constitutive *in vitro* overexpression of *ScCBF1* in both potato species showed better overall plantlet growth and root development under drought stress and higher proline levels in the stems and leaves. A significant increase in *DNH10* expression was also associated with drought stress. In summary, the expression of *ScCBF1* in potatoes induces responses associated with drought adaptation mechanisms, resulting in better overall plant growth.

Key words: *CBF* gene, drought stress, *in vitro*, potato, *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*.

Introduction

The cultivated potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important food crop in the world, with an annual production of approximately 325

million tons (FAO, 2012). Although grown in many different climates, potato crops are sensitive to drought stress. Low levels of water availability during potato crop growth significantly reduce yield, shortening the production period and limiting geographical distribution. Drought stress is particularly harmful during tuber formation, affecting tuber number, size and quality (Ekanayake

and Midmore, 1992). Drought not only affects tuber production but also primarily reduces vegetative growth, shoot length, leaf size and leaf number (Weisz *et al.*, 1994; Deblonde and Ledent, 2001). In addition to stomata closure, drought stress reduces gas exchange through reductions in the transpiration and photosynthetic rates (Ekanayake and Midmore, 1992; Dalla Costa *et al.*, 1997; Deblonde and Ledent, 2001; Kiziloglu *et al.*, 2006). The vulnerability of potato to drought is attributed to the shallow root system of this crop (50 to 80 cm deep), which does limit water uptake (Ekanayake and Midmore, 1992; Dalla Costa *et al.*, 1997). Drought tolerance could also be attributed to several genotype characteristics. However, the length and capacity of the root system are critical. The root/shoot dry weight ratio increases as plant water stress increases due to relative reductions in the shoot dry weight (Chazen and Neumann, 1994; Iwama, 2008). Drought also induces biochemical and molecular changes (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). The synthesis of compatible solutes, such as proline, soluble sugars, and glycine betaine, plays a crucial role in osmotic adjustments. Under osmotic stress, there is an increase in the concentration of free proline, which acts as an osmotic agent, protecting plants from dehydration (Kavi Kishor *et al.*, 2005; Szabados and Savoure, 2010). It has been suggested that proline participates in multiple roles in plant stress, stabilizing proteins and membranes and providing a source of carbon, nitrogen and energy during cell rehydration (Kavi Kishor *et al.* 2005; Szabados and Savoure, 2010). Proline has been associated with drought tolerance and other abiotic stresses in several plant species, such as rice (Su and Wu, 2004) and potato (Knipp and Honermeier, 2006). A study in different potato genotypes showed the accumulation of free proline in the leaves under drought stress (Bansal and Nagarajan, 1986). However, a recent study showed that the proline concentration increased earlier in drought susceptible varieties than in drought tolerant varieties, suggesting that proline accumulation is only a varietal characteristic in potatoes (Schafleitner *et al.*, 2007). Several genes are

either up or down regulated in response to osmotic stress (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yang *et al.*, 2010). There are genes that directly protect against environmental stresses and genes that play a role in gene expression regulation and signal transduction (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). The genes that play a role in gene expression regulation and signal transduction include transcription factors such as C-repeat Binding Factors/Dehydration responsive element binding (*CBF/DREB*) genes (Liu *et al.*, 1998). The CBFs bind to the cold/dehydration responsive regulatory motif (CRT/DRE) and are present in the promoter of many drought and cold responsive genes, such as those associated with osmoprotectant, cold-responsive (*COR*) and late-embryogenesis-abundant (*LEA*) proteins (Liu *et al.*, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). In Arabidopsis plants, *AtCBF3* overexpression increased $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) transcript accumulation and consequently increased the proline concentration (Gilmour *et al.*, 2000). A similar response has been associated with CBF overexpression in some species, such as tomato (Hsieh *et al.*, 2002), tall fescue (Zhao *et al.*, 2007) and potato (Pino *et al.*, 2008). Studies in wheat have reported an association between the *CBF* genes and *LEA* expression upon abiotic stress (Kume *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005). Dehydrins like genes (*DHNs*) are members of the *LEA* protein family, and the most abundant class of dehydrins, such as the barley dehydrins *DHN1*, *DHN2*, *DHN3*, *DHN4*, *DHN6*, and *DHN9*, is induced in response to drought or ABA (Allagulova *et al.*, 2010). Some studies in potato and tobacco have also demonstrated an association of *CBF* overexpression with *LEA* protein expression. For example, the overexpression of *AtCBF* in potato substantially increased *Solanum tuberosum* Protein inhibitor (*StPI*) and *DHN10* transcript levels more than ω -9 stearoyl-ACP desaturase (ω -9) and *DHN2* (Pino *et al.*, 2008).

The expression of the CBF regulon increases cold, salinity and drought tolerance in different plant species (Jaglo *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*,

2002; Kasuga *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010). Recent studies have confirmed the existence of the CBF regulon in *Solanum commersonii*, a wild potato species highly tolerant to abiotic stress. *S. commersonii* CBF genes induce similar genes to those induced through CBF transcription factors from *Arabidopsis* (Pennycooke *et al.*, 2008; Carvallo *et al.*, 2011). Therefore, the CBF transcription factors of *S. commersonii* might play a central role in the response to low temperatures and drought stress in potatoes. The aim of this research was to evaluate whether the overexpression of the *ScCBF1* gene, cloned from *S. commersonii*, could enhance drought stress tolerance in genetically modified (GM) plants of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* grown under *in vitro* drought stress. To establish possible mechanisms for drought tolerance, the free proline content was measured. The expression of *P5CS* and *DNH10* was also evaluated, as both genes play a role in osmotic adjustment and membrane stability.

Materials and methods

Constructs and plant transformation

A 750 bp fragment containing the coding region of *ScCBF1* (GenBank: EU849672.1) was cloned into the PstI (SbfI) site of the binary transformation vector pCAMBIA1304. The resulting plasmid, Z45, containing the *ScCBF1* coding sequence under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. *Agrobacterium*-mediated transformation was conducted in a cultivated potato non-drought tolerant *S. tuberosum* (cultivar Cardinal) and a wild potato drought tolerant *S. commersonii* Dun (PI 243503 clone 13), according to Pino *et al.* (2008). The plantlets were further selected for hygromycin resistance (5 and 10 mg L⁻¹). Hygromycin-resistant rooted plantlets were analyzed for *ScCBF1* integration through PCR and Southern analyses. The 35S promoter forward primer 35S-P.001 (5'-cacgtcttcaaagcaagtg-3') and the *ScCBF1* gene

reverse primer (5'-gctagcttagatagaataatccataag-3') were used to verify the integration of the 35S-*ScCBF1* operon. The PCR reactions were run in an XP Thermal cycler (Bioer Co., Zhejiang, R.P China) for 35 cycles at 94 °C for 40 s, 55 °C for 40 s and 72 °C for 60 s.

Plant material and drought stress treatment

In this study, wild type (WT) and three GM lines (Lines 6, 21, 22) were used for *S. commersonii*, and WT and three GM lines (Lines 11, 15, 19) were used for *S. tuberosum*. The drought conditions were simulated *in vitro* through the addition of polyethylene glycol 4000 (PEG) mol. wt. 4000 (PhytoTechnology Laboratories., Shawnee Mission, KS, USA) to hormone-free MS medium. Briefly, MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing 20 g L⁻¹ sucrose and no hormones was supplemented with 0, 4 or 8% PEG, generating water potential (MPa) values of -0.021, -0.362 and -0.478, respectively. The media pH was adjusted to 5.7, and the media were solidified with 7.5 g L⁻¹ agar. Glass vessels (200 mL) containing 20 mL of the medium were used. *In vitro* drought stress treatments were performed based on the results of preliminary studies showing that potato vegetative growth was negatively affected when the soil water potential dropped to -0.3 MPa and that stomatal conductance and net photosynthesis were reduced when the soil water potential dropped to -0.55 MPa. The soil water potential was maintained between 0 and -0.03 MPa in irrigated potatoes and other species (Martínez and Moreno, 1992; Molinos *et al.*, 2004; Schafleitner *et al.*, 2007). The water potential of all media was measured using a Vapor Pressure Osmometer Vapro 5520 (Wescor, Inc., Logan, Utah, USA). The measurements were repeated until reaching reliable consistent values.

Experimental conditions

Nodal segments (5-6 mm) from 30-day-old plantlets were cut from the middle third of the

stem (excluding the shoot tips and basal regions) and used as explants. Three explants for each vessel (experimental unit) were cultured. *In vitro* plantlets were grown at 24 °C in a growth chamber with a 16 h light/8 h dark photoperiod provided by a photon flux of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from cool white fluorescent tubes. The 50-day-old plantlets (without sub culturing) were evaluated for vegetative growth, root development, proline quantification and gene expression.

Evaluation of vegetative growth

The plantlets were removed from the *in vitro* PEG-based medium. The shoots were cut from the roots, and the plantlet height was measured as the length of the main stem from base to the tip. The foliage (stems and leaves) was weighed, collected and stored in liquid N₂ at -80 °C until further analysis.

Evaluation of root characters

The roots were cut from the shoots and washed to remove any residual medium and preserved in 70% alcohol. The samples were measured for root length, root diameter and total root area. The roots were scanned using an EPSON Perfection V700 Photo Scanner (Epson America Inc., Long Beach, CA, USA), and the root characters were analyzed using the WinRhizo-Pro image analysis system (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada).

Proline analysis

The free proline content was determined from the stems and leaf tissue in each genotype under each drought stress treatment. The stem and leaf tissues were collected, pulverized in liquid N₂ and stored at -80 °C. The proline analyses, using 20-30 mg lyophilized tissue per sample, were performed as in Gilmour *et al.* (2000). The absorbance was determined at 515 nm using a spectrophotometer SpectroQuest-2800 (UNICO. Dayton, NJ, USA).

The resulting values were compared with a standard curve constructed using known amounts of L-proline (Sigma-Aldrich, SG, Switzerland).

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from leaf tissue using TRIZOL® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to Chomczynski and Sacchi (1987). For the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis, 1 μg of RNA was reverse transcribed using a Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The qRT-PCR reactions were performed in 25 μL of LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany), containing 10 ng of cDNA and 0.3 nM of each primer. Primers were designed to generate the 63-bp *ScCBFI* fragment (F: 5-tatggcggaggactaatgc-3, R: 5-tccacataatgatctcccatttc-3), the 102-bp *P5SC* fragment (F: 5-cgatccacaat cagagctaattc-3, R: 5-gcagtcataaccaccttcca-3) (Schafleitner *et al.*, 2007), the 496-bp *StC118 (DNH10)* fragment (F: 5-gctaaacccccaaaaaaactcatt-3, R: 5-gtgaatgtactcgtcttttgac-3) (Pino *et al.*, 2008) and the 100-bp potato 60S fragment (F: 5-aacaatggcggctaagaaga-3, R: 5-tgccataaacctttttgt-3) (Carvalho *et al.*, 2011). The qRT-PCR reactions were performed using a real-time PCR LightCycler 2.0 System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Specific primers for the potato 60S gene [expressed sequence tag (EST) clone STMCK67] were used as the internal control for the normalization of the RNA steady-state level. The relative gene expression in the wild-type (WT) lines at 24 °C (0 time) was set to 1, and the other values were adjusted accordingly. For each gene, a calibration curve was generated for each gene based on serial dilutions (10^{-1} to 10^{-3} $\mu\text{g mL}^{-1}$) of the templates. The purity of amplified products was verified through melting curve analyses. The initial amount of transcript in each sample was calculated from the standard curve using the default (fit point/arithmetic)

methods in the LightCycler Software Version 3 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and normalized to the values of the internal control. The data represent the means of three experimental replicates over time (n=9).

Experimental design and statistical analysis

A randomized complete block design was used. Wild type and three GM lines per gene construct and potato species were evaluated for three drought stress treatments. For each genotype and drought stress treatment, three independent experiments over time, using three replicate samples per experiment, were conducted, and each replicate consisted of an experimental unit of three plantlets. A total of 27 plantlets were evaluated for each genotype and drought stress treatment. The data were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) and mean separation (Duncan's Multiple Range) tests, performed using the SAS Program VERSION 9.1.3 2003 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results and discussion

Transgenic lines overexpressing the ScCBF1 gene showed significantly better plantlet growth and survival under drought stress

One of the first responses to water deficit is reduced plant growth, due to the inhibition of cell expansion. Water limitation reduces the force, or cell turgor pressure, required for cell expansion and reduces leaf expansion and stem and root growth (Spollen *et al.*, 1993; Iwama, 2008). It has been reported in potatoes and other plant species that soil water potential lower than -0.3 MPa reduces plant growth and biomass (Molinos *et al.*, 2004; Schafleitner *et al.*, 2007). The results of this study showed that plant growth was adversely affected through *in vitro* drought stress treatments ($P \leq 0.0001$) when the water potential dropped to -0.36 MPa (with 4% PEG). Only GM

lines overexpressing the *ScCBF1* gene showed better overall plant growth in terms of reduction in the stem length and total foliage weight (Table 1). *In vitro* drought stress adversely affected the shoot height in both potato species, and the WT lines were more affected, showing 70% shoot height reduction after treatment with 4% PEG and an 80% height reduction when the water potential dropped to -0.48 MPa (8% PEG). The shoot height of the GM lines was less affected. In GM *S. tuberosum* (Lines 11, 15 and 19), the shoot height was inhibited 30% after treatment with 4% PEG and 55% after treatment with 8% PEG. Similar results were observed for total foliage weight (stems + leaves), showing that the GM lines were significantly less affected under *in vitro* drought stress compared with the WT lines ($P \leq 0.0001$). In GM *S. tuberosum* Line 19, a 52% reduction in the total foliage weight was observed with 4% PEG treatment and a 67% reduction was observed with 8% PEG (-0.48 MPa), while the WT lines showed severe growth inhibition, with a 92% reduction after 8% PEG treatment. *In vitro* drought stress adversely affected plantlet survival in both potato species. Although all GM lines showed 100% plantlet survival (0, 4, and 8% PEG), WT *S. commersonii* showed a 15% reduction in survival after 8% PEG treatment ($P = 0.0168$), and WT *S. tuberosum* showed a 20% reduction in survival after 4% PEG treatment and a 40% reduction in survival after 8% PEG treatment ($P \leq 0.0001$). These results suggest that *in vitro* screening is sufficient to discriminate drought tolerance in terms of biomass development and plantlet survival, similar to previous studies showing that *in vitro* screening is a useful technique for the initial screening to select drought tolerant genotypes in different plant species, such as sunflower (Punia and Jain, 2002), *Rubus* (Orlikowska *et al.*, 2009), and potato (Gopal and Iwama, 2007). Gopal and Iwama (2007) reported the general effect of water stress on *in vitro* plant growth, which was similar to the observations obtained under field conditions, in terms of the reduction of stem and foliage development, root number and root dry

weight. Previous studies in cultivated potatoes have shown that along with overall plant growth inhibition, other major physiological mechanisms are also affected with low soil water potential. Indeed, after 10 days under drought stress, the soil water potential dropped to -0.55 MPa, the stomatal conductance was reduced to 89%, and net photosynthesis was reduced to 86% (Martínez and Moreno, 1992).

ScCBF1 overexpression in potatoes increased root development through the elongation of existing roots.

Several studies have shown that the roots continue elongating under conditions of low water potential, suggesting that this differential response in roots and shoots could be an adaptation to drought stress (Westgate and Boyer, 1985; Spollen *et*

Table 1. *In vitro* drought stress effects on overall plantlet growth, expressed as a percentage of shoot height reduction, plant survival and foliage weight loss for *Solanum commersonii* (Sc.WT), GM plantlets (Lines 6, 21, 22), *Solanum tuberosum* cv 'Cardinal' (St.WT) and GM (Lines 11, 15, 16). *In vitro* potato plantlets were grown under different PEG4000 concentrations (0, 4 and 8%). The average values of three different experiments are shown (n=27)

Species	PEG4000 (%)	Genotype	Shoot height reduction (%)	Total foliage weight loss (%)	Plant survival (%)	
<i>S. commersonii</i>	0	Sc.WT	0.0	0.0	100.0	
		Line 6	0.0	0.0	100.0	
		Line 21	0.0	0.0	100.0	
		Line 22	0.0	0.0	100.0	
	4	Sc.WT	64.5	85.1	100.0	
		Line 6	35.1	45.0	100.0	
		Line 21	32.1	60.0	100.0	
		Line 22	32.2	57.2	100.0	
	8	Sc.WT	82.8	91.2	85.2	
		Line 6	50.5	87.1	100.0	
		Line 21	60.9	89.2	100.0	
		Line 22	49.0	80.2	100.0	
			PEG Treatment	P≤0001	P≤0001	P=0.0642
			Genotypes	P≤0001	P≤0001	P=0.0440
		PEGXGenotype	P≤0001	P≤0001	P=0.0168	
<i>S. tuberosum</i>	0	St.WT	0.0	0.0	100.0	
		Line 11	0.0	0.0	100.0	
		Line 15	0.0	0.0	100.0	
		Line 19	0.0	0.0	100.0	
	4	St.WT	72.9	81.2	80.0	
		Line 11	50.3	67.1	100.0	
		Line 15	42.4	67.0	100.0	
		Line 19	44.5	52.4	100.0	
	8	St.WT	84.8	91.7	60.0	
		Line 11	56.5	78.6	100.0	
		Line 15	59.4	69.8	100.0	
		Line 19	51.5	67.5	100.0	
			PEG Treatment	P≤0001	P≤0001	p=0.0008
			Genotype	P≤0001	p=0.0015	P≤0001
		PEGXGenotypes	P≤0001	p=0.0039	P≤0001	

al., 1993). A field trial evaluating 250 potato genotypes using “the pulling resistance of roots selection-criterion” showed a positive correlation between the maximum length and root dry weight under drought stress (Ekanayake and Midmore, 1992). The potato GM lines showed differences in the root development compared with that in the WT lines ($P \leq 0.0001$) in terms of root length, root diameter and total root area (Table 2). For example, in Line 15, the root length increased from 39.4 cm (0% PEG) to 48.2 cm (4% PEG), while the total root area increased from 3.5 cm² (0% PEG) to 4.0 cm² (4% PEG). Similar results were observed in *S. commersonii*, where the root length for GM Lines 6, 21 and 22, grown on 4% PEG, was between 47 and 58 cm, while the root length for the WT lines was significantly shorter at 22 cm (Figure 1). However, when the water potential dropped to -0.478 MPa (8% PEG), the root growth was severely affected, while in GM *S. tuberosum* lines, the root length was between 25 and 30 cm, and in the WT lines, the root length was reduced to 14 cm. In addition, the root area

was reduced 2-3 cm² in the GM lines and 0.9 cm² in the WT lines. These results show that a PEG medium-water potential lower than -0.4 MPa drastically reduces root development, similar to previous studies showing that a soil water potential lower than -0.3 MPa reduces overall potato plant growth (Molinis *et al.*, 2004; Schafleitner *et al.*, 2007). These results showed that drought tolerant lines increased root development through the elongation of the existing roots and the expansion of the root area, similar to the results of previous studies in different plant species (Westgate and Boyer, 1985; Iwama, 2008).

The proline content increased under in vitro drought stress and ScCBF1 gene overexpression

Several plant species cope with drought stress through osmolyte accumulation, such as soluble sugars and free proline, which act as osmotic agents, protecting plant cells from dehydration (Szabados and Savoure, 2010). In different Andean

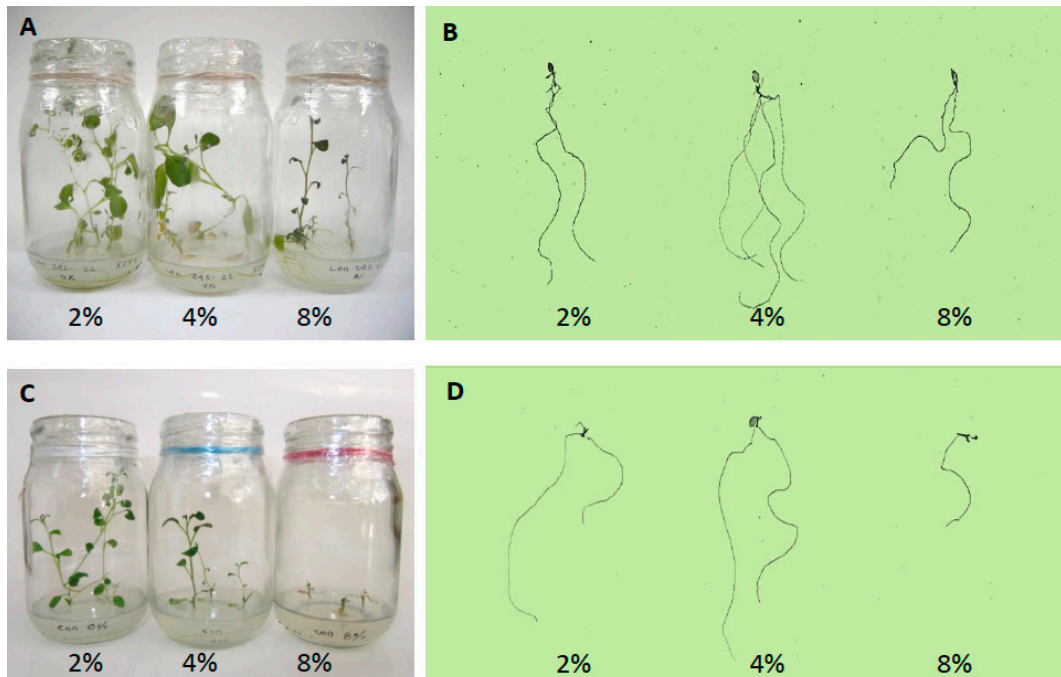


Figure 1. *In vitro* drought stress screening in potato plantlets, showing the overall growth and root development in GM *Solanum commersonii* Line 22 (A, B) and WT plants (C, D). *In vitro* potato plantlets were grown under different PEG4000 treatments (0, 4 and 8%).

Table 2. *In vitro* drought stress effects on plantlet root development for *Solanum commersonii* (Sc.WT), GM plantlets (Lines 6, 21, 22), *Solanum tuberosum* cv Cardinal (St.WT) and GM plantlets (Lines 11, 15, 16). *In vitro* potato plantlets were grown under different PEG4000 concentrations (0, 4 and 8%). The average values of three different experiments are shown (n=27)

Species	PEG4000 (%)	Genotype	Total root length (cm)	Root diameter (mm)	Total root area (cm ²)	
<i>S. commersonii</i>	0	Sc.WT	53.42	0.259	4.13	
		Line 6	31.93	0.190	1.90	
		Line 21	36.45	0.236	2.71	
		Line 22	42.71	0.233	3.13	
	4	SC.WT	22.14	0.263	1.83	
		Line 6	57.69	0.204	3.70	
		Line 21	46.95	0.268	3.95	
		Line 22	50.57	0.195	3.10	
	8	Sc.WT	16.28	0.253	1.30	
		Line 6	19.14	0.190	1.14	
		Line 21	16.24	0.197	1.00	
		Line 22	18.31	0.222	1.33	
			PEG treatment	P≤0001	P=0.0015	P≤0001
			Genotype	P≤0001	P≤0001	P≤0001
		PEGXGenotype	P≤0001	P≤0001	P≤0001	
<i>S. tuberosum</i>	0	St.WT	35.34	0.300	3.32	
		Line 11	36.28	0.228	2.60	
		Line 15	39.42	0.281	3.45	
		Line 19	35.84	0.207	2.33	
	4	St.WT	23.98	0.258	1.94	
		Line 11	38.03	0.250	3.04	
		Line 15	48.12	0.267	4.04	
		Line 19	38.01	0.252	3.09	
	8	WT	13.88	0.219	0.96	
		Line 11	24.71	0.240	1.86	
		Line 15	27.94	0.233	3.04	
		Line 19	30.11	0.243	2.29	
			PEG treatment	P≤0001	P=0.004	P≤0001
			Genotypes	P≤0001	P=0.002	P≤0001
		PEGXGenotypes	P≤0001	P≤0001	P≤0001	

potato clones, free proline is accumulated under drought stress, increasing earlier in drought susceptible varieties than in drought tolerant plants (Schafleitner *et al.*, 2007). Because previous studies reported proline accumulation in GM Arabidopsis plants overexpressing the *CBF3* gene (Gilmour *et al.*, 2000) and in GM tomato plants overexpressing the *AtCBF1* gene under water deficit (Hsieh *et al.*, 2002), the proline content was

also evaluated in the present study. Overall, the proline concentration increased approximately 1.5- and 2.5-fold under *in vitro* drought stress (Figure 2). In *S. tuberosum*, the increase in the proline concentration was higher than in *S. commersonii* (Figure 2B), showing significant differences among *in vitro* drought stress treatments ($P \leq 0.0001$) and genotypes ($P \leq 0.0001$). GM *S. tuberosum*, Lines 11, 15 and 19, showed increased proline content

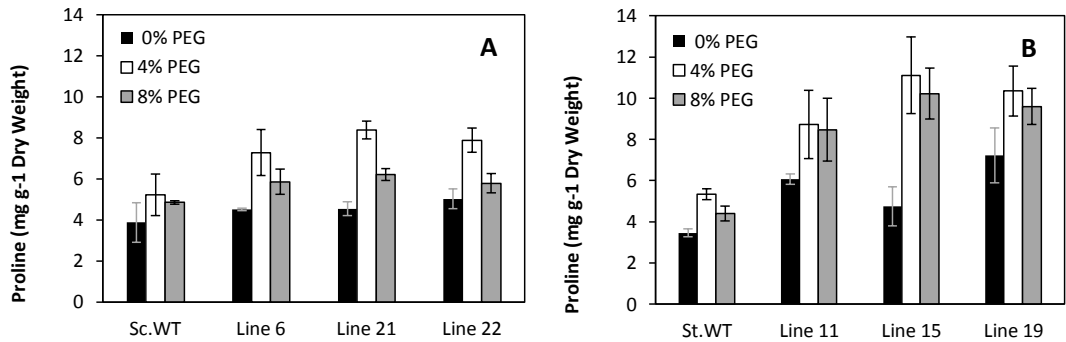


Figure 2. Effect of *in vitro* drought stress on free proline accumulation: (A) in GM *Solanum commersonii* Lines 6, 21, and 22 and WT plants, and (B) in GM *Solanum tuberosum* cv. Cardinal Lines 11, 15, and 19 and WT plants. The average values of three different experiments are shown (n=9). The bars indicate the standard deviation. Significant differences were observed in both potato species, between GM lines and WT plants ($P \leq 0.0001$).

compared with the non-drought stressed WT plants. For example, in Line 15, the free proline was 11.1 mg g⁻¹ dry weight, and in WT plants, the free proline was significantly lower at 5.3 mg g⁻¹ dry weight. Similar results were observed in *S. commersonii* (Figure 2A).

Differential expression of ScCBF1, pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene and dehydrin-like gene (DNH10) was observed in both potato species upon drought stress

Similar to previous studies reporting that CBF/DREB gene expression is associated with the expression of *P5CS* and *DNH*-like genes under abiotic stress (Gilmour *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2005; Kume *et al.*, 2005), in both potato species, the constitutive overexpression of the *ScCBF1* gene was also associated with *P5CS* and *DNH10* transcript accumulation under *in vitro* drought stress (Figure 3).

The overexpression of the *ScCBF1* gene in GM lines for both potato species was 1.8- and 3.3-fold higher than that in control WT plants (Figure 3A and Figure 3B). This slight increase might reflect the fact that the majority of GM lines showed only one insertion site in the Southern analysis (data not shown). GM *S. tuberosum* Line 15 showed two insertion sites and increased transcript accumulation. Despite the *ScCBF1*

expression level, the GM lines showed better plantlet growth and root development than the WT lines in both potato species. Notably, in the GM lines, the *ScCBF1* transcript increased upon *in vitro* drought stress, reflecting the presence of endogenous potato *CBF* homologs, which are also induced under abiotic stress (Gilmour *et al.* 2000; Carvallo *et al.*, 2011).

The expression of *P5CS* and *DNH10* was also examined, as both genes play a role in osmotic adjustment and membrane stability, and the expression of these genes is up regulated through *CBF* genes (Gilmour *et al.*, 2000). Previous studies have revealed that GM tobacco plants, overexpressing *P5CS*, accumulated more proline than the control plants, showing enhanced tolerance to osmotic stress (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Other studies have suggested that *P5CS* overexpression is associated with significantly better root development (Kavi Kishor *et al.*, 2005). The GM potato Lines 15 and 21 showed significantly larger total root areas and accumulated higher proline content in the stems and leaves. In addition, the GM lines showed 1.5-fold increased *P5CS* transcript accumulation compared with control WT plants (Figure 3C and Figure 3D). However, this level of transcript accumulation is low with respect to previous results reported in *Arabidopsis* plants, where *AtCBF3* overexpression resulted in increased proline content (5-fold higher compared

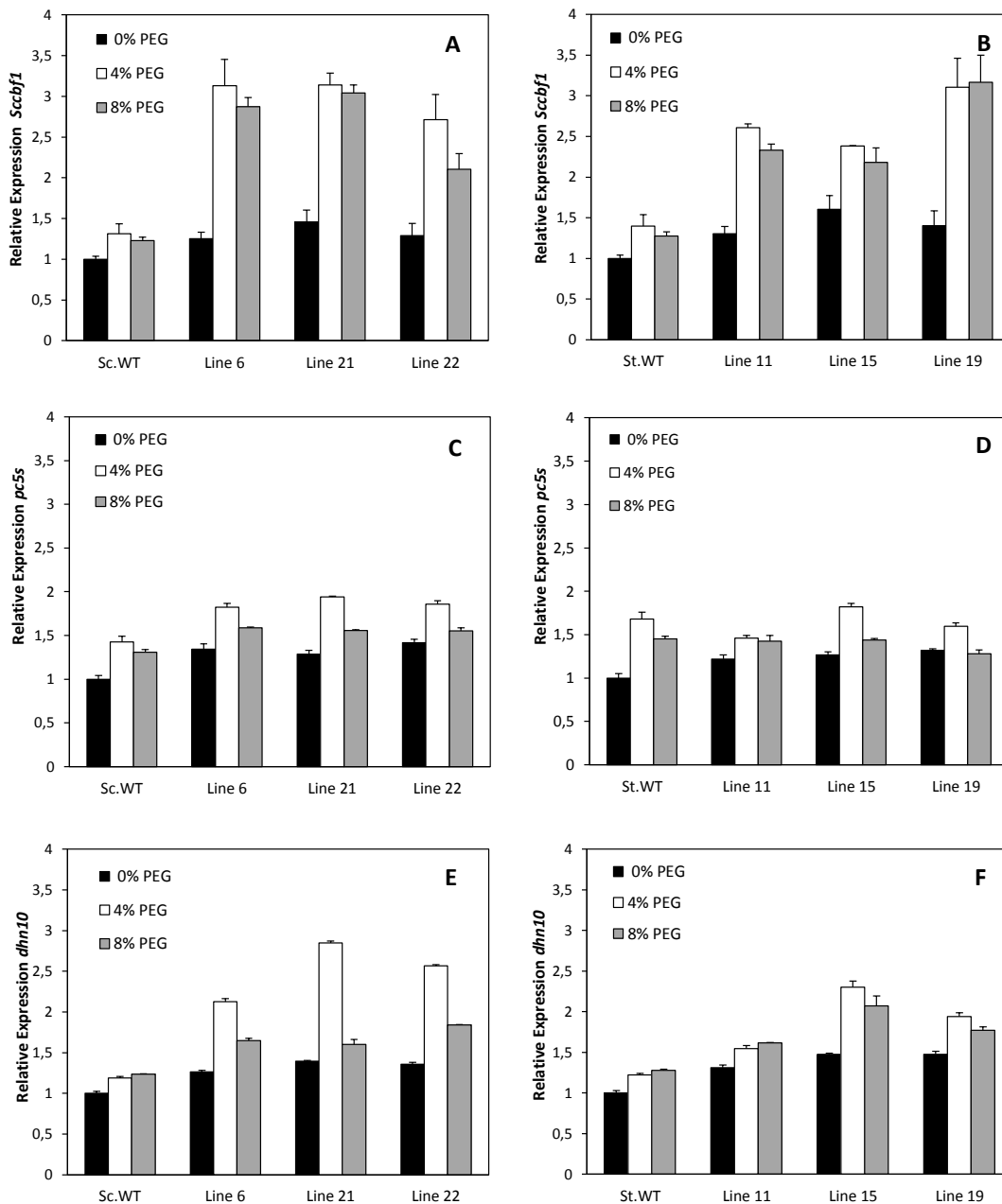


Figure 3. Effect of drought stress on the relative gene expression of *ScCBF1*, pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) and *Dehydrins (DNH10)* genes. The transcript levels were determined through qRT-PCR analysis in GM *Solanum commersonii* Lines 6, 21 and 22 and WT plants (A, C, D) and in GM *Solanum tuberosum* Lines 11, 15 and 19 and WT plants (B, D, F). Potato plantlets were grown under *in vitro* drought stress at 24 °C, with a 16 h:8 h day:night photoperiod, in hormone free MS medium containing 0, 4 and 8% PEG4000. The qRT-PCR analysis was performed using 100 ng of total RNA per sample. The relative expression of each transcript was normalized using the potato 60S gene as an internal reference. For *Solanum commersonii*, the relative expression in WT plants at 0% PEG was set to 1, and the other values were adjusted accordingly. For *Solanum tuberosum*, the relative expression in WT plants at 0% PEG was set to 1, and the other values were adjusted accordingly. The average values of three different experiments are shown (n=9). The bars indicate the standard deviation. Significant differences were observed for *ScCBF1* and *DNH10* expression in both potato species and between GM lines and WT plants ($P \leq 0.0001$).

with control WT plants) and 4-fold higher *P5CS* transcript accumulation (Gilmour *et al.*, 2000). This difference might partially reflect the fact that in *Arabidopsis* plants, maximum expression was reported at the beginning of the stress treatment (24 hours), and subsequently, *P5CS* transcript accumulation was significantly reduced (Gilmour *et al.*, 2000). In both GM potato lines, the gene expression analysis was conducted at the end of the experiment (50 days under *in vitro* drought stress). Thus, the differences in the observation might also reflect the *P5CS* probes used. Indeed, a previous study in tomatoes overexpressing the *AtCBF1* gene showed that proline concentrations were higher in GM tomato plants than in WT plants, but no significant differences in the *P5CS* expression between WT and GM plants were observed, and the authors attributed this difference to the *P5CS* probe used (Hsieh *et al.*, 2002).

Several stress-responsive Dehydrins have been associated with CBF overexpression and drought stress. Dehydrins act as chaperons, stabilizing vesicles, proteins, and membrane structures in stressed plants (Close, 1997; Allagulova *et al.*, 2010). However, the precise function of these proteins remains unknown. In wheat, early Dehydrin expression has been associated with drought tolerant genotypes and *CBF* gene expression (Kobayashi *et al.*, 2005; Kume *et al.*, 2005). In *Solanum* species, such as tobacco and potato, *DHN*-like genes have been associated with cold tolerance and CBF gene expression (Pino *et al.*, 2008). A previous study in GM tomato plants overexpressing the *AtCBF1* gene did not show Dehydrin like-gene expression (*TAS14*) (Hsieh *et al.*, 2002). These results could be attributed to the low homology between *Arabidopsis* gene probes and tomato endogenous homologs or unknown tomato *LEA* genes induced through the

heterologous expression of the *CBF1* gene. In the present study, GM *S. tuberosum* (Line 15) and GM *S. commersonii* (Lines 21 and 22) showed the best drought tolerance, in terms of plant growth, total root length and total root area, and 1.5- to 3.0-fold higher *DNH10* expression ($P \leq 0.0001$) compared with WT plants (Figure 3E and 3F). In this study, the majority of GM *S. commersonii* lines showed higher *ScCBF1* and *DNH10* transcript accumulation with drought stress (GM Lines 6, 21 and 22), while in GM *S. tuberosum*, the transcript accumulation was significantly lower.

In summary, *in vitro* screening for drought tolerance showed that the *ScCBF1* gene overexpression in GM potato induces several responses associated with drought adaptation mechanisms, resulting in better overall plant growth, in terms of shoot height, total foliage weight, root development and plantlet survival. An association between *ScCBF1* and *DNH10* transcript accumulation was observed, but no association with the *P5CS* gene was detected, despite the observed effects on the proline content during drought stress. Further studies are needed to evaluate these GM lines in the field, in terms of physiological parameters and tuber production under different watering treatments. In addition, it is necessary to confirm the function of *P5CS* and *DNH10* and other *DNH-like* genes through the genetic transformation of potato. Moreover, the identification of a novel potato stress inducible promoter is needed to increase *ScCBF1* transcript accumulation under drought stress.

Acknowledgements

This research was financially supported through funding from FONDECYT (F111075021) and MINAGRI-CHILE (501364-70).

Resumen

M.T. Pino, A. Ávila, A. Molina, Z. Jeknić y T.H.H. Chen. 2013. *Solanum tuberosum* y *Solanum commersonii*, sobre-expresando el gen *ScCBF1*, mejoraron su tolerancia a sequía en condiciones de cultivo *in vitro*.. Cien. Inv. Agr. 40(1):171-184. La papa cultivada es sensible a sequía, tanto el rendimiento como la calidad se reducen cuando el potencial hídrico de suelo baja a -0.3 MPa. La sequía también produce alteraciones fisiológicas, bioquímicas y moleculares, que han sido asociados a cambios en la expresión de genes que actúan directamente en la protección de la planta o regulando otros genes de respuesta. En este último grupo, están los factores de transcripción del tipo CBF/DREB, que han sido asociados a tolerancia heladas, salinidad y sequía en diferentes especies. El objetivo de este estudio fue evaluar si la sobreexpresión del gen *ScCBF1*, clonado desde *Solanum commersonii*, podría mejorar la tolerancia a sequía en plantas genéticamente modificadas de *Solanum tuberosum* and *S. commersonii* bajo condiciones *in vitro*. En conjunto con algunos mecanismos de adaptación a sequía, como osmoprotectores y genes asociados al ajuste osmótico y estabilidad de las membranas. Los tratamientos de sequía fueron simulados *in vitro*, agregando polyethylen-glycol (PEG4000) en medio MS libre de hormonas. Se evaluó crecimiento vegetativo, desarrollo radicular, contenido de prolina, y expresión de los genes *ScCBF1*, *P5CS* y *DNH10*. La expresión constitutiva del gen *ScCBF1* en ambas especies mejoró significativamente el crecimiento vegetativo y radicular bajo sequía-*in vitro*. Además, aumentó significativamente el contenido de prolina en hojas y tallos, y la expresión del gen *DNH10*, sugiriendo que la sobreexpresión constitutiva del gen *ScCBF1* estaría asociada a algunos mecanismos de adaptación a sequía.

Palabras clave: Gen *CBF*, *in vitro*, papas, sequía, *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*.

References

- Allagulova, Ch.R., F.R. Gimalov, F.M. Shakirova, and V.A. Vakhitov. 2010. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)* 68:945-951.
- Bansal, K.C., and S. Nagarajan. 1986. Leaf water content, stomatal conductance and proline accumulation in leaves of Potato (*Solanum tuberosum* L.) in response to water stress. *Indian J. Plant Physiol.* 29:397-404.
- Carvallo, M., M.T.Pino, Z. Jeknić, C. Zou, C. Doherty, S. Shiu, T. Chen, and M. Thomashow. 2011. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance-*Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62:3807-3819.
- Chazen, O., and P.M. Neumann. 1994. Hydraulic signals from the roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiol.* 104:1385-1392.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Close, T.J. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* 100:291-296.
- Dalla Costa, L., G. Delle Vedove, G. Gianquinto, R. Giovanardi, and A. Peressotti. 1997. Yield, water use efficiency and nitrogen uptake in potato: influence of drought stress. *Potato Res.* 40:19-34.
- Deblonde, P., and J. Ledent. 2001. Effects of moderate drought conditions on green leaf number stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *Eur. J. Agron.* 14:31-41.
- Ekanayake, I.J., and D.J. Midmore. 1992. Genotypic variation for root pulling resistance in potato and its relationship with yield under water-deficit stress. *Euphytica* 61:43-53.

- FAO. 2012. Statistical databases FAOSTAT. Available online at: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (Website accessed: July 2012).
- Gilmour, S., A. Selbot, M. Salazar, J. Everar, and M. Thomashow. 2000. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124:1854-1865.
- Gopal, J., and K. Iwana. 2007. *In vitro* screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep.* 26:693-700.
- Hsieh, T., J. Lee, Y. Charng, and M. Chan. 2002. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* 130:618-626.
- Iwama, K. 2008. Physiology of the potato: new insights into root system and repercussions for crop management. *Potato Research* 51:333-353.
- Jaglo, K., S. Kleff, K. Amundsen, X. Zhang, V. Haake, J. Zang, T. Deits, and M. Thomashow. 2001. Components of the Arabidopsis C-repeat/Dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* 127:910-917.
- Kasuga, M., S. Miura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi Shinozaki. 2004. A combination of *Arabidopsis DREB1A* gene and stress inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45:346-350.
- Kavi Kishor, P.B., S. Sangam, M.N. Amrutha, P. Sri Lakshmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, and N. Screenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Sci.* 88:424-438.
- Kiziloglu, F.M., U. Sahin, T. Tunc, and S. Diler. 2006. The effect of deficit irrigation on potato evapotranspiration and tuber yield under cool season and semiarid climatic condition. *Journal of Agronomy* 5:284-288.
- Knipp, G., and B. Honermeier. 2006. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *J. Plant Physiol.* 163:392-397.
- Kobayashi, F., S. Takumi, S. Kume, M. Ishibashi, R. Ohno, K. Murai, and C. Nakamura. 2005. Regulation by Vrn-1/Fr-1 chromosomal intervals of CBF-mediated Cor/Lea gene expression and freezing tolerance in common wheat. *J. Exp. Bot.* 56:887-895.
- Kume, S., F. Kobayashi, M. Ishibashi, R. Ohno, C. Nakamura, and S. Takumi. 2005. Differential and coordinated expression of Cbf and Cor/Lea genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance. *Genes Genet. Syst.* 80:185-197.
- Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transcription pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- Martínez, C.A., and U. Moreno. 1992. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 4:33-38.
- Molinos, C., A. Villegas, P. Sanchez, G. Alcantar, N. Rodriguez, and L. Ruiz. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". *INCI* 29:384-388.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Orlikowska, T., D. Kucharska, and M. Horbowicz. 2009. The reaction of raspberry and blackberry cultivars to drought stress simulated *in vitro* by polyethylene glycol (PEG) 6000. *Acta Hort.* (ISHS) 839:337-342.
- Pennycooke, J.C., H. Cheng, S.M. Roberts, Q. Yang, S.Y. Rhee, and E.J. Stockinger. 2008. The low temperature-responsive, *Solanum* CBF1 genes maintain high identity in their upstream regions in a genomic environment undergoing gene

- duplications, deletions, and rearrangements. *Plant Mol. Biol.* 67:483-497.
- Pino, M.T., J. Skinner, Z. Jeknić, P. Hayes, A. Soeldner, M. Thomashow, and T. Chen. 2008. Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environ.* 31:393-406.
- Punia, M., and A. Jain. 2002. *In vitro* selection for drought tolerance in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Nat. J. Plant Improv.* 4:27-30.
- Schafleitner, R., A. Gaudin, R. Gutierrez, C. Alvarado, and M. Bonierbale. 2007. Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. *Acta Physiol Plant.* 29:19-26.
- Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance *J. Exp. Bot.* 58:221-227.
- Spollen, W.G., R.E. Sharp, I.N. Saab, and Y. Wu. 1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. *In: Smith J.A.C., and H. Griffiths (eds.). Water deficits, plant responses from cell to community.* Oxford: Bios Scientific Publishers 37-52.
- Su, J., and R. Wu. 2004. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci.* 166:941-948.
- Szabados, L., and A. Savoure. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15:89-97.
- Weisz, R., K. Kaminski, and Z. Smilowitz. 1994. Water deficit effects on potato leaf growth and transpiration: utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops. *American Journal of Potato Research* 71:829-840.
- Westgate, M.E., and J.S. Boyer. 1985. Osmotic adjustment and inhibition of leaf, root, stem, and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164:540-549.
- Yang, S., B.Vanderbeld, J. Wan, and Y.Huang. 2010. Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. *Molecular Plant* 3:469-490.
- Zhao, J., W. Ren, D. Zhi, L. Wang, and G. Xia. 2007. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep.* 26:1521-1528.

Comparison of yield based drought tolerance indices in improved varieties, genetic stocks and landraces of potato (*Solanum tuberosum* L.)

Rolando Cabello · Philippe Monneveux ·
Felipe De Mendiburu · Merideth Bonierbale

Received: 18 December 2012 / Accepted: 8 February 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Drought strongly influences potato (*Solanum tuberosum*) production and quality. Potato being a drought susceptible crop, the development of varieties with enhanced tolerance to water stress could highly improve productivity in drought prone areas. The objective of this study was to evaluate the ability of several yield based indices to be used in large scale screening for drought tolerance. The experiment included improved varieties, genetic stocks and landraces potatoes grown under drought and irrigated conditions. A group of accessions with high yield under both conditions was identified. Mean productivity (MP), geometric mean productivity (GMP), tolerance (TOL), drought tolerance index (DTI), drought susceptible index (DSI) and yield stability index (YSI) were calculated from tuber yield under drought and irrigated conditions. The relationships between these indices and yield were analyzed. The Fleiss' Kappa concordance test was used to analyze the correspondence between accessions previously identified as highly productive under both drought and irrigated conditions and accessions with optimal

values for the different indices. MP, GMP and DTI allowed identifying genotypes combining high yield potential and high yield under drought within the three subsets of genotypes. Conversely, DSI, YSI and TOL showed low and variable concordance values across subsets, suggesting that their efficiency in screening genotypes highly depends on the nature of the tested genetic material.

Keywords Drought · Concordance test · Potato · Yield based indices

Introduction

Drought is an important limiting factor for potato production in most areas of the world, influencing yield and tuber quality (Dalla Costa and Giovanardi 1994). Drought occurs due to lack of rainfall or inadequate irrigation techniques. Potato is highly sensitive to drought stress, the decline in photosynthesis being fast and substantial, even at relatively low water potential (Ta et al. 2003). Its vulnerability to drought stress is also related to its shallow and poor root system and low capacity to extract soil water (Steyn et al. 1998). Drought affects plant growth and production by reducing the amount of productive foliage (Jefferies 1993), decreasing the rate of photosynthesis per unit of leaf area (Ta et al. 2003) and shortening the vegetative period (Deblonde et al. 1999). All stages of crop development are sensitive to

R. Cabello · P. Monneveux (✉) · F. De Mendiburu ·
M. Bonierbale
International Potato Center (CIP), Av. La Molina 1895,
La Molina, Lima 12, Peru
e-mail: p.monneveux@cgiar.org

F. De Mendiburu
Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM),
Av. La Molina, Lima 12, Peru

drought stress (Spitters and Schapendonk 1990). As drought is an erratic and unpredictable phenomenon, the objective of breeders is to improve the capacity of the plant to tolerate drought while maintaining high yield under favorable conditions (Spitters and Schapendonk 1990).

According to their comparative yield performance in stress and non-stress environments genotypes have been categorized in four groups by Fernandez (1992) as genotypes with relatively uniform performance in both stress and non-stress conditions (group A), genotypes with high yield in non-stress conditions (group B), genotypes with high yield in stress conditions (group C) and genotypes with low yield in both stress and non-stress conditions (group D). Several yield-based drought tolerance indices, based on mathematical relationships between yield under irrigated and drought conditions, have also been proposed to characterize the behavior of genotypes in stress and non-stress environments, and to screen drought tolerant genotypes (Mitra 2001). These indices have been used in many crops like sugar beet (Sadeghian et al. 2000), cotton (Zangi 2005), sesame (Golestani and Pakniyat 2007), durum wheat (Talebi et al. 2009), bean (Habibi 2011), sorghum (Singh et al. 2011), maize (Mhike et al. 2012), barley (Khokhar et al. 2012) and bread wheat (Drikvand et al. 2012). In potato, the efficiency of yield indices for potato clone selection has been evaluated under hot (de Souza Lambert et al. 2006) and drought (Hassanpanah 2010) conditions. Most of these studies have been however realized on a limited number of breeding material or commercial cultivars.

The objective of the present study was to compare six drought tolerance indices (calculated from tuber

yields obtained under drought and irrigated conditions) within a large set of potato landraces, improved varieties, and genetic stocks and to test the efficiency of these indices to identify genotypes combining high yield under drought and irrigated conditions. The efficiency of yield indices to identify genotypes yielding well under both stress and non-stress conditions has been analyzed by many authors through their correlation with yield under stress and non-stress conditions, sometimes completed by multivariate analysis (Kaya et al. 2002; Farshadfar and Sutka 2002; Golabadi et al. 2006; Sio-Se Mardeh et al. 2006; Nouri et al. 2011; Khodarahmpour et al. 2011) or 3D graphs, bi-plot and cluster analysis (Ahmadzadeh et al. 2011). However, the different indices have different levels of precision, making difficult comparisons with yield. On the other hand, each index has to be interpreted according to its physiological meaning and optimal value. For example a good behavior under both irrigated and drought conditions leads to high values of mean productivity (MP), geometric mean productivity (GMP), drought tolerance index (DTI) and yield stability index (YSI) and generally low values of tolerance (TOL) and drought susceptible index (DSI). Finally, according to Zangi (2005), a good selection index should also allow distinguishing group A as defined by Fernandez (1992) from the others, what implies to compare the capacity of the different indices to identify genotypes that combine high yield under stress and non-stress conditions. To allow comparison of indices and evaluation of their efficiency in a more accurate way, the capacity of the different indices to identify genotypes having high yield under both stress and non-stress conditions was evaluated in the present study by using the Fleiss'

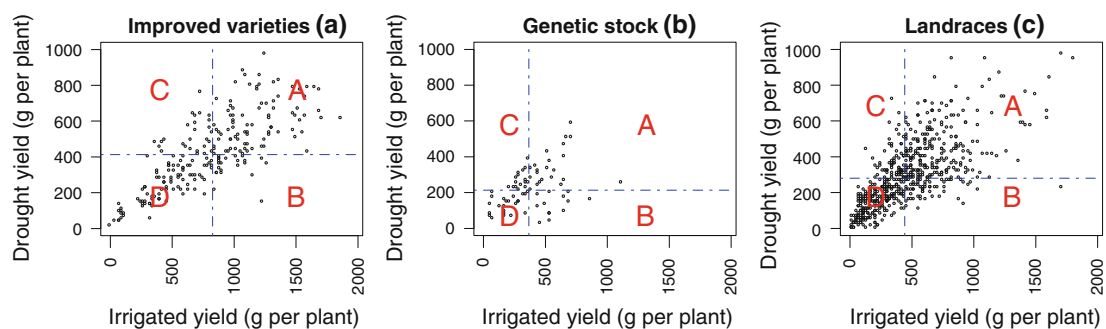


Fig. 1 Genotype groups based on yield under drought and irrigated conditions, in improved varieties (a), genetic stocks (b) and landraces (c). Groups A, B, C and D are defined according to Fernandez (1992)

Kappa test, an extension of the Kappa test which provides a measure of the degree to which two methods concur in their respective sortings of N items into k mutually exclusive categories (Fleiss 1971).

Materials and methods

Plant material

A set of 918 potato accessions provided by CIP (Centro Internacional de la Papa) genebank was used in this study. It comprised 226 improved varieties, 74 genetic stocks and 618 landraces. The subset of improved varieties included non-CIP varieties and advanced breeding clones extracted from the late blight resistant (LBR) and lowland tropic virus resistant (LTVR) populations developed at CIP (Bonierbale et al. 2003). Genetic stocks comprised two segregating diploid population extracted from populations developed at CIP to improve late blight resistance and nutritional characteristics, respectively. The development of the first population is described by Bonierbale et al. (1994). The second population was originated from a cross between a LBR Phureja accession and a susceptible late blight *S. tuberosum* dihaploid (Ghislain et al. 2001).

The 618 landraces accessions belonged, following the taxonomy of cultivated potatoes proposed by Spooner et al. (2007) and Ovchinnikova et al. (2011), to the four species *Solanum ajanhuiri* Juz. & Bukasov (15), *S. curtilobum* Juz. & Bukasov (15), *S. juzepczukii* Bukasov (22) and *S. tuberosum* L. (566). *S. tuberosum* L. included accessions of the cultivar groups Andigenum (261), Chaucha (113), Goniocalyx (45), Phureja (81), Stenotomum (43) as well as non Andean *S. tuberosum* accessions (23). Plant maturity in of the accessions of each subset was scored (from 1 to 9), with scores of 8 or 9 corresponding to accessions being ready for harvesting. At 120 days after planting 68 % of landraces were still not ready for harvesting. Within the subsets of improved varieties and genetic stocks, 34 and 47 % of accessions were ready for harvesting at 90 days after planting and 76 and 100 % at 120 days, respectively. As a consequence, the subset of landraces was considered to be later than the subsets of improved varieties and genetic stocks. This information was taken into account in managing timing of water stress application and harvest.

Experimental conditions

The set was evaluated throughout 5 years, from 2004 to 2008, in CIP's La Molina experimental station, located in the coast of Peru, at latitude -12.0778° , longitude -76.9110° and 240 m above sea level. La Molina climate is characterized by the absence of rainfall, high relative humidity (between 71.3 and 92.0 %) and low vapor deficit pressure (from 38×10^{-6} MPa in August to 58×10^{-6} MPa in November). Annual average minimum and maximum temperatures were 14.9 and 18.0 °C, respectively. Monthly maximum temperature ranged from 17.1 °C in August to 19.1 °C in November. Accumulated solar radiation increased toward the end of the cropping season, and ranged from 1,671 to 4,808 W m^{-2} . Weather inter-annual variation was very low.

The soil was an Entisol, containing 46 % sand, 32 % silt and 22 % clay. Bulk density ranged from 1.3 to 1.2 g cm^{-3} and field capacity from 24 to 21 % moisture by weight down the soil profile to 100 cm. Soil organic matter content was 3.1 % and pH was 7.1. Electrical conductivity (EC) and cation exchange capacity were 2.7 DS m^{-1} and 10.7 $\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively.

Different accessions were evaluated each year with the exception of the controls, cultivated in all years. Planting was done during the first week of August, and harvest the last week of November. Germplasm of the three subsets was evaluated in three different trials, due to their different plant type and earliness. Thirty plants per clone, in three replications, in one row and 10 plants per replication were arranged in the field, following an alpha design in a randomized complete block design. Fertilization and weed and pest control were the same for each group and year.

Irrigation frequency and volume were estimated to allow significant differences between treatments and accessions. In the irrigated treatment, water was applied to the crop every 10 days. In the drought treatment, furrow irrigation was stopped 35 days after planting in the case of improved varieties and 42 days after planting in the case of the genetic stocks and native cultivars, to take into consideration the quicker early growth of the improved germplasm. The total quantity of water received by the crop over the 5 years varied between 375 and 414 mm for the irrigated treatment and 128 and 175 mm in the drought treatment. Soil water potential was measured every day in each treatment using granular matrix sensors

(Watermark model 900 M-Monitor, the Irrrometer Company, Riverside-California, USA), placed at 30 and 45 cm depth in three sites. Data were recorded every day at 2:00 p.m. with a data logger. Four weeks after stopping irrigation, soil water potential in the fully irrigated treatment ranged from 0.022 to 0.063 MPa and exceeded by 0.2 MPa the drought treatment.

Yield-based selection indices

Tuber yield (g plant^{-1}) was measured for each plot were measured 120 days after planting on genetic stocks and landraces and 90 days after planting for improved varieties that had a much shorter growing cycle. Drought tolerance indices were calculated using the following relationships:

Mean productivity (MP) = $(Y_p + Y_s)/2$ (Rosielle and Hamblin 1981)

Geometric mean productivity (GMP) = $(Y_p \times Y_s)^{0.5}$ (Fernandez 1992)

Tolerance (TOL) = $Y_p - Y_s$ (Hossain et al. 1990)

Drought tolerance index (DTI) = $(Y_s \times Y_p)/(\bar{Y}_p)^2$ (Fernandez 1992)

Drought susceptibility index (DSI) = $[1 - (Y_s/Y_p)]/[1 - (SI)]$ (Fischer and Maurer 1978) where stress intensity (SI) = $1 - (\bar{Y}_s/\bar{Y}_p)$

Yield stability index (YSI) = Y_s/Y_p (Bousslama and Schapaha 1984)

In all these equations, Y_s was the yield of a given genotype under drought, Y_p the yield of this genotype under irrigated conditions, \bar{Y}_s and \bar{Y}_p being the mean yields of all genotypes under stress and non-stress conditions, respectively.

Statistical analysis

Experimental data were subjected to analysis of variance using SAS-Proc Mixed version 9.1 for WINDOWS in order to adjust the year effect on the accessions. The capacity of the different indices to identify genotypes combining high yield under stress and non-stress conditions was analyzed by comparing the concordance of the grouping of genotypes in four categories A, B, C and D according to Fernandez (1992) with respect to the indices MP, GMP, TOL, DTI, DSI and YSI, using the Kappa-Fleiss

concordance test. Whereas conventional Kappa tests (e.g., Scott's pi or Cohen's kappa) work for only two raters, Fleiss' kappa works for any number of raters giving categorical ratings to a fixed number of items. It consequently allows assessing the reliability of agreement between a fixed numbers of raters when assigning categorical ratings to a number of items or classifying items (Banerjee et al. 1999). It can be interpreted as expressing the extent to which the observed amount of agreement among raters exceeds what would be expected if all raters made their ratings completely randomly.

The Kappa index was calculated as: $K = (P_o - P_e)/(1 - P_e)$ where P_o is the observed value (observed proportion of concordance) and P_e is the expected value (proportion of concordance expected according to the hypothesis of independence of indices). The factor $(1 - P_e)$ gives the degree of agreement that is attainable above chance, and $(P_o - P_e)$ gives the degree of agreement actually achieved above chance. To calculate P_o and P_e , the following matrix was established:

Stress index	Yield under irrigated conditions		
	Low	High	Sum
Low	a	b	r
High	c	d	s
Sum	t	u	N

P_o and P_e were calculated as $(a+d)/N$ and $(tr+us)/N^2$, respectively.

If the raters are in complete agreement then $K = 1$. If there is no agreement among the raters (other than what would be expected by chance) then $K = 0$. Since yield and indices are continued values, they were discredited, using the median to separate in two classes (high and low values). To reflect the sampling error, a confidence interval around the obtained K value was calculated according to Sim and Wright (2005), as $K \pm Z_{1-\alpha} S_k$, where Z is the standard normal and S_k is the standard deviation of the estimator K.

The results of the test were interpreted based on Landis and Koch (1977). Five levels of confidence of the concordance were considered: very low ($K < 0.2$), low ($0.20 < K < 0.40$), intermediate ($0.40 < K < 0.60$),

high ($0.60 < K < 0.80$), and very high ($0.80 < K < 1.0$).

Results

Stress intensity (SI), calculated from Y_p and Y_s values, was 0.309 for the whole collection. Improved varieties, genetic stocks and landraces had SI values of 0.422, 0.277 and 0.271, respectively. Highly significant differences were found for tuber yield among the tested subsets of accessions, both under irrigated and drought conditions (data not shown). There was no significant difference between years for the different indices (Table 1). Significant differences were noted between subsets and genotypes, except for DSI and YSI. Improved varieties had significantly higher MP, GMP, TOL and DTI (Table 2). Genotype effect was significant for MP, GMP and DTI.

Correlation between Y_p and Y_s was highly significant for improved varieties and landraces, and significant for genetic stocks (Table 3). A positive and highly significant correlation was noted between

Y_p and the yield-based indices MP, GMP, TOL and DTI within the three subsets. Y_p was significantly positively correlated to DSI and negatively to YSI. Y_s was significantly associated with MP, GMP and DTI within all subsets. It was associated with TOL within improved varieties but not within genetic stocks and landraces. Significant correlations were noted between MP, GMP, TOL and DTI within all subsets. TOL correlated positively to DSI and negatively to YSI. DSI was highly significantly correlated to YSI within all subsets. According to the levels of confidence previously defined, the concordance values were high or very high for MP, GMP and DTI within the three subsets. Concordance values for TOL, DSI and YSI were low or intermediate and highly differed with the considered subset (Table 4).

Discussion

Moderate stress intensities observed in this study are likely to be due to the high relative humidity of the

Table 1 Variance analysis for MP, MGP, TOL, DTI, DSI and YSI in the whole collection and its different subsets (improved varieties, genetic stocks and landraces)

Source of variation	Degrees of freedom	MP	GMP	TOL	DTI	DSI	YSI
Year	8	3,512,158ns	2,913,356ns	3,609,487ns	29.48ns	171.87ns	30.54ns
Subset (year)	3	1,337,747**	979,788**	4,660,703**	11.69*	122.15ns	21.70ns
R (year × subset)	25	133,937**	144,173**	609,036**	2.10**	205.38**	36.49**
Genotype (year × subset)	946	119,252**	110,048**	106,403ns	1.27**	72.12ns	12.81ns
Improved varieties							
Mean values		599.40	543.33	394.62	1.19	0.280	0.882
Year	4	1,094,253ns	778,300ns	1,737,267ns	7.74 ns	119.23ns	21.18ns
R (year)	10	123,341**	78,597**	637,765**	1.40**	178.34ns	31.68ns
Genotype (year)	236	156,105**	141,210**	153,772**	2.15**	99.88ns	17.74ns
Genetic stocks							
Mean values		311.55	279.88	176.93	0.32	0.522	0.780
Year	1	189,158ns	478,032ns	1,186,185ns	2.05ns	33.09ns	5.88ns
R (year)	4	27,496ns	42,863**	129,772ns	0.25**	12.74*	2.26*
Genotype (year)	76	39,459**	35,048**	57,863ns	0.16**	4.67ns	0.83ns
Landraces							
Mean values		396.19	355.21	185.05	0.59	-0.304	1.128
Year	4	2,260,212*	1,370,303*	7,728,019*	13.09ns	361.97ns	64.31ns
R (year)	11	182,275**	240,628**	757,198**	3.42**	300.01*	53.30*
Genotype (year)	634	115,099**	107,439**	94,588ns	1.08**	69.86ns	12.41ns

ns No significant

** Significant at 0.01, * significant at 0.05

Table 2 Indices values of the three subsets

Index	Improved varieties	Genetic stocks	Landraces
Mean productivity (MP)	599.4 ± 11.18	311.55 ± 9.68	396.19 ± 5.47
Geometric mean productivity (GMP)	543.33 ± 10.3	279.88 ± 8.97	355.21 ± 5.15
Tolerance (TOL)	394.62 ± 15.28	176.94 ± 15.49	185.05 ± 7.7
Drought tolerance index (DTI)	1.19 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Drought susceptibility index (DSI)	0.28 ± 0.42	0.52 ± 0.14	−0.3 ± 0.19
Yield stability index (YSI)	0.88 ± 0.18	0.78 ± 0.06	1.13 ± 0.08

Table 3 Relationships between Y_p , Y_s , TOL, MP, GMP, DSI and YSI

	Y_s	MP	GMP	TOL	DTI	DSI	YSI
Improved varieties							
Y_p	0.77**	0.97**	0.94**	0.88**	0.91**	0.39*	−0.39*
Y_s		0.89**	0.94**	0.38*	0.91**	0.03ns	−0.02ns
MP			0.99**	0.76**	0.96**	0.28ns	−0.28ns
GMP				0.67**	0.97**	0.23ns	−0.23ns
TOL					0.65**	0.55**	−0.55**
DTI						0.16ns	−0.16ns
DSI							−0.99**
Genetic stocks							
Y_p	0.43*	0.92**	0.80**	0.83**	0.75**	0.58**	−0.58**
Y_s		0.74**	0.88**	−0.15 ns	0.87**	−0.13 ns	0.13ns
MP			0.96**	0.55**	0.92**	−0.37*	−0.37*
GMP				0.33*	0.96**	0.25ns	−0.25ns
TOL					0.28*	0.71**	−0.71**
DTI						0.16ns	−0.16ns
DSI							−0.99**
Landraces							
Y_p	0.71**	0.96**	0.92**	0.81**	0.87**	0.38*	−0.38*
Y_s		0.88**	0.92**	0.16ns	0.86**	−0.16ns	0.16ns
MP			0.99**	0.61**	0.93**	0.19ns	−0.19ns
GMP				0.52**	0.94**	0.14ns	−0.14ns
TOL					0.50**	0.67**	−0.67**
DTI						0.11ns	−0.11ns
DSI							−0.99**

ns No significant

** Significant at 0.01, * significant at 0.05

experimental site that reduces the evaporative demand (Cabello et al. 2012). Year effect on tuber yield was not significant due to the low inter-annual climatic variation in the testing site. DSI and YSI did not discriminate subsets and accessions with subsets. Higher MP, GMP, TOL and DTI were observed in the subset of modern varieties. This result as well as the highly significant correlations noted between these indices and tuber yield under irrigated conditions is

likely to be explained by the mode of calculation of these indices.

Mean productivity (MP), calculated as the arithmetic mean between Y_p and Y_s , highly depends on yield under irrigated conditions and consequently tends to be higher in genotypes (and subsets of genotypes) with higher yield potential as previously reported by Cengiz and Ilhan (1998) in chickpea and Ghagar Sepanlo et al. (2000) in wheat, Shirazi

Table 4 Concordance test (Kappa) for MP, GMP, TOL, DTI, DSI and YSI in improved varieties, genetic stocks and landraces

Index	Groups ^a				Concordance test 95 % confidence
Improved varieties					
	A = 88	B = 25	C = 25	D = 88	
MP	88	10	10	88	0.79 (0.73–0.86)
GMP	88	13	13	88	0.83 (0.77–0.89)
TOL	16	25	25	16	0.25 (0.19–0.31)
DTI	88	13	13	88	0.83 (0.77–0.89)
DSI	38	25	25	38	0.44 (0.37–0.51)
YSI	38	25	25	38	0.44 (0.37–0.51)
Genetic stocks					
	A = 24	B = 13	C = 13	D = 24	
MP	24	3	3	24	0.61 (0.48–0.74)
GMP	24	7	7	24	0.77 (0.66–0.88)
TOL	7	13	13	7	0.42 (0.30–0.54)
DTI	24	7	7	24	0.77 (0.66–0.88)
DSI	11	0	1	12	0.10 (0.06–0.20)
YSI	13	13	12	12	0.58 (0.45–0.71)
Landraces					
	A = 239	B = 68	C = 69	D = 239	
MP	237	22	25	239	0.76 (0.72–0.80)
GMP	238	32	34	239	0.82 (0.78–0.86)
TOL	67	68	66	64	0.31 (0.27–0.35)
DTI	238	32	34	239	0.82 (0.78–0.86)
DSI	125	0	2	127	0.18 (0.13–0.22)
YSI	114	68	67	112	0.18 (0.13–0.22)

^a See Fig. 1

Kharrazi and Naroui Rad (2011) in sorghum. MP also correlated to Y_s and had high concordance values within all subsets, indicating capacity to identify genotypes combining high yield under stress and non-stress conditions, i.e., genotypes belonging to the group A as defined by Fernandez (1992). According to Rosielle and Hamblin (1981), selection for mean productivity generally increase yield in both stress and non-stress environments.

Geometric mean productivity (GMP), calculated as the root square of the product between Y_p and Y_s is supposed to be less driven by yield potential than MP (Fernandez 1992; Zangi 2005) but is often used by breeders to evaluate high-yielding genotypes under stressed and optimal conditions (Ramirez and Kelly 1998). The highly significant correlations between GMP and yield both under irrigated and drought conditions, as well as the results of the concordance test, indicate the capacity of this index to accurately identify genotypes combining high potential yield and tolerance to drought

conditions. The ability to separate group A genotypes from others using the GMP index is consistent with the results reported by Kristin et al. (1997) and Fernandez (1992) in common bean, Souri et al. (2005) in pea, Rezaeizad (2007) in sunflower and Jafari et al. (2009) in maize. The highly significant correlation noted between MP and GMP suggests that both indices can be used indifferently.

Weaker correlation between TOL and Y_p could be explained by the fact that high TOL values can be favored by high Y_p values but also by low Y_s (Fernandez 1992). The association between TOL and Y_s was however weak or non significant. The concordance value of this index differed according to the considered subset. Finally, TOL did not allow identification of group A genotypes.

Drought Tolerance Index (DTI) effectively discriminated genotypes with high yield in both stressed and non-stressed environments. DTI was significantly positively correlated to Y_p and Y_s . DTI was highly significantly

associated to both Y_s and Y_p indices and exhibited high concordance values within all subsets of genotypes, suggesting that selection for DTI could allow identifying genotypes that yield well in both stress and non-stress environments.

Drought susceptible index (DSI) depends not only on Y_s and Y_p but also on stress intensity. Its value consequently highly depends on environmental conditions. DSI of less than a unit are considered to be drought tolerant, since their yield reduction in drought conditions is smaller than the mean yield reduction of all genotypes (Ramirez and Kelly 1998).

Both YSI and DSI significantly correlated to Y_s but not to Y_p . They did not correlate with other indices except TOL and low concordance values were noted for these indices within all subsets of genotypes. Finally, genotype effects were significant for these two indices neither in the whole collection, nor in each subset. The use of both indices has been suggested by Sio-Se Mardeh et al. (2006) and Golabadi et al. (2006) to evaluate for drought tolerance. The results of the present study however suggest that these indices tend to give advantage to highly productive genotypes.

In summary, the significant and positive correlation between Y_p and MP, GMP and DTI observed in this study are in good agreement with Talebi et al. (2009), Ahmadizadeh et al. (2011) and Drikvand et al. (2012). MP, GMP and DTI also had significant correlation with yield under drought, as previously noted by Golabadi et al. (2006), Sio-Se Mardeh et al. (2006) and Mhike et al. (2012). The test of concordance used in the present study brought useful information not provided by previous yield based indices comparative studies, allowing evaluating the ability of indices to discriminate genotypes yielding well under both irrigated and drought conditions. According to the test of concordance MP, GMP and DTI had better capacity than other indices to identify genotypes combining high yield potential and high yield under drought. Conversely, for DSI, YSI and TOL levels of confidence of concordance varied across subsets, suggesting that their efficiency in screening genotypes may highly depend on the nature of the tested genetic material. Based on these results, MP, GMP and DTI are more adequate to select genotypes yielding well under both stressed and optimal conditions. Saba et al. (2001) noted that narrow-sense heritability estimates were much lower for DSI and TOL, compared to GMP, MP, and DTI and suggested that selection based on the latter indices

could be more promising than on DSI and TOL. As potential yield influences yield under stress under moderate stress conditions more than under severe stress conditions (Blum 1996; Pantuwan et al. 2002) the efficiency of these selection indices is however expected to vary with stress severity. Further studies under different environments and stress intensities, and particularly under more severe stress, are consequently needed to precise the efficiency of yield based indices to select for drought tolerance in potato.

Acknowledgments The research has been supported by the FONTAGRO-BID Project 8038 “Competitiveness enhancement of wheat and potato production systems in South America to face climate change”.

References

- Ahmadizadeh M, Shahbazi H, Valizadeh M, Zaeifizadeh M (2011) Genetic diversity of durum wheat landraces using multivariate analysis under normal irrigation and drought stress conditions. *Afr J Agric Res* 6(10):2294–2302
- Banerjee M, Capozzoli M, McSweeney L, Sinha D (1999) Beyond kappa: a review of inter-rater agreement measures. *Can J Stat* 27:3–23
- Blum A (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul* 20:135–148
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Pineda O, Tanksley SD (1994) QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor Appl Genet* 87:973–987
- Bonierbale MW, Simon R, Zhang DP, Ghislain M, Mba C, Li XC (2003) Genomics and molecular breeding for root and tuber crop improvement. In: Newbury HJ (ed) *Plant molecular breeding*. Blackwell, Oxford, pp 216–253
- Bousslama M, Schapaugh WT (1984) Stress tolerance in soybean. Part I: evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Sci* 24:933–937
- Cabello R, De Mendiburu F, Bonierbale M, Monneveux P, Roca W, Chujoy E (2012) Large-scale evaluation of potato improved varieties, genetic stocks and landraces for drought tolerance. *Am J Potato Res* 89(5):400–410
- Cengiz T, Ilhan M (1998) Assessment of response to drought stress of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lines under rain fed conditions. *Trend J Agric For* 22:615–621
- Dalla Costa L, Giovanardi R (1994) Water use efficiency and nitrogen recovery in potato. *Potato Res* 37:456–457
- de Souza Lambert E, Pereira Pinto CAB, Beserra de Menezes C (2006) Potato improvement for tropical conditions: II. Selection indices and efficiency of indirect selection. *Crop Breed Appl Biotechnol* 6:185–193
- Deblonde PMK, Haverkort AJ, Ledent JF (1999) Responses of early and late potato cultivars to moderate drought conditions: agronomic parameters and carbon isotope discrimination. *Eur J Agron* 11:91–105
- Drikvand R, Hossinpur T, Ismaili A, Salahvarzi E (2012) Assessment of drought tolerance indices for screening of rain fed wheat genotypes. *J Food Agric Environ* 10:768–772

- Farshadfar E, Sutka J (2002) Multivariate analysis of drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) substitution lines. *Cereal Res Commun* 31:33–39
- Fernandez GCJ (1992) Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: Kuo CG (ed) *Adaptation of food crops to temperature and water stress*. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, pp 257–270
- Fischer RA, Maurer R (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Aust J Agric Res* 29:897–912
- Fleiss JL (1971) Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol Bull* 76(5):378–382
- Ghagar SM, Siyadat H, Mirlatif M, Mirnia SK (2000) Effect of cutting of irrigation in different growth stages on yield and water use efficiency and comparison of some drought tolerance indices in four wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Soil Water J* 12(10):64–75
- Ghislain M, Trogniz B, Herrera MR, Solis J, Casallo G, Vásquez C, Hurtado O, Castillo R, Portal L, Orrillo M (2001) Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions. *Theor Appl Genet* 103:433–442
- Golabadi M, Arzani A, Maibody SAMM (2006) Assessment of drought tolerance in segregating populations in durum wheat. *Afr J Agric Res* 1(5):162–171
- Golestani M, Pakniyat H (2007) Evaluation of drought tolerance indices in sesame lines. *J Sci Technol Agric Nat Res* 11: 141–150
- Habibi G (2011) Influence of drought on yield and yield components in white bean. *World Acad of Sci Eng Technol* 79:244–253
- Hassanpanah D (2010) Evaluation of potato advanced cultivars against water deficit stress under in vitro and in vivo condition. *Biotechnology* 9:164–169
- Hossain ABS, Sears AG, Cox TS, Paulsen GM (1990) Desiccation tolerance and its relationship to assimilate partitioning in winter wheat. *Crop Sci* 30:622–627
- Jafari A, Paknejad F, Jami Al-Ahmadi M (2009) Evaluation of selection indices for drought tolerance of corn (*Zea mays* L.) hybrids. *Int J Plant Prod* 3(4):1735–6814
- Jefferies RA (1993) Responses of potato genotypes to drought. I. Expansion of individual leaves and osmotic adjustment. *Ann Appl Biol* 122:93–104
- Kaya Y, Palta C, Taner S (2002) Additive main effects and multiplicative interactions analysis of yield performance in bread wheat genotypes across environments. *Turk J Agric For* 26:275–279
- Khodarahmpour Z, Choukan R, Bihanta MR, Hervan EM (2011) Determination of the best heat stress tolerance indices in maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids under Khuzestan Province conditions. *J Agric Sci Technol* 13:111–121
- Khokhar MI, Teixeira da Silva JA, Spiertz H (2012) Evaluation of barley genotypes for yielding ability and drought tolerance under irrigated and water-stressed conditions. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 12(3):287–292
- Kristin AS, Serna RR, Perez FI, Enriquez BC, Gallegos JAA, Vallejo PR, Wassimi N, Kelley JD (1997) Improving common bean performance under drought stress. *Crop Sci* 37:43–50
- Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159–174
- Mhike X, Okori P, Magorokosho C, Ndlela T (2012) Validation of the use of secondary traits and selection indices for drought tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.). *Afr J Plant Sci* 6:96–102
- Mitra J (2001) Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr Sci* 80:758–762
- Nouri A, Etmnan A, Teixeira da Silva JA, Mohammadi R (2011) Assessment of yield, yield-related traits and drought tolerance of durum wheat genotypes (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.). *Aust J Crop Sci* 5(1):8–16
- Ovchinnikova A, Krylova E, Gavrilenko T, Smekalova T, Zhuk M, Knapp S, Spooner DM (2011) Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *Petota*: solanaceae). *Bot J Linn Soc* 165:107–155
- Pantuwan G, Fukai S, Cooper M, Rajatasereejul S, O’Toole JC (2002) Yield response of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to different types of drought under rainfed lowlands. Part 1. Grain yield and yield components. *Field Crops Res* 73: 153–168
- Ramirez P, Kelly JD (1998) Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica* 99:127–136
- Rezaeizad A (2007) Response of some sunflower genotypes to drought stress using different stress tolerance indices. *Seed Plant* 23(1):43–58
- Rosielle AA, Hamblin J (1981) Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. *Crop Sci* 21:943–946
- Saba J, Moghaddam M, Ghassemi K, Nishabouri MR (2001) Genetic properties of drought resistance indices. *J Agric Sci Technol* 3:43–49
- Sadeghian SY, Fazli H, Mohammadian R, Taleghani DF, Mesbah M (2000) Genetic variation for drought stress in sugarbeet. *J Sugar Beet Res* 37:55–77
- Shirazi Kharrazi MA, Naroui Rad MR (2011) Evaluation of sorghum genotypes under drought stress conditions using some stress tolerance indices. *Afr J Biotechnol* 10: 13086–13089
- Sim J, Wright CC (2005) The Kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther* 85:257–268
- Singh BU, Rao KV, Sharma HC (2011) Comparison of selection indices to identify sorghum genotypes resistant to the spotted stem borer *Chilo partellus* (Lepidoptera: *Noctuidae*). *Int J Trop Insect Sci* 31:38–51
- Sio-Se Mardeh A, Ahmadi A, Poustini K, Mohammadi V (2006) Evaluation of drought resistance indices under various environmental conditions. *Field Crops Res* 98:222–229
- Souri J, Deghani H, Sabaghpour SH (2005) Study pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in water stress condition. *Iran J Agric Sci* 36(6):1517–1527
- Spitters CJT, Schapendonk AHCM (1990) Evaluation of breeding strategies for drought tolerance in potato by means of crop growth simulation. *Plant Soil* 123:193–203
- Spooner DM, Núñez J, Trujillo G, Herrera MR, Guzmán F, Ghislain M (2007) Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proc Nat Acad Sci USA* 104:19398–19403

- Steyn JM, Du Plessis HF, Fourie P, Hammes PS (1998) Yield response of potato genotypes to different soil water regimes in contrasting seasons of a subtropical climate. *Potato Res* 41:239–254
- Ta J, Kaushik SK, Minhas JS, Bhardwaj V (2003) The potato breeding for biotic and abiotic stress. Mehta, New Delhi, p 446
- Talebi R, Fayaz F, Mohammad NA (2009) Effective selection criteria for assessing drought stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Gen Appl Plant Physiol* 35:64–74
- Zangi MR (2005) Correlation between drought resistance indices and cotton yield in stress and non-stress conditions. *Asian J Plant Sci* 4:106–108

Increased Genomic Prediction Accuracy in Wheat Breeding Through Spatial Adjustment of Field Trial Data

Bettina Lado,* Ivan Matus,[†] Alejandra Rodríguez,[†] Luis Inostroza,[†] Jesse Poland,^{*,§} François Belzile,** Alejandro del Pozo,^{††} Martín Quincke,* Marina Castro,* and Jarislav von Zitzewitz*^{1,2}

*Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay, [†]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile, [‡]United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Hard Winter Wheat Genetics Research Unit, Manhattan, Kansas 66506, [§]Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan, Kansas, **Département de Phytologie and Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada, and ^{††}Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile

ABSTRACT In crop breeding, the interest of predicting the performance of candidate cultivars in the field has increased due to recent advances in molecular breeding technologies. However, the complexity of the wheat genome presents some challenges for applying new technologies in molecular marker identification with next-generation sequencing. We applied genotyping-by-sequencing, a recently developed method to identify single-nucleotide polymorphisms, in the genomes of 384 wheat (*Triticum aestivum*) genotypes that were field tested under three different water regimes in Mediterranean climatic conditions: rain-fed only, mild water stress, and fully irrigated. We identified 102,324 single-nucleotide polymorphisms in these genotypes, and the phenotypic data were used to train and test genomic selection models intended to predict yield, thousand-kernel weight, number of kernels per spike, and heading date. Phenotypic data showed marked spatial variation. Therefore, different models were tested to correct the trends observed in the field. A mixed-model using moving-means as a covariate was found to best fit the data. When we applied the genomic selection models, the accuracy of predicted traits increased with spatial adjustment. Multiple genomic selection models were tested, and a Gaussian kernel model was determined to give the highest accuracy. The best predictions between environments were obtained when data from different years were used to train the model. Our results confirm that genotyping-by-sequencing is an effective tool to obtain genome-wide information for crops with complex genomes, that these data are efficient for predicting traits, and that correction of spatial variation is a crucial ingredient to increase prediction accuracy in genomic selection models.

KEYWORDS

genotyping-by-sequencing
genomic selection
wheat
single nucleotide polymorphism
quantitative trait locus
spatial Correction
GBLUP
Shared data resources
GenPred

Copyright © 2013 Lado *et al.*

doi: 10.1534/g3.113.007807

Manuscript received August 26, 2013; accepted for publication September 18, 2013; published Early Online September 30, 2013.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Unported License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Supporting information is available online at <http://www.g3journal.org/lookup/suppl/doi:10.1534/g3.113.007807/-/DC1>

¹Present address: SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany.

²Corresponding author: SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany. E-mail: jari.zitzewitz@secobra.com

Wheat is the third most-important cereal crop in the world, with a total production of 704 million tons annually (FAOSTAT, 2011). To meet future market demands, some of the most important breeding objectives include increasing total yields and the rate at which wheat breeding programs adapt to new and changing environments.

New genomic tools in wheat breeding have allowed the incorporation of new allelic variants into adapted germplasm. Strategies like quantitative trait loci and association mapping have aided in identifying genes or genomic regions responsible for traits of interest (Lander and Botstein 1989; Jansen 1993; Tanksley 1993; Risch and Merikangas 1996; Pritchard *et al.* 2000; Kraakman *et al.* 2004; Kirigwi *et al.* 2007; Neumann *et al.* 2010; Le Gouis *et al.* 2012; Yu *et al.* 2012).

■ **Table 1** Description of models used to adjust the phenotypic data

Model Name	Model Expression
IB	$y = g_i + rep_j + bl(rep)_{ijk} + e_{ijk}$
RC	$y = g_i + rep_j + fil(rep)_{jk} + col(rep)_{ji} + e_{ijk}$
RCB_MVNG	$y = g_i + \beta x_j + rep_k + e_{ijk}$
MVNG	$y = u + \beta x_i + e_i$

IB, incomplete blocks, field design; g, treatment; rep, repetitions; bl(rep), incompletes blocks nested in repetitions; e, residual; u, general mean; RC, row by column model; fil(rep), rows nested in repetitions; col(rep), columns nested in repetitions; RCB_MVNG, random complete block model with moving means as covariable; x, covariable as phenotypic value of plot minus means of neighbors plots within grid; MVNG, linear regression model with moving means as covariable.

Trait-associated markers then become selection targets to assist in molecular breeding programs (Collard *et al.* 2005; Landjeva *et al.* 2007; Collard and Mackill 2008; Buerstymayr *et al.* 2009). However, these approaches have limitations due to the difficulty in detecting significant markers within gene regions that are involved in the expression of complex traits influenced by many genes at different levels (Xu 2003). The most important traits involved in breeding are complex. Therefore, other strategies that take into account thousands of markers at one time in a model to predict complex traits have recently been developed.

Genomic selection (GS) is a recent approach that is being applied in crop breeding to make decisions for advancing germplasm from one generation to the next. GS was first proposed in animal breeding by Meuwissen *et al.* (2001). The development of high-throughput sequencing platforms, yielding a vast amount of information for each genotype allows the application of GS. For GS to be applicable in commercial breeding, genotyping methods need to be cost-effective. Genotyping-by-sequencing (GBS) is a high-throughput genotyping method that has been shown to be very useful for complex genomes like wheat (Poland *et al.* 2012a; Poland and Rife 2012). GBS costs are directly linked to the decreasing cost of sequencing driven by global research into developing new low-cost sequencing technologies and platforms. The wheat genome is very large at 16 Gb (*i.e.*, five times the human genome) and very complex with 80% repeated regions and 25–30% of its genes duplicated (Bennett and Smith 1976; Dubcovsky *et al.* 1996; Akhunov *et al.* 2003). Furthermore, wheat is a hexaploid species with three genomes (A, B, and D) per chromosome (Sarkar and Stebbins 1956; Dvorak and Zhang 1990; Dvorak *et al.* 1993). GBS uses methylation sensitive enzymes, which results in the elimination of most of the repeated regions and reduces the genome representation to increase the efficiency of sequencing (Elshire *et al.* 2011; Sonah *et al.* 2013).

The development of novel statistical approaches for GS is a crucial step, where all the genotypic information is taken into account to be associated with phenotypic data by adjusting the parameters in a prediction model. The parameters of the model are currently being adjusted with linear models (Ridge regression [RR]), Bayesian approaches (Bayes A and Bayes B), and semiparametric strategies (reproducing Kernel Hilbert spaces [RKHS] and neural networks) (Meuwissen *et al.* 2001; Gianola *et al.* 2003, 2011; de los Campos *et al.* 2010; Endelman 2011; Goddard *et al.* 2011; Poland *et al.* 2012b). RKHS is defined by a “reproducing kernel,” which is a function of the relationship between pairs of genotypes. RKHS is a semiparametric approach, which could be represented as a parametric model by choosing the appropriate kernel (de los Campos *et al.* 2010). Two kernels that are commonly applied are known as RR and Gaussian (GAUSS). The relationships between genotypes in RR are established

by the use of an additive model, and in GAUSS, the relationship between individuals is calculated with Euclidean distances that take into account epistatic interactions (Gianola and Van Kaam 2008; Endelman 2011).

Because genotyping is taking a more routine and accepted approach, improvements in model predictions are focused on precision phenotyping. Physiological differences and environmental conditions that affect the precision of the measured phenotype need to be taken into account to have an accurate GS prediction model. The breeder needs to know with accuracy the fields in which selections will occur; therefore, high-throughput phenotyping technologies are being implemented before planting (characterization of field heterogeneity) and during crop development to help reduce nongenetic variation (Crossa *et al.* 2006; Cabrera-Bosquet *et al.* 2012; Masuka *et al.* 2012; White *et al.* 2012). Otherwise, traditional methods are applied in which field design takes care of most of the variation and model correction mechanisms take into account the field heterogeneity that produces spatial correlation errors. These spatial trends can be eliminated with postdata treatment. Different strategies exist, including model variance-covariance matrixes, row-columns, and moving-means (Cullis *et al.* 1998; Peiris *et al.* 2008; Müller *et al.* 2010; Leiser *et al.* 2012).

The objectives of this study were (1) to validate the GBS technology as a tool for genotyping germplasm with complex genomes; and (2) to create an optimized training model for GS with a germplasm to be bred in a Mediterranean climate environment of central Chile, using a diverse set of wheat genotypes. Our study confirms that GBS is an inexpensive, robust, and useful tool to obtain genomewide information for breeding programs that work with complex genomes, such as wheat. Furthermore, we evaluate that spatial adjustment of the phenotypic data in each trial is very important to reduce error in the model and increase prediction accuracy. Here we evaluate spatial variation across the field, while also exploring fundamental variations that take into account environmental and genotypic interactions.

MATERIALS AND METHODS

Germplasm and growth conditions

The germplasm consists of 384 advanced lines from two different breeding programs, including 55 lines from the wheat breeding program at Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) in Chile, 143 from the International Wheat and Maize Improvement Centre (CIMMYT) that were previously selected for adaptiveness to Chilean environments (these lines share common ancestors with the INIA-Chile breeding program), and 186 lines from INIA in Uruguay. The objective with this set of lines was to create a germplasm base to breed for drier areas in Chile and subsequently other countries within the projects involved.

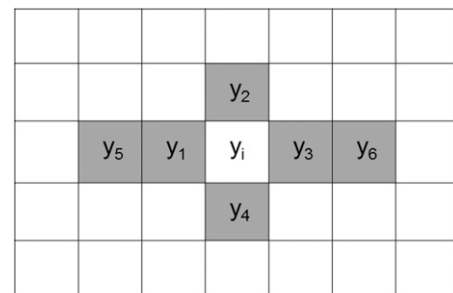


Figure 1 Diagram to calculate the covariable x_i . Y_i is the phenotypic value in the plot. The neighboring plots are indicated with gray color.

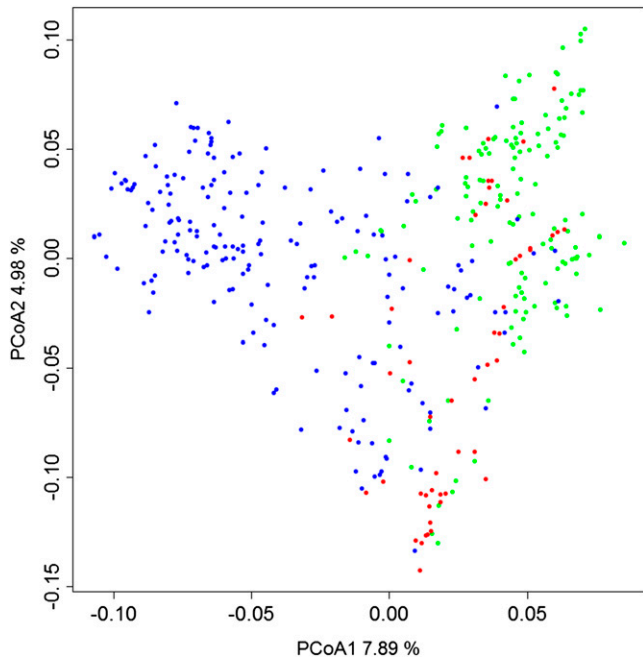


Figure 2 PCoA from dissimilarity matrix calculated with genetic data. Points in red represent advanced lines from the INIA Chile breeding program, green points identify lines from CIMMYT, and blue points denote advanced lines and prebreeding lines from the INIA Uruguay breeding program.

The breeding germplasm was evaluated in the Mediterranean environment Santa Rosa (36°32' S, 71°55' W; 217 m.a.s.l.) under two levels of water supply, mild water stress and fully irrigated, in 2011. In

2012 the lines were evaluated in Santa Rosa under the two levels of water supply and also evaluated in Cauquenes (35° 58' S; 72° 17' W), a traditionally dry-land agricultural region with lower yield potential. Cauquenes has a granitic soil (Alfisol) with low fertility; the minimum average temperature is 4.7° (July), the maximum is 27° (January) and the long-term average annual precipitation is 695 mm. Santa Rosa has a volcanic soil (Andisol) with adequate fertility for wheat; the minimum average temperature is 3.0° (July), the maximum is 28.6° (January), and long-term average annual precipitation is 1270 mm (del Pozo and Del Canto 1999).

The experimental design was an alpha-lattice with 20 incomplete blocks, with each block containing 20 genotypes. Two replicates were used at both trials of Santa Rosa in 2011 and 2012 and at Cauquenes in 2012. Plots consisted of five rows of 2 m long and 0.2 m distance among rows. Sowing dates were on August 31st and September 7th at Santa Rosa and Cauquenes, respectively, and the sowing rate was 20 g m². Plots were fertilized with 260 kg ha⁻¹ of ammonium phosphate (46% P₂O₅ and 18% N), 90 kg ha⁻¹ of potassium chloride (60% K₂O), 200 kg ha⁻¹ of sulphomag (22% K₂O, 18% MgO, and 22% S), 10 kg ha⁻¹ of boronatrocaltita (11% B), and 3 kg ha⁻¹ of zinc sulfate (35% Zn). During tillering, an extra 80 kg ha⁻¹ of N was applied. Weeds were controlled with MCPA at 750 g a.i. ha⁻¹ + Metsulfuron Metil 8 g a.i. ha⁻¹. Furrow irrigation was used at Santa Rosa: one irrigation (at tillering) for the mild water stress trial and four irrigations (at tillering, flag leaf emergence, heading, and middle grain filling) of ca. 50 mm each for the fully irrigated trial.

For phenotyping, all lines were evaluated for grain yield (GY), thousand kernel weight (TKW), number of kernels per spike (NKS), and days to heading (DH) in 2011. In 2012, only GY was evaluated. For the yield components (TKW and NKS), 25 spikes were randomly selected from each plot. For GY, the whole plot was harvested. DH

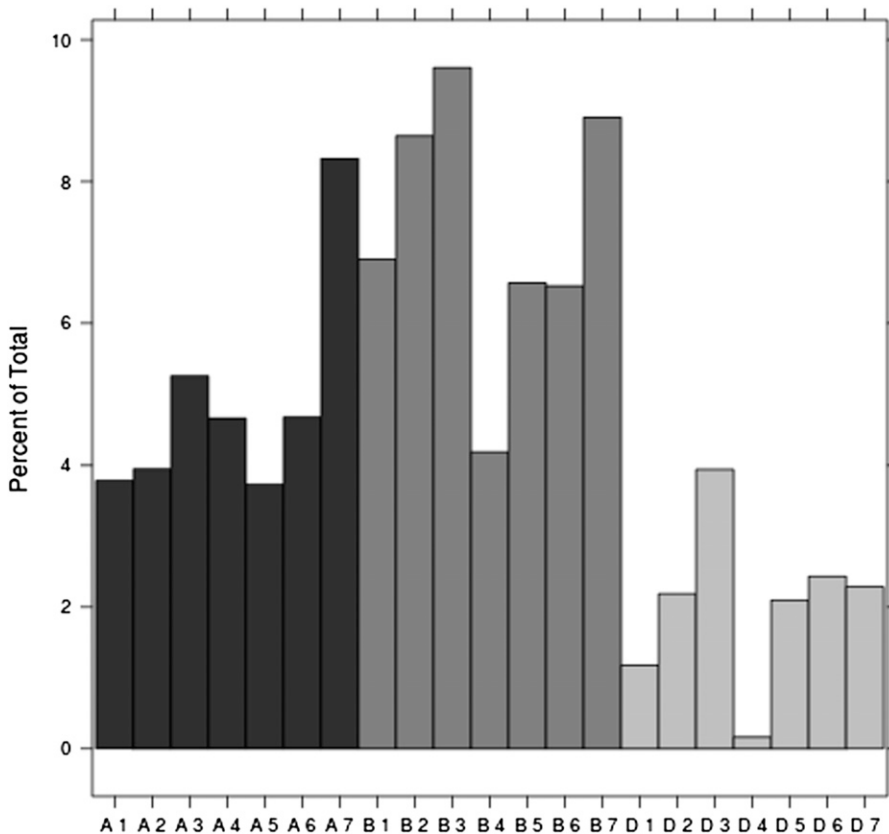


Figure 3 GBS-based SNP distribution along different wheat chromosomes.

was recorded as the number of days from sowing till 50% of spikes emerged.

SNP identification

Genomic DNA was extracted using DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN). Library construction was followed by using the *Pst*I-*Msp*I GBS protocol described by Poland *et al.* (2012a). This step and sequencing was performed twice. The libraries were made in collaboration with the Kansas State University, Manhattan, Kansas, and the Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes at the Université Laval, Quebec, Canada. The sequencing was performed on an Illumina Hi-Seq 2000 at the DNA core facility at the University of Missouri, Columbia, Missouri, and the McGill University-Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Canada) for each set of libraries. The sequences

were analyzed, in relation to base quality and distribution of sequence in different samples, using the Galaxy (<http://galaxy.psu.edu/>) software.

Single-nucleotide polymorphism (SNP) calls were made using the Tassel Pipeline (TP; <http://maizegenetics.net>), with modification for nonreference SNP calling by Poland *et al.* (2012a). The TP handles the sequence information coming from next-generation sequencing. Tags are defined, which are a set of identical sequences, and then the number of sequences per tag are counted. To handle tags with sequencing errors, the parameter to eliminate tags was established at less than 15 sequences. Tags are then defined individually by the lines that it came from. A pairwise alignment between tags to call some set of potential SNPs is then established. The TP has different filters for calling SNPs. In this study inbred lines that are in a highly homozygous

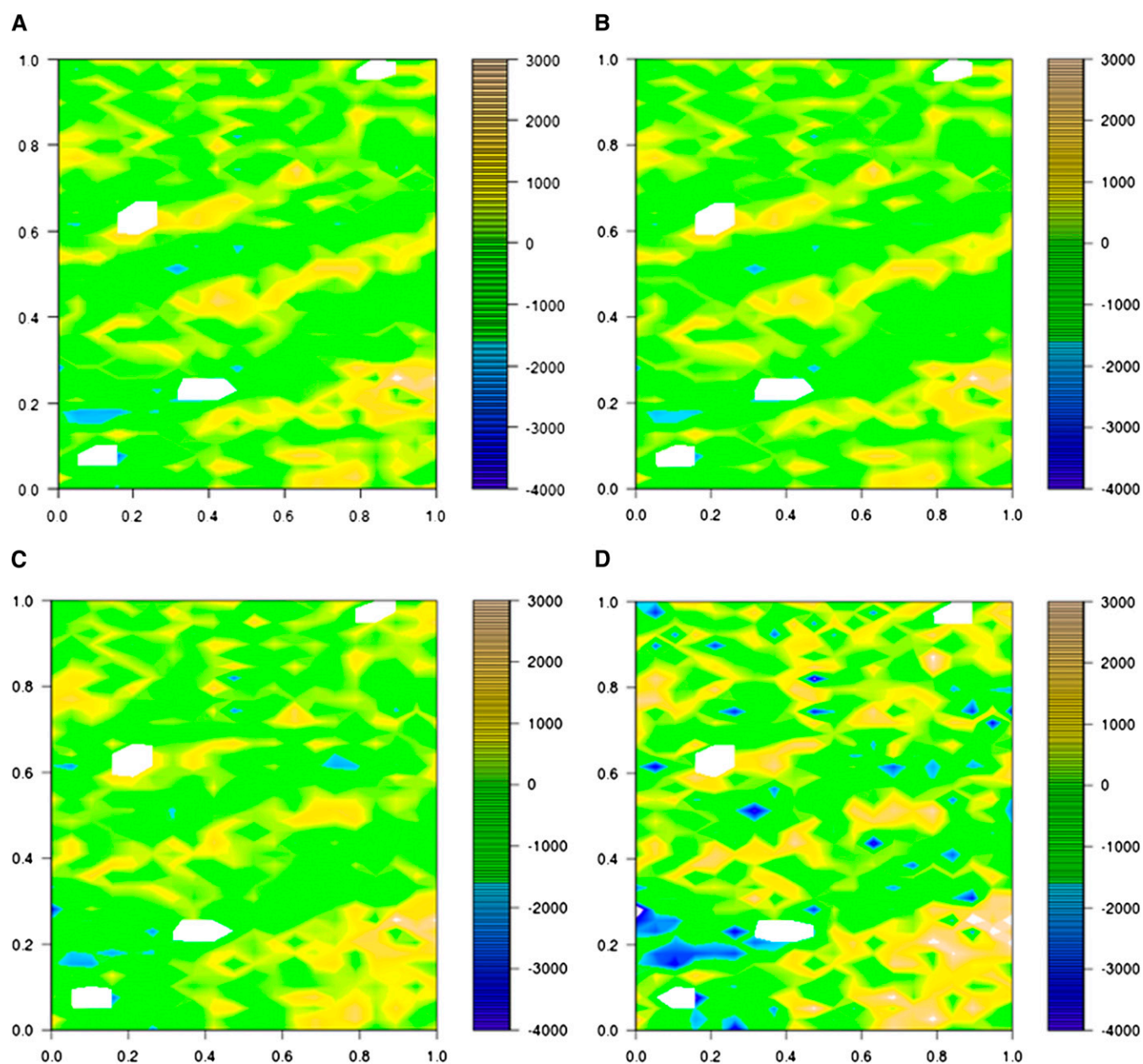


Figure 4 Plot residuals along the field for each model analysis for Santa Rosa irrigated. The color scale shows the value of residuals as indicated. (A) Residuals for incomplete blocks, field design; (B) residuals for RC; (C) residuals for RCB_MVNG; (D) residuals for MVNG.

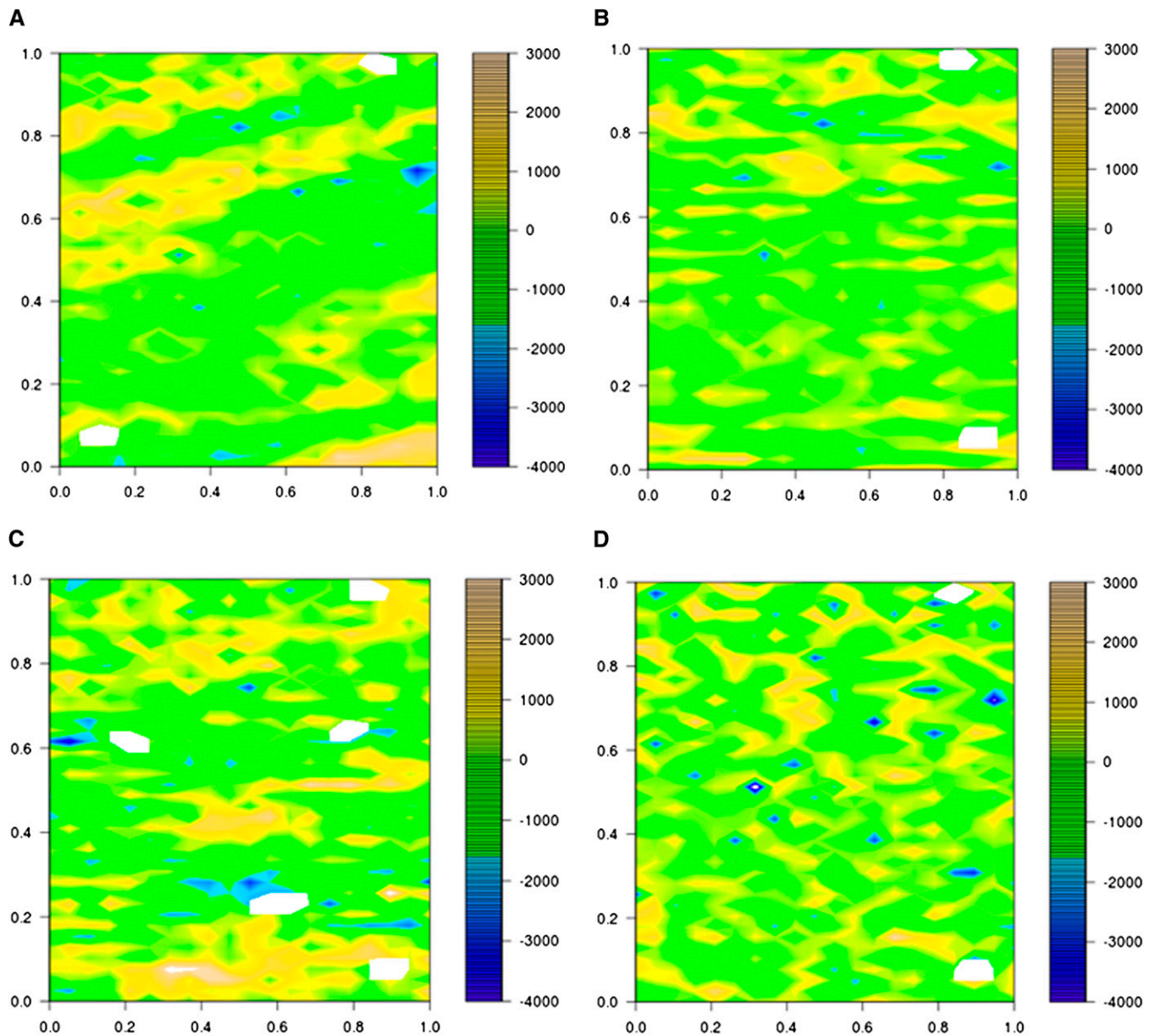


Figure 5 Plot residuals along the field for each model analysis for Santa Rosa nonirrigated trial. The color scale shows the value of residual effects as indicated. (A) Residuals for incomplete blocks, field design; (B) residuals for RC; (C) residuals for RCB_MVNG; (D) residuals for MVNG

state were used; therefore, the “inbreeding coefficient” filter was used and set to 0.9 to eliminate high amounts of heterozygotes. The minor allele frequency filter was set to 0.01, and the minimum locus coverage was set to eliminate SNPs with more than 80% missing data. Once the complete SNP matrix was established (supporting information, File S1), the missing data were imputed using the realized relationship matrix method multivariate normal expectation maximization (MVN-EM) described by Poland *et al.* (2012b) with the R environment (R Development Core Team 2008) package rrBLUP (Endelman 2011). To further verify that the imputed SNPs were not affected, we correlated the genetic relationship matrix with and without imputed SNPs. Then, to further verify the quality of the imputed SNPs, marker-based kinship matrixes between random subsets of SNPs were calculated and compared with the rrBLUP software package (Endelman 2011).

Genetic and phylogenetic comparisons

SNP data from 384 diverse wheat genotypes were used to calculate the kinship (A) matrix of genotypes using the EMMA package (Kang *et al.* 2008) in R environment (R Development Core Team 2008). The dissimilarity matrix ($1 - \text{similarity matrix}$) was analyzed by principal coordinate analysis (PCoA) by use of the ape package (Paradis *et al.* 2004) in R.

Sequence alignments

The SNP tags were BLASTed against the sequence database available from the Synthetic x Opatá map by Poland *et al.* (2012a) (available at <http://www.wheatgenetics.org/index.php/download/viewcategory/10-synop>) using blastn from package NCBI-BLAST+ (Altschul *et al.* 1990) setting the parameters, maximum target, and number of threads at 1 and percent of identity at 95%.

■ **Table 2 Broad sense heritability for each field trial**

		2011			2012
		H ² IB	H ² RC	H ² RCB_MVNG / MVNG	H ²
SR_FI	GY	0.42	0.44	0.57	0.622
	TKW	0.88	0.88	0.89	—
	DH	0.95	0.95	0.95	—
	NKS	0.76	0.76	0.74	—
SR_MWS	GY	0.33	0.37	0.56	0.641
	TKW	0.79	0.81	0.82	—
	DH	0.93	0.93	0.93	—
	NKS	0.74	0.75	0.75	—
C_WS	GY	—	—	—	0.340

H², broad sense heritability; IB, incomplete blocks, field design; RC, row by column model; RCB_MVNG, random complete block model with moving means as covariable; MVNG, linear regression model with moving means as covariable; SR_FI, Santa Rosa under Full Irrigation; SR_MWS, Santa Rosa under Mild Water Stress; C_SWS, Cauquenes under severe water stress; GY, grain yield; TKW, thousand kernel weight; DH, days to heading; NKS, number of kernels per spike.

Linkage disequilibrium (LD) between each pair of mapped SNPs was calculated as r^2 using the trio package (Schwender *et al.* 2012) in R. SNPs were ordered following the bin map order presented in the database used by Poland *et al.* (2012a). After SNPs were ordered, the LD values were plotted using the LDheatmap package (Shin *et al.* 2006) in R.

Phenotypic predictions

Phenotypic data were analyzed using the lme4 (Bates 2007) and mvngGrAd (Technow 2012) packages in R. The analysis was performed individually for each condition and year. Two different mixed models and one linear regression model (Table 1), defined as Row-by-Column (RC), Random Complete Block model with moving means (RCB_MVNG), and linear regression model with moving means as covariable (MVNG), were considered to account for spatial correlations. Two of the four models use a covariable to correct for spatial variation in the field. The covariable (x_i) was calculated as the value of phenotypic plot minus mean phenotypic value of neighbors plots, $x_i = y_i - \text{mean}(y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6)$; Figure 1).

■ **Table 3 Accuracy of predictions for each trial in 2011 using random training sets with 100 independent randomizations**

			IB	RC	RCB_MVNG	MVNG
SR_FI	GY	RR	0.298 ± 0.117	0.296 ± 0.119	0.319 ± 0.114	0.319 ± 0.113
		GAUSS	0.312 ± 0.117	0.310 ± 0.120	0.325 ± 0.117	0.326 ± 0.116
	TKW	RR	0.780 ± 0.056	0.780 ± 0.056	0.777 ± 0.057	0.843 ± 0.040
		GAUSS	0.786 ± 0.055	0.786 ± 0.055	0.782 ± 0.056	0.847 ± 0.039
	DH	RR	0.409 ± 0.109	0.409 ± 0.109	0.405 ± 0.109	0.579 ± 0.123
		GAUSS	0.436 ± 0.111	0.436 ± 0.111	0.433 ± 0.111	0.614 ± 0.121
	NKS	RR	0.479 ± 0.114	0.479 ± 0.114	0.484 ± 0.115	0.665 ± 0.077
		GAUSS	0.487 ± 0.119	0.487 ± 0.119	0.492 ± 0.120	0.669 ± 0.075
SR_MWS	GY	RR	0.236 ± 0.141	0.275 ± 0.147	0.231 ± 0.127	0.347 ± 0.134
		GAUSS	0.231 ± 0.144	0.273 ± 0.150	0.260 ± 0.128	0.370 ± 0.132
	TKW	RR	0.759 ± 0.061	0.762 ± 0.061	0.757 ± 0.058	0.841 ± 0.034
		GAUSS	0.764 ± 0.059	0.767 ± 0.059	0.761 ± 0.057	0.845 ± 0.034
	DH	RR	0.398 ± 0.110	0.399 ± 0.110	0.396 ± 0.110	0.563 ± 0.134
		GAUSS	0.423 ± 0.108	0.423 ± 0.108	0.423 ± 0.108	0.604 ± 0.134
	NKS	RR	0.464 ± 0.115	0.466 ± 0.114	0.458 ± 0.114	0.608 ± 0.088
		GAUSS	0.483 ± 0.111	0.485 ± 0.111	0.478 ± 0.111	0.608 ± 0.086

IB, incomplete blocks, field design; RC, row by column model; RCB_MVNG, random complete block model with moving means as covariable; MVNG, linear regression model with moving means as covariable; SR_FI, Santa Rosa under full irrigation; GY, grain yield; RR, Ridge regression kernel; GAUSS, Gaussian kernel; TKW, thousand kernel weight; DH, days to heading; NKS, number of kernels per spike; SR_MWS, Santa Rosa under mild water stress.

The three mixed models have a general expression as follows:

$$y = \beta X + Zu + e$$

where X is the design matrix for fixed effects β , Z is the design matrix for random effects, and u and e are the residual matrix that follows the distribution $e \sim N(0, \sigma_e^2 I)$. After the analysis of the residuals from each phenotypic model was established, the best linear unbiased predictors (BLUPs) were obtained to calculate genomic predictions by genomic best linear unbiased predictor (GBLUP) using the rrBLUP package with two different kernels, RR and GAUSS (Endelman 2011). The predictions were validated with 100 replications using the cross validation method described by Crossa *et al.* (2010). The samples were subdivided in seven similar sets. The training population was composed of six of the sets (86% of the samples) and the validation was performed on the remaining set (14% of the samples). For predictions between environments, adjusted data from two environments were used to train predictions in the remaining three environments.

RESULTS

SNP identification

GBS SNPs were identified among sequences tag pairs by allowing one to three mismatches between tags. Two library replicates for the 384 samples were analyzed jointly for SNPs, producing a total of 102,324 SNPs. Similarity matrices calculated with and without imputation shown high correlation ($r = 0.990, p < 0.001$).

Genetic and phylogenetic comparisons

To test the predictability of the markers in constructing a genetic relationship matrix, the 102,324 SNPs were divided into two randomly assigned identical sets of 51,162 SNPs in each group. Two genetic similarity matrices were constructed independently with each of the sets of SNPs. The Pearson correlation between matrices was 0.997 ($p = 0.001$). A genetic similarity matrix was calculated with the complete set of markers to perform a principal coordinate analysis. The germplasm was separated in two groups, representing each breeding program (CIMMYT-INIA Chile and INIA Uruguay). The first two principal coordinates explained 12.9% of variation (Figure 2).

■ **Table 4 Accuracy of prediction for yield in 2012 using random training sets with 100 independent randomizations**

	RR	GAUSS
SR_FI	0.487 ± 0.093	0.516 ± 0.086
SR_MWS	0.617 ± 0.078	0.626 ± 0.077
C_SWS	0.382 ± 0.104	0.378 ± 0.104

RR, Ridge regression kernel; GAUSS: Gaussian kernel; SR_FI, Santa Rosa under Full Irrigation; SR_MWS, Santa Rosa under Mild Water Stress; C_SWS, Cauquenes under Severe Water Stress.

Sequence alignments

When comparing sequences using BLAST against the Poland *et al.* (2012a) GBS-based SNP database, we found that the sequences in common showed a good coverage throughout all 21wheat linkage groups. Of all the SNPs, 13% (13,357) found high-quality matches. Although a good coverage was observed, the D genome presented fewer SNPs than the A and B genomes (Figure 3). As expected, LD analysis between mapped SNPs indicated high LD between closely linked SNPs along all chromosomes (File S1).

Phenotypic analysis

Phenotypic data were collected under different soil water availability in 2011 and 2012. The traits under study (GY, TKW, NKS, DH) were analyzed adjusting for field design and for spatial variation using linear mixed models. The residuals for the adjusted traits in 2011 were heterogeneous due to spatial correlations (Figure 4 and Figure 5). Other models (RC, RCB_MVNG, and MVNG) were considered to reduce correlations between residuals. The RC model was inadequate to correct the residual heterogeneity, because the same spatial correlation was observed (Figure 4 and Figure 5). The other two (RCB_MVNG and MVNG) models adjusted, which include the moving means as a covariable, presented homogeneous residuals along the field (Figure 4 and Figure 5). In addition, the broad sense heritability was calculated for each model. The greatest heritability value was for the MVNG model for all traits (Table 2).

In 2012 the fields had minimal spatial variation; therefore, after we adjusted the phenotypic data with the intended field design, the residuals we observed were homogeneous throughout the field. The heritability for yield was greater for the 2012 trials than for the 2011 trials. Cauquenes, which was a dry-land condition with more drought stress, presented a more pronounced field variation (Table 2) resulting in a lower heritability than the other two fields in 2012.

Phenotypic predictions

A GS model using the GBLUP approach was fitted for each trait, using the line BLUPs of the best-fit phenotypic model. In all cases the 86% of genotypes were used to train the genomic model and the predictions were assessed in the other 14%. The predictions were evaluated using 100 cross validations with the training and prediction sets randomly partitioned.

We determined the standard deviation across all correlation for each model. The RR and GAUSS kernels were tested for each GS model. In most of the cases GAUSS performed better than RR. In general, the phenotypic data adjusted with MVNG, resulted in greater prediction accuracies, although high standard errors were observed (Table 3). The prediction accuracies for 2012 were greater than for 2011 (Table 3 and Table 4).

All possible combinations of the trials were used to test as training sets to observe the prediction accuracy from year to year or from one environment to the next. Because of the high variation from year to year, the best predictions were obtained when adding information in the model that included both years (Table 5).

DISCUSSION

The challenge in wheat breeding is to accelerate the adaptation of germplasm for more efficient and rapid results, if possible, to increase yield, and to adapt to future climate change. Tools are now available that allow taking up this challenge and relate the complex genetic mechanism involved in phenotypic expression in relation with environmental interactions (Heffner *et al.* 2009).

Genotypic analysis

We detected 102,324 SNPs using two library replicates, which were used to calculate a dissimilarity matrix, which was analyzed by PCoA. As described by Poland *et al.* (2012a), we didn't expect big differences between dissimilarity matrixes calculates with and without imputation. For PCoA, the lines were grouped by breeding program of origin. This was expected as the lines from the same breeding program should be more similar genetically because they share a common parental background and were bred under similar developmental conditions (Rauf *et al.* 2010).

When BLASTing against tags in the SynOpDH genetic map, we found that 13% of the tags aligned with high similarity. These tags were used to test LD between SNPs (File S1). High LD groups were identified, which is expected if the genotypes in each sample are true calls. In the same way, the distribution and concentration of SNPs in

■ **Table 5 Accuracy of predictions between different environments**

	SR_FI2011	SR_MWS2011	C_SWS2012	SR_FI2012	SR_MWS2012
1	0.292	0.319	0.263	0.294	0.414
2	0.221	0.234	0.192	0.205	0.405
3	0.291	0.312	0.251	0.275	0.414
4	0.569	0.641	—	—	0.319
5	0.626	0.681	—	—	0.310
6	0.628	0.718	—	—	0.258
7	—	—	0.560	0.639	0.329
8	—	—	0.604	0.662	0.326
9	—	—	0.624	0.693	0.269
10	—	—	—	—	0.430
					0.445
					0.466
					0.465
					0.303
					0.325

In each case (1–10), two environments were used to train the prediction model. SR_FI2011, Santa Rosa Full irrigated in 2011; SR_MWS2011, Santa Rosa mild water stress in 2011; C_SWS2012, Cauquenes severe water stress in 2012; SR_FI2012, Santa Rosa full irrigated in 2012; SR_MWS2012, Santa Rosa mild water stress 2012. The training sets were 1: SR_FI2012/SR_MWS2012; 2: C_SWS2012/SR_MWS2012; 3: C_SWS2012/SR_FI2012; 4: SR_MWS2011/ SR_MWS2012; 5: SR_MWS2011/ SR_FI2012; 6: SR_MWS2011/C_SWS2012; 7: SR_FI2011/SR_MWS2012; 8: SR_FI2011/SR_FI2012; 9: SR_FI2011/C_SWS2012; 10: SR_FI2011/SR_MWS2011.

different chromosomes was in agreement with other assessments of LD in elite wheat breeding lines (Chao *et al.* 2010). Although 13% does not seem like a high proportion, the resulting number of SNPs is 13,357, which are well distributed and is a high number of SNPs, allowing us to calculate LD across individuals and confirming high correlations between closely linked SNPs per linkage group. This evidence allows us to trust the quality of the SNPs identified through GBS for genomic predictions.

Phenotypic predictions

Before predictions were made, the phenotypic data were adjusted and residuals in the model were analyzed. The analysis showed a strong spatial effect across the field for the 2011 data. The introduction of a spatial correction model enabled a better adjustment in measurements, showing an increment in the heritability of measurements. A greater heritability indicates that a greater proportion of the variance in the experiment is due to a difference between genotypes (Holland *et al.* 2003). The models that showed a greater heritability also showed an increase in the mean accuracies of genomic predictions. The importance of taking into account appropriate field design prior to the experiment has been demonstrated before (Federer 2003; Federer and Crossa 2012). Strategies for data analysis also have been described in cases in which the variability in the field has not been measured before applying the field design and has made the field design ineffective (Cullis *et al.* 1998; Piepho and Williams 2010). In this study we found that these postdata adjustments improved the quality of our data. As genotyping becomes less and less of a constraint for developing genomic prediction training sets, proper treatment of phenotypic observations is the key to increasing the accuracy of predictions. There are studies that include sets of environmental variables in training models, which are measured during experiments, with the objective to control these sources of variation and consider genotypic \times environmental interactions (Chapman 2008). If the different sources of variation could be measured, together with genotypic \times environment interactions, prediction accuracies should improve.

Another interest is the ability to predict phenotypes across environments, or from year to year (Burgueño *et al.* 2012). However, when predicting new lines in previously untested environments, most prediction power is lost. Therefore, it is important to generate a growing database for model training, with corresponding sets of genotypes for the breeding program and target environments and continually increase the number of environments tested. In the present study, greater prediction accuracies were observed when we used data from 2 years to train the model (Table 5). When training the model with data from only one year, the accuracies of predictions were low because the year-to-year correlation was low (Table 5).

The accuracies of predictions were comparable with other work in wheat, which have used different fingerprinting approaches (Crossa *et al.* 2010; Heffner *et al.* 2011), adding confidence to the GBS approach.

Two different statistical models were tested using the GBLUP approach. The greatest prediction accuracies were achieved with a Gaussian kernel. This model considers epistatic effects in addition to additive effects modeled presented in RR models (Gianola and Van Kaam 2008).

This study is part of a long-term objective to adapt wheat germplasm to Mediterranean climate environments of central Chile and subsequently to other regions in South America that are in similar needs. Previous data (I. Matus, unpublished data) and experience suggest that the 384 lines present traits incorporated from CIMMYT, show adaptation to drier areas in Chile, and that both

germplasm groups (INIA-Chile and INIA-Uruguay) have shown different degrees of adaptation to these Chilean environments. We believe that this dataset contains the necessary genetic diversity for a germplasm base to start a breeding program guided toward drier areas in Chile.

The development of new genotyping tools has been the framework to the practical implementation of GS. There are many crops with different genomic characteristics that should be considered when identifying the most suited genotyping methodology. In this study, GBS was successfully applied for the genome-wide characterization of wheat breeding lines. GBS is a low-cost approach that can be used to genotype thousands of lines per year in a commercial breeding program.

The challenge in leveraging genomic assisted breeding approaches in applied programs now remains in obtaining high-quality and long-term accumulation of phenotypic data from multiple years and targeted environments. This study showed an increase in prediction accuracy with proper treatment of phenotypic data from field trials. High-throughput and high-precision phenotyping tools are being tested and used that will be well suited for breeding program and increasing predictions. Understanding and predicting the complex interaction between genotype and environment will also be key to select lines based on genotypic information.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alejandro Castro for technical assistance in field experiments. This work was supported by the research grants FONTAGRO ATN/OC-11943 and FONDECYT no. 1110732.

LITERATURE CITED

- Akhunov, E. D., A. W. Goodyear, S. Geng, L. L. Qi, B. Echalié *et al.*, 2003 The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genet. Res.* 13: 753–763.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
- Bates, D., 2007 lme4: Linear mixed-effects models using *s4* classes, pp. R package. Available at: <http://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html>. Accessed October 8, 2013.
- Bennett, M. D., and J. B. Smith, 1976 Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 274: 227–274.
- Buerstymayr, H., T. Ban, and J. A. Anderson, 2009 QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed.* 128: 1–26.
- Burgueño, J., G. de los Campos, K. Weigel, and J. Crossa, 2012 Genomic prediction of breeding values when modeling genotype \times environment interaction using pedigree and dense molecular markers. *Crop Sci.* 52: 707–719.
- Cabrera-Bosquet, L., J. Crossa, J. von Zitzewitz, M. D. Serret, and J. L. Araus, 2012 High-throughput phenotyping and genomic selection: the frontiers of crop breeding converge. *J. Integr. Plant Biol.* 54: 312–320.
- Chao, S., J. Dubcovsky, J. Dvorak, M. C. Luo, S. P. Baenziger *et al.*, 2010 Population- and genome-specific patterns of linkage disequilibrium and SNP variation in spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics* 11: 727–744.
- Chapman, S. C., 2008 Use of crop models to understand genotype by environment interactions for drought in real-world and simulated plant breeding trials. *Euphytica* 161: 195–208.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, and E. C. K. Pang, 2005 An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Collard, B. C., and D. J. Mackill, 2008 Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363: 557–572.

- Crossa, J., J. Burgueño, P. L. Cornelius, G. McLaren, R. Trethowan *et al.*, 2006 Modeling genotype \times environment interaction using additive genetic covariances of relatives for predicting breeding values of wheat genotypes. *Crop Sci.* 46: 1722–1733.
- Crossa, J., G. de los Campos, P. Perez, D. Gianola, J. Burgueño *et al.*, 2010 Prediction of genetic values of quantitative traits in plant breeding using pedigree and molecular markers. *Genetics* 186: 713–724.
- Cullis, B., B. Gogel, A. Verbyla, R. Thompson, and A. Verbyla, 1998 Spatial analysis of multi-environment early generation variety trials. *Biometrics* 54: 1–18.
- de los Campos, G., D. Gianola, G. J. Rosa, K. A. Weigel, and J. Crossa, 2010 Semi-parametric genomic-enabled prediction of genetic values using reproducing kernel Hilbert spaces methods. *Genet. Res.* 92: 295–308.
- del Pozo, A., and P. del Canto, 1999 Zonas agroclimáticas y sistemas productivos de la VII y VII región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Quilamapu 113.
- Dubcovsky, J., M. C. Luo, G. Y. Zhong, R. Bransteitter, A. Desai *et al.*, 1996 Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* 143: 983–999.
- Dvorak, J., and H. B. Zhang, 1990 Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9640–9644.
- Dvorak, J., P. Terlizzi, H. B. Zhang, and P. Resta, 1993 The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21–31.
- Elshire, R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto *et al.*, 2011 A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6: e19379.
- Endelman, J. B., 2011 Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. *Plant Genome J.* 4: 250–255.
- FAOSTAT, 2011. Home page. Available at: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Accessed October 8, 2013.
- Federer, W. T., 2003 Exploratory model selection for spatially designed experiments – some examples. *J. Data Sci.* 1: 231–248.
- Federer, W. T., and J. Crossa, 2012 I.4 screening experimental designs for quantitative trait loci, association mapping, genotype-by environment interaction, and other investigations. *Front. Physiol.* 3: 1–8.
- Gianola, D., M. Perez-Enciso, and M. A. Toro, 2003 On marker-assisted prediction of genetic value: beyond the ridge. *Genetics* 163: 347–365.
- Gianola, D., and J. B. van Kaam, 2008 Reproducing kernel Hilbert spaces regression methods for genomic assisted prediction of quantitative traits. *Genetics* 178: 2289–2303.
- Gianola, D., H. Okut, K. A. Weigel, and G. J. Rosa, 2011 Predicting complex quantitative traits with Bayesian neural networks: a case study with Jersey cows and wheat. *BMC Genet.* 12: 87–101.
- Goddard, M. E., B. J. Hayes, and T. H. E. Meuwissen, 2011 Using the genomic relationship matrix to predict the accuracy of genomic selection. *J. Anim. Breed. Genet.* 128: 409–421.
- Heffner, E. L., M. E. Sorrells, and J.-L. Jannink, 2009 Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49: 1–12.
- Heffner, E. L., J.-L. Jannink, and M. E. Sorrells, 2011 Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. *Plant Genome J.* 4: 65–75.
- Holland, J. B., W. E. Nyquist, and C. T. Cervantes-Martínez, 2003 Heritability for plant breeding: an update, pp. 9–112, in *Plant Breeding Reviews*, Vol. 22, edited by J. Janick. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK.
- Jansen, R., 1993 Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211.
- Kang, H. M., N. A. Zaitlen, C. M. Wade, A. Kirby, D. Heckerman *et al.*, 2008 Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709–1723.
- Kirigwi, F., M. Van Ginkel, G. Brown-Guedira, B. Gill, G. M. Paulsen *et al.*, 2007 Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Mol. Breed.* 20: 401–413.
- Kraakman, A. T. W., R. E. Niks, P. M. M. M. Van den Berg, P. Stam, and F. A. Van Eeuwijk, 2004 Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168: 435–446.
- Lander, E. S., and D. Botstein, 1989 Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Landjeva, S., V. Korzun, and A. Börner, 2007 Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271–296.
- Le Gouis, J., J. Bordes, C. Ravel, E. Heumez, S. Faure *et al.*, 2012 Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124: 597–611.
- Leiser, W. L., H. F. Rattunde, H.-P. Piepho, and H. K. Parzies, 2012 Getting the most out of sorghum low-input field trials in West Africa using spatial adjustment. *J. Agron. Crop Sci.* 198: 349–359.
- Masuka, B., J. L. Araus, B. Das, K. Sonder, and J. E. Cairns, 2012 Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. *J. Integr. Plant Biol.* 54: 238–249.
- Meuwissen, T. H., B. J. Hayes, and M. E. Goddard, 2001 Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.
- Müller, B. U., A. Schützenmeister, and H.-P. Piepho, 2010 Arrangement of check plots in augmented block designs when spatial analysis is used. *Plant Breed.* 129: 535–542.
- Neumann, K., B. Kobijlski, S. Denčić, R. K. Varshney, and A. Börner, 2010 Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.* 27: 37–58.
- Paradis, E., J. Claude, and K. Strimmer, 2004 APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Peiris, T. U. S., S. Samita, and W. H. D. Veronica, 2008 Accounting for spatial variability in field experiments on tea. *Exp. Agric.* 44: 547–557.
- Piepho, H. P., and E. R. Williams, 2010 Linear variance models for plant breeding trials. *Plant Breed.* 129: 1–8.
- Poland, J. A., P. J. Brown, M. E. Sorrells, and J. L. Jannink, 2012a Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7: e32253.
- Poland, J., J. Endelman, J. Dawson, J. Rutkoski, S. Wu *et al.*, 2012b Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *The Plant Genome Journal* 5: 1–11.
- Poland, J. A., and T. W. Rife, 2012 Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *Plant Genome J.* 5: 547–557.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, N. A. Rosenberg, and P. Donnelly, 2000 Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 170–181.
- R Development Core Team, 2008 *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: <http://www.R-project.org>.
- Rauf, S., J. A. Teixeira, A. Ali, and K. Abdul, 2010 Consequences of plant breeding on genetic diversity. *Int. J. Plant Breeding* 4: 1–21.
- Risch, N., and K. Merikangas, 1996 The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516–1517.
- Sarkar, P., and G. L. Stebbins, 1956 Morphological evidence concerning the B genome in wheat. *Am. J. Bot.* 43: 1–8.
- Schwender, H., Q. Li, C. Neumann, and I. Ruczinski, 2012 trio: trio package without Fortran code, pp. R package. Available at: <http://artax.karlin.mff.cuni.cz/r-help/library/trio/html/00Index.html>. Accessed October 8, 2013.
- Shin, J. H., S. Blay, B. McNeney, and J. Graham, 2006 LDheatmap: an R function for graphical display of pairwise linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *J. Stat. Softw.* 16: 1–9.
- Sonah, H., M. Bastien, E. Iqura, A. Tardivel, G. Legare *et al.*, 2013 An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping. *PLoS ONE* 8: e54603.
- Tanksley, S. D., 1993 Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205–233.

- Technow, F., 2012 pp. R Package for moving grid adjustment in plant breeding field trials. Available at: <http://artax.karlin.mff.cuni.cz/r-help/library/mvngGrAd/html/00Index.html>. Accessed October 8, 2013.
- White, J. W., P. Andrade-Sanchez, M. A. Gore, K. F. Bronson, T. A. Coffelt *et al.*, 2012 Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Res.* 133: 101–112.
- Xu, S., 2003 Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics* 165: 2259–2268.
- Yu, L. X., A. Morgounov, R. Wanyera, M. Keser, S. K. Singh *et al.*, 2012 Identification of Ug99 stem rust resistance loci in winter wheat germplasm using genome-wide association analysis. *Theor. Appl. Genet.* 125: 749–758.

Communicating editor: D.-J. De Koning

Wheat genotypic variability in grain yield and carbon isotope discrimination under Mediterranean conditions assessed by spectral reflectance

Gustavo A. Lobos¹, Iván Matus², Alejandra Rodríguez², Sebastián Romero-Bravo¹, José Luis Araus³ and Alejandro del Pozo^{1*}

¹Plant Breeding and Phenomic Center, Faculty of Agricultural Sciences, University of Talca, Talca, Chile, ²CRI-Quilamapu, Agricultural Research Institute, Chillán, Chile, ³Plant Physiology Department, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain. *Correspondence: adelpozo@utalca.cl

Abstract A collection of 368 advanced lines and cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) from Chile, Uruguay, and CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), with good agronomic characteristics were evaluated under the Mediterranean conditions of central Chile. Three different water regimes were assayed: severe water stress (SWS, rain fed), mild water stress (MWS; one irrigation around booting), and full irrigation (FI; four irrigations: at tillering, flag leaf appearance, heading, and middle grain filling). Traits evaluated were grain yield (GY), agronomical yield components, days from sowing to heading, carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in kernels, and canopy spectral reflectance. Correlation analyses were performed for 70 spectral reflectance indices (SRI) and the other traits evaluated in the three trials. GY and $\Delta^{13}\text{C}$ were the traits best correlated with SRI, particularly when these indices were measured during grain filling. However, only GY could be predicted using a single regression, with Normalized Difference Moisture Index

(NDMI2: $2 \times 200_{\lambda} / 100$) having the best fit to the data for the three trials. For $\Delta^{13}\text{C}$, only individual regressions could be forecast under FI (r^2 : 0.25–0.37) and MWS (r^2 : 0.45–0.59) but not under SWS (r^2 : 0.03–0.09). NIR-based SRI proved to be better predictors than those that combine visible and NIR wavelengths.

Keywords: Breeding; drought; dry matter index; normalized difference moisture index; vegetative index; water index.

Citation: Lobos GA, Matus I, Rodríguez A, Romero-Bravo S, Araus JL, del Pozo A (2013) Wheat genotypic variability in grain yield and carbon isotope discrimination under Mediterranean conditions assessed by spectral reflectance. *J Integr Plant Biol* XX(XX):XXX–XXX. doi: 10.1111/jipb.12114

Edited by: Martin A. J. Parry

Received Apr. 30, 2013; Accepted Sept. 23, 2013

Available online on Oct. 09, 2013 at www.wileyonlinelibrary.com/journal/jipb

© 2013 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences

INTRODUCTION

High-throughput phenotyping under field conditions is of paramount importance for QTL identification and genomic and conventional selection of plants with better adaptation to abiotic stresses. Drought is the main stress under a Mediterranean climate, with wheat being mainly cultivated under rain fed conditions. In that context, developing new cultivars with higher yield potential and drought resistance is of high importance to cope with the present constraints of Mediterranean environments (Montecinos and Aceituno 2003; Lionello et al. 2006), as well as the increased challenges caused by global (i.e., social and environmental) change (Lobell et al. 2008). In the Mediterranean climate region of Chile, precipitation has been decreasing over the last century (Minetti et al. 2003), probably as a consequence of the global climatic change. On this scenario, agronomists, breeders, and physiologists have aimed their efforts at developing drought-tolerant genotypes.

Wheat grain yields (GYs) have increased significantly since the 1960s in many regions of the world, including Chile (Calderini and Slafer 1998; Engler and del Pozo 2013), as a consequence of genetic improvement and better agronomic practices. Unfortunately, GY progress has been greater in temperate and humid environments (with high water availabil-

ity) than in Mediterranean environments under rain fed conditions (Araus et al. 2008). As a consequence, new approaches are needed to tackle the lower productivity under water-limited conditions (Fischer 2007).

According to Blum (2006) the superior performance of drought-adapted cereal cultivars can be grouped into four categories: (i) capturing more soil water; that is, plants with deeper root systems can extract more soil moisture under drought conditions; (ii) economizing water use, reducing water loss through leaf morphology (e.g., waxy leaves with lower stomatal conductance), and/or reducing soil evaporation using vigorous plants that rapidly cover the soil surface (Richards et al. 2002), or with plants having higher spike photosynthesis (which has higher water use efficiency than leaves; Tambussi et al. 2007); (iii) maintaining cell hydration through osmotic adjustment; and (iv) utilizing stem reserves for grain filling under stress. However, the evaluation of these drought-related traits is time consuming and is difficult to do when a large number of genotypes need to be evaluated across different environments.

A well-established phenotypic trait to select wheat genotypes better adapted to water stress is the use of carbon discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$). This trait is a proxy of water use efficiency, and has been used to select genotypes with a constitutively higher use efficiency that are better adapted to the

Mediterranean conditions of Australia (Condon et al. 2002; Rebetzke et al. 2002). However, $\Delta^{13}\text{C}$ can also provide an indirect determination of the effective water used by the crop (Araus et al. 2002; Blum 2009). In that sense, linear (positive or negative) relationships have been observed between kernel $\Delta^{13}\text{C}$ and GY under Mediterranean conditions (Condon et al. 1987; Acevedo et al. 1997; Araus et al. 2003, 2008; del Pozo et al. 2012). Unfortunately, the determination of $\Delta^{13}\text{C}$ needs an isotope ratio mass spectrometer that either requires support from a technical facility, or if outsourced, makes the analysis rather expensive and therefore unaffordable when a large number of genotypes under different environments have to be evaluated.

Indirect assessments of agronomic and physiological traits can be performed using spectral reflectance techniques (Araus et al. 2002; Babar et al. 2006b). These are based on the capacity of plants to absorb and reflect certain wavelengths of solar radiation according to the structural and physiological characteristics of the canopy. Spectral reflectance indices (SRI) seem to have a great potential for high-throughput phenotyping in wheat breeding programs (Araus et al. 2002) because they allow *a priori* assessment of yield and other relevant crop traits in a fast, albeit nondestructive, manner, and under real (i.e., field) conditions. To date the most widely used SRI are vegetation indices based on the differential reflectance of the canopy in the visible (400–700 nm) and near-infrared (700–1 100 nm) ranges of the spectrum due to the absorption of light by chlorophyll and associated pigments. Among the most common is the normalized difference vegetation index (NDVI) (Araus et al. 2001). However, there are other categories of indices (Araus et al. 2002) such as those informing on water status (Peñuelas et al. 1997) or on photosynthetic efficiency (Filella et al. 1996). Thus, using ground-based spectroradiometers and combining the reflectance at different wavelengths a large number of SRI have been developed to assess in small-grain cereals different crop traits such as plant density (Arnall et al. 2006), crop biomass (Aparicio et al. 2002), leaf area index (Aparicio et al. 2002), leaf chlorophyll (Babar et al. 2006b), stay-green syndrome (Lopes and Reynolds 2012), plant water status (Gutierrez et al. 2010a, b), grain yield (Aparicio et al. 2000; Prasad et al. 2007b; Gutierrez et al. 2010a,b), and protein (Apan et al. 2011^{Q1}). However, most of the above studies have been performed using a rather limited number of genotypes and only a few SRI have been tested. Moreover, while most of the available studies in this area have been performed using the information provided by the visible spectrum in addition to the near-infrared (700–1 100 nm) region reflected by the canopy, the availability of affordable field-portable spectroradiometers reaching wavelengths up to 2 500 nm expands the capacity to phenotype wheat that is better adapted to Mediterranean conditions. Indeed, water, for example, absorbs several wavelength regions in the range between 1 100 and 2 500 nm.

The objective of this study is to test the comparative performance of a large set of SRI to assess genotypic differences in grain yield and components of agronomic yield, as well as $\Delta^{13}\text{C}$. For this a field-portable full-range (λ 350–2 500 nm) UV/Vis/NIR spectroradiometer was used. Measurements were performed in a large set of wheat genotypes (368 elite genotypes from INIA-Chile, INIA-Uruguay, and CIMMYT) growing under a wide range of water regimes (severe and mild water stress and full irrigation) in a Mediterranean environment (central Chile).

RESULTS

Genotypic variability

The average GY of 368 genotypes was 1.7, 4.8, and 8.1 Mg under severe water stress (SWS), mild water stress (MWS), and full irrigation (FI), respectively, with large genotypic variability for the three trials (Figure 1A). Plant height decreased with water stress, from 98.6 at FI to 58.3 cm under SWS (Figure 1B). The $\Delta^{13}\text{C}$ in kernels increased from 14.2‰ (range 11.9–16.3) under SWS to 18.3‰ (range 15.6–20.0) under FI (Figure 1C). The GY components of spike per m², kernels per spike (KPS) and thousand kernel weight (TKW) also increased with water supply and the ranges of genotypic variability were large for the three trials (Figure 1D–F).

Relationships between SRI and traits

Correlation analysis between traits and the 70 SRI taken at heading and the middle grain filling stage showed that Pearson correlation coefficients of >0.65 or <-0.65 were only obtained for GY and $\Delta^{13}\text{C}$ in kernels (Tables S1, S2), whereas lower coefficients were found for KPS and TKW. In general, higher coefficients were observed when SRI were calculated from measurements taken at the middle grain filling stage compared with those conducted at heading (Tables S1, S2); thus the coefficients of the correlations of SRI with GY increased by 76% and 71% under MWS and FI, respectively, whereas correlations of SRI with $\Delta^{13}\text{C}$ increased by 89% and 90%.

At the middle grain filling, the relationship between days from sowing to heading (DH) and NDVI (830; 660) had a weak correlation ($r \approx 0.46$), whereas with water SRI the r values were even lower (≈ 0.32 ; Table S2). Pearson correlations between DH and GY or $\Delta^{13}\text{C}$ were in general not significant, except for GY in MWS and $\Delta^{13}\text{C}$ in FI where these relationships were weak (data not shown). Furthermore, when DH was included in the stepwise regression analysis its specific weight (coefficient) was low (0.04–0.08; Tables S3, S4).

For the different traits and trials, SRI (water- and vegetation-SRI) selected according to their high correlation coefficient ($r > 0.65$ or <-0.65) as an average for the three trials (Table S2) were compared to the NDVI (830; 660) as control using regression analysis (Figure 2). Under SWS, the shortwave infrared water index (SWWI) and two normalized difference moisture indices (NDMI) correlated better than NDVI with GY (r^2 increased $\approx 41\%$). Under MWS most of the water SRI exhibited higher ($\approx 10\%$) determination coefficients with GY than the NDVI. In the case of FI the increment in r^2 of the regressions was higher ($\approx 43\%$) (Figure 2A). Compared with NDVI, the water SRI exhibited a better fit (r^2 increased at SWS ≈ 46 , MWS ≈ 12 , and FI $\approx 32\%$) with $\Delta^{13}\text{C}$ (Figure 2C). For plant height the determination coefficients were lower ($r^2 < 0.30$) than for GY, but the three groups of SRI performed better than the NDVI for the three trials (Figure 2B). Regarding the number of spikes per m², the best SRI presented similar fits as the NDVI ($r^2 \approx 0.4$) under SWS, whereas under MWS and FI all the SRI (including NDVI) had a low r^2 (≈ 0.13) (Figure 2D). Coefficients of determination were low for KPS and TKW (Figure 2E, F).

The relationships between selected SRI (those with $r > 0.77$) and the GY and $\Delta^{13}\text{C}$ traits for the three trials are shown in Figures 3 and 4. According to their r^2 values, SRI fitted better with GY than $\Delta^{13}\text{C}$ in all of the trials, and the best indices were NDMI2, NWI3, and SWWI followed by NDVI (Table 1).

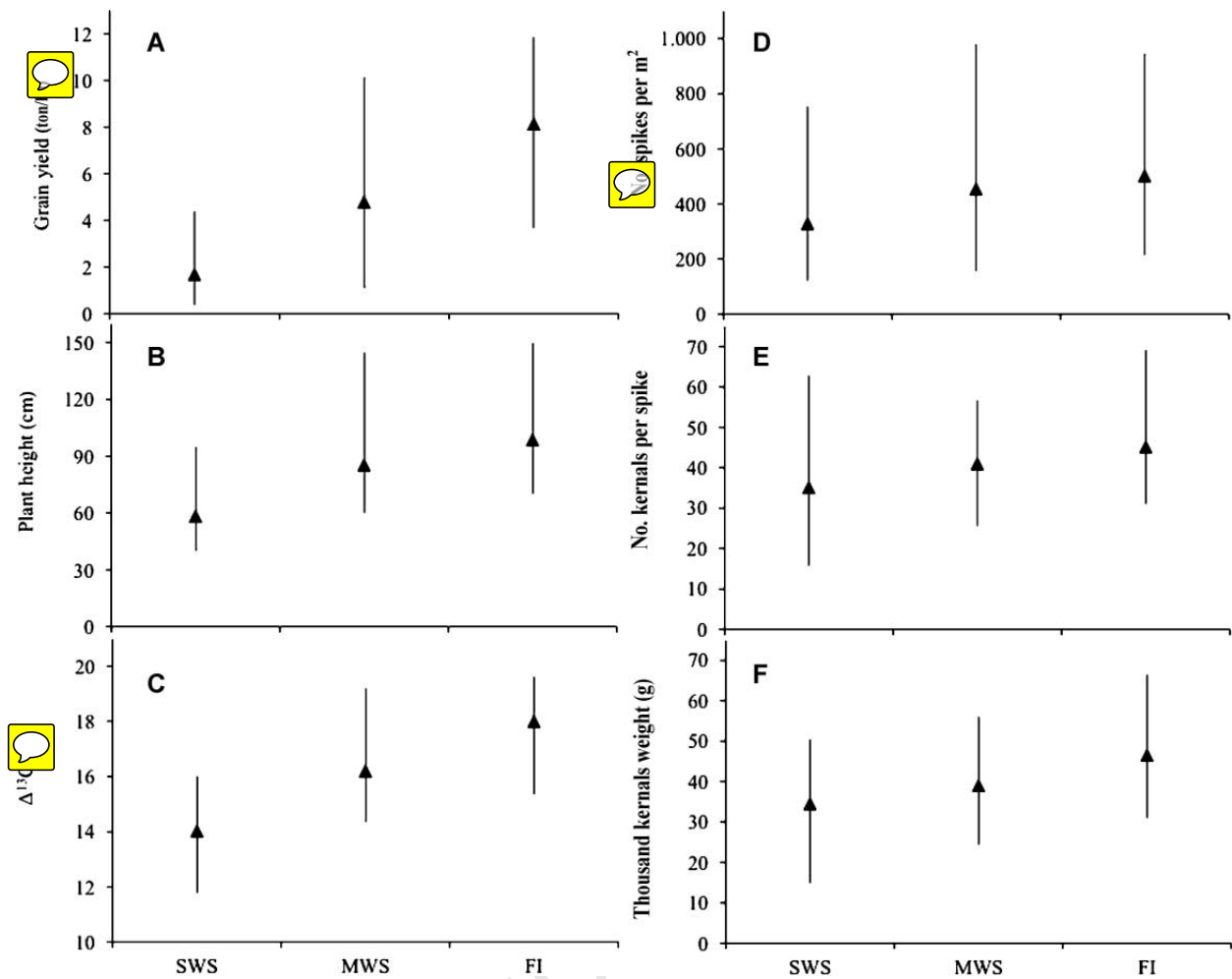


Figure 1. Mean and range (minimum–maximum) values for grain yield (A), plant height (B), carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}C$) in kernels (C), number of spikes per m² (D), number of kernels per spike per m² (E), and thousand kernel weight (F), for 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS) at Cauquenes, and mild water stress (MWS) and full irrigation (FI) at Santa Rosa

Coefficients of determination for $\Delta^{13}C$ depended on the trial: between 0.25–0.37 under FI, 0.45–0.59 under MWS, and 0.03–0.09 under SWS (Table 1). Some of the SRI had positive and linear relationships (e.g., NDVI), and others had negative linear or curvilinear relationships (NDMI2, NWI3, and SWWI) with the traits. The relationships of the SRI with the different traits fitted differently at SWS (Cauquenes) than at the other two trials at Santa Rosa (MWS and FI), and this was more evident for $\Delta^{13}C$ than for GY (Figure 4). In the case of GY, a single regression equation either with NDVI or NDMI2 (lower data dispersion between SWS and MWS) can be used for the three trials (Table 1, and Figures S1, S2). For $\Delta^{13}C$ none of the SRI fitted the data into a single equation (Table 1).

DISCUSSION

In line with previous studies, genotypic variability was shown for the SRI assayed (Aparicio et al. 2000; Babar et al. 2006a,b). However, in our study a very large set of genotypes and SRI

were assayed. Grain yield, followed by kernel $\Delta^{13}C$ were the traits best correlated with SRI, whereas the correlations with yield components were far weaker. Comparable results, even if with a far smaller set of genotypes, have been reported previously in wheat (Aparicio et al. 2004). Moreover, the majority (74%) of the SRI increased the GY prediction if measured during the middle grain filling period compared with heading, which highlights the importance of when this technique is used for breeding programs. In fact, the traits evaluated (GY and $\Delta^{13}C$) are determined during grain filling, the time when the measured SRI performed the best. Moreover this agrees with the peculiarities of the Mediterranean climate, which is characterized by increasing drought at the end of the crop cycle. Furthermore, as shown by the stepwise regression analysis, the better performance of SRI measured late in the crop cycle was not really influenced by differences in phenology across the set of genotypes (Bort et al. 2005).

Because most of the studies consider a limited number of genotypes or a few SRI (Babar et al. 2006a,c; Prasad et al. 2007b; Gutierrez et al. 2010a,b), it is difficult to compare the current work with previous reports. For example, Babar

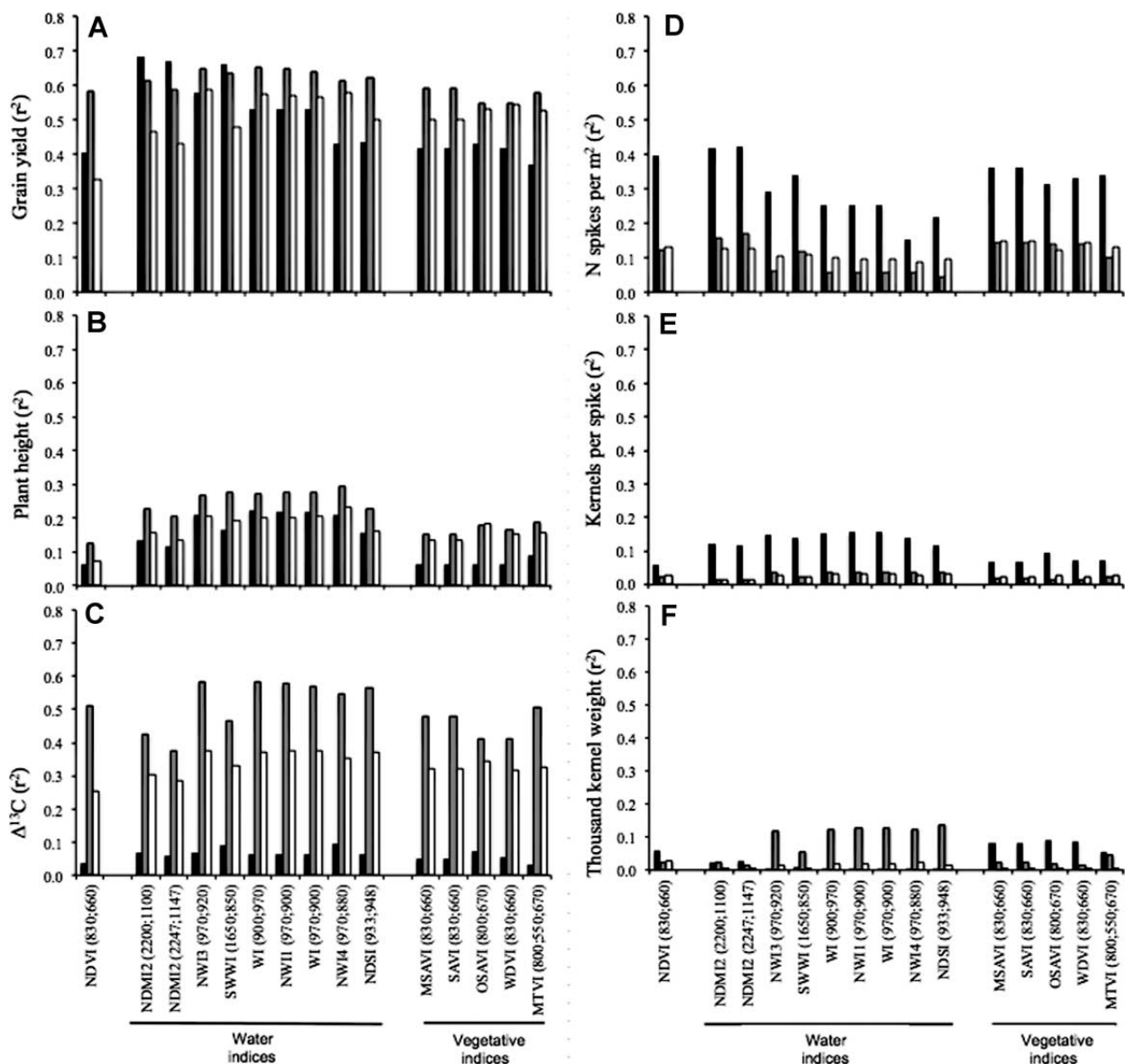


Figure 2. Determination coefficients (r^2) for the relationships between several spectral reflectance indices with grain yield (A), plant height (B), carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in kernels, number of spikes per m^2 (D), number of kernels per spike (E), and thousand kernel weight (F) for the set of 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS; black bars), mild water stress (MWS; grey bars) and full irrigation (FI; white bars)

Measurements were conducted at middle grain filling. Two different categories of spectral indices were assayed: water and vegetation indices. In addition, the vegetation index NDVI (normalized difference moisture index) (830; 660) was also included for comparison.

et al. (2006a), working with 76 genotypes and seven SRI under irrigated conditions, proved that the effect of growth stage on SRI was dependent on the type of SRI (water- vs. vegetation-SRI).

When individual regressions of SRI with GY or $\Delta^{13}\text{C}$ were compared for each trial it was possible to establish that in general NDMI2, NWI3, and SWWI indices performed better than NDVI, the most commonly used SRI. Days from sowing to heading correlated weakly with yield components and $\Delta^{13}\text{C}$ in kernels (Tables S1, S2), indicating that differences in phenology have a low impact on these traits. Indeed, DH explained a far

lower range of genotypic variability in GY and $\Delta^{13}\text{C}$ than the SRI (Tables S3, S4).

For each category of spectral indices, normalized difference formulations generally performed better than the conventional ones by capturing genotypic variability in GY and $\Delta^{13}\text{C}$. This agrees with previous studies (Inoue et al. 2008). In our study, the genotypic variability in GY was better explained by SRI belonging to either the categories of normalized water (e.g., NWI3: 970; 920) or normalized difference moisture (e.g., NDMI2: 2 200; 1 100) indices clearly performed better than vegetation indices such as NDVI or

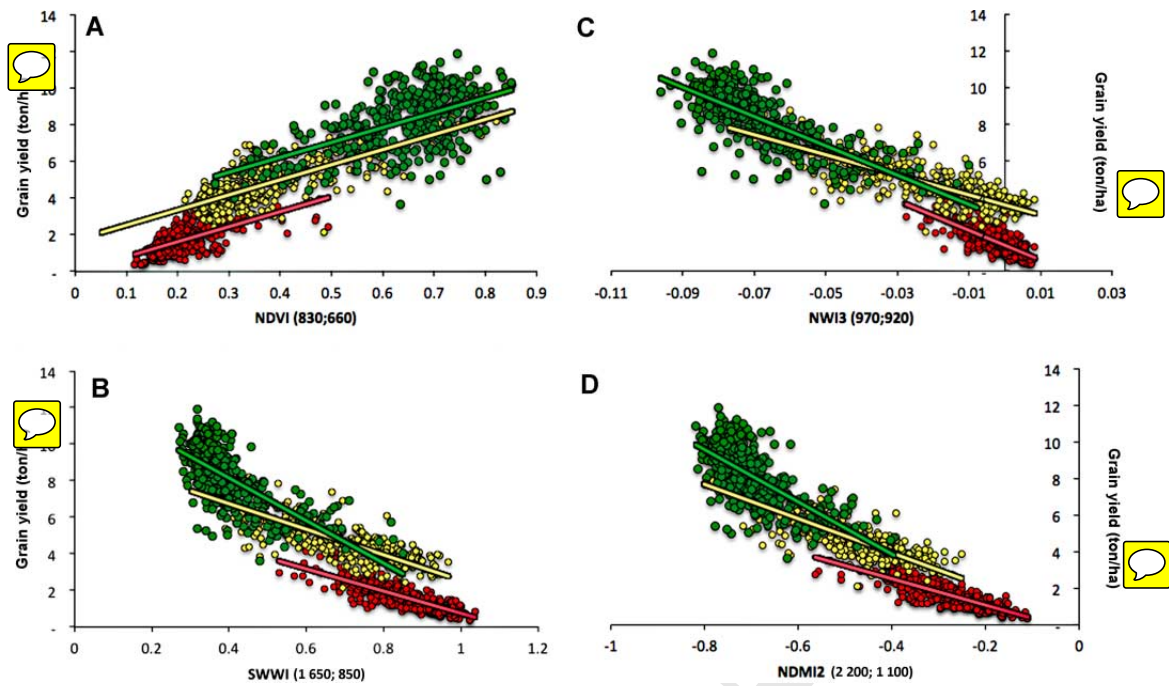


Figure 3. Relationships between grain yield and the spectral reflectance indices normalized difference moisture index (NDVI) (830; 660) (A), SWWI (1,650; 850) (B), NWI₃ (970; 920) (C), and NDMI₂ (2,200; 1,100) (D) across the set of 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS; red) at Cauquenes, and mild water stress (MWS; yellow) and full irrigation (FI; green) at Santa Rosa. Crops were measured at middle grain filling. Colored lines are linear regression for each trial (for regression and coefficients of determination refer to Table 1).

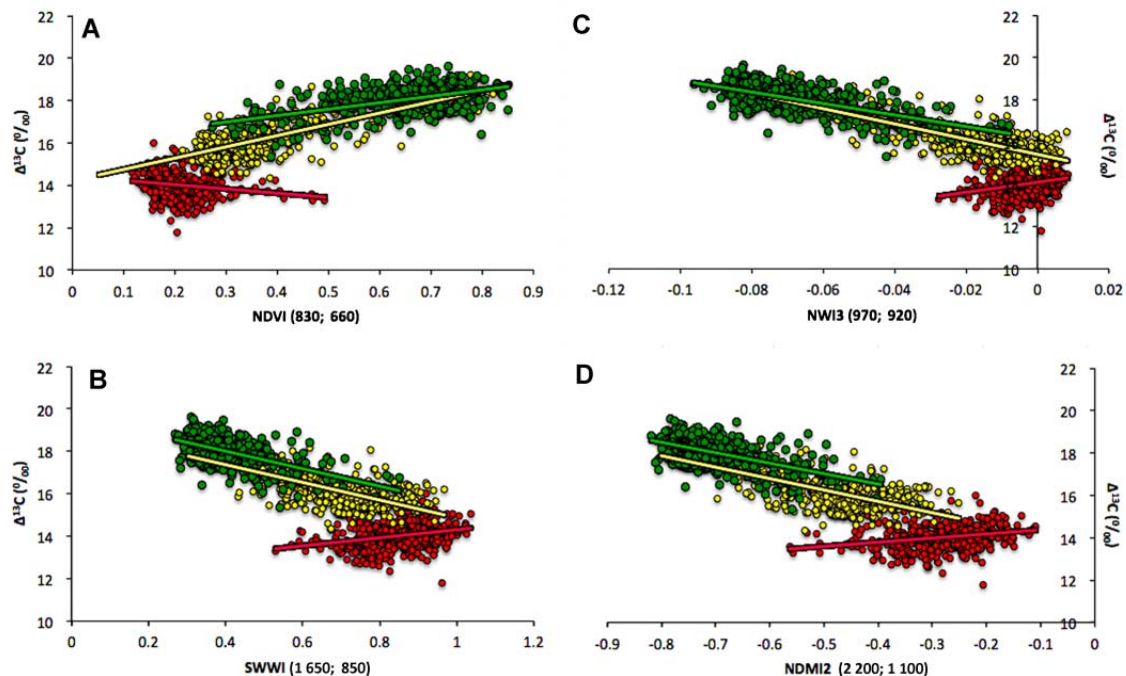


Figure 4. Relationships between $\Delta^{13}\text{C}$ in kernels and the spectral reflectance indices normalized difference moisture index (NDVI) (830; 660) (A), SWWI (1,650; 850) (B), NWI₃ (970; 920) (C), and NDMI₂ (2,200; 1,100) (D) across the set of 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS; red) at Cauquenes, and mild water stress (MWS; yellow) and full irrigation (FI; green) at Santa Rosa. Crops were measured at middle grain filling. Colored lines are linear regression for each trial (for regression and coefficients of determination refer to Table 1)

Table 1. Equations, coefficients of determination and residual standard error (RSE) of the relationships across the 368 genotypes between different spectral reflectance indices (SRI) measured at middle grain filling and either grain yield (GY) or $\Delta^{13}\text{C}$

Index	Trial	Grain yield Equation	r^2	RSE	$\Delta^{13}\text{C}$ Equation	r^2	RSE
NDVI (830; 660)	FI	$y = 8.136x + 2.961$	0.33	1.356	$y = 3.047x + 16.068$	0.25	0.609
	MWS	$y = 8.225x + 1.706$	0.62	0.833	$y = 5.322x + 14.215$	0.53	0.631
	SWS	$y = 8.183x - 0.012$	0.40	0.531	$y = -2.029x + 14.437$	0.03	0.577
	All^a	$y = 13.186x - 0.4765$	0.84	1.174	$y = 7.743x + 12.94$	0.77	0.859
NDMI2 (2 200; 1 100)	FI	$y = -14.267x - 1.843$	0.47	1.207	$y = -4.928x + 14.558$	0.30	0.586
	MWS	$y = -9.358x + 0.188$	0.66	0.799	$y = -5.377x + 13.562$	0.45	0.681
	SWS	$y = -7.199x - 0.360$	0.68	0.386	$y = 1.957x + 14.572$	0.07	0.566
	All	$y = 0.653 \exp(-3.613x)$	0.86	1.010	$y = -8.220x + 12.04$	0.78	0.776
NWI3 (970; 920)	FI	$y = -79.788x + 2.822$	0.58	1.063	$y = -27.22x + 16.192$	0.37	0.557
	MWS	$y = -54.6x + 3.595$	0.66	0.765	$y = -36.083x + 15.418$	0.59	0.577
	SWS	$y = -80.998x + 1.399$	0.58	0.448	$y = 23.877x + 14.1$	0.07	0.566
	All	$y = -89.673x + 2.1232$	0.87	1.079	$y = -51.815x + 14.491$	0.77	0.768
SWWI (1 650; 850)	FI	$y = -11.118x + 12.535$	0.42	1.193	$y = -4.134x + 19.662$	0.33	0.575
	MWS	$y = -6.868x + 9.452$	0.63	0.775	$y = -4.164x + 19.034$	0.47	0.656
	SWS	$y = -6.066x + 6.813$	0.66	0.401	$y = 1.902x + 12.407$	0.09	0.560
	All	$y = 27.26 \exp(-3.047x)$	0.78	1.135	$y = -7.055x + 20.61$	0.73	0.727

Relationships were studied for each of the three growing conditions assayed: Cauquenes under severe water stress (SWS) and Santa Rosa under mild water stress (MWS) and full irrigation (FI).

^aEquation, coefficient of determination and residual standard error considering the data of the three water regimes (trial) combined.

indices related to photosynthetic efficiency like PRI (Tables S3, S4) (Table 1). In fact, both categories of indices (NWI and NDMI) share in common the assessment of differences in water status. The same may be said for the SWWI (1 650, 850), which in spite of not being a normalized index performs better than NDVI or PRI in capturing differences in GY within each environment because it is a water index (Inoue et al. 2008) (Tables S1, S2).

The NWI does not measure water content directly but does apparently detect changes in leaf anatomy and cell structure that are caused by the state of hydration in the plant. It is based on the hypothesis that the near-infrared radiation (NIR) wavelength at 970 nm penetrates deeper into the canopy and therefore may estimate water content more accurately than other kinds of indices (Babar et al. 2006a; Prasad et al. 2007a; Gutierrez et al. 2010a). In fact, most of the reports, even with a far shorter number of genotypes tested than in our study, conclude that among the indices placed in the visible and NIR range of the spectrum (approximately 350–1 200 nm), water indices formulated using NIR wavelengths are the best at identifying genotypic differences in water status (Gutiérrez et al., 2010a,b). NWI3, the best of the NWIs in our study, as well as in previous reports on wheat (Babar et al. 2006a), uses a reference wavelength of 880 nm whose energy is not absorbed by water. In agreement with previous studies, this gave slightly better results than the other NWIs, which use reference wavelengths of 850, 900, and 920 nm (Peñuelas et al. 1997; Prasad et al. 2007a; Gutierrez et al. 2010b).

The NDMI is similarly calculated as the NWI, but uses shortwave-infrared radiation (SWIR, approximately 1 300–2 500 nm) together with one NIR wavelength as a reference instead of just two NIR wavelengths. The reduction in reflectance of the SWIR as compared to the NIR is due to the absorption of water in tissues, so this index value can be used as an estimation of water content in the vegetation (Jin and Sader 2005; Lozano et al. 2007). This index is also related to

vegetation structure and cover, as well as to emissivity and energy balance (McDonald et al. 1998). NDMI2 has been used in previous studies covering a miscellaneous range of plants, from cereals (Inoue et al. 2008) to trees (Lozano et al. 2007). In the case of the SWWI, and similar to NDMI, water content in tissues is also assessed through the reduction in reflectance of the SWIR (in this case 1 650 nm compared to the 2 200 nm of NDMI2) as compared to the NIR, which serves as a reference wavelength (Inoue et al. 2008). Our study is novel in the sense that it shows how an index like NDMI or even the SWWI, both formulated using SWIR, perform comparably to NWI in assessing genotyping differences in GY within each of the growing conditions (trials).

In summary, whereas SWWI and NDMI2 are NIR-based SRI that use water-absorbing wavelengths, NWI3 is an NIR-based SRI that has weak water-absorbing bands (Peñuelas et al. 1993), but probably records morphological changes in internal anatomy related to turgidity. The fact that at SWS the slope of correlation between SRI and $\Delta^{13}\text{C}$ were opposite to those at MWS and FI suggests that the information incorporated into these SRI is different for the two categories of environments. However, correlations of these SRI with GY always had the same sign (either positive or negative) for the three trials, which suggests that the portion of genotypic variability in $\Delta^{13}\text{C}$ included in these SRI at SWS would not be associated with differences in biomass.

In the case of $\Delta^{13}\text{C}$, NWI3 was the best of the SRI even when in general all the spectral indices captured a lower portion of genotypic variability than for GY. Moreover, all of the SRI only assessed genotypic variability in $\Delta^{13}\text{C}$ under FI and MWS. In the same way, genotypic correlation of $\Delta^{13}\text{C}$ with GY was only significant (and positive) for FI and MWS while under SWS the correlation was very weak. The commonalities of $\Delta^{13}\text{C}$ and the spectral indices catching genotypic differences in GY only at the two least stressed growing conditions indicate that these SRI capture the genotypic variability in $\Delta^{13}\text{C}$ just through

the same physiological principles as they do capturing in GY. In fact, when pooling data from different trials, NWI₃ assessed a similarly large proportion of green biomass (around 80%) as vegetation indices like NDVI (Royo and Villegas 2011). In the same sense, when GY data from the three growing environments were combined in this study, the strength of the determination coefficients of the relationships of NWI₃, NDMI₂, and SWWI were very high and comparable to that of NDVI. However, whereas these three categories of water indices (NWI, SWWI, and NDMI) had comparable performances that were better than the NDVI in predicting GY within each growing condition, in the case of $\Delta^{13}\text{C}$ the NWI (and specifically NWI₃) performed better than NDMI₂, SWWI, and vegetation indices such as NDVI. In a previous study Gutierrez et al. (2010b) concluded that among all water spectral indices formulated using wavelengths in the range of the visible (400–700 nm) and near-infrared (700–1 300 nm), NWI₃ showed the most consistent associations with water-relation parameters such as leaf and soil water potentials and canopy temperature. NWI₃ was sufficiently sensitive to detect genotypic differences in water status at the canopy and soil levels indicating its potential application in precision phenotyping. Our study expands the comparison by including a very large set of genotypes together with indices formulated using wavelengths in the range of the SWIR and concludes once more that NWI₃ is the most promising index assessing genotypic differences in water status (in this case measured through a time-integrative trait like $\Delta^{13}\text{C}$ in dry matter) (Condon et al. 2004). In fact the performance of the vegetation index, NDVI, was comparable to NDMI₂ or SWWI in assessing $\Delta^{13}\text{C}$. Moreover, the association between the different categories of water indices and $\Delta^{13}\text{C}$ at FI and MWS indicates that canopy water content plays a role in determining genotypic $\Delta^{13}\text{C}$ at moderate–low stress conditions. Our results contrast with previous studies in very different plant species (trees) where MDWI, an index that incorporates the maximum and minimum reflectance at the SWIR wavelengths between 1 500 and 1 750 nm, performed better at detecting plant water status compared to indices that use near-infrared wavelengths such as the different water indices (Eitel et al. 2006). Such results suggest there is still room for testing more water indices using SWIR wavelengths.

The fact that at SWS the slopes of correlation between SRI and $\Delta^{13}\text{C}$ were opposite to those at MWS and FI suggest that the information these SRI have incorporated is different for the two categories of environments. However, correlations of these SRI with GY always had the same sign (either positive or negative) for the three trials, which suggests that the portion of genotypic variability in $\Delta^{13}\text{C}$ included in these SRI at SWS is not associated with differences in biomass. These results support the concept that genotypic variability in $\Delta^{13}\text{C}$ can be assessed indirectly, but only under moderate stress or well-watered conditions. $\Delta^{13}\text{C}$ is a useful trait for selecting genotypes under water stress conditions; however, its determination is expensive when large amounts of analysis are needed (Condon et al., 2002, 2004). These results provide a new tool to incorporate $\Delta^{13}\text{C}$ in wheat breeding programs focused on drought tolerance.

In conclusion, NIR and SWIR-based water indices proved to be better predictors of GY than vegetation indices that combine visible and NIR wavelengths, such as vegetation indices like NDVI. Our data indicate that genotypic variability in GY can be predicted using a single regression, with NDMI₂

having the best fit for the three environments. There has been no previous information for predicting $\Delta^{13}\text{C}$ using SRI, but its investigation in the current study allows inclusion of this trait in breeding programs for selecting drought-tolerant genotypes. However, the SRI performed comparatively less well at predicting $\Delta^{13}\text{C}$ than GY, and only for conditions of moderate or no water stress, with NIR-based water indices performing better than the other SRI. Even for conditions of moderate or no water stress, different SRI showed a reasonable correlation with $\Delta^{13}\text{C}$.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

A collection of 368 advanced lines and cultivars of spring bread wheat from INIA-Chile, INIA-Uruguay, and CIMMYT, with good agronomic characteristics and disease tolerance were evaluated in two Mediterranean environments, Cauquenes (35°58'S, 72°17'W; 177 m.a.s.l.) in rain fed or severe water stress (SWS) and Santa Rosa (36°32'S, 71°55'W; 217 m.a.s.l.) under two levels of water supply: mild water stress (MWS) and full irrigation (FI), in 2011. At Cauquenes, the average-annual daily mean, minimum and maximum temperatures are 14.7, 4.7 (July), and 27°C (January) respectively, while the average annual precipitation is 695 mm, with a 6-month (November to April) dry season (del Pozo and del Canto 1999). At Santa Rosa, the average-annual daily mean, minimum and maximum temperatures are 13.0, 3.0 (July), and 28.6°C (January), respectively, while the average annual precipitation is 1 100 mm (del Pozo and del Canto 1999). Temperature and rainfall of the growing season are detailed in Table 2.

Plots were of five 2 m-long rows, 0.2 m apart and the sowing rate was 20 g/m². Sowing dates were 31 August and 7 September at Santa Rosa and Cauquenes, respectively. The experimental design for each trial was an alpha-lattice with a single replicate. Plots were fertilized with 260 kg of ammonium phosphate (46% P₂O₅ and 18% N), 90 kg/ha of potassium chloride (60% K₂O), 200 kg/ha of sul-po-mag (22% K₂O, 18% MgO and 22% S), 10 kg/ha of boronatrocalcita (11% B), and 3 kg/ha of zinc sulfate (35% Zn). Fertilizers were incorporated with a cultivator before sowing. During tillering an extra 153 kg/ha of N was applied. Weeds were controlled with the application of flufenacet + flurtamone + diflufenican (96 g a.i.) as pre-emergence and a further application of MCPA (525 g a.i.) + metsulfuron-metil (5 g a.i.) as post-emergent. Furrow irrigation was used at Santa Rosa; one irrigation at tillering (Z21) for the MWS trial and four irrigations for the fully irrigated trial, at tillering (Z21), flag leaf emergence (Z37), heading (Z50), and grain filling (Z70), of approximately 50 mm each.

Evaluations

Traits evaluated on each trial were: (i) GY by harvesting 2 m²; (ii) plant height at maturity; (iii) days from sowing to heading, through periodic (twice a week) observations; (iv) number of spikes per m² determined in 1 m row; (v) number of kernels per spike (KPS) and thousand kernel weight (TKW) in 25 spikes taken at random from each plot; and (vi) carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in mature kernels.

For $\Delta^{13}\text{C}$, kernels were finely ground in a mill and sent to the Laboratory of Applied Physical Chemistry at Ghent University

Table 2. Monthly maximum, minimum and mean temperature and monthly rainfall at the two experimental sites in central Chile in 2011–2012

Cauquenes		May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	Jan
Temp (°C)	Max	17.7	13.9	13.3	14.6	19.5	21.9	25.6	30.8	30.0
	Min	3.8	3.4	0.6	3.4	3.4	3.6	8.9	10.7	11.8
	Mean	10.8	8.7	6.9	9.0	11.5	12.8	17.2	20.8	20.9
Rainfall (mm)		22.6	40.2	111.9	114.0	28.5	5.0	11.2	0.0	5.4
Santa Rosa ^a		May	Jun	Jul	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec	Jan
Temp (°C)	Max	14.9	12.8	10.4	10.9	17.7	20.2	23.8	29.0	28.8
	Min	3.0	2.4	1.1	4.5	2.9	3.7	6.9	9.5	10.2
	Mean	8.9	7.6	5.7	7.7	10.3	11.9	15.3	19.3	19.5
Rainfall (mm)		43.8	213.7	120.5	52.1	91.0	17.3	24.0	0.0	3.1

^aMild water stress (MWS) and full irrigation (FI) trials were furrow irrigated with 50 mm at flag leaf emergence (19 October 2011). Three additional irrigations (of 50 mm each) were applied to the fully irrigated trial on 7, 22 November and 9 December 2011.

(Belgium) to analyze the carbon isotope composition ($\Delta^{13}\text{C}$). The $\Delta^{13}\text{C}$ was determined in an elemental analyzer (ANCA-SL, PDZ Europa, Northwich, UK) interfaced to a Sercon 20-20 IRMS with SysCon electronics (Sercon, Crewe, UK) and was expressed as parts per mille (‰). The samples were measured relative to laboratory standards, which are similar to the sample and have been calibrated against international standards by Iso-Analytical (Crewe). The precision of $\delta^{13}\text{C}$ analyses was 0.3‰ (SD, $n = 10$). The $\Delta^{13}\text{C}$ of kernels was calculated as: $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) = $(\Delta^{13}\text{C}_a - \Delta^{13}\text{C}_p) / [1 + (\Delta^{13}\text{C}_p / 1,000)]$, where a and p refer to air and the plant, respectively (Farquhar et al. 1989). $\Delta^{13}\text{C}_a$ was taken as -8.0 ‰.

Absolute reflectance (350–2 500 nm) of the canopy was taken using a portable spectroradiometer (FieldSpec 3 JR, ASD, Boulder, CO, USA), with a 2.3 mm diameter and 25° full conical angle optical fiber. Measurements were made from 11.00 to 17.00 hours, on clear days (radiation higher than 800 W/m²) and at two phenological stages: (i) heading in Santa Rosa (22 November 2011) and (ii) middle late grain filling in Cauquenes (13 December 2011) and Santa Rosa (21 December 2011). Three shots per plot were taken on each measurement with the bean of the optical fiber placed at 45° and 80 cm over the top of the canopy. To avoid problems originating from sun position during the day, radiometric calibration was performed against a field reference panel (Spectralon, ASD) every 15 min approximately. A total of 2 150 wavelength-bands were taken per measurement and used to calculate a total of 70 SRI (Table S1) previously published for small-grain cereals (Babar et al. 2006b; Inoue et al. 2008; Royo and Villegas 2011). These indices belong to two different categories: vegetation and water indices.

Statistical calculations and analysis

Data calculation consisted of the following steps: (i) correlation across genotypes of the 70 SRI with GY, the agronomical yield components and $\Delta^{13}\text{C}$ at each of the growing conditions (trials) and the two phenological stages assayed. In addition, for the measurements taken during middle grain filling the NDVI (830; 660) was compared against the SRI with a high coefficient of correlation (r) (at least two trials with $r > 0.65$ or < -0.65 , and an average r for the three trials also beyond 0.65 or lower than -0.65); from that group of SRI, the three with the highest r (> 0.77 or < -0.77) but derived from different wavelength

ranges (NDM2 (2 200; 1 100); NWI3 (970; 920); and SWWI (1 650; 850)) (Table S1) were plotted and compared with NDVI (830; 660) for each trial and also fitted to a unique regression with all data. To evaluate the relative contribution of phenology (days from planting to heading, DH) on GY or $\Delta^{13}\text{C}$, stepwise regression analyses were performed for the spectroradiometrical indices NDMI2 (2 200; 1 100) and NDVI (830; 660), and phenology (Table S3 and 4). Also, Pearson's correlation coefficients were calculated on each trial between GY or $\Delta^{13}\text{C}$ and DH (data not shown). Statistical analysis was performed using R 3.0.0 (R Development Core Team 2008) and Sigma Plot (version 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the research grant FONDECYT No. 1110732, and PIEI, University of Talca (“Programa de Investigación sobre Adaptación de la Agricultura al Cambio Climático”). Participation of José Luis Araus was supported by the program “Atracción de Capital Humano Avanzado del Extranjero, Modalidad Estadías Cortas de Conicyt No. 80110025” and the Spanish project AGL2010-20180 (subprogram AGR). We thank Martín Quincke from INIA-La Estanzuela, Uruguay, CIMMYT for providing wheat germplasm and Alejandro Castro, Felix Estrada and Alejandro Escobar for technical assistance in field experiments.

REFERENCES


- Acevedo E, Bagínsky C, Solar B, Ceccarelli S (1997) Discriminación isotópica de ^{13}C y su relación con el rendimiento y la eficiencia de transpiración de genotipos locales y mejorados de cebada bajo diferentes condiciones hídricas. *Inv Agríc* (Chile) 17: 41–54
- Apan A, Kelly R, Phinn S, Strong W, Lester D, Butler D, Robson A (2006) Predicting grain protein content in wheat using hyperspectral sensing of in-season crop canopies and partial least squares regression^{Q2}. *Int J Geoinformat* 2: 93–108
- Aparicio N, Villegas D, Casadesús J, Araus JL, Royo C (2000) Spectral vegetation indices as nondestructive tools for determining durum wheat yield. *Agron J* 92: 83–91


- Aparicio N, Villegas D, Araus JL, Casadesús J, Royo C (2002) Relationship between growth traits and spectral reflectance indices in durum wheat. **Crop Sci** 42: 1547–1555
- Aparicio N, Villegas D, Royo C, Casadesús J, Araus JL (2004) Effect of sensor view angle on the assessment of agronomic traits by spectral reflectance measurements in durum wheat under contrasting Mediterranean conditions. **Int J Remote Sens** 25: 1131–1152
- Araus JL, Casadesús J, Bort J (2001) Recent tools for the screening of physiological traits determining yield. In: Reynolds M. P. (Ed) *Application of Physiology in Wheat Breeding*, CIMMYT, Mexico, DF, pp. 59–77
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds M, Royo C (2002) Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? **Ann Bot** 89: 925–940
- Araus JL, Villegas D, Aparicio N, del Moral LFG, El Hani S, Rharrabti Y, Ferrio JP, Royo C (2003) Environmental factors determining carbon isotope discrimination and yield in durum wheat under Mediterranean conditions. **Crop Sci** 43: 170–180
- Araus JL, Slafer GA, Royo C, Serret MD (2008) Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. **Crit Rev Plant Sci** 27: 377–412
- Arnall DB, Raun WR, Solie JB, Stone ML, Johnson GV, Girma K, Freeman KW, Teal RK, Martin KL (2006) Relationship between coefficient of variation measured by spectral reflectance and plant density at early growth stages in winter wheat. **J Plant Nutr** 29: 1983–1997
- Babar MA, Reynolds MP, van Ginkel M, Klatt AR, Raun WR, Stone ML (2006a) Spectral reflectance indices as a potential indirect selection criteria for wheat yield under irrigation. **Crop Sci** 46: 578–588
- Babar MA, Reynolds MP, van Ginkel M, Klatt AR, Raun WR, Stone ML (2006b) Spectral reflectance to estimate genetic variation for in-season biomass, leaf chlorophyll, and canopy temperature in wheat. **Crop Sci** 46: 1046–1057
- Babar MA, van Ginkel M, Klatt A, Prasad B, Reynolds MP (2006c) The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. **Euphytica** 150: 155–172
- Blum A (2006) Drought adaptation in cereal crops: A prologue. In: Ribaut J. M. (Ed) *Drought Adaptation in Cereals*, The Harworth Press, Inc., New York, pp. 3–15
- Blum A (2009) Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field Crops Res** 112: 119–123
- Bort J, Casadesús J, Nachitt M, Araus JL (2005) Factors affecting the grain yield predicting attributes of spectral reflectance indices in durum wheat: Growing conditions, genotype variability and date of measurement. **Int J Remote Sens** 26: 233–235
- Calderini DF, Slafer GA (1998) Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th Century. **Field Crops Res** 57: 335–347
- Condon AG, Richards RA, Farquhar GD (1987) Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat. **Crop Sci** 27: 996–1001
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD (2002) Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. **Crop Sci** 42: 122–131
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD (2004) Breeding for high water-use efficiency. **J Exp Bot** 55: 2447–2460
- del Pozo A, del Canto P (1999) Zonas agroclimáticas y sistemas productivos de la VII y VII región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones Quilamapu. Serie Quilamapu No. 113
- del Pozo A, Castillo D, Inostroza L, Matus I, Méndez AM, Morcuende R (2012) Improving drought tolerance of barley using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. **Ann Appl Biol** 160: 157–167
- Eitel JUH, Gessler PE, Smith AMS, Robberecht R (2006) Suitability of existing and novel spectral indices to remotely detect water stress in *Populus* spp. **Forest Ecol Manag** 229: 170–182
- Engler A, del Pozo A (2013) Assessing long- and short-term trends in cereal yields: The case of Chile between 1929 and 2009. **Cien Inv Agr** 40: 55–67
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. **Ann Rev Plant Physiol Mol Biol** 40: 503–537
- Filella I, Amaro T, Araus JL, Peñuelas J (1996) Relationship between photosynthetic radiation-use efficiency of barley canopies and the photochemical reflectance index. **Physiol Plant** 96: 211–216
- Fischer RA (2007) Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. **J Agr Sci** 145: 99–113
- Gutierrez M, Reynolds MP, Raun WR, Stone ML, Klatt AR (2010a) Spectral water indices for assessing yield in elite bread wheat genotypes under well-irrigated, water-stressed, and high-temperature conditions. **Crop Sci** 50: 197–214
- Gutierrez M, Reynolds MP, Klatt AR (2010b) Association of water spectral indices with plant and soil water relations in contrasting wheat genotypes. **J Exp Bot** 61: 3291–3303
- Inoue Y, Peñuelas J, Miyata A, Mano M (2008) Normalized difference spectral indices for estimating photosynthetic efficiency and capacity at a canopy scale derived from hyperspectral and CO₂ flux measurements in rice. **Remote Sens Environ** 112: 156–172
- Jim S, Sader SA (2005) Comparison of time series tasseled cap wetness and the normalized difference moisture index in detecting forest disturbances. **Rem Sens Environ** 94: 364–372
- Lionello P, Malanotte-Rizzoli P, Boscolo R (Ed) (2006) *Mediterranean Climate Variability*, Vol. 4, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 438.
- Lobell DB, Burke MB, Tebaldi C, Mastrandrea MD, Falcon WP, Naylor RL (2008) Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. **Nature** 319: 607–610
- Lopes M, Reynolds R (2012) Stay-green in spring wheat can be determined by spectral reflectance measurements (normalized difference vegetation index) independently from phenology. **J Exp Bot** 63: 3789–3798
- Lozano FJ, Suárez-Seoane S, de Luis E (2007) Assessment of several spectral indices derived from multi-temporal Landsat data for fire occurrence probability modeling. **Rem Sens Environ** 107: 533–544
- McDonald AJ, Genmell FM, Lewis PE (1998) Investigation of the utility of spectral indices for determining information on coniferous forests. **Rem Sens Environ** 66: 250–272
- Minetti JL, Vargas WM, Poblete AG, Acuña LR, Casagrande G (2003) Non-linear trends and low frequency oscillations in annual precipitation over Argentina and [Chile](#)^{Q3}, 1931–1999. **Atmosfera** 16: 199–135
- Montecinos A, Aceituno P (2003) Seasonality of the ENSO-related rainfall variability in central Chile and associated circulation anomalies. **J Climate** 16: 281–296
- Peñuelas J, Filella I, Biel C, Serrano L, Save R (1993) The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status. **Int J Remote Sens** 14: 1887–1905
- Peñuelas J, Isla R, Filella I, Araus JL (1997) Visible and near-infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. **Crop Sci** 37: 198–202
- Prasad B, Carver BF, Stone ML, Babar MA, Raun WR, Klatt AR (2007a) Genetic analysis of indirect selection for winter wheat grain yield using spectral reflectance indices. **Crop Sci** 47: 1416–1425

- Prasad B, Carver BF, Stone ML, Babar MA, Raun WR, Klatt AR (2007b) Potential use of spectral reflectance indices as a selection tool for grain yield in winter wheat under great plains conditions. *Crop Sci* 47: 1426–1440
- R Development Core Team. (2008) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rebetzke GJ, Condon AG, Richards RA, Farquhar GD (2002) Selection for reduced carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci* 42: 739–745
- Richards RA, Rebetzke GJ, Condon AG, van Herwaarden AF (2002) Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals. *Crop Sci* 42: 111–121
- Royo C, Villegas D (2011) Field measurements of canopy spectra for biomass assessment of small-grain cereals. In: D. Matovic, (Ed) *Biomass—Detection, Production and Usage*, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 27–52. DOI: 10.5772/973
- Tambussi EA, Bort J, Nogués S, Guiamet JJ, Araus JL (2007) The photosynthetic role of ears in C₃ Cereals: Metabolism, water use efficiency and contribution to grain yield. *Crit Rev Plant Sci* 26: 1–16

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found in the online version of this article:

 **Figure S1. Relationships between grain yield and the spectral reflectance indices NDVI (830; 660) (A), SWWI (1,650; 850) (B), NWI₃ (970; 920) (C), and NDMI₂ (2,200; 1,100) (D) across the set of 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS) at Cauquenes, and mild water stress (MWS) and full irrigation (FI) at Santa Rosa, measured at middle grain filling.** White lines represent the fitting lines of the regressions (for regression and coefficients of determination refer to Table 2).

 **Figure S2. Relationship between $\Delta^{13}\text{C}$ and the spectral reflectance indices NDVI (830; 660) (A), SWWI (1,650; 850)**

(B), NWI₃ (970; 920) (C), and NDMI₂ (2,200; 1,100) (D) across the set of 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS) at Cauquenes, and mild water stress (MWS) and full irrigation (FI) at Santa Rosa, measured at middle grain filling.

White lines represent the fitting lines of the linear regressions (for regression and coefficients of determination refer to Table 2).

Table S1. Correlation coefficients of the relationships between spectral reflectance indices (SRI) measured at heading and: grain yield (GY), plant height (PH), spikes per m², kernels per spike (KPS), thousand kernel weight (TKW), days from sowing to heading (DH) and carbon discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in kernels, for 368 genotypes of wheat grown in Santa Rosa under mild water stress (MWS) and full irrigation (FI). Correlation correlations >0.65 are highlighted.

Table S2. Correlation coefficients of the relationships between several spectral reflectance indices (SRI) measured at middle grain filling and: grain yield (GY), plant height (PH), spikes per m², kernels per spike (KPS), thousand kernel weight (TKW), days from sowing to heading (DH) and carbon discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) in kernels, for 368 genotypes of wheat grown under severe water stress (SWS) at Cauquenes, and mild water stress (MWS) and full irrigation (FI) at Santa Rosa. Indices are the same as for Table S1. Correlation correlations >0.65 are highlighted.

Table S3. Comparative performance of spectroradiometrical indices NDMI₂ and NDVI and phenology (days from planting to heading, DH) explaining genotypic variability on grain yield (GY). The three traits were used as independent variables in a stepwise analysis.

Table S4. Comparative effect of spectroradiometrical indices NDMI₂ and NDVI and phenology (days from planting to heading, DH) on genotypic variability on carbon isotope discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$). The three traits were used as independent variables in a stepwise analysis.

AUTHOR QUERY FORM

JOURNAL: JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY

Article: jipb12114

Dear Author,

During the copyediting of your paper, the following queries arose. Please respond to these by annotating your proofs with the necessary changes/additions using the E-annotation guidelines attached after the last page of this article.

We recommend that you provide additional clarification of answers to queries by entering your answers on the query sheet, in addition to the text mark-up.

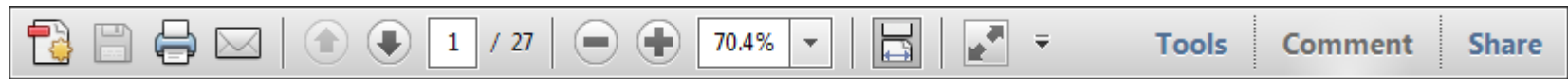
Query No.	Query	Remark
Q1	Apan et al. (2011) has not been included in the Reference List. Do you mean Apan et al. (2006)?	YES
Q2	Apan et al. (2006) has not been cited in the text. Please indicate where it should be cited; or delete from the Reference List.	KEEP IT
Q3	Please check the page range.	119-135

USING e-ANNOTATION TOOLS FOR ELECTRONIC PROOF CORRECTION

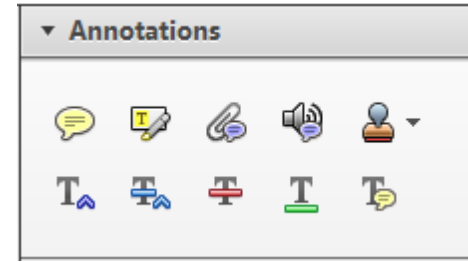
Required software to e-annotate PDFs: Adobe Acrobat Professional or Adobe Reader (version 8.0 or above). (Note that this document uses screenshots from Adobe Reader X)

The latest version of Acrobat Reader can be downloaded for free at: <http://get.adobe.com/reader/>

Once you have Acrobat Reader open on your computer, click on the [Comment](#) tab at the right of the toolbar:



This will open up a panel down the right side of the document. The majority of tools you will use for annotating your proof will be in the [Annotations](#) section, pictured opposite. We've picked out some of these tools below:



1. Replace (Ins) Tool – for replacing text.

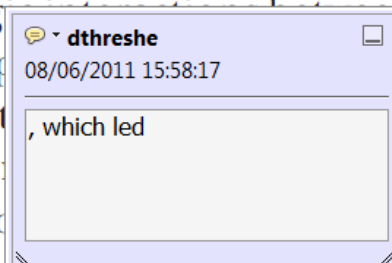


Strikes a line through text and opens up a text box where replacement text can be entered.

How to use it

- Highlight a word or sentence.
- Click on the [Replace \(Ins\)](#) icon in the Annotations section.
- Type the replacement text into the blue box that appears.

standard framework for the analysis of microeconomics. Nevertheless, it also led to the emergence of a new paradigm of strategic behavior. The number of competitors in the industry is that the structure of the industry is a key component of the competitive environment. At the industry level, are externalities an important work on entry by Shirasaka (1987) and henceforth) we open the 'black b



2. Strikethrough (Del) Tool – for deleting text.



Strikes a red line through text that is to be deleted.

How to use it

- Highlight a word or sentence.
- Click on the [Strikethrough \(Del\)](#) icon in the Annotations section.

there is no room for extra profits and the number of firms that can survive in the industry is zero and the number of firms (net) values are not determined by the number of firms. Blanchard and Kiyotaki (1987), in their paper on perfect competition in general equilibrium, show that the effects of aggregate demand and supply shocks in the classical framework assuming monopoly are not different from those in a perfectly competitive framework. An exogenous number of firms

3. Add note to text Tool – for highlighting a section to be changed to bold or italic.



Highlights text in yellow and opens up a text box where comments can be entered.

How to use it

- Highlight the relevant section of text.
- Click on the [Add note to text](#) icon in the Annotations section.
- Type instruction on what should be changed regarding the text into the yellow box that appears.

dynamic responses of mark-ups to cost changes. The VAR evidence

with well-labeled demand curves. The VAR model is consistent with the demand-



4. Add sticky note Tool – for making notes at specific points in the text.

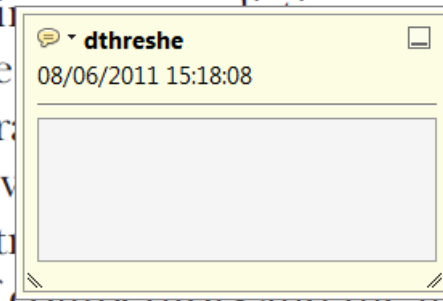


Marks a point in the proof where a comment needs to be highlighted.

How to use it

- Click on the [Add sticky note](#) icon in the Annotations section.
- Click at the point in the proof where the comment should be inserted.
- Type the comment into the yellow box that appears.

and supply shocks. Most of the time, the number of firms in the industry is zero and the number of firms (net) values are not determined by the number of firms. Blanchard and Kiyotaki (1987), in their paper on perfect competition in general equilibrium, show that the effects of aggregate demand and supply shocks in the classical framework assuming monopoly are not different from those in a perfectly competitive framework. An exogenous number of firms



USING e-ANNOTATION TOOLS FOR ELECTRONIC PROOF CORRECTION

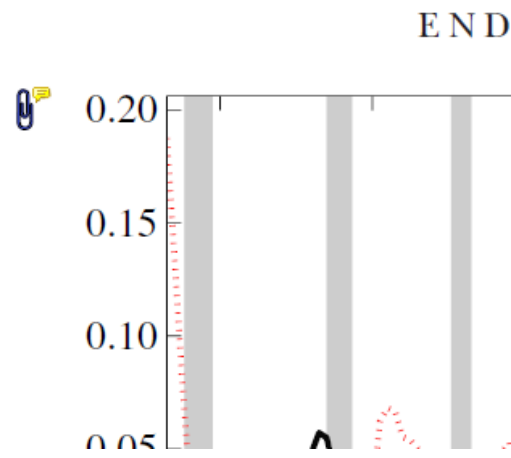
5. Attach File Tool – for inserting large amounts of text or replacement figures.



Inserts an icon linking to the attached file in the appropriate place in the text.

How to use it

- Click on the [Attach File](#) icon in the Annotations section.
- Click on the proof to where you'd like the attached file to be linked.
- Select the file to be attached from your computer or network.
- Select the colour and type of icon that will appear in the proof. Click OK.



6. Add stamp Tool – for approving a proof if no corrections are required.

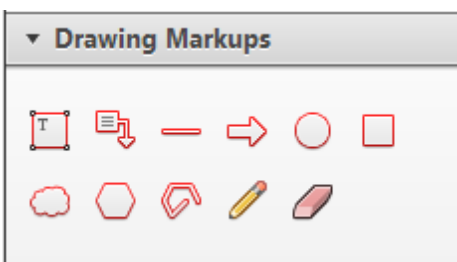


Inserts a selected stamp onto an appropriate place in the proof.

How to use it

- Click on the [Add stamp](#) icon in the Annotations section.
- Select the stamp you want to use. (The [Approved](#) stamp is usually available directly in the menu that appears).
- Click on the proof where you'd like the stamp to appear. (Where a proof is to be approved as it is, this would normally be on the first page).

of the business cycle, starting with the
 on perfect competition, constant ret
 production. In this environment goods
 extra profits and the market for marke
 he market for goods is determined by the model. The New-Key
 otaki (1987), has introduced produc
 general equilibrium models with nomin
 and market-clearing. Most of this literat

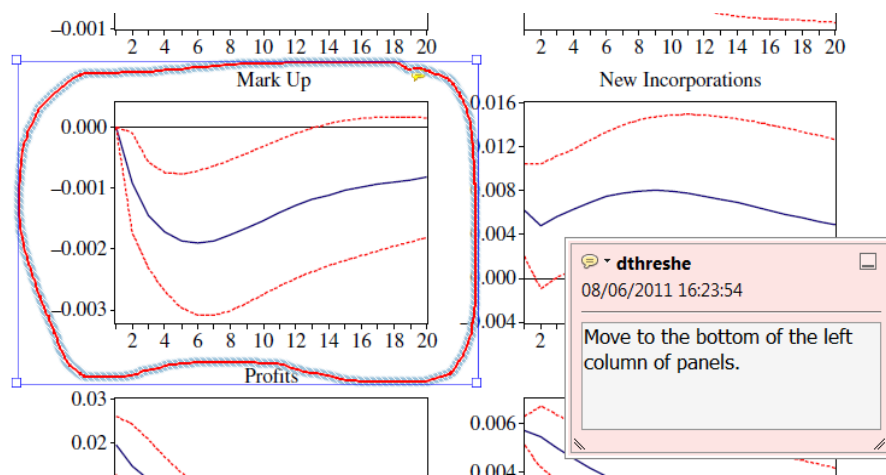


7. Drawing Markups Tools – for drawing shapes, lines and freeform annotations on proofs and commenting on these marks.

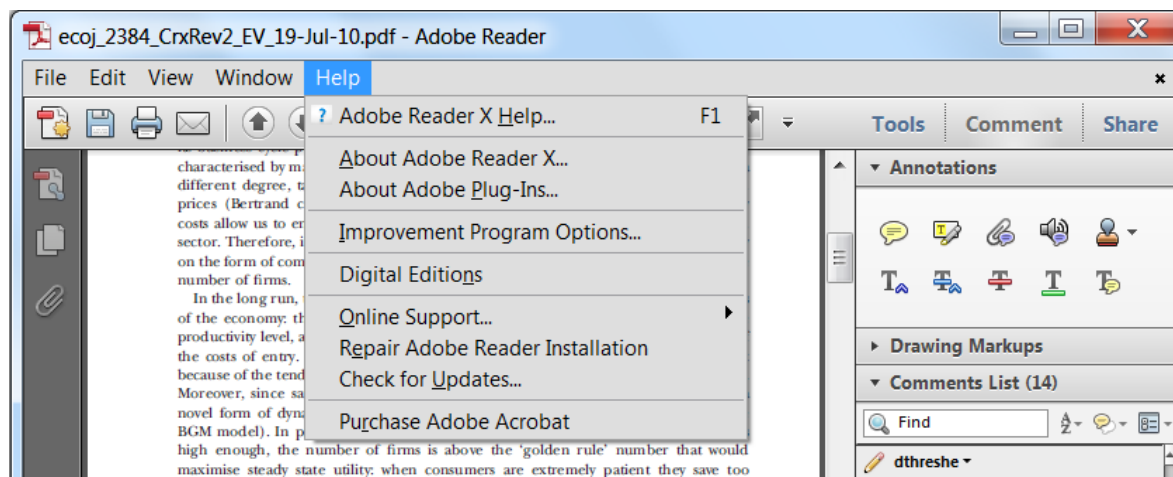
Allows shapes, lines and freeform annotations to be drawn on proofs and for comment to be made on these marks..

How to use it

- Click on one of the shapes in the [Drawing Markups](#) section.
- Click on the proof at the relevant point and draw the selected shape with the cursor.
- To add a comment to the drawn shape, move the cursor over the shape until an arrowhead appears.
- Double click on the shape and type any text in the red box that appears.



For further information on how to annotate proofs, click on the [Help](#) menu to reveal a list of further options:



GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE 384 GENOTIPOS DE *T. aestivum* PARA SELECCIÓN GENÓMICA.



Bettina Lado¹, Alejandro del Pozo², Ivan Matus³, Alejandra Rodríguez³, Luis Inostroza³, Gustavo A. Lobos², Marina Castro¹, Martín Quincke¹, Luciana Landechea¹, François Belzile⁴, Jesse Poland⁵ y Jarislav von Zitzewitz¹.



1. Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto de investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay
2. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile.
3. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.
4. Département de Phytologie, Université Laval, Québec, QC, Canada.
5. Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan, Kansas, United States of America

email: blado@inia.org.uy

INTRODUCCIÓN:

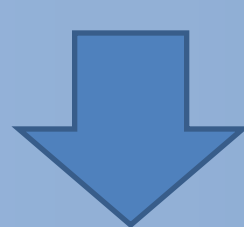
En el área del mejoramiento genético de cultivos la posibilidad de predecir comportamientos fenotípicos a campo de los distintos cultivares, a partir de la información genética de cada individuo, ha aumentado debido principalmente a los recientes avances en las tecnologías de análisis molecular. El genotipado por secuenciación es una nueva técnica que permite simplificar la construcción de librerías genómicas reduciendo los costos de secuenciación (Elshire et al., 2011), lo cual incrementa la posibilidad de su utilización a gran escala en el marco de un programa de mejoramiento. Contando con una alta densidad de marcadores y buena calidad de fenotipado, es posible predecir comportamientos a campo, contando únicamente con información genética, mediante Selección Genómica (Mewissen et al., 2001).

OBJETIVO:

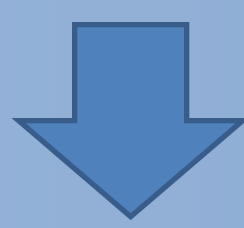
Ajustar una metodología de identificación de SNPs mediante Genotipado por Secuenciación en 384 genotipos para su posterior aplicación en Selección Genómica en el marco de un programa de mejoramiento genético de trigo.

METODOLOGÍA:

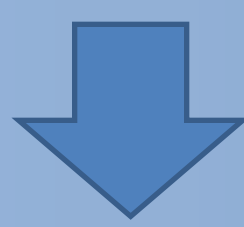
Genotipado por secuenciación para construcción de librerías y secuenciación en plataforma Illumina/Solexa HiSeq2000
identificación de SNPs



Estructura de la población: análisis de coordenadas principales con matriz Kinship.



Mapeo de SNPs en bases de datos y análisis de la distribución por cromosoma



Predicciones fenotípicas (rendimiento y peso de 1000 granos) y validación cruzada. Datos fenotípicos: alfa látice simple, 400 genotipos en 2 repeticiones y 2 condiciones hídricas (riego y secano).



$$y = X\beta + Z\mu + \epsilon$$

y: fenotipo; X: Matriz de diseño de efectos fijos; β : vector de efectos fijos (BLUE); Z: Matriz de diseño de efectos aleatorios; μ : vector de efectos aleatorios (BLUP); ϵ : efectos aleatorios del error experimental

RESULTADOS:

Los análisis planteados permitieron identificar 28.199 SNPs en 382 individuos. Se identificó un reducido número de SNPs con bajas frecuencias alélicas (entre 0.01 y 0.05%) y proporción de heterocigotos mayor al 3%.

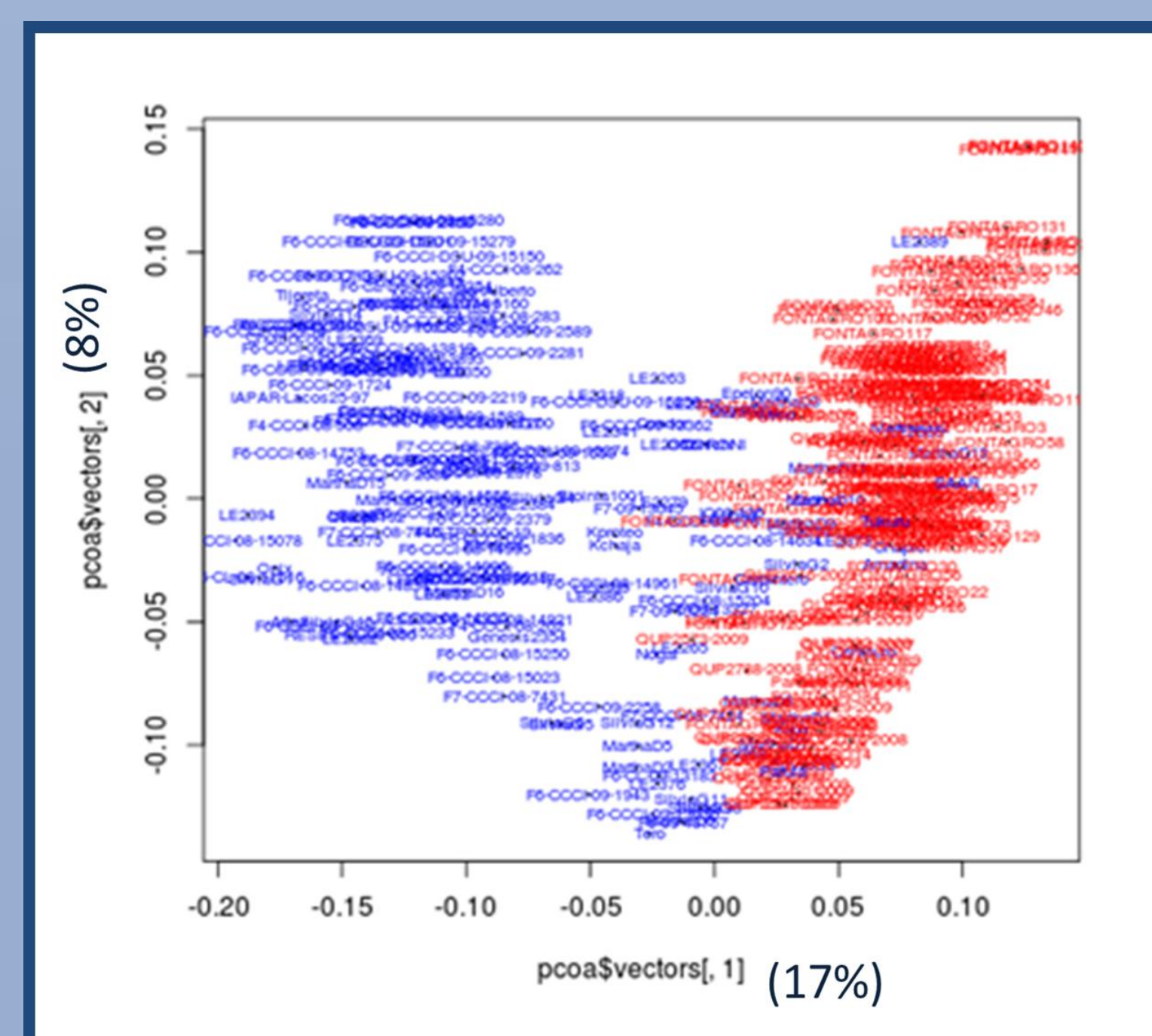


Figura 4. Análisis de coordenadas principales. En azul se destacan las variedades de Uruguay y en rojo las de Chile.

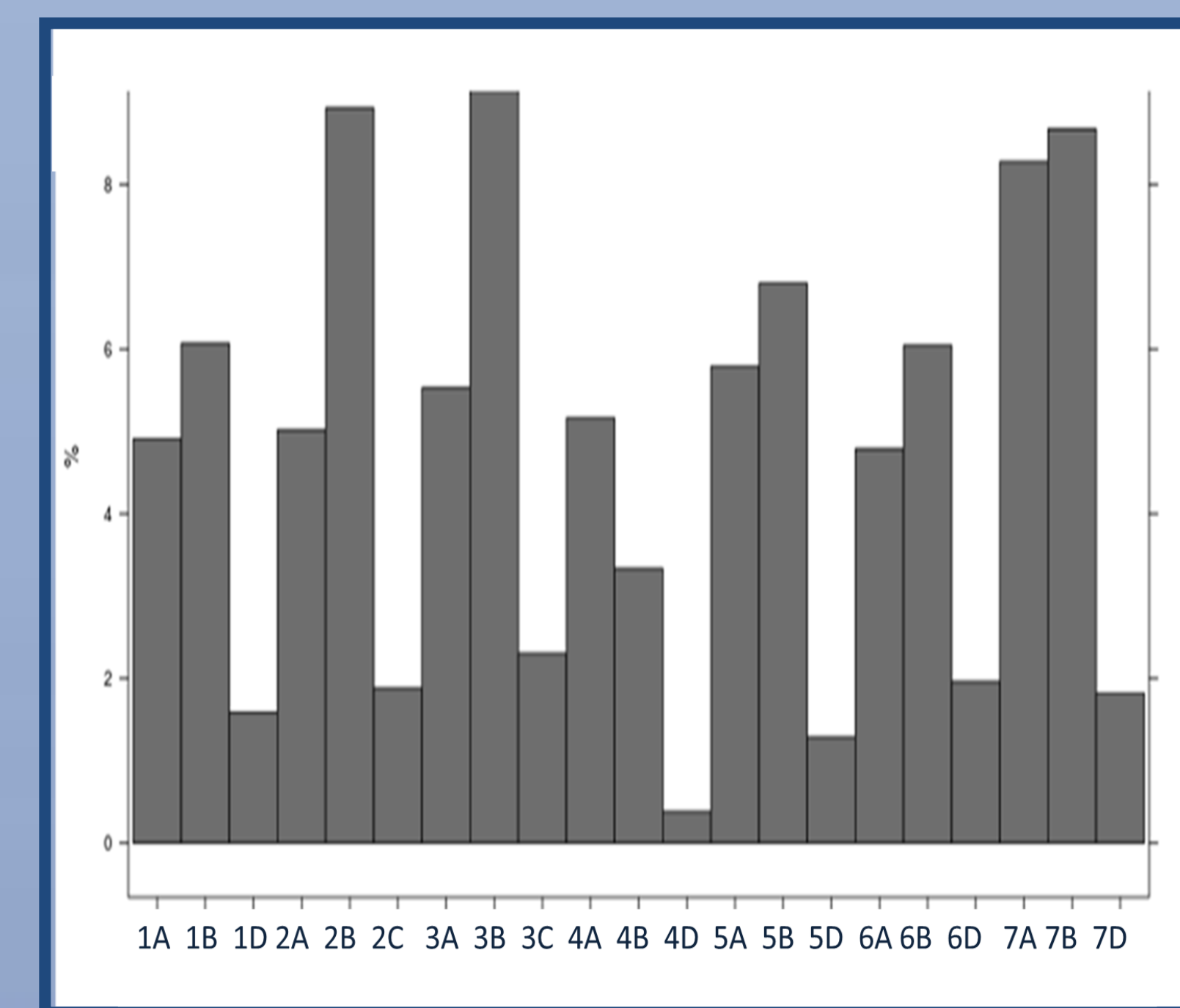


Figura 5. Distribución de los SNPs en porcentaje, en los distintos cromosomas.

Tabla 1. Heredabilidad de Rendimiento y peso de mil granos en ambos ambientes

Modelos	rendimiento		Peso de mil granos	
	H riego	H secano	H riego	H secano
LS	0.42	0.33	0.88	0.79
FC	0.44	0.37	0.88	0.81
BCA_MVNG	0.57	0.56	0.89	0.82

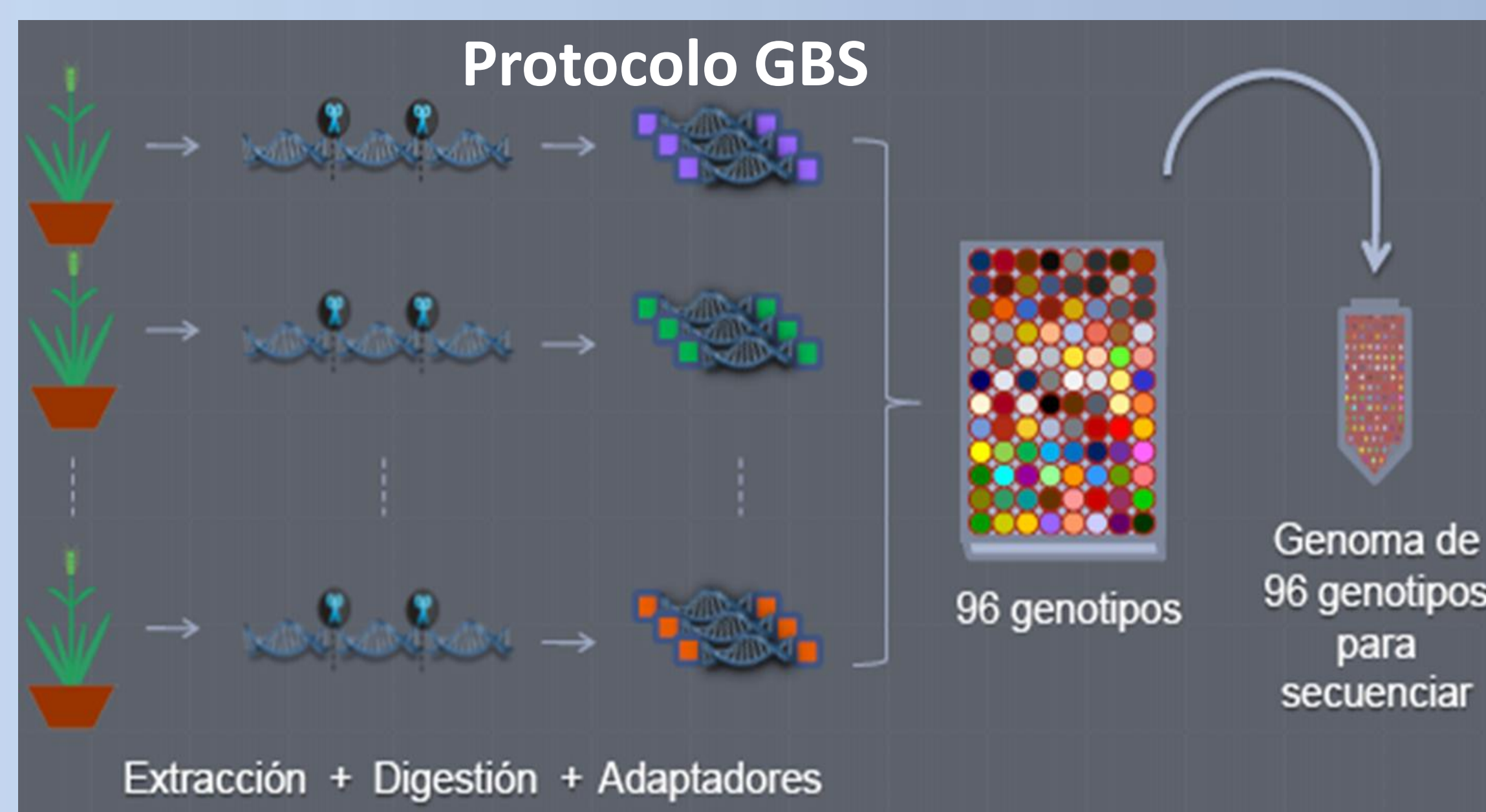
FC: ajuste con modelo de filas y columnas; LS: ajuste con el modelo de diseño un alfa látice simple;

BCA_MVNG: ajuste con modelo de diseño de bloque completos al azar con medias móviles como covariable

Tabla 2. Correlaciones entre los GEBV y los BLUP en la población de validación, para Rendimiento y peso de mil granos, con los 4 modelos planteados y para las medias sin ajustar.

		Rend. riego	P1000g riego	Rend. secano	P1000g secano
Sin ajustar	RR	0.174±0.057	0.794±0.022	0.129±0.051	0.752±0.023
	GAUSS	0.337±0.090	0.794±0.022	0.285±0.108	0.754±0.025
FC	RR	0.221±0.061	0.755±0.021	0.171±0.068	0.766±0.019
	GAUSS	0.341±0.084	0.753±0.022	0.315±0.092	0.767±0.019
LS	RR	0.245±0.060	0.751±0.023	0.191±0.061	0.745±0.026
	GAUSS	0.361±0.074	0.751±0.031	0.324±0.078	0.748±0.027
BCA_MVNG	RR	0.246±0.077	0.752±0.022	0.219±0.060	0.764±0.019
	GAUSS	0.374±0.078	0.753±0.023	0.339±0.086	0.764±0.021
MVNG	RR	0.278±0.068	0.787±0.019	0.216±0.065	0.799±0.021
	GAUSS	0.396±0.070	0.787±0.020	0.357±0.084	0.799±0.02

Sin ajustar: medias fenotípicas con promedios simples; FC: ajuste con modelo de filas y columnas; LS: ajuste con el modelo de diseño un alfa látice simple; BCA_MVNG: ajuste con modelo de diseño de bloque completos al azar con medias móviles como covariable; MVNG: ajuste de un modelo de regresión lineal con medias móviles como variable regresora.



CONCLUSIÓN:

Genotipado por secuenciación es una técnica que permite identificar buena densidad SNPs con un menor costo y podría ser utilizada en conjunto con selección genómica, para su aplicación como herramienta en un programa de mejoramiento en trigo

REFERENCIAS:

- Elshire, R. J., et al. (2011). PloS one, 6(5), e19379.
Mewissen, T. H., et al. (2001). Genetics, 157(4), 1819-29.

Phenotyping Protocols in Potato for Drought Tolerance

Salazar C., Romero P., Villagra P., Pino M.T. (*)

Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA la Platina

Fluorescence

FMS2 Modulated Chlorophyll Fluorometer



PSII damage

Fv/Fm

acclimated to darkness

Acclimated to actinic light

Heat dissipation in the PSII

NPQ

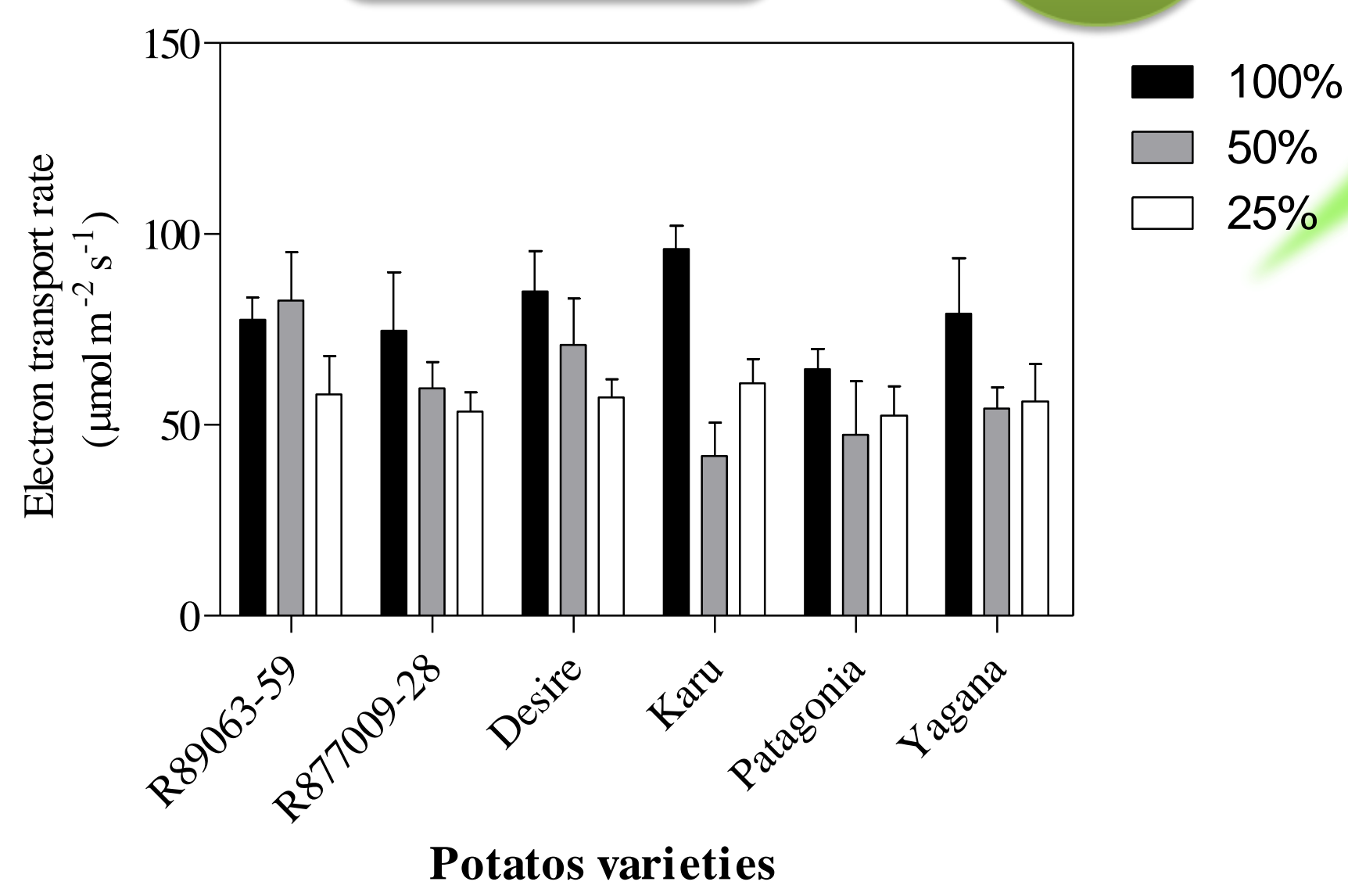
o qN

Excitation excess on PSII

qP

PSII damage

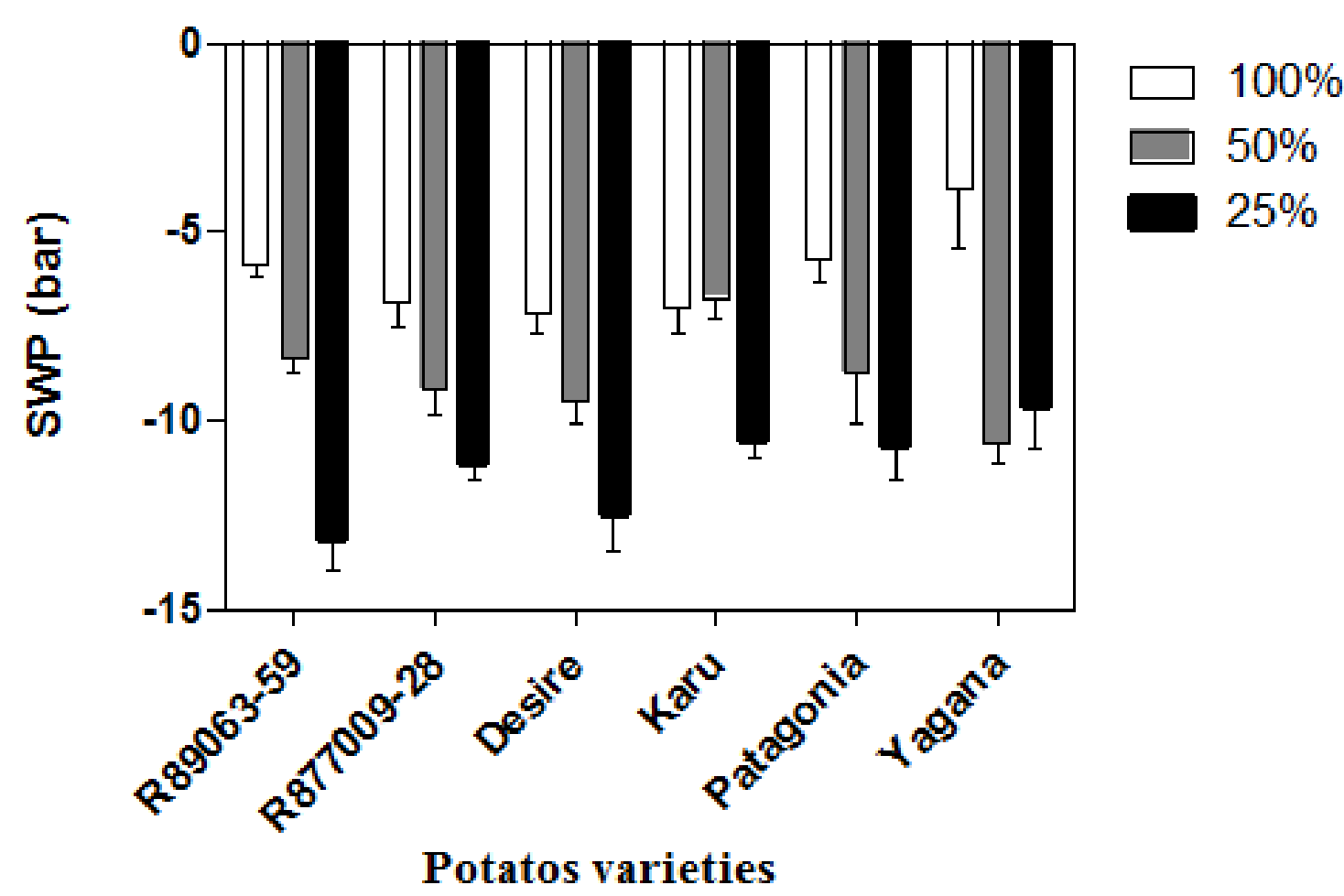
Fv/Fm



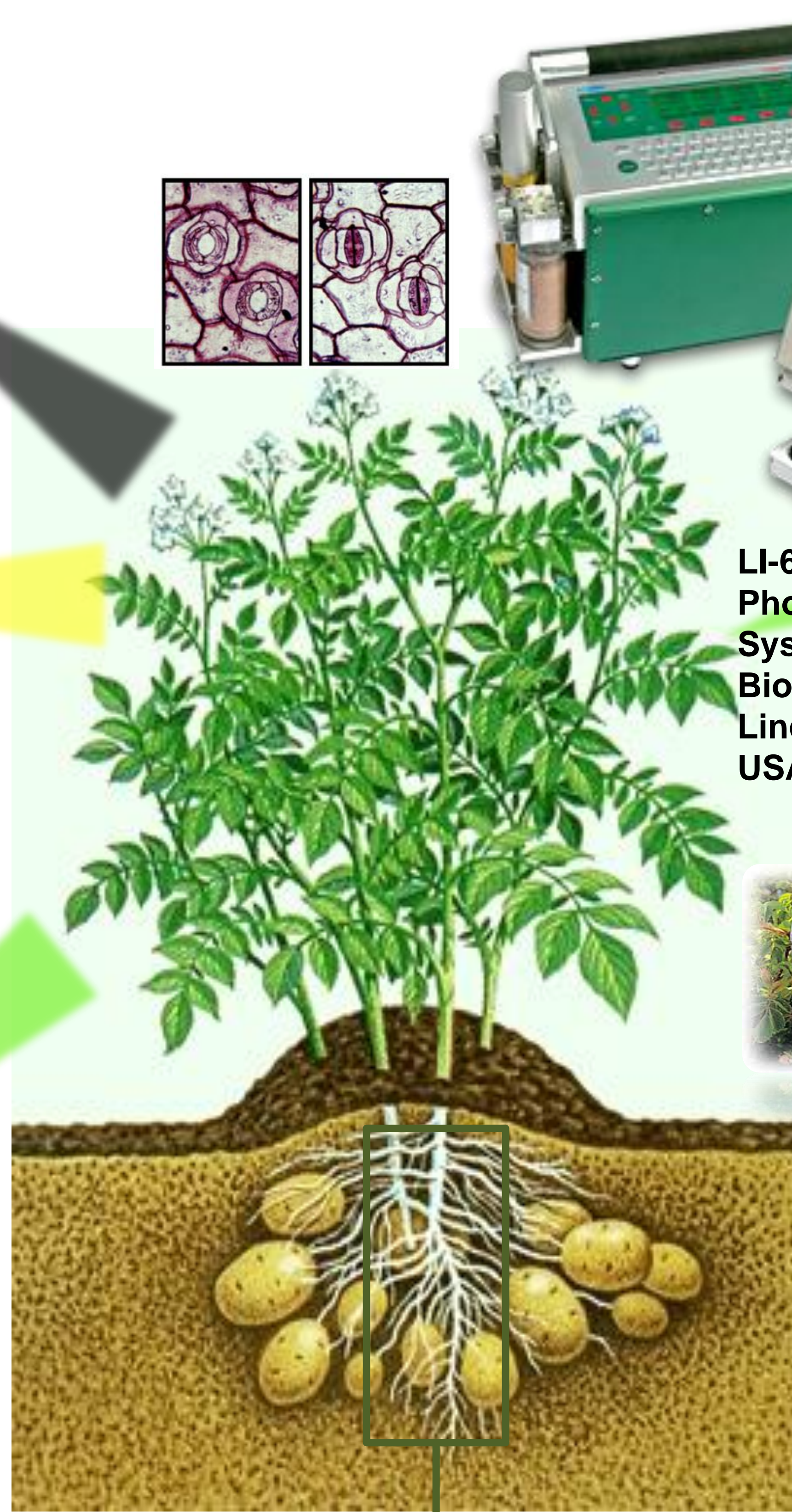
Potatos varieties



Scholander-type pressure chamber (PMS Instruments, Corvallis, OR)



Potatos varieties



LI-6400XT Portable Photosynthesis System (LICOR Biosciences, Inc. Lincoln, Nebraska, USA)

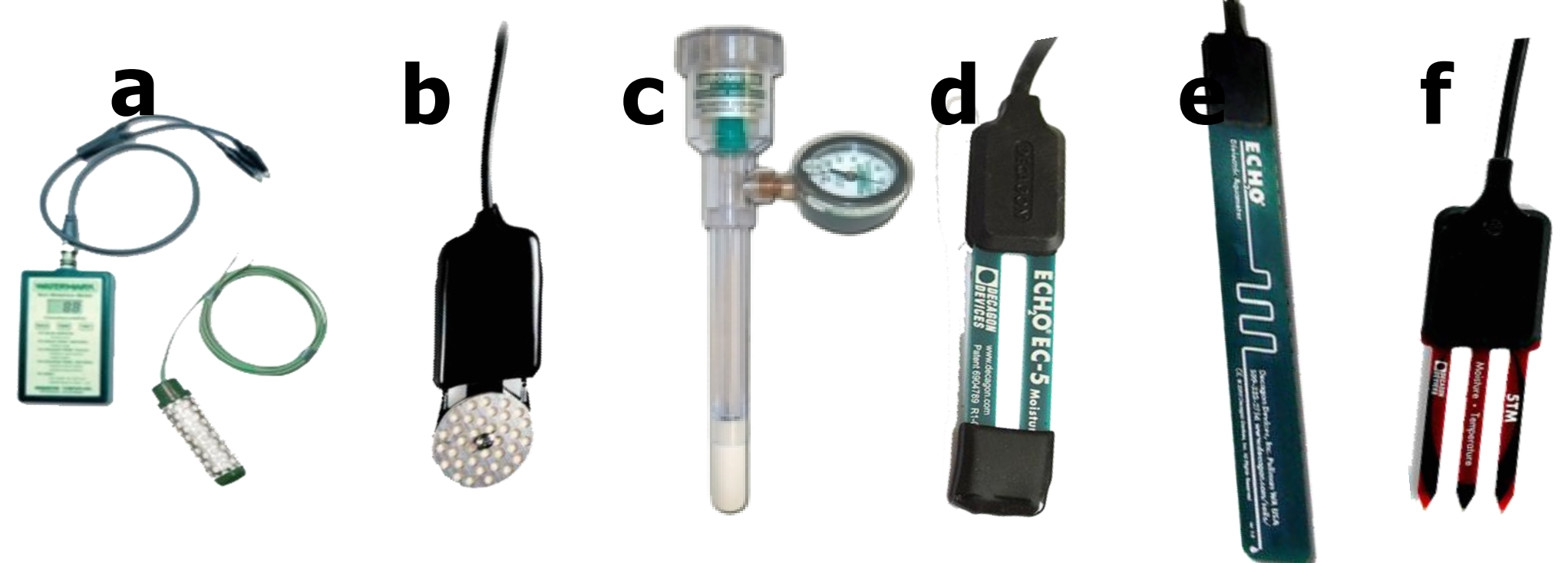
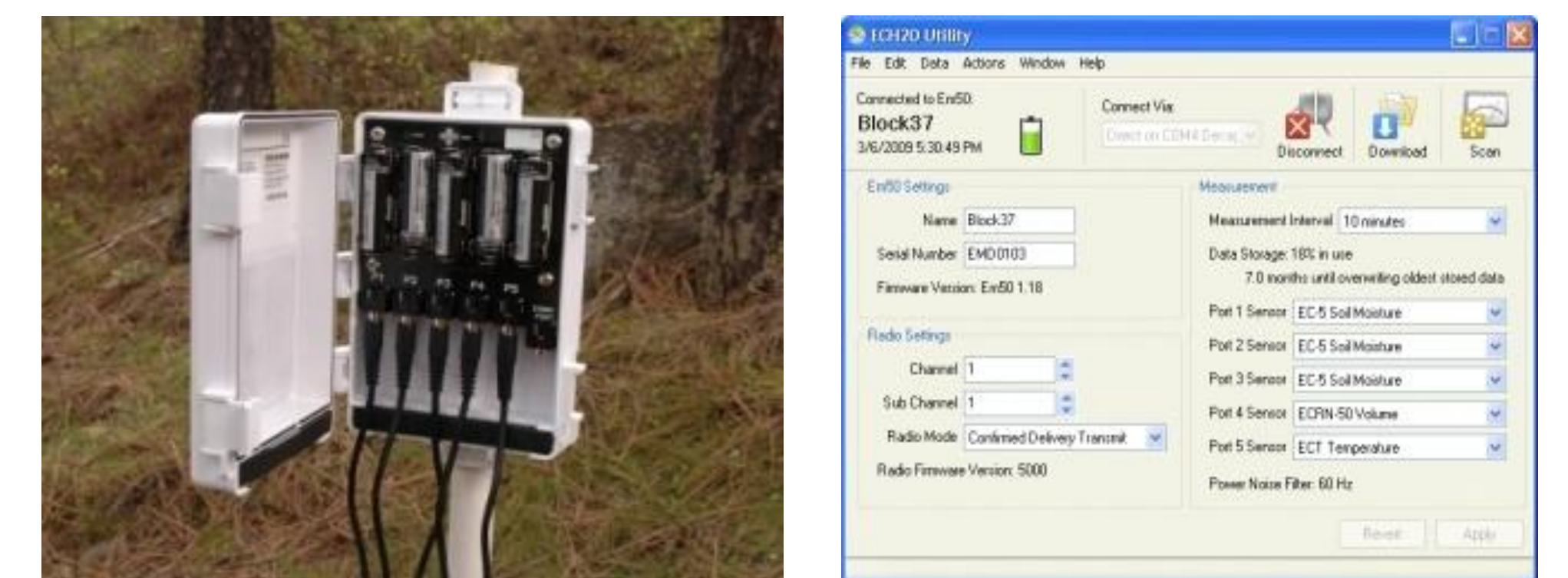
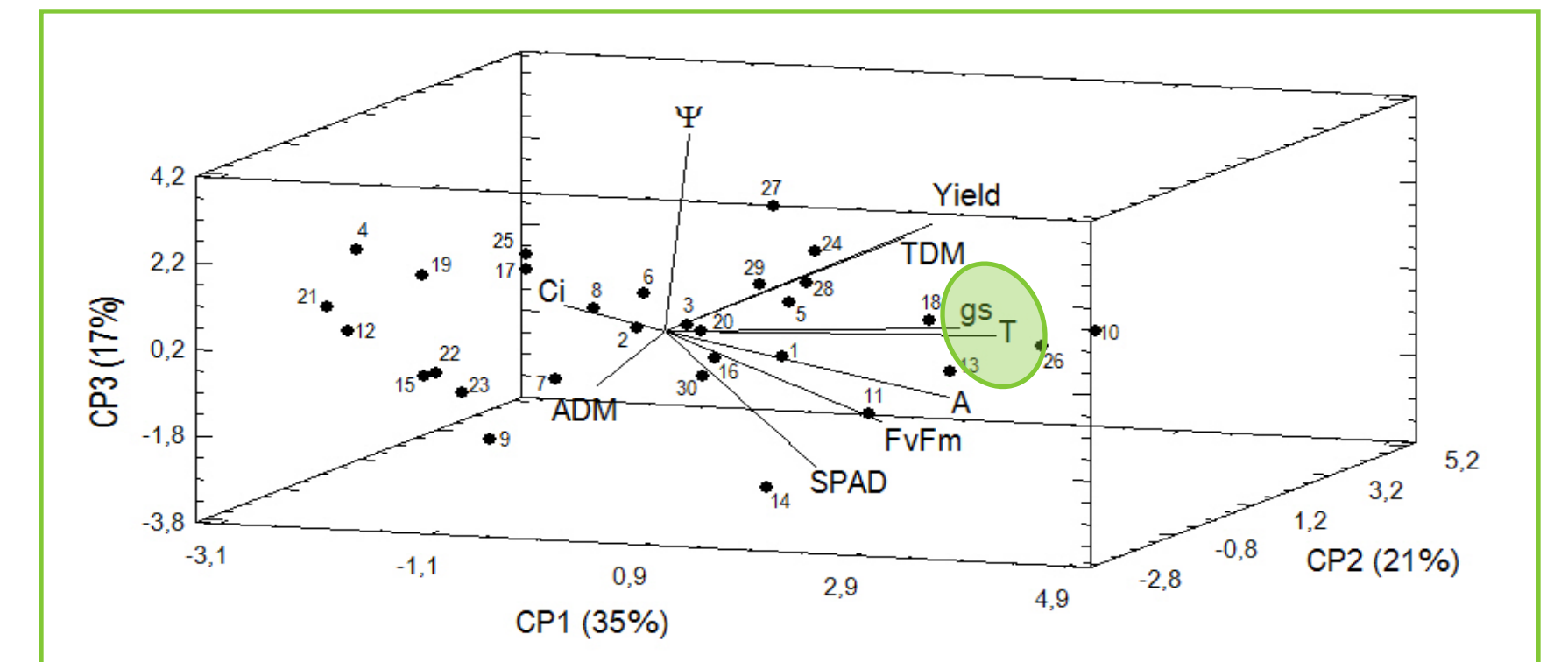
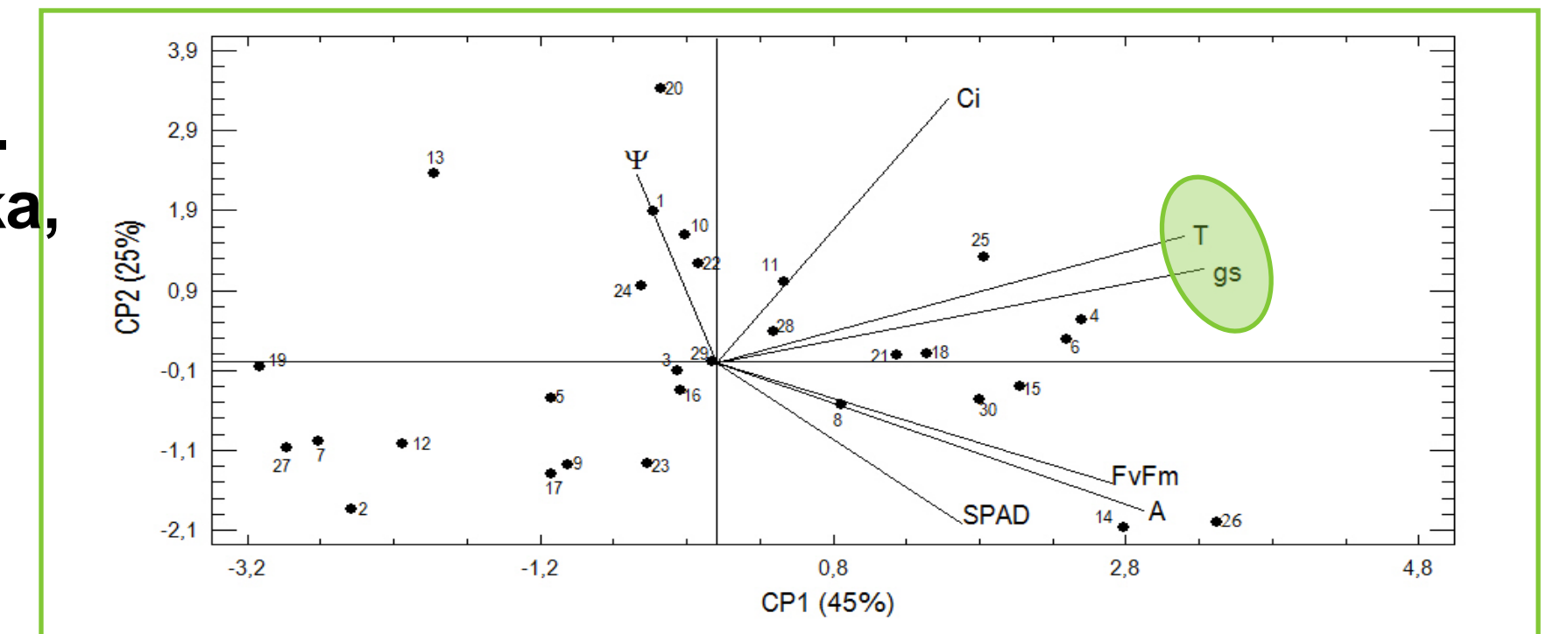
Gas exchange

Photosynthetic rate

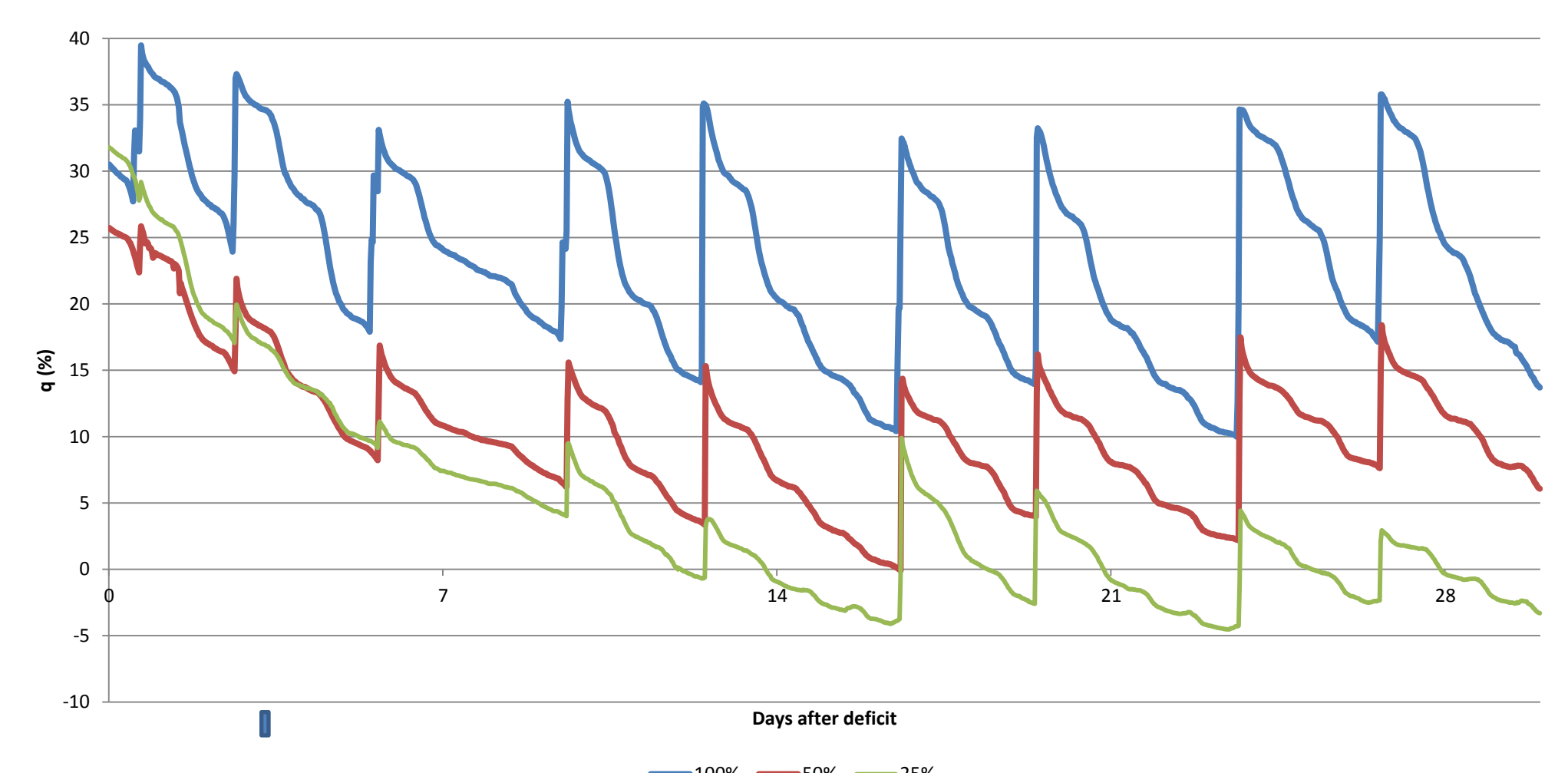
Stomatal conductance

Sub-stomatal CO₂ concentration

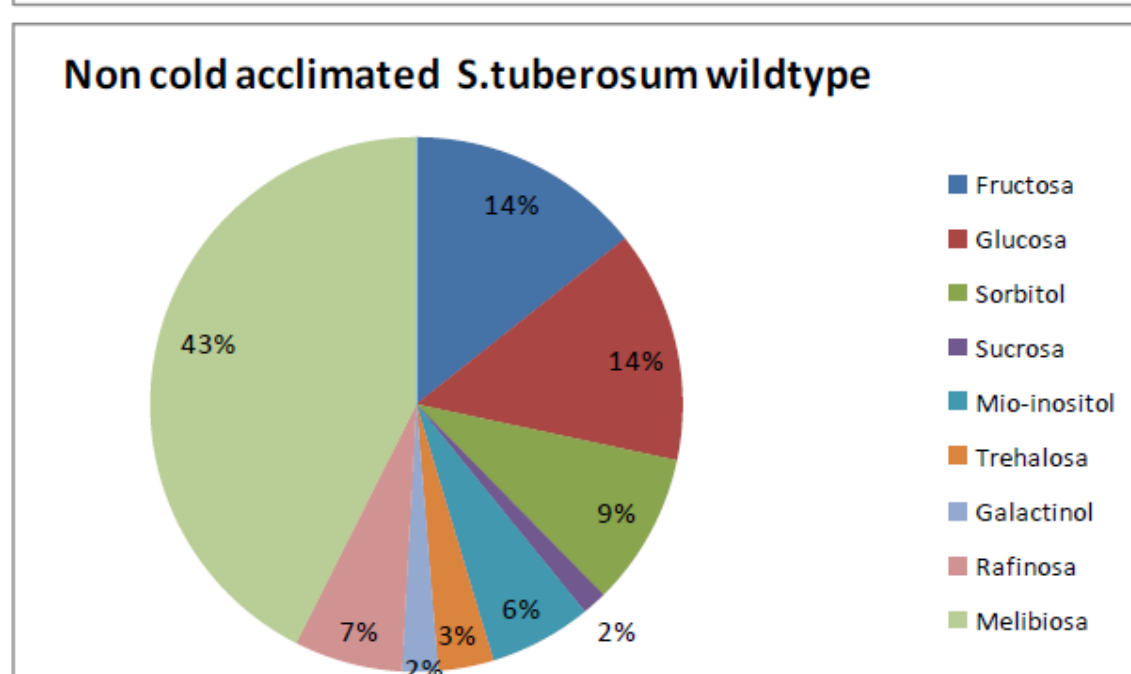
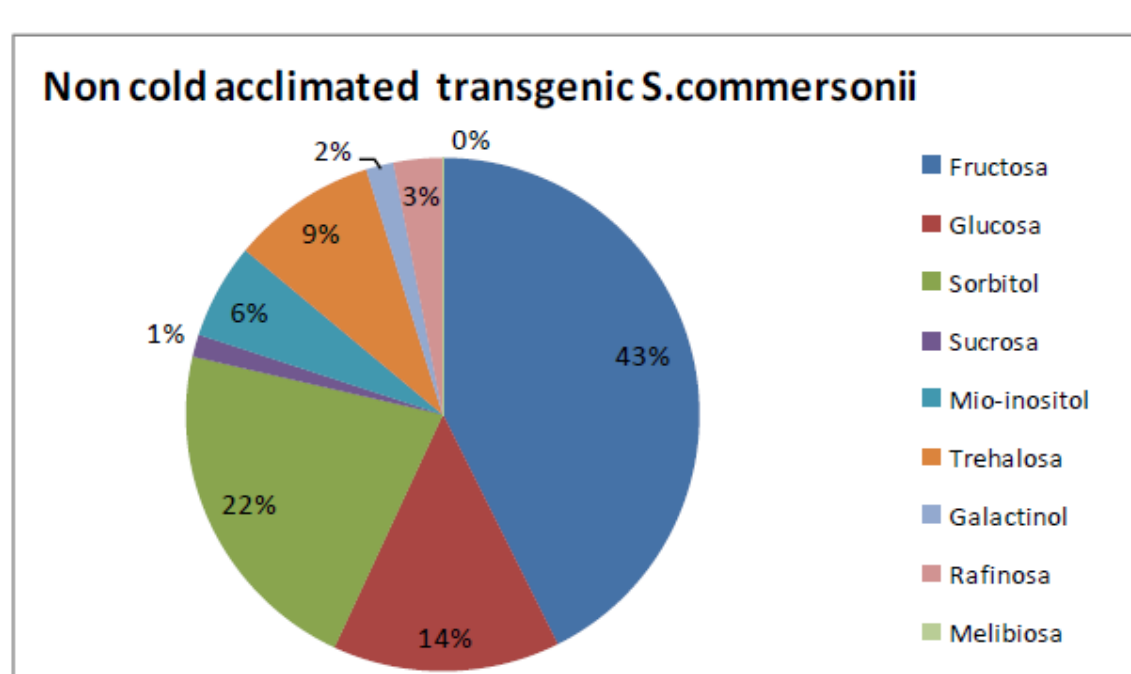
Evapotranspiration



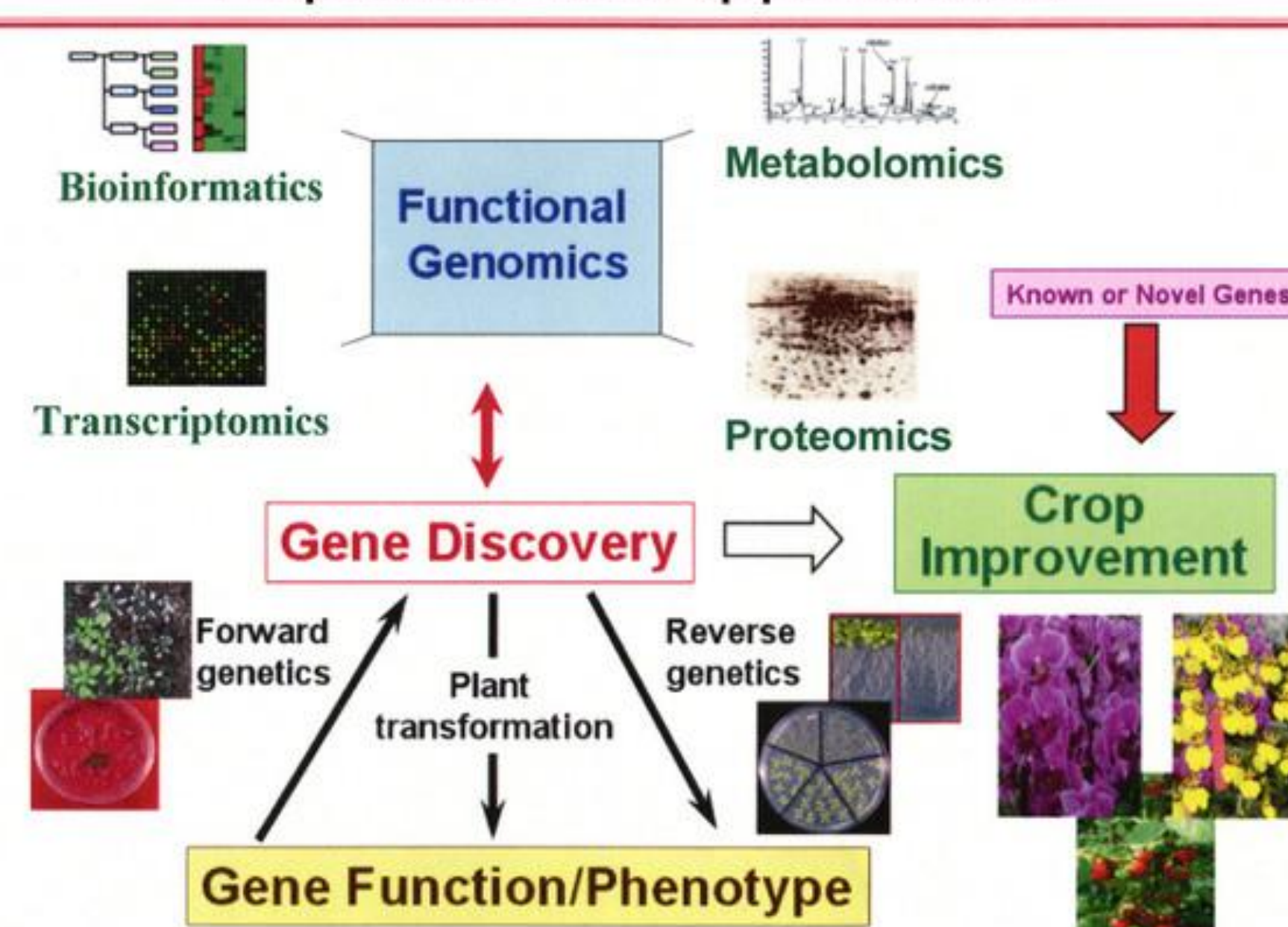
Soil moisture meters. a) watermark (Irrometer company INC.); b) MPS -1 (Decagon); c) Tensiometer (irrometer); d) m Ech2O EC-5 (Decagon); e) Ech2O dielectric acuumeter (Decagon); f) 5TE moisture, temperature and electric conductivity) sensor



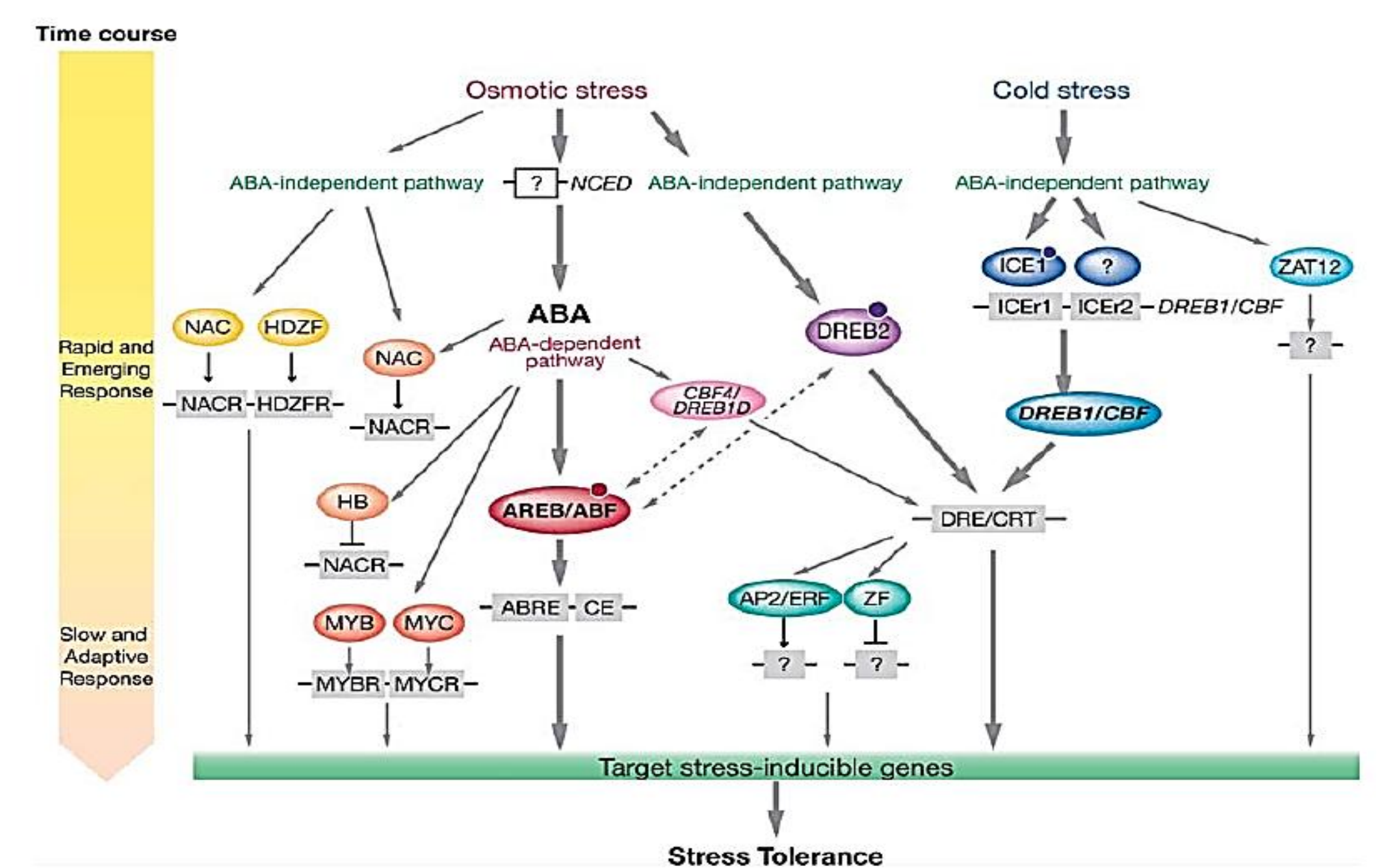
Osmoprotectors



Experimental Approaches



Genómica



Discovering QTL in Uruguayan Wheat Germplasm using Genome Wide Association Analysis

Lado, Bettina¹, Silva, Paula², Matus, Ivan³, Inostroza, Luis³, del Pozo, Alejandro⁴, Castro Marina², German, Silvia², Quincke, Martín², von Zitzewitz, Jari⁵



¹ Facultad de Agronomía, UdelaR, Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay; ² Instituto Nacional de investigación Agropecuaria, La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay; ³ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile; ⁴ Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile.; ⁵SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany. blado@fagro.edu.uy

Introduction

Wheat is the most important winter crop in Uruguay. The wheat breeding efforts are centralized in increasing yield and grain quality. It is also necessary to introduce resistance genes for the most important diseases among which leaf rust (LR, caused by *Puccinia triticina*) is one of the most relevant. LR is present every year and causes grain yield losses up to 50% in susceptible cultivars. Genome Wide Association (GWA) analysis is a novel approach to reveal the genetic basis of relevant agronomic traits through the incorporation of high amounts of genetic data and used to identify new markers linked to QTLs that influence the expression of genes involved in those traits. In this study we undertook GWA in 186 lines from INIA-Wheat Breeding Program (INIA-WBP) using Genotyping-by-Sequencing (GBS) to detect QTLs for two relevant agronomic traits, yield and LR resistance.

Materials and methods

Phenotypic evaluations were carried out during 2012 wheat growing season for yield and LR resistance, in Chile and Uruguay, respectively. The 186 genotypes were field tested for yield under two different water regimes in Mediterranean climatic conditions: mild water stress (MWS; one irrigation at tillering) and irrigated (I; four irrigations: at tillering, flag leaf appearance, heading and middle grain filling). The same genotypes were phenotyped for LR resistance in two artificial inoculated locations, Young and La Estanzuela. Phenotypic analyses were performed using R software and Best Linear Unbiased Predictor (BLUP) were calculated for each trait. Genotypic data was collected using GBS through Tassel pipeline (Elshire *et al.* 2011, Poland *et al.* 2012). GWA were realized using a model with Kinship relationship matrix as random effect and principal component analysis as fixed effect (both calculated with SNPs)

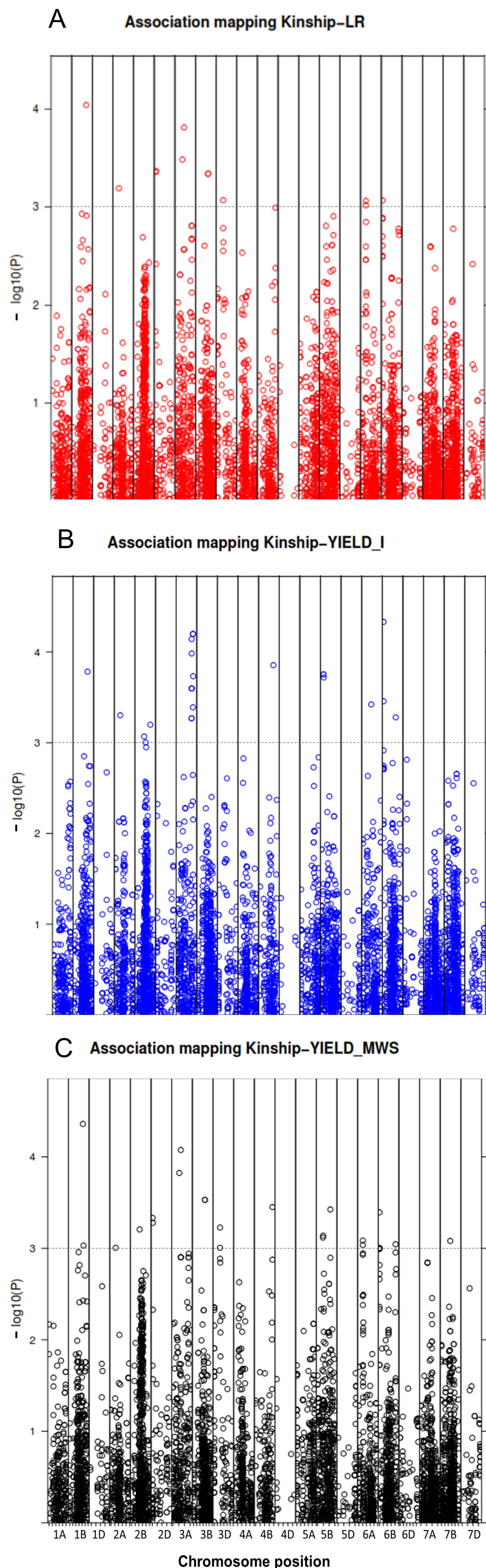
Results and Conclusions

From a total of 97,771 SNPs identified, 7 % (6813 SNPs) were mapped using the wheat database Synthetic x Opata DH. GWA analyses were conducted for each environment using a mixed model with genetic relatedness as random effect. We found 25 and 24 significant markers for yield under MWS and FI, respectively, on chromosomes 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4B, 5B, 6A and 6B for both water regimes and in chromosomes 2D, 3D and 7B only for MWS. For LR, 12 associations were detected on chromosomes 1B, 2A, 2D, 3A, 3B, 3D, 4B, 6A and 6B. All markers positions were confirmed using the BLAST of International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). This study provides significant marker trait associations that can be used for enhancing yield and LR resistance through molecular breeding at INIA.

Fig. 1. Manhattan plot for Association Mapping using Kinship model A. Significant markers for Leaf Rust (LR) Resistance B. Significant markers for Yield under Irrigation (YIELD_I) C. Significant markers for Yield under mild water stress (YIELD_MWS). Dotted line show the threshold above we consider significant markers associated to QTL.

References:

Elshire, Robert *et al.* 2011. "A Robust, Simple Genotyping-by-sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species." *PLoS One* 6: e19379
Poland, Jesse *et al.* 2012. "Genomic Selection in Wheat Breeding Using Genotyping-by-Sequencing." *The Plant Genome Journal* 5:103.



INIA-Chile, INIA-Uruguay y el Centro Internacional de la Papa unen esfuerzos para desarrollar variedades de papa y trigo tolerantes al Cambio Climático

María Teresa Pino¹, Julio Kalazich¹, Iván Matus¹, Luis Inostroza¹, Patricio Sandaña¹, Raymundo Gutierrez², Bettina Lado³, Marina Castro³. ¹ INIA-Chile, ²Centro internacional de la Papa, ³INIA-Uruguay.

Todos los escenarios a nivel mundial proyectan alzas en las temperaturas, variaciones en los patrones de precipitaciones y mayor ocurrencia de eventos climáticos extremos.

Los estudios del Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC, sigla en inglés) muestran que en conjunto con un alza en las temperaturas promedios también se observan variaciones en los patrones de precipitaciones y mayor frecuencia en la ocurrencia de eventos climáticos extremos. En casi todos los escenarios a nivel mundial se proyecta que la temperatura promedio subiría entre 1,8°C y 4°C a final de este siglo, mientras el nivel del mar subiría entre 29 y 82 centímetros, producto del derretimiento de los hielos polares y de los glaciares. Está pronosticado que esto tendrá graves consecuencias debido a que según se asegura, el umbral crítico de aumento de la temperatura es de alrededor de 2°C. En Chile, el escenario climático al 2040 proyecta intensificación de aridez en la zona norte y el avance del desierto hacia el sur. Se produciría un aumento de la temperatura promedio de 2°C a 4°C, mientras que las precipitaciones disminuirían en alrededor del 30% en la zona central y aumentarían en los extremos del país (CONAMA, 2006). Más allá de los escenarios climáticos proyectados, Chile en los últimos años ha enfrentado importantes periodos de sequía, particularmente la zona centro norte del país. Los embalses de la región de Coquimbo han estado operando a menos de la mitad de su capacidad histórica, alcanzando niveles preocupantes: Puclaro un 4%, La Paloma un 3% y Cogotí inferior al 1%.

Los Sistemas Productivos de Secano Serían los más Afectados por el Cambio Climático

Como la agricultura depende de la disponibilidad de agua, cualquier cambio en el régimen de precipitaciones y en particular la sequía afectarían a gran parte de los cultivos y frutales de nuestro país. Los sistemas productivos de secano serían los más afectados, porque dependen de las precipitaciones estacionales. Por otra parte, la implementación de riego en cultivos de secano no es fácil, la pequeña y mediana agricultura serían las más vulnerables considerando su baja capacidad de inversión.

El efecto de la sequía sobre los rendimientos de los cultivos de secano depende de la especie, del estado de desarrollo del cultivo y de la duración de la sequía. En trigo, el aumento de temperaturas y la sequía aceleran el desarrollo del cultivo, causan aborto floral, y acortan el periodo de llenado del grano. El periodo más crítico a estrés por sequía ocurre durante la floración

y llenado de granos, causando pérdidas importantes en los rendimientos. A nivel mundial, la sequía ha afectado la producción de trigo en diferentes regiones en las últimas temporadas; las sequías en Estados Unidos, Rusia y Australia, causaron la mayor reducción en la oferta de trigo a nivel global desde el año 2003. Kansas, el mayor productor de trigo de invierno de Estados Unidos, no sólo enfrentó las peores condiciones climáticas en casi tres décadas; también sufrió una de las peores sequías en el año 2012. En Asia Central, Kazajstán (país que ocupa el sexto lugar entre los mayores exportadores de trigo del mundo), también enfrentó estrés por sequía y altas temperaturas durante el 2012, lo cual significó una reducción en la producción de trigo del 57%; mientras normalmente cosechaban 42 granos en cada espiga, esa temporada cosecharon sólo 2 a 4 granos por espiga.

En papa, el incremento de las temperaturas y la sequía afectan el crecimiento vegetativo, inhiben la tuberización, tamaño y calidad del tubérculo. El periodo crítico a déficit hídrico es durante la tuberización o llenado de tubérculos. Las proyecciones indican que la sequía y el aumento de temperaturas causaría una disminución de los rendimientos en papas, particularmente en zonas donde “no exista” la posibilidad de implementar riego tecnificado. Por otra parte la temperatura nocturna tiene una influencia crucial en la diferenciación de tubérculos y formación de almidón. Cuando la temperatura supera los 22°C el desarrollo de los tubérculos se ve severamente afectado. La disminución esperada de los rendimientos en varios países, particularmente de regiones tropicales y subtropicales, llegará al 20–30%. Durante estas últimas temporadas, la sequía ha afectado a 130.000 hectáreas de papa en Colombia, causando pérdidas en la producción del 50%. Contrariamente, se espera que el cambio climático tenga un efecto favorable sobre los rendimientos en zonas de cultivo de mayor latitud y mayor altitud, siempre y cuando no existan limitaciones de agua. Por otra parte, el aumento sostenido de la temperatura ejerce una alta presión de selección sobre las papas silvestres; el CIP estima que cerca del 20% de ellas corren el riesgo de extinguirse para el año 2055.

El consorcio INIA-Chile, INIA-Uruguay y el Centro Internacional de Papa (CIP) trabaja en la selección y desarrollo de genotipos de trigo y papa con mayor tolerancia a la sequía y a altas temperaturas.

El consorcio INIA-Chile, INIA-Uruguay y el Centro Internacional de Papa (CIP) busca aumentar la competitividad y sustentabilidad de cultivos de papa y trigo frente al Cambio Climático, a través de la selección y desarrollo de genotipos con mayor tolerancia a sequía y a altas temperaturas. Fundamentalmente busca poner a disposición de los programas de mejoramiento genético regionales; genotipos tolerantes a sequía y a altas temperaturas, protocolos de caracterización genética y fenotípica eficientes y estandarizados. En este contexto y con financiamiento de los proyectos FONTAGRO ATN/OC-11943-RG (Fondo SECCI) y Cambio Climático (*MINAGRI 501364-70*) se han evaluado 380 genotipos de trigo y sobre 200 genotipos de papa en los diferentes países con el apoyo de un grupo interdisciplinarios de profesionales en las áreas de mejoramiento genético, fisiología vegetal, biología molecular y manejo agronómico.

Los materiales de trigo evaluados en el contexto del consorcio provienen de los programas nacionales de mejoramiento genético de INIA-Chile (55 genotipos), del CIMMYT (143 genotipos) e INIA-Uruguay (186 genotipos). En Chile y durante estas últimas temporadas, los 384 genotipos fueron evaluados en campo bajo dos condiciones hídricas (riego y déficit hídrico) en Santa Rosa y además fueron evaluadas en Cauquenes (déficit hídrico severo). Ambos ambientes presentan clima mediterráneo, pero difieren en el tipo de suelo y cantidad de precipitaciones. En Cauquenes (35° 58'S; 72° 17'O) el suelo es de origen granítico (Alfisol), presenta baja fertilidad y las precipitaciones no superan los 500 mm/año. Por otro lado, en Chillán (36°31' S; 71°54' O) el suelo es de origen volcánico (Andisol), presenta una adecuada fertilidad para el cultivo del trigo y las precipitaciones pueden superar los 1000 mm/año. Los materiales de trigo fueron evaluados en función del rendimiento, componentes del rendimiento, parámetros fisiológicos y moleculares. Basado en índices de selección de tolerancia a sequía, los cuales integran el rendimiento bajo riego y sequía, se identificaron en Chile 16 genotipos contrastantes en rendimiento (tolerantes y sensibles) en ambas condiciones (riego y sequía). Esos genotipos fueron nuevamente fenotipados en campo en INIA La Estanzuela, Uruguay (34° 20'S, 57° 42'O), en suelos con una adecuada fertilidad para el cultivo del trigo (Brunosol Eutríco Típico LAc v) y bajo techos corredizos para evitar el efecto de las precipitaciones.

Por otra parte, con fondos del proyecto se caracterizaron genéticamente las 384 líneas de trigo utilizando una metodología de secuenciación de última generación conocida como GBS (sigla en inglés para Genotyping-by-Sequencing), trabajo que se realizó en colaboración con Kansas State University (EEUU) y el Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Université Laval (Quebec, Canada). Esta técnica permite la selección de genotipos sobresalientes en caracteres que se busca mejorar, como tolerancia a sequía o rendimiento de grano, mediante la integración de información fenotípica y genotípica en modelos de predicción. Se identificaron 102.324 marcadores moleculares tipo SNP (single nucleotide polymorphism) y se ajustó el modelo de predicción (GBLUP) para rendimiento de grano (RG); este análisis permitió identificar los mejores genotipos (predicción de progenitores con alto RG) mediante el cálculo de sus 'valores de cría', índice que integra la información fenotípica (RG) y genotípica (SNP), en cada ambiente y entre los distintos ambientes. También se realizó análisis de 'mapeo asociativo', procedimiento que permite identificar regiones genómicas o genes de interés para la tolerancia a sequía.

En papa, se han evaluado sobre 200 genotipos entre Chile y el CIP, incluyendo germoplasma nativo, líneas segregantes, líneas avanzadas y cultivares, los cuales han sido caracterizados por su respuesta a sequía y altas temperaturas. El protocolo de evaluación en papas considera evaluaciones en campo bajo riego y sequía, evaluaciones fisiológicas detalladas para genotipos contrastantes (sensibles y tolerantes) y evaluaciones moleculares que incluyen expresión génica y genotipado. Al igual que en trigo, se está utilizando la metodología de secuenciación de última generación (GBS, sigla en inglés para Genotyping-by-Sequencing), trabajo que se realiza en el Institute for Genomic Diversity, Cornell University (EEUU). La evaluación en campo ha considerado evaluar los distintos genotipos tanto en condiciones de riego como de sequía en diferentes áreas geográficas de cada país (Tabla 1). En este contexto el CIP durante la ejecución del proyecto evaluó

un total de 918 accesiones de papas basados en los índices de selección de tolerancia a sequía, los cuales integran el rendimiento bajo riego y sequía. Entre los índices evaluados, MP (productividad Media), GMP (productividad media geométrica) y DTI (tolerancia a sequía) permitieron identificar un grupo de accesiones con alta producción en ambas condiciones (riego y sequía). Además, el INIA-Chile ha estado evaluando cada temporada con esta metodología líneas de papas avanzadas prontas a convertirse en cultivares comerciales con el objeto de entregar al productor información relevante respecto a cómo estos materiales se comportarían frente a eventos climáticos como sequía y altas temperaturas.

Por otra parte, en el proyecto FONTAGRO se ha estado calibrado y validando el modelo de simulación AQUACROP (creado por la FAO) en cinco genotipos de trigo y en los cultivares Karu-INIA y Desiree-INIA en condiciones de riego y secano. Esta herramienta permitirá no solo predecir los cambios en rendimientos de este cultivo en respuesta al futuro cambio climático, sino que también ayudara a diseñar y evaluar estrategias de manejo (ej: épocas de plantación y necesidades de riego) que permitan mantener o incrementar los rendimientos en futuros escenarios climáticos.

El consorcio INIA-Chile, INIA-Uruguay y el CIP ha permitido identificar líneas parentales tolerantes a sequía que ya están siendo incorporados a los programas de mejoramiento genético de cada país. Asimismo, los cultivares actualmente comercializados han sido evaluado en función de su respuesta a sequía y altas temperaturas, lo cual ha permitido identificar algunos materiales genéticos que tienen mejor comportamiento frente a eventos de sequía, destacan líneas de papas avanzadas como R89063-59 y R90160-5, y cultivares como Karú-INIA.

Asimismo, este proyecto ha permitido presentar sus resultados en por lo menos 20 congresos nacionales e internacionales, cuatro publicaciones científicas de alto impacto, por lo menos 10 días de campo, tres talleres regionales entre los países miembros del consorcio, y países como España, Estados Unidos y otros países Latino Americanos en temas como estrategias de genética asociativa, evaluación de la tolerancia a factores abióticos, metodología de secuenciación de última generación y la formación de por lo menos 10 tesis en esta temática. Además, este proyecto cuenta con una página web que entrega información sobre sus objetivos, avances, resultados y actividades de difusión. Su link es http://platina.inia.cl/ftg_cluype/

Tabla 1. Lugares en Perú y Chile utilizados para evaluaciones de respuesta a sequía y altas temperaturas en papas.				
País	Lugar	Ubicación	Periodo de cultivo	Temperaturas promedios y precipitaciones acumuladas durante el periodo de cultivo
Perú	La Molina	Lat.:12°04'41.20"S Long.:76°56'36.50"E Alt.: 243 msnm	Oct.2010- Ene.2011	Temp promedio máxima 25.2°C, Temp Min Prom 17.3°C. Precipitación acumulada 0 mm. Desértico árido subtropical costanero.
	Huancayo	Lat.:12°00'34.96"S Long.:75°13'22.50"E Alt.: 3293 msnm	Ene.2011-Abril.2011	Temp promedio máxima 24.9°C, Temp Min Prom 9.3°C. Estuvo bajo los techos corredizos, para evitar el efecto de las precipitaciones
	Majes, Arequipa	Lat:16°29'27"S, Long.:72°05'33"E, Alt:1,268 msnm,	Oct.2011- Feb.2012	Temp promedio máxima 26.2°C, Temp Min Prom 13.6°C. Precipitación acumulada 0 mm. Desierto árido.
Chile	La Platina, RM	Lat:33°34'12"S, Long: 70°38'O Alt: 625 msnm	Oct.2011- Marz.2012	Temp promedio máxima 32.8°C, Temp promedio 18.6°C. Precipitación acumulada 0mm
	La Platina, RM	Lat:33°34'12"S, Long: 70°38'O Alt: 625 msnm	Sept.2012- Marz.2013	Temp promedio máxima 35.5°C, Temp promedio 17.4°C. Precipitación acumulada 68mm
	Remehue, Osorno	Lat: 40°31' S Long: 73°03'O Alt: 65 msnm.	Oct.2011- Abril.2012	Temp promedio máxima 20.9°C. Temp promedio 13.8°C, Precipitación acumulada 279 mm
	Remehue, Osorno	Lat: 40°31' S Long: 73°03'O Alt: 65 msnm.	Oct.2012- Abril.2013	Temp promedio máxima 20.3°C. Temp promedio 13.9°C. Precipitación acumulada 375 mm



Día de Campo en Cauquenes, Chile (35°58'0"S 72°21'0"O) Octubre de 2012.



Día de Campo realizado en INIA La Estanzuela Uruguay (34°20'S, 57°42'O) Octubre 2012

Se publicará la segunda quincena de enero del 2014 en TIERRA ADENTRO N° 106, <http://www.inia.cl/prensa/revista-tierra-adentro/>



Curso Teórico-Práctico "Evaluación de la tolerancia a factores abióticos", Mayo 2012 (Cuzco, Perú)



Workshop Proyecto FONTAGRO en INIA La Estanzuela, Mayo 2013 (Colonia, Uruguay)



Ensayos bajo invernadero en genotipos contrastantes de papas (sensibles y tolerantes a sequía) para evaluaciones fisiológicas detalladas y expresión de genes (INIA Chile)

Caracterización fenotípica de alta precisión: el nuevo desafío del mejoramiento genético de la tolerancia a sequía en especies cultivadas como el Trigo

Luis Inostroza Ing.Agr. Dr linostroza@inia.cl INIA Quilamapu	Marina Castro. Ing.Agr. PhD INIA Uruguay	María-Teresa Pino Ing.Ag.PhD INIA La Platina
Iván Matus. Ing.Agr. MSc.PhD INIA Quilamapu	Bettina Lado Bioq. MSc INIA-Uruguay	Julio Kalazich Ing.Ag.PhD INIA Remehue
Alejandra Rodriguez. Ing.Agr. INIA Quilamapu	Raymundo Gutiérrez. Ing.Ag.MSc CIP	Patricio Sandaña Ing.Ag.Dr INIA Remehue

Mejoramiento genético y alimentación humana

Incrementar la tolerancia a sequía y/o eficiencia en el uso del agua de las especies vegetales cultivadas es un desafío para muchos programas de mejoramiento genético, tanto públicos como privados a nivel mundial. El problema radica en el incremento en la demanda de alimentos ocasionado por el crecimiento sostenido de la población mundial y la competencia por el recurso hídrico entre los distintos agentes de la sociedad global (agricultura, urbanismo e industrias).

En el año 1804 la población humana alcanzó el primer billón de habitantes y tomó cerca de 118 años en duplicarse (2 billones). Posteriormente, la segunda guerra mundial gatilló un incremento similar en la población pero en sólo 37 años. Las generaciones nacidas durante éste periodo (1945-1955) han sido testigos de una nueva duplicación de la población, pero ahora desde los 3 a los 6 billones de habitantes en la actualidad. Se estima que para los próximos 20 años la población incrementará en cerca de 2 billones de habitantes. Por otro lado, el consumo anual de agua dulce de la población humana es cercano a los 4.500 km³, de los cuales el sector agrícola ocupa cerca del 70% en sus procesos productivos. La fuerte competencia por el recurso hídrico entre los distintos sectores de la sociedad (agricultura, urbanismo e industrias) presiona a incrementar la producción de alimento con menores volúmenes de agua. La problemática se acentúa al considerar los efectos del cambio climático en los ambientes agrícolas de Chile Continental, donde se estima que para finales del siglo XXI las precipitaciones se reducirán en torno al 25% en primavera y 40% en verano.

Hasta ahora, la demanda de alimentos ha sido satisfecha por el sector agrícola. Desde el año 1800 hasta la primera mitad del siglo XIX, el incremento en la producción de alimento se asoció estrechamente a la incorporación de nueva superficie arable para la agricultura. Hoy ésta estrategia no es posible y existe fuerte restricción al crecimiento de la superficie agrícola por efecto del crecimiento demográfico.

La 'Revolución Verde' fue un hito histórico que impactó significativamente la producción de alimentos. En la década de los 60', la incorporación de los fertilizantes sintéticos y la implementación de técnicas de riego en los sistemas productivos agrícolas, iniciaron una revolución en las ciencias agronómicas. Por otro lado, los avances en el mejoramiento genético, asociado al descubrimiento de los genes de enanismos en cereales, permitieron cambiar la partición de la biomasa desde los tallos al grano. Desde la 'Revolución Verde' la productividad de los cultivos se ha incrementado

<http://www.inia.cl/prensa/revista-tierra-adentro/>, en TIERRA ADENTRO N° 106, que se publicará la segunda quincena de enero del 2014:

en paralelo a la demanda de alimentos de la población mundial, esto sin incrementos en superficie cultivable. Existe un claro consenso entre mejoradores y agrónomos para atribuir los incrementos en la producción de alimentos tanto a los avances en la agronomía (50%) y mejoramiento genético de los cultivos (50%).

Caracterización genética vs caracterización fenotípica

Históricamente el mejoramiento genético se ha definido como una mezcla entre ciencia y arte. Hoy los desafíos son complejos y los avances en el conocimiento de la genética a nivel molecular son asombrosos. Desde la secuenciación completa del genoma humano durante el año 2003 ya siete genomas de especies vegetales han sido secuenciados completamente, de estos seis corresponden a especies cultivadas (arroz, maíz, sorgo, vid, álamo y papaya) y uno a la especie modelo *Arabidopsis*.

Uno de los avances más impactantes en el campo de la genética molecular ha sido la disminución en los costos de secuenciación, lo que se expresa relativo al costo de secuenciar un genoma humano. Por ejemplo, en el año 2001 el costo por secuenciar un genoma humano alcanzaba los 90 millones de dólares, hoy con las nuevas técnicas de secuenciación-masiva (NGC, next generation sequencing) el costo ha bajado a los 8.000 dólares/genoma y se trabaja para lograr secuenciar un genoma en menos de 24 horas a un costo de 1000 dólares (<http://www.genome.gov/sequencingcosts/>). Todos estos avances han impactado la genética vegetal, actualmente se dispone de mapas genéticos organizados por marcadores moleculares de distintos tipos (SSR y SNP), se conocen secuencias de genes de importancia agronómica (resistencia a enfermedades, calidad de grano, entre otros) y su ubicación en el genoma. Información que permite seguir la herencia de caracteres fenotípicos de interés y facilitar su introgresión dentro del material elite. De esta manera disminuyendo significativamente los costos, en términos de tiempo y dinero, para el desarrollo de nuevos cultivares comerciales.

Con lo descrito en el párrafo anterior, queda de manifiesto la importancia de la información molecular en el mejoramiento genético de especies vegetales. Sin embargo, su uso potencial depende de la capacidad para asociarla a la expresión de caracteres fenotípicos de importancia agronómica, como lo es la tolerancia a sequía. La secuencia de un gen 'x' no sirve de nada si se desconoce su función en la planta y su efecto sobre el fenotipo. Los análisis genéticos que permiten estudiar la asociación genotipo/fenotipo también han evolucionado en el tiempo desde los análisis clásicos de QTL (loci de caracteres cuantitativo) hasta los análisis de selección genómica. Los últimos no sólo buscan encontrar la asociación genotipo/fenotipo sino que también predecir el fenotipo en función de la información genética. En este sentido, los avances en el mejoramiento genético de la tolerancia a sequía de especies vegetales cultivadas se ve limitado por la escasez de metodologías de caracterización fenotípica bajo condiciones de campo, estandarizadas y de alta precisión, que sean un complemento a la información genética.

Proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943: desarrollo de herramientas fisiológicas para la selección de plantas tolerantes a sequía

En términos genéticos la tolerancia a sequía es un carácter fenotípico complejo, esto significa que es un carácter controlado por muchos genes que son altamente influenciados por el ambiente donde crecen las plantas. Por esta razón la tolerancia a sequía es un carácter difícil de mejorar. En este contexto, uno de los objetivos del proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943 fue "identificar y estandarizar métodos eficientes de selección de genotipos tolerantes a sequía y altas temperaturas". Para ello se trabajó con los Programas Nacionales de Mejoramiento Genético de trigo y papa de

<http://www.inia.cl/prensa/revista-tierra-adentro/>, en TIERRA ADENTRO N° 106, que se publicará la segunda quincena de enero del 2014:

tres países del Cono Sur de América (Chile, Uruguay y Perú). Un grupo multidisciplinario de investigadores provenientes de INIA-Chile, INIA-Uruguay y el Centro Internacional de la Papa en Perú, unieron esfuerzos para caracterizar fenotípicamente 384 genotipos de trigo y 200 genotipos de papa en diversos ambientes, donde la sequía y las altas temperaturas son los estreses ambientales que más limitan la productividad de los cultivos. A continuación se presentan los principales resultados de la selección de genotipos de trigo tolerantes a sequía.

Estrategias para evaluar tolerancia a sequía en trigo

Durante dos temporadas de crecimiento (2011/12 y 2012/13), se establecieron 384 accesiones de trigo en dos ambientes representativos de la zona cerealera de Chile. En Cauquenes (35° 58'S; 72° 17'O; Foto 1A) el suelo es de origen granítico y presenta baja fertilidad; las precipitaciones no superan los 500 mm/año. En Chillán (36°31' S; 71°54' O; Foto 1B) el suelo es de origen volcánico y presenta una adecuada fertilidad para el cultivo del trigo; las precipitaciones pueden superar los 1000 mm/año. Ambos ambientes presentan clima mediterráneo, donde el cultivo del trigo sufre una sequía de tipo terminal durante el periodo de llenado de grano. En Chillán, se establecieron dos experimentos, uno manejado bajo condiciones de riego y otro bajo secano. En Cauquenes sólo se cultivó bajo condiciones de secano. En todos los ensayos, se instalaron sensores de capacitancia para monitorear la humedad del suelo (Foto 2A), los que registraron en intervalo horario el contenido de humedad volumétrico (Foto 2B).

Durante el periodo de crecimiento vegetativo se midió la fracción de radiación fotosintéticamente activa interceptada (FIPAR) con un ceptómetro (Foto 2C). Durante el periodo de llenado de grano se midió en la hoja bandera el contenido de clorofilas con un medidor SPAD-502 (Minolta, Foto 2D), el contenido relativo de agua mediante registro del peso fresco, túrgido y seco de la hoja (CRA, Foto 2E) y área foliar específica mediante el registro del peso seco y área de las hojas. También se determinó la temperatura de la planta mediante termometría infrarroja (Foto 2F), la discriminación isotópica del ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$), mediante espectrometría de masa y el contenido de carbohidratos no estructurales presente en los tallos al inicio y al final del periodo de llenado de grano. Por otro lado, la caracterización agronómica contempló el registro de la fecha de espigadura, número de tallos por metro cuadrado, altura de planta, rendimiento de grano y sus componentes (peso mil granos, número de granos por espigas, entre otros).

Los resultados mostraron una amplia variabilidad genética en todos los caracteres fenotípicos evaluados. El rendimiento grano varió entre localidades, temporadas de crecimiento y ambientes hídricos (riego vs secano). En Chillán, durante la primera y segunda temporada de crecimiento la sequía redujo el rendimiento de grano en un 25 y 10%, respectivamente (Figura 1), reflejando la mayor severidad de la sequía durante la primera temporada. Algunos caracteres mostraron un alto grado de asociación con el rendimiento de grano evaluado bajo condiciones de sequía (Figura 2). Por ejemplo, el índice de tolerancia a sequía (IST), calculado a partir de los datos de rendimiento de grano evaluado bajo condiciones de riego y secano, permitió seleccionar accesiones con tolerancia a sequía divergente (Tolerantes vs Sensibles). Las que se diferenciaron en su comportamiento agronómico y fisiológico bajo condiciones de sequía (Tabla 1).

Consideraciones finales

El proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943 permitió validar e implementar una plataforma de caracterización fenotípica bajo condiciones de campo. La que

<http://www.inia.cl/prensa/revista-tierra-adentro/>, en TIERRA ADENTRO N° 106, que se publicará la segunda quincena de enero del 2014:

actualmente se encuentra disponible en los Programas de Mejoramiento Genético de trigo de los países del Cono Sur de América. La plataforma considera protocolos para la evaluación de caracteres fisiológicos de forma rápida y económica. Además integra elementos computacionales que facilitan la digitalización instantánea de la información colectada. La plataforma fenotípica permite identificar variabilidad genética en caracteres agronómicos y fisiológicos relacionados con la tolerancia a sequía del cultivo de trigo, lo que facilita la selección y mejora genética del carácter. En este estudio se identificaron 8 genotipos tolerantes a sequía, los que se están caracterizando genéticamente para entender los mecanismos moleculares que le confieren el atributo señalado.

Con la información fisiológica obtenida, en términos de su control sobre el comportamiento agronómico del cultivo de trigo bajo condiciones de sequía, se avanzará en la automatización de los procesos de fenotipo mediante la integración de imágenes aéreas multiespectrales. Las que permitirán evaluar caracteres fisiológicos de forma rápida y económica. Por otro lado, hoy se avanza, para integrar a la plataforma fenotípica, en el desarrollo de técnica de caracterización fenotípica de raíces, las que cumplen un rol fundamental en los mecanismos de tolerancia a sequía de todas las especies cultivadas..

Tabla 1. Media grupal para caracteres agronómicos y fisiológicos evaluados en genotipos de trigo con tolerancia divergente a sequía (tolerantes y sensibles), evaluados bajo condiciones de secano en Chillán.

Carácter Fenotípico	Sensibles	Tolerantes
Rendimiento grano (Ton/ha)	5.20	7.30
Stay green (SPAD/día)	-0.42	-0.53
$\Delta^{13}C$ (‰)	16.4	17.3
FIPAR (%)	82.2	89.4

EN EDICION REVISTA TA

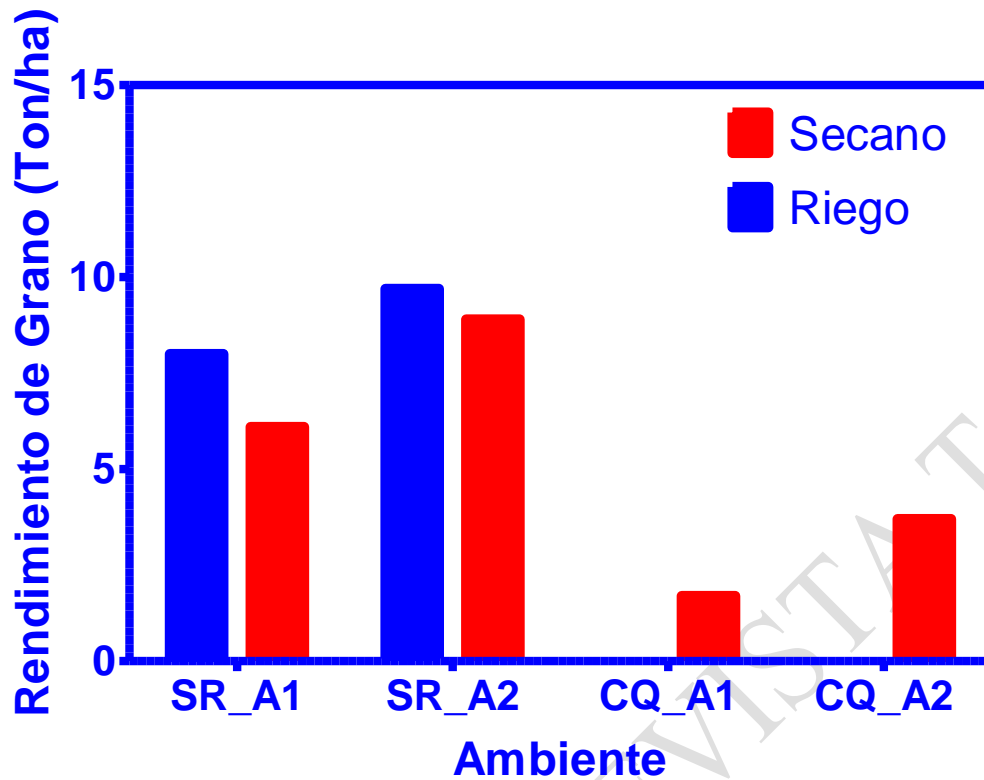


Figura 1. Rendimiento de grano de 384 genotipos de trigo evaluado durante dos temporadas de crecimiento (A1= 2011/12 y A2=2012/13), dos localidades (Cauquenes (CQ) y Chillán (SR)) y dos ambientes hídricos (riego y secano).

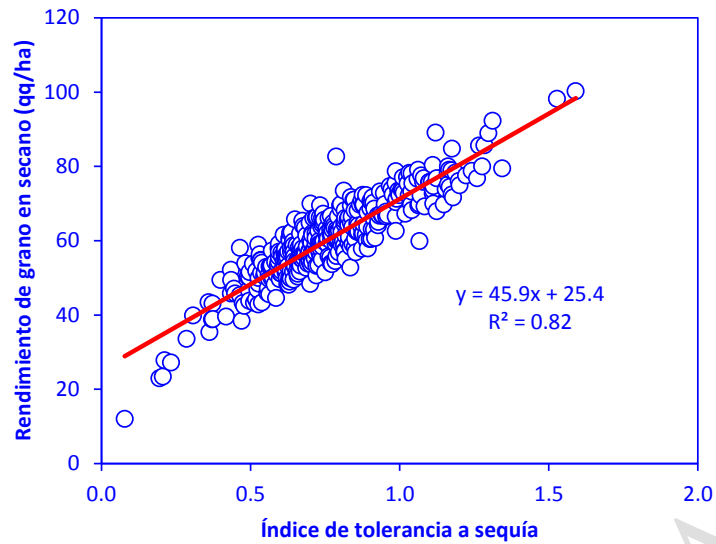


Figura 2. Relación entre el índice de tolerancia a sequía y el rendimiento de grano evaluado bajo condiciones de secano.

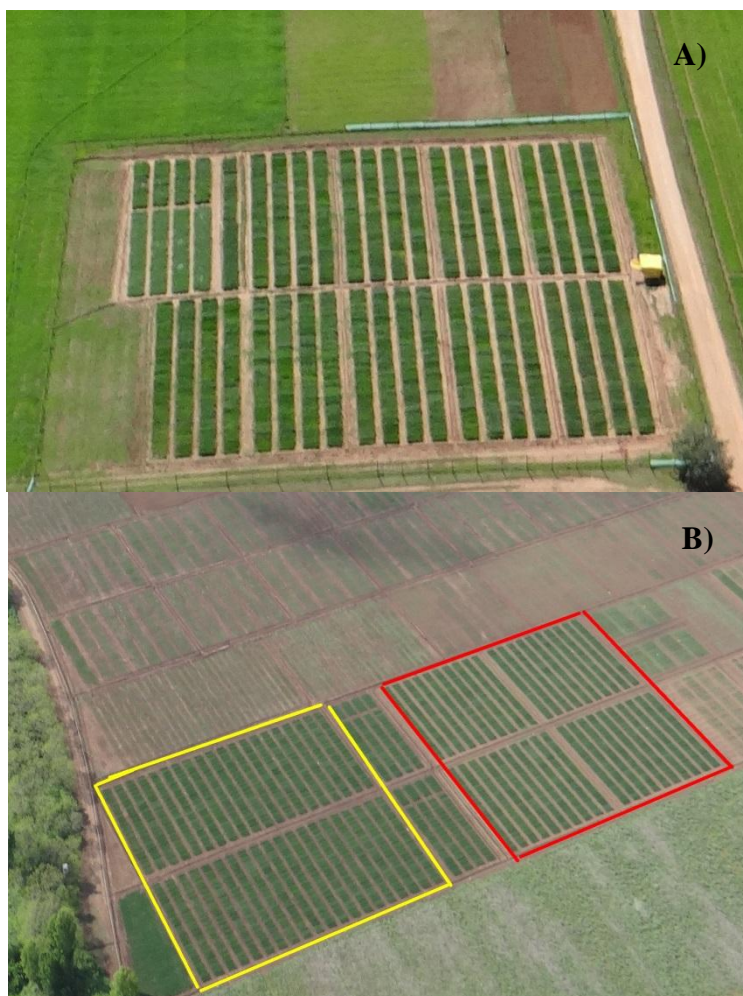


Foto 1. Foto panorámica de los experimentos de caracterización fenotípica de 384 genotipos de trigo en Cauquenes (A) y Chillán (B). Cuadrado rojo y amarillo señalan experimentos manejados bajo condiciones de riego y secano, respectivamente.



Foto 2. Instalación de sensores de capacitancias para monitoreo de la humedad del suelo (A), Registro y descarga de registro temporal del contenido de humedad de suelo (B), medición de la fracción de radiación fotosintéticamente activa interceptada con un ceptómetro (C), medición del contenido de clorofilas en hoja bandera (D), colecta de hoja bandera para la determinación de contenido relativo de agua y área foliar específica (F), medición de la temperatura de la planta mediante termometría infrarroja (F).

SELECCIÓN GENÓMICA Y MEJORAMIENTO DE TRIGO.

**Dalma Castillo¹, Ivan Matus¹, Luis Inostroza¹, Alejandro del Pozo²,
Alejandra Rodríguez¹, Bettina Lado³, Martin Quincke³, Marina Castro³, Jari Von
Zitzewitz⁴**

1 INIA-Quilamapu-Chile, 2:Universidad de Talca, 3:INIA-La Estanzuela-Uruguay, 4: SECOBRA Saatzucht, Alemania.

La creciente demanda alimenticia es un desafío que obliga a los mejoradores de cultivos a incrementar de manera sostenida la productividad, logrando, mediante los procesos de mejoramiento genético, ajustar el ciclo de crecimiento y los requerimientos del cultivo a nuevas zonas, perfeccionando además características agronómicas que favorecen la resistencia tanto a enfermedades y plagas, como a condiciones ambientales adversas, por ejemplo, altas y bajas temperaturas y déficit hídrico.

Los métodos convencionales de mejoramiento genético de cultivos (cruzamiento, retrocruzamiento y selección a campo de genotipos más promisorios) han sido y siguen siendo fundamentales en la obtención de variedades con las características deseadas. Sin embargo, durante los últimos años se han incorporado técnicas biotecnológicas que ofrecen diversas ventajas, entre las que se destacan la inclusión de genes de interés presentes en otras especies dentro del cultivo objetivo del mejoramiento (transgénesis) y la posibilidad de acortar los tiempos en la obtención de un cultivar con las características deseadas. La selección asistida por marcadores moleculares (SAM), se incluye dentro del grupo de métodos que permiten reducir estos tiempos, y se basan en la identificación de marcadores asociados a genes de interés. Sin embargo, la selección asistida por marcadores moleculares (SAM), y la transgenia, han permitido avanzar y mejorar, principalmente, caracteres del tipo cualitativos, pero no facilita el desarrollo de nuevas variedades de cultivos puesto que los caracteres cuantitativos, también llamados complejos o poligénicos, de alta importancia agronómica y económica, son difíciles de identificar con estas metodologías.

Frente a esto último se ha desarrollado una nueva forma de análisis llamada Selección Genómica (SG), en la cual se seleccionan los mejores individuos basándose en el valor de cría estimado o valor de la progenie (GEBV). A diferencia de otros análisis, la SG, considera la totalidad de la varianza genética de cada individuo mediante la suma de los efectos de los alelos, logrando identificar regiones genómicas cuyo efecto sobre el fenotipo es reducido, las cuales se enmascaran en un análisis genómico clásico. Esta capacidad de predicción de caracteres complejos hace de la selección genómica una metodología clave en un programa de mejoramiento genético vegetal.

Hoy en día, el proceso de selección de genotipos de alto potencial de rendimiento y tolerancia a condiciones adversas como estrés hídrico, demora aproximadamente 10 a 15 años. La selección genómica sugiere avances sustanciales en la eficiencia de selección combinando la caracterización molecular y la selección a campo (caracterización fenotípica). Así permitiría reducir el ciclo de selección y aumentar la eficiencia en combinación con métodos de avance generacional (descendencia por semilla única en autógamias, doble haploides, entre otros), ya que SG lograría inferir la información para selección, basándose en el ADN del individuo.

Una de las ventajas más importantes para un programa de mejoramiento, es aplicar SG en la generación F2, seleccionando así desde el comienzo los genotipos de interés y a la vez, generar información para poder predecir los cruzamientos que generan individuos con mayores potenciales.

Para aplicar selección genómica y realizar estas predicciones es necesario, realizar el siguiente proceso, resumido también en la Figura 1:

- Saturar el genoma con marcadores moleculares, de la especie involucrada de manera amplia y con alta densidad. Es importante enfatizar que esta herramienta debe ser accesible (en referencia a su simplicidad y costos) de ser aplicada en un programa de mejoramiento.
- Utilizar métodos de caracterización fenotípica (fenotipado) de alta precisión.
- Y desarrollar un modelo estadístico adecuado con información genética y fenotípica de un conjunto de individuos que formen parte del programa de mejoramiento. Dicho modelo permite predecir el comportamiento fenotípico de variedades aunque no se cuente con su información fenotípica.

De este modo, se podrían seleccionar genotipos conjugando factores importantes tanto para mejoradores, como productores y la industria tales como rendimiento de grano y la calidad industrial sin necesidad de contar con una serie de años o ambientes con estreses bióticos y abióticos extremos para poder seleccionar el material.

En Chile, esta metodología aún no es incorporada a los programas de mejoramiento. Sin embargo, el Programa de Mejoramiento de Trigo de INIA-Quilamapu, dentro del marco del proyecto Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO)-8038, titulado: "Aumento de la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo en Sudamérica ante el cambio climático", desarrollado por INIA-Chile e INIA-Uruguay, ha iniciado el desarrollo preliminar de esta metodología. Para eso se utilizaron 384 líneas de trigo de primavera cuyo origen era Chile, Uruguay y CIMMYT. Estas líneas de trigo fueron secuenciadas, lo que permitió la identificación de 28.199 marcadores moleculares SNP (Polimorfismo de nucleótido

único), de interés para el programa de mejoramiento. Luego, con el objetivo de validar los SNPs, en su aplicación en el cálculo de predicciones fenotípicas, se utilizaron datos de rendimiento y peso de mil granos obtenidos a partir de ensayos de campo (para todos los individuos) establecidos en campo experimental en Santa Rosa, Chillán, (36°34'WS) Chile, bajo 2 condiciones hídricas contrastantes, riego y seco.

Rendimiento, es una variable de interés y de difícil predicción. Su expresión depende de la interacción entre un gran número de genes y una serie de procesos bioquímicos, que se definen por la combinación de factores genéticos y ambientales como características de suelo, precipitaciones, fertilización, temperatura ambiental e interacción genotipo x ambiente (GxE), en cambio Peso de Mil Granos presentó un mayor valor de heredabilidad que el anterior, por lo que supone una mejor predicción.

Si bien la Selección Genómica es una metodología que continúa en desarrollo, este trabajo aporta evidencias que indican que sería un método aplicable a programas de mejoramiento genético de trigo., lo cual sumado en los decrecientes costos en secuenciación y a nuevas tecnologías de caracterización genotípica que permiten individualizar especies de genomas complejos, con un número de marcadores masivos y sin genoma de referencia, como es el caso de trigo, potenciando aun más la utilidad de SG en especies productivas.

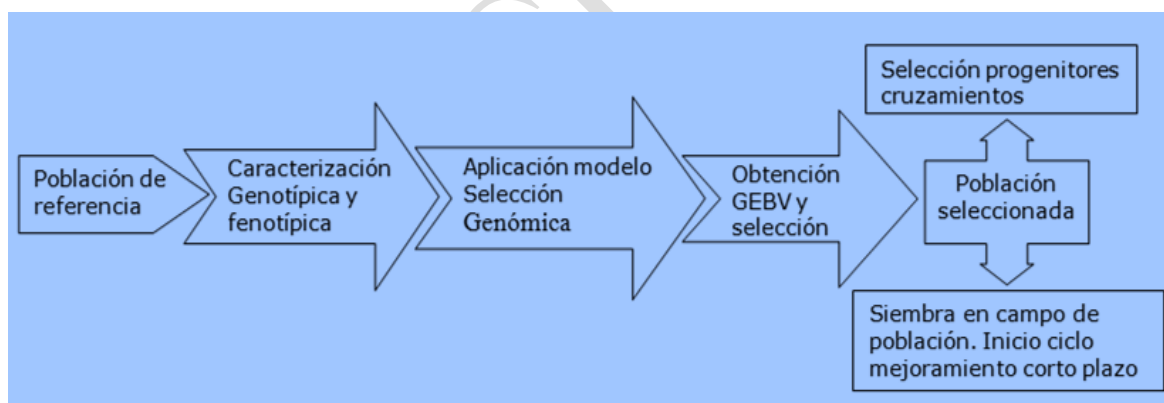


Figura 1: Diagrama aplicación de Selección Genómica en programa de mejoramiento de trigo

EN EDICION RTA

<http://www.inia.cl/prensa/revista-tierra-adentro/>, en TIERRA ADENTRO N° 106, se publicará la segunda quincena de enero del 2014:

The 12th International Wheat Genetics Symposium

12th IWGS

INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM



12th International Wheat Genetics Symposium. 2013

Discovering novels QTL in Uruguayan Wheat Germplasm using Genome Wide Association Analysis

Lado, B.^{1*}, Silva, P.^{2*}, Matus, I.³, Inostroza, L.³, del Pozo, A.⁴, Castro M.², German, S.², Quincke, M.², von Zitzewitz, J.⁵

¹Facultad de Agronomía, UdelaR, Garzón 780, Montevideo 12900, Uruguay. ²Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto Nacional de investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay, ³Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. ⁴Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile. ⁵SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany. *Corresponding authors: betti_la@hotmail.com; mpsilva@inia.org.uy. These authors contributed equally to this study.

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most important winter crop in Uruguay. The wheat breeding efforts are centralized in increasing yield and grain quality. It is also necessary to introduce resistance genes for the most important diseases among which leaf rust (LR, caused by *Puccinia triticina*) is one of the most relevant. LR is present every year and causes grain yield losses up to 50% in susceptible cultivars. The traditional wheat breeding has been improved by the incorporation of new genomic tools. Genome Wide Association (GWA) analysis is a novel approach to reveal the genetic basis of relevant agronomic traits through the incorporation of high amounts of genetic data and used to identify new markers linked to QTLs that influence the expression of genes involved in those traits. In this study we undertook GWA in 186



The 12th International Wheat Genetics Symposium

12th IWGS

INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM

lines from INIA-Wheat Breeding Program (INIA-WBP) using Genotyping-by-Sequencing (GBS) to detect QTLs for two relevant agronomic traits, yield and LR resistance. Phenotypic evaluations were carried out during 2012 wheat growing season for yield and LR resistance, in Chile and Uruguay, respectively. The 186 genotypes were field tested for yield under two different water regimes in Mediterranean climatic conditions: mild water stress (MWS; one irrigation at tillering) and fully irrigated (FI; four irrigations at tillering, flag leaf appearance, heading and middle grain filling). The same genotypes were phenotyped for LR resistance in two artificial inoculated locations, Young and La Estanzuela. Phenotypic analyses were performed using R software and Best Linear Unbiased Predictor (BLUP) were calculated for each trait. Genotypic data was collected using GBS through Tassel pipeline. From a total of 97,771 SNPs identified, 7 % (6813 SNPs) were mapped using the wheat database Synthetic x Oyata DH. GWA analyses were conducted for each environment using a mixed model with genetic relatedness as random effect. We found 25 and 24 significant markers for yield under MWS and FI, respectively, on chromosomes 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4B, 5B, 6A and 6B for both water regimes and in chromosomes 2D, 3D and 7B only for MWS. For LR, twelve associations were detected on chromosomes 1B, 2A, 2D, 3A, 3B, 3D, 4B, 6A and 6B. This study provides significant marker trait associations that can be used for enhancing yield and LR resistance through molecular breeding at INIA.



Genotipado por secuenciación en trigo (*Triticum aestivum*)

8^{ava} Jornadas de la Sociedad de
Bioquímica y Biología Molecular 2013
(SBBM, SUB)

B. Lado¹, M. Quincke², I. Matus³, M. Castro², J. von Zitzewitz⁴

1Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias (UDELAR); 2Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay; 3Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile; 4SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany.

El genotipado por secuenciación (GBS) es una metodología para identificar marcadores a gran escala, muy útil para genomas complejos como el de trigo. GBS tiene como objetivo disminuir costos y pasos de manipulación, reduciendo la complejidad del genoma con enzimas de restricción que evitan cortar en zonas repetidas. Los fragmentos que han sido digeridos son identificados de forma diferencial para cada muestra, esto permite realizar un multiplex de 96 o más muestras para secuenciar conjuntamente. En este trabajo se genotiparon 384 líneas experimentales provenientes de los programas de mejoramiento de trigo de Uruguay y Chile. Una vez extraído el ADN utilizando el kit Qiagen® se enviaron a construir las librerías de GBS a la Universidad Laval, Canadá que se secuenciaron en la Universidad McGill, Canadá. Los datos se analizaron por dos metodologías bioinformáticas (pipelines) para identificar polimorfismos en una sola base (SNPs). Los métodos de validación utilizados fueron interpretación de la similitud genética entre líneas, mapeo en base de datos y cálculo de desequilibrio de ligamiento de los SNPs mapeados. El método que mostró mejores resultados fue el pipeline de Tassel (<http://www.maizegenetics.net/tassel/docs/TasselPipelineGBS.pdf>) identificándose 28.199 SNPs. Los métodos de validación utilizados permitieron concluir que la metodología es adecuada para genotipar líneas experimentales de trigo. El siguiente paso es la utilización de los datos en la asociación con el fenotipo.

8vas Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular 2013, Montevideo. El resumen está en la página 64,

AAAAGGTCGGGTATCGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 GTAGCGTAGCGTATTTGGGAAACGATGCGCGGGGCTTATAAACGAACGGTAGGCTTAGGGGGTAT
 ACGTACGGTACGATGCTAGCTCGATGCTGATGCTATCCCCCTTAGGGTGAATTCACAAAAGGGG
 GAGAGAGAGATTATATATAAAAGTCCGGTATCGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTT
 AGGGGTTTATTAAACCGTAGCGTAGCGTATTTGGGAAACGATGCGCGGGGCTTATAAACGAACGGTAGG
 CTTGAGTTAGGGGGTATACGTACGGTACGATGCTAGCTCGATGCTGATGCTATCCCCCTTAGGGTGAAT
 TCCCCCAAAAAGGGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 GGCCCTTTTGGCTTTTACAAAAGGGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 TATAAACGAACGGTAGGCTTTTACAAAAGGGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 CCCCCTAGGCTTTTACAAAAGGGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 TTCCA AAAACACACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 AACGATGCGCGGGGCTTATAAACGAACGGTAGGCTTAGGTTAGGGGGTATACGTACGGTACGATGCTAGCT
 CGATGCTATCGGTATCCCCCTTAGGGTGAATTCACAAAAGGGGGGAGAGAGAGATTATATATAAA
 AGGTCCGGTATCGGGTTTTACAAAACACACACGGCCCCCTTTGAGCTTTAGGGGTTTATTAAACC
 GCGTAGCGTA Bettina Lado, Ivan Matus, François Belzile, Jesse 3GGGTACG
 TACGGTACGA Poland, Martín Quincke, Marina Castro, y Jarislav von AAGGGGA
 GAGAGAGATI Zitzewitz TGAGCTTTAG
 GGGTTTATTAAACG IAGCG IAGCG IAI I TGGGAAACGATGCGCGGGGCT IAI AAACGAACGGTAGGCTT
 GAGTTAGGGGGTATACGTACGGTACGATGCTAGCTCGATGCTGATGCTATCCCCCTTAGGCTGAAATTC
 CCCCCAAAAGGGGGGAGAGAGAGATTATATATGGACCTTAGGGGGAGAGAGACACGCGGATTGACG
 GCTCGATGCTATCGGTATCCCCCTT TCCCCCAAAAAGGGGGAGACACACATTATATAT
 AAAAGG TCAC IAGCG IAGCG IAI I TGGGAAACGATGCGCGGGGCT IAI AAACGAACGGTAGGCTT
 GTAGCGT ACG/ IAGCG IAGCG IAI I TGGGAAACGATGCGCGGGGCT IAI AAACGAACGGTAGGCTT
 ACGTACC IAGCG IAGCG IAI I TGGGAAACGATGCGCGGGGCT IAI AAACGAACGGTAGGCTT
 GAGAGAGAGAT IAI IAI IAAAAGGT IAI I TGGGAAACGATGCGCGGGGCT IAI AAACGAACGGTAGGCTT

GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN EN TRIGO

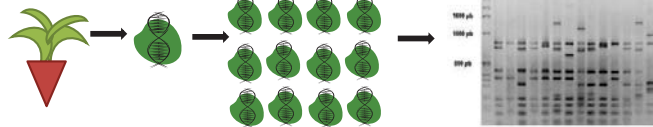
INTRODUCCIÓN



GENOTIPADO – IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN EL GENOMA

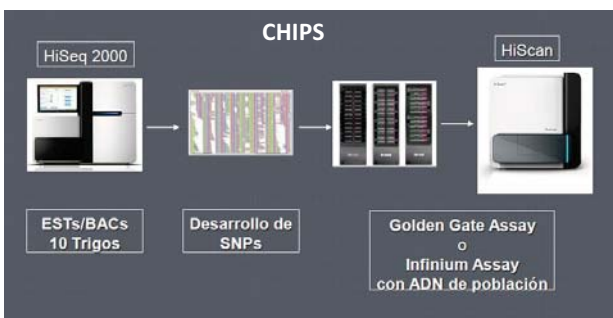
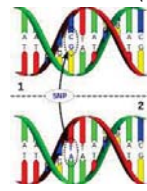
Algunos de los más usados actualmente:

- Polimorfismo en el largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP)
- Polimorfismo en el largo de los Fragmentos de Amplificación (AFLP)
- ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)
- Microsatélites o SSR
- CAPs
- Y mucho más..



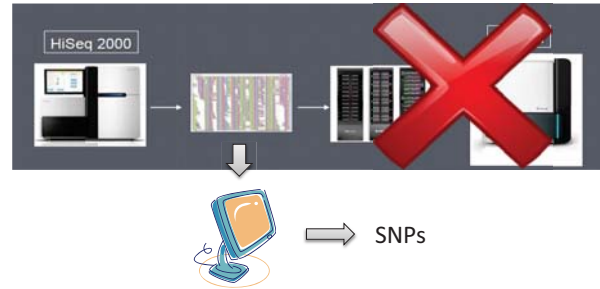
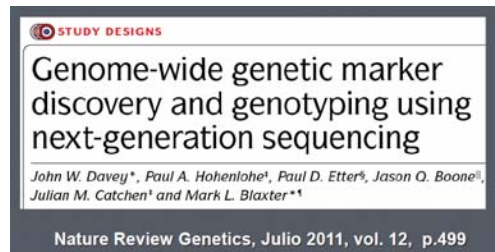
Son trabajos y relativamente costosos al aplicarlos en poblaciones grandes Su abundancia en el genoma es limitada

Polimorfismo en un solo nucleótido (SNPs) Mayor abundancia en el genoma



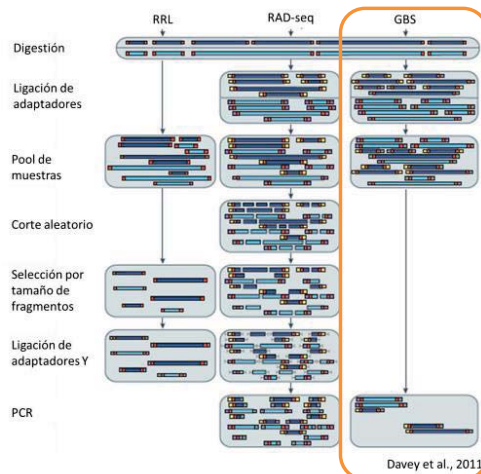
Problemas con los chips:

- Muchos SNPs no son polimórficos en mi población
- Costos

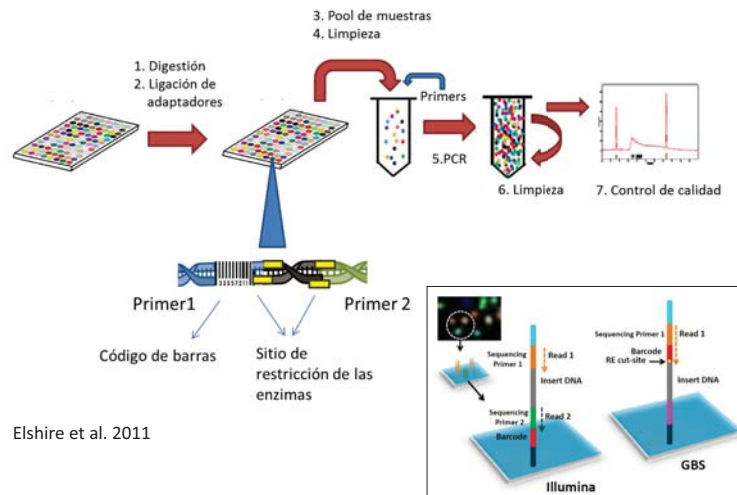


II. GENETIC ANALYSIS SERVICES PRICING INFORMATION					
Catalog Number	Description	# Attempted BeadTypes	# of Samples (multiples of 48)	Price per Sample	Maximum Sub Total
FT-251-1001	ISelect Infinium Custom FastTrack Service Project	90,000	517	\$106	\$54,802

Genotipado utilizando secuenciación masiva



Genotipado por Secuenciación (GBS)



Elshire et al. 2011

Costo por muestra

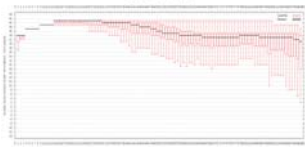


<http://www.maizegenetics.net/gbs-overview>

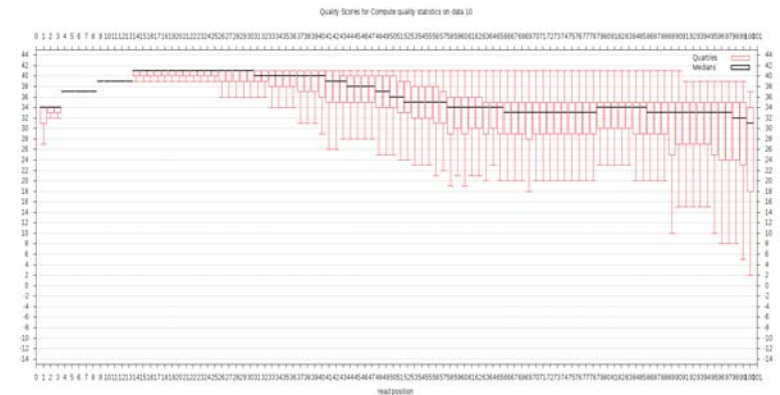
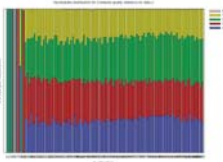
RESULTADO DEL GENOTIPADO DE 384 LÍNEAS DE TRIGO

Análisis de Calidad de los datos

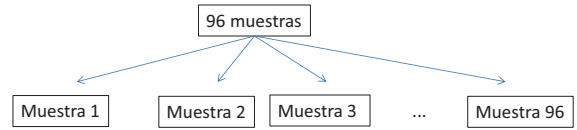
- Utilizando el software Galaxy se analiza la calidad de las secuencias obtenidas



- Distribución nucleotídica a lo largo de las secuencias



Separación de las muestras por código de barra

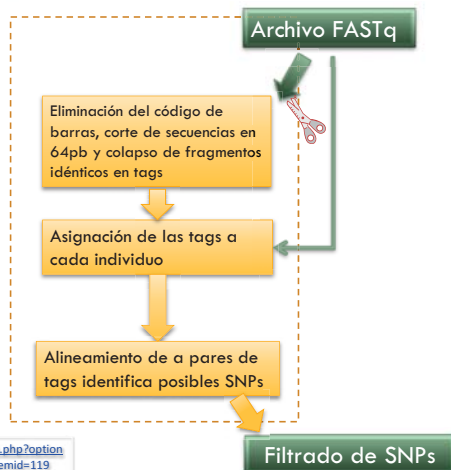


	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 4
MEDIA	1.638.720	1.769.106	1.536.438	1.586.164
MEDIANA	1.639.113	1.776.518	1.480.471	1.563.313
MIN	886.203	527.022	829.564	492
MAX	2.343.232	3.640.197	2.913.331	3.378.320
DS	322.839	630.338	394.675	648.487

2 muestras sin secuencias

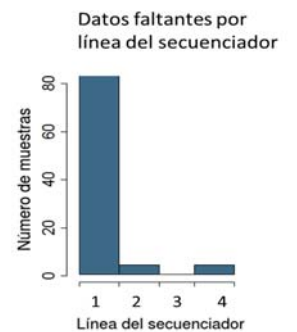
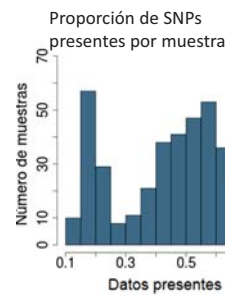
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

TASSEL PIPELINE

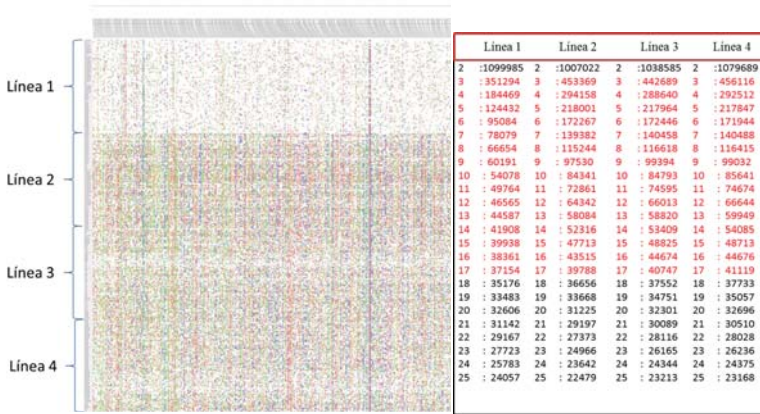


http://www.maizegenetics.net/index.php?option=com_content&task=view&id=89&Itemid=119

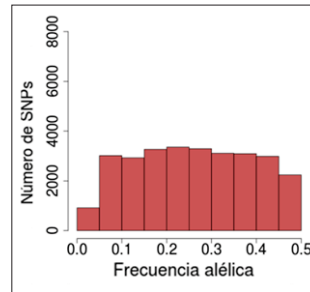
Identificamos 28.199 SNPs



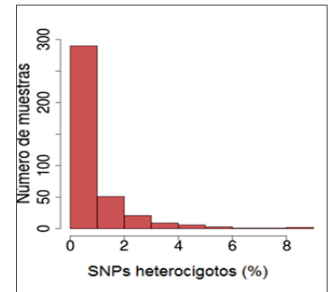
Algunas características de los SNPs identificados



Distribución de SNPs según frecuencia alélica



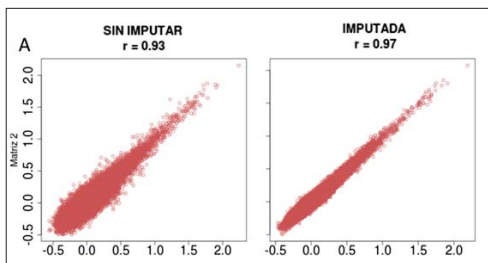
Distribución de muestras según % de SNPs heterocigotos



En trigo se espera bajo nivel de heterocigosis, especie autógama. Chao et al. (2010) 0.5% de alelos heterocigotos .

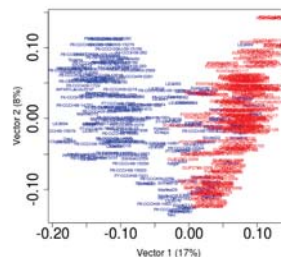
Análisis de los SNPs identificados

Correlación ente matrices de distancia genética con subgrupos de SNPs separados aleatoriamente



La correlación entre distancias con subgrupos de marcadores sirven para determinar si ambos grupos explican las mismas relaciones genéticas (Hamblin et al., 2007; Chao et al., 2009).

Análisis de los SNPs identificados



Componente principales:
Materiales provenientes de dos programas de mejoramientos

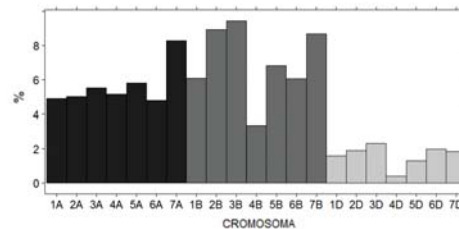
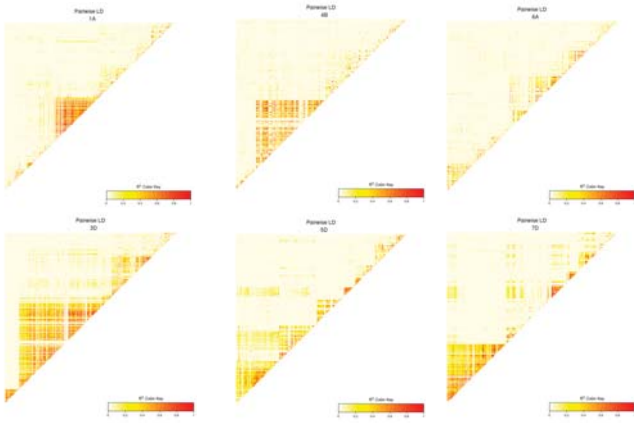


Table 1 Wheat OPA evaluation.

Genome	Total assayed	No. failed SNPs	No. good SNPs
A	642	93	549
B	675	109	566
D	219	35	184
Total	1536	237	1299

Chao et al., 2010

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO





64° Congreso Sociedad
Agronómica de Chile

XXII Congreso Chileno de
Fitopatología

Resumen de Trabajo- poster

Determinación de ideotipos de planta con tolerancia a la sequía basado en el estudio de diez clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo condiciones de zona árida

Castillo B.¹, Pino M.T.², Gutiérrez R.³, Pocco M.¹, Bonierbale M.³

¹Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Escuela Profesional y Académica de Agronomía, Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, Arequipa, Perú.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina, Santiago, Chile. CP: 8831314. E-mail: mtpino@inia.cl

³Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. Apartado 1558, Lima 12.

El calentamiento global provocado por el cambio climático que experimenta el mundo y la escasez de agua para la agricultura en los próximos años, hacen necesario la determinación de características deseables (ideotipos) para los cultivos bajo condiciones de estrés hídrico y/o que sean tolerantes a la sequía, estos aspectos pueden mejorar la capacidad de adaptación al cambio climático principalmente en los sistemas de producción de papa en el mundo. El objetivo de esta investigación fue determinar ideotipos de papa para tolerancia a sequía. Se evaluaron diez clones de papa con 16 repeticiones, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 2 (tratamientos de riego) por 10 (clones), en un área experimental de 244,8 m² durante el período de octubre de 2011 a febrero de 2012. El experimento se realizó en Santa Rita de Siguan Arequipa, Perú (16° 29' 27" Lat. Sur). Se comparó: riego y sequía en la etapa de inicio de tuberización (70 días después de la siembra). Se buscó establecer las relaciones entre la fisiología, biometría y características agronómicas al estrés por sequía. Las evaluaciones fisiológicas realizadas fueron: fotosíntesis, área específica de la hoja, contenido relativo de agua, reflectancia NDVI (Índice Diferencial de la Vegetación Normalizada por sus siglas en inglés), contenido de clorofila SPAD (Soil Plant Analysis Development), área foliar, termoestabilidad de la membrana celular. Las evaluaciones biométricas realizadas fueron: altura de planta, cobertura foliar, longitud de hoja y diámetro de tallo. Las evaluaciones agronómicas realizadas fueron: rendimiento, biomasa e índice de susceptibilidad al estrés. Los clones con mejores características para la tolerancia a la sequía fueron: 398192.592, 398190.523 y 397077.16 los mismos que reúnen ciertos ideotipos que los hacen apropiados como características asociadas con la tolerancia a la sequía.

Financiamiento: proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943 y STC-CGIAR MINAG



64° Congreso Sociedad
Agronómica de Chile

XXII Congreso Chileno de
Fitopatología

Resumen de Trabajo-Presentación Oral

Efecto del Estrés Hídrico Controlado en el Intercambio Gaseoso, Fluorescencia de Clorofila Biomasa y Rendimiento para Seis Genotipos de Papas.

Pino MT.¹, Salazar C.¹, Villagra P.², Romero P.¹, Sandaña P.², Kalazich J.²

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina, Santiago, Chile. CP: 8831314. E-mail: mtpino@inia.cl

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Remehue, Osorno, Chile.

En Chile, el escenario climático al 2040, proyecta que por efecto del cambio climático se produciría un aumento de temperatura que fluctuaría entre 2°C y 4°C, mientras las precipitaciones disminuirían en alrededor del 30% en la zona central. En este escenario será indispensable contar con genotipos adaptados a la sequía y a altas temperaturas. En estudio se evaluó la respuesta a sequía de seis genotipos de papas (Desireé, Karu, Patagonia, Yagana, R89063-59, R877009-28) bajo condiciones controladas de invernadero. Estos genotipos fueron seleccionados a partir de 30 genotipos previamente evaluados por su respuesta a sequía en campo. Estas variedades y líneas avanzadas fueron sometidas durante 28 días a déficit-hídrico controlado a partir de inicio de tuberización, bajo los siguientes tratamientos; 25% de riego (T25), 50% de riego (T50), 100% de riego (T100), en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. A los 0, 7, 14 y 28 días de tratamiento, se evaluaron: intercambio gaseoso (tasa de fotosíntesis neta AN, conductancia estomática gs, concentración sub-estomática de CO₂ Ci, tasa de transpiración E); Fluorescencia de clorofila (tasa de transporte de electrones ETR, Φ PSII, quenching fotoquímico qP, rendimiento cuántico máximo del PSII Fv'/Fm'); biomasa, rendimiento de tubérculos por planta, y desarrollo radicular. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza, comparación de medias y análisis de componentes principales. Los resultados mostraron diferencias significativas en rendimientos y en los parámetros fisiológicos; la variedad Karú y la línea R877009-28 mostraron mejores rendimiento por planta para T25 y T50. Karú, Desireé y la línea R877009-28 presentaron mayor intercambio gaseoso, con tasas más altas de fotosíntesis y conductancia estomática, luego de dos semanas bajo estrés hídrico. Karú presentó los valores más alto de transporte de electrones (ETR), Φ PSII y rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv'/Fm'), a partir de las dos semanas bajo estrés hídrico.

Financiamiento: Proyectos FONTAGRO ATN/OC-11943 FTG8038, MINAGRI-INIA 501364-70 Cambio climático.



64° Congreso Sociedad
Agronómica de Chile

XXII Congreso Chileno de
Fitopatología

Resumen de Trabajo

Validación del modelo Aquacrop en cinco genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivados en condiciones de disponibilidad de agua contrastante

Peña, A¹., Inostroza, L²., Matus, I²., Gutierrez, R³., Pedreros, A¹., Zapata, N¹.

¹Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, CRI-Quilamapu, Chillán, Chile. E-mail: linostroza@inia.cl

³Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Hoy es relevante conocer el comportamiento fisiológico y agronómico de cultivares modernos de trigo ante los eventuales escenarios climáticos proyectados a futuro como consecuencia del calentamiento global. Los modelos de simulación de cultivos permiten estimar éstas respuestas y generar información para la orientación de los criterios de selección en programas de fitomejoramiento. El modelo AquaCrop, desarrollado por FAO, simula la producción de biomasa y rendimiento en respuesta a la disponibilidad de agua del suelo. El objetivo de este estudio, fue validar el modelo AquaCrop en cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), cultivados en dos condiciones hídricas contrastantes (riego y secano) en la zona central de Chile. En cada condición hídrica se estableció los cultivares en parcelas de 2x4 m en hileras distanciadas a 0.2 m. Cada experimento se organizó en un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Se evaluó la tasa de crecimiento de órganos (tallos, hojas y espigas) y el rendimiento con sus componentes. Con ésta información se evaluó y calibró el modelo de simulación. El modelo AquaCrop, mostró una sobrestimación de la biomasa acumulada en los primeros estados de desarrollo, en comparación con los datos de campo. AquaCrop fue capaz de simular la producción de biomasa con una precisión entre buena y aceptable, con un error de la raíz del cuadrado medio normalizado (RMSE) entre 10 y 25% y un índice de concordancia (Índice-D) entre 0.95 y 0.98. De los cinco cultivares solamente Pandora y QUP2542 tuvieron un RMSE normalizado menor al 20% y un índice-D promedio de 0.97. En cambio Millán sólo en condiciones de riego obtuvo un RMSE normalizado menor a 20% y un índice-D promedio 0.97. Por último, el rendimiento fue simulado correctamente no existiendo diferencias significativa ($p > 0.05$) entre lo observado y simulado, siendo QUP2542 el cultivar de mayor rendimiento bajo condiciones de secano.

Actividad financiada por proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943 y MINAGRI-INIA-501364-70



64° Congreso Sociedad
Agronómica de Chile

XXII Congreso Chileno de
Fitopatología

Resumen de Trabajo

Valores de cría y predicciones genómicas para rendimiento en 384 genotipos de trigo de Chile y Uruguay

**Bettina Lado¹, Ivan Matus², Alejandra Rodríguez², Luis Inostroza², Alejandro del Pozo³,
Marina Castro¹, Martín Quincke¹ y Jarislav von Zitzewitz⁴**

¹Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto Nacional de investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.

³Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile.

⁴SECOBRA Saatzucht GmbH, Feldkirchen 3, 85368 Moosburg, Germany. E-mail: betti_la@hotmail.com.

La selección de genotipos de trigo mediante la integración de la información fenotípica y genotípica en modelos de predicción se conoce como Selección Genómica. La información genotípica debe ser obtenida con alta densidad en el genoma del individuo, mediante métodos de genotipado a gran escala. La precisión de los datos fenotípicos es clave en el ajuste de los modelos que serán usados para predecir fenotipos en líneas que solo cuentan con información genotípica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el modelo de predicción genómica para la selección de líneas experimentales de trigo sin datos fenotípicos y seleccionar individuos en base a los valores de cría genéticos estimados, integrando la información genética y los datos de rendimiento evaluados en el campo en distintos ambientes. En este trabajo se genotiparon 384 líneas de trigo de los programas de mejoramiento genético de INIA Chile e INIA Uruguay utilizando la metodología de genotipado por secuenciación. Dichas líneas fueron evaluadas en el campo bajo dos condiciones hídricas (riego y déficit hídrico) en Santa Rosa 2011 y 2012, y además fueron evaluadas en Cauquenes en 2012 (déficit hídrico severo). El modelo de predicción que se ajustó fue un modelo GBLUP en el cual se integra la matriz de relaciones entre individuos calculada a partir de los marcadores genéticos. Los mejores genotipos se seleccionaron con el cálculo de valores de cría que integran la información fenotípica y genotípica, en cada ambiente y entre los distintos ambientes. La metodología de validación cruzada mostró que los valores obtenidos en las predicciones de rendimiento se ajustan a lo esperable, con valores de correlaciones entre 0.33 y 0.52, dependiendo del año y el ambiente en el que se realicen las predicciones. Este trabajo muestra que la metodología empleada es adecuada en el ajuste de modelos de Selección Genómica.

Actividad financiada por proyecto FONTAGRO ATN/OC-11943 y MINAGRI-INIA-501364-70



64° Congreso Sociedad
Agronómica de Chile

XXII Congreso Chileno de
Fitopatología

Resumen de Trabajo-Presentación Oral

Las variedades de papa Karú y Yagana muestran diferencias en su respuesta a sequía, en rendimiento, intercambio gaseoso y expresión de los genes AAO y DHN

Pino M.T.¹, Velasco R.², Estay D., Villagra P., Julio Kalazich¹

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina, Santiago, Chile. CP: 8831314. E-mail: mtpino@inia.cl

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Remehue, Osorno, Chile.

³ Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo sensible a sequía, particularmente durante el periodo de tuberización y llenado de tubérculos. En plantas el déficit hídrico es primero reconocido a nivel de raíces, gatillando una serie de señales y activando varios genes que conllevan al cierre estomático, disminución del intercambio gaseoso y baja en la asimilación de carbohidratos. Varios genes son regulados en respuesta a estrés hídrico, entre ellos el gen ABA aldehyde oxidasa (AAO) que participa en la síntesis de ABA y genes tipo Dehidrininas (DHNs) que actúan estabilizando vesículas, proteínas y membranas en plantas estresadas. Durante este estudio, se evaluó el efecto del déficit-hídrico en dos variedades de papas, Yagana y Karú, bajo condiciones controladas de invernadero. Ambas variedades fueron sometidas durante dos semanas a estrés hídrico a partir de inicio de tuberización, bajo los siguientes tratamientos; 25% de riego (T25), 50% de riego (T50), 100% de riego (T100) en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Rendimiento, biomasa, intercambio gaseoso, y expresión de los genes AAO y DNH10 fueron evaluados durante el experimento. La conductancia estomática y tasa fotosintética disminuyeron con el nivel y tiempo de déficit hídrico en ambas variedades, siendo Karú aquella que presentó niveles más altos de intercambio gaseoso. La relación de la biomasa área/raíces+tubérculos fue menor en Karú, mostrando un mayor desarrollo radicular y de tubérculos en relación al desarrollo de tallos y hojas bajo estrés hídrico. El rendimiento en Karú fue significativamente ($P < 0.05$) superior a Yagana bajo déficit hídrico. Diferencias significativas fueron observadas en la expresión del gen AAO que participan en la síntesis de ABA. No se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen DNH10. En conclusión, Karú presentó una mejor respuesta a déficit hídrico que Yagana, en términos de rendimientos y mecanismos de adaptación a sequía.

Financiamiento: Proyectos FONTAGRO ATN/OC-11943 FTG8038, MINAGRI-INIA 501364-70 Cambio climático.

“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS Y SEQUÍA EN CULTIVARES DE PAPAS NO TRANSFORMADOS Y TRANSFORMADOS CON EL GEN ScCBF1, CLONADO DESDE *Solanum commersonii*”

“Effect of freezing stress and drought stress on non-transgenic potato and transgenic potato harboring the ScCBF1 gene cloned from *Solanum commersonii*”

Sergio Enrique Millaguir Contreras ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Alumno tesista, Universidad Católica de Temuco. Email: smillaguir@gmail.com

ABSTRACT

The cultivated potato is sensitive to freezing stress and drought, limiting their distribution and productivity. This research aimed to study the response to drought and frost in non transgenic potato cultivars and transgenic potatoes genetically transformed with ScCBF1 gene cloned from *Solanum commersonii*, a wild potato highly tolerant to abiotic stress.

In order to evaluate freezing tolerance, the cell damaged was studied by ion leakage test to -2, -4, -6, -8, -10 and -12°C in potato plants non-acclimated and cold- acclimated to 4°C during one week. Transgenic and no transgenic plants for *Solanum tuberosum* (WT-St) cv. Cardinal, *S. tuberosum* cv. Umatilla (WT-St) and *S. commersonii* Dun PI243503 clone 13 (WT-Sc) were evaluated. The transgenic lines of these potato species were genetically modified with 35Sp::ScCBF1 gene (lines-Z45), pSc gene (lines-Z47) and pSc::ScCBF1 gene (lines-Z57). Experimental design was a randomized complete block with three replications. The experimental unit consisted of three plants per genotype and treatment (acclimated and not cold acclimated). Three independent experiments were performed in time with three replicates per genotype and condition, per each experiment. In *S. commersonii*, the comparative analysis of frost tolerance showed that transgenic lines Z-45, harboring ScCBF1 gene under a constitutive promoter, significantly improved their frost tolerance. Moreover, the results showed that these transgenic lines Z45 improved in frost tolerance after one week under cold acclimation. In relation to *S. tuberosum* cv. Cardinal, transgenic lines harboring construction Z45, significantly improved frost tolerance compared

with their wild type (no transgenics) However, no significant differences in freezing tolerance were observed between cold acclimated and non-acclimated plants. Regarding to transgenic *S. tuberosum* cv. Umatilla genetically transformed with ScCBF1 gene, no significant differences were detected in frost tolerance compared with their wild type (no transgenics) for any of evaluated gene constructs.

The response to drought stress was assessed by monitoring the stomata conductance ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-2}$), chlorophyll fluorescence variation (Fv/Fm) and decreased on net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) after 2, 4, 8, and 10 days under drought stress (25% replacement of evaporated water). This experiment was conducted in pots (2L) under greenhouse conditions. *Solanum commersonii* Dun PI243503 (clone 13) and nine *S. tuberosum* genotypes (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara, Yagana, R87009-28, R89054-34, and R91193-1) were evaluated. The water content in soil was monitoring with FDR probes ECH5 (Decagon Devices, USA) connected to a data logger (EM50), data were recorded every 30 min. This information was complete by monitoring the weight loss per pot during the trial. Experimental design was a randomized complete block with four replications, the experimental unit consisted of four plants per genotype and treatment (T1: unrestricted irrigation (100% replacement) and T2: With watering restrictions (25% replacement)). The results showed that for all genotypes; stomata conductance, chlorophyll fluorescence and photosynthetic rate decreased significantly with the length of drought stress treatment (T2). *S. commersonii* was less affected in these physiological parameters in relation to *S. tuberosum* genotypes. Tubers per plant and yield per plant were also assessed; the results showed a significant decrease in the yield per plant in all *S. tuberosum* genotypes, yield loss was between 15 and 30%.

Keywords: abiotic stress; frost, drought, *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, ScCBF1 gene.

RESUMEN

La papa cultivada es sensible al estrés por heladas y a la sequía lo cual limita su distribución y baja su productividad. La presente investigación buscó estudiar la respuesta a heladas y a sequía de cultivares de papas no transformados genéticamente y transformados con el gen ScCBF1 clonado desde *Solanum commersonii*, una papa silvestre altamente tolerante a estrés abiótico.

Para evaluar la tolerancia heladas, se estudió el porcentaje de células dañadas (ión leakage test) a -2, -4, -6, -8, -10 y -12°C en plantas de papas no aclimatadas y aclimatadas a 4°C. Los genotipos evaluados fueron plantas transgénicas y no transgénicas de *Solanum tuberosum* cv. Cardinal, *S. tuberosum* cv. Umatilla y *S. commersonii* Dun PI243503 (clone 13). Las líneas transgénicas de estas especies fueron transformadas con tres construcciones; 35S:: ScCBF1 (líneas-Z45), pSC (líneas-Z47) y pSC::ScCBF1 (líneas-Z57). Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con tres repeticiones. La

unidad experimental estuvo compuesta por tres plantas por genotipo y tratamiento (aclimatadas y no aclimatadas a 4°C). Se realizaron tres experimentos independientes en el tiempo con tres repeticiones por genotipo y condición. El análisis comparativo para las líneas transgénicas (Z45, Z47 y Z57) de *S. commersonii*, mostró que aquellas líneas transformadas genéticamente con el gen ScCBF1 bajo un promotor constitutivo (Líneas Z45), mejoraron significativamente su tolerancia a heladas. Además, los resultados mostraron que estas líneas transgénicas Z45 al ser aclimatadas a 4°C durante una semana, mejoraron su tolerancia a heladas respecto a estas mismas sin aclimatar. En relación con *S. tuberosum* cv. Cardinal transformada genéticamente con la construcción Z45, estas líneas mejoraron significativamente su tolerancia a heladas en comparación con su control sin transformar. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre plantas aclimatadas y no aclimatadas a bajas temperaturas. Respecto a *S. tuberosum* cv. Umatilla transformada genéticamente con el gen ScCBF1, no se observaron diferencias significativas en tolerancia a heladas respecto al control no transformado, para ninguna de las construcciones evaluadas. La respuesta a déficit hídrico se evaluó a través del seguimiento de la conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), variación de la fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) y disminución de la tasa fotosintética neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-2}$), después de 2, 4, 8, y 10 días bajo estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada). Este estudio se realizó bajo invernadero y en plantas en macetas. Los genotipos evaluados fueron *S. commersonii* Dun PI243503 (clone 13) y nueve genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1). El contenido de agua en el suelo se monitoreó con sondas del tipo FDR (Decagon Devices, USA) ECH5 conectadas a un datalogger (EM50) que permitió obtener registros por maceta cada 30 min. Esto fue complementado con un seguimiento de la pérdida de peso por maceta durante el ensayo. Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo compuesta por cuatro plantas por variedad y tratamiento; T1 sin restricciones de riego (100% de reposición) y T2 con restricciones de riego (25% de reposición). Los resultados mostraron que en todos los genotipos evaluados; la conductancia estomática, la fluorescencia de la clorofila y la tasa fotosintética disminuyeron significativamente en la medida que aumentaron los días bajo déficit hídrico (T2). La respuesta fisiológica fue menos afectada en *S. commersonii*. Asimismo se evaluó los tubérculos por planta y el rendimiento por planta, los resultados mostraron una disminución significativa en la producción por planta en todos los genotipos de papa cultivada, entre un 15 y 30%.

Palabras claves: estrés abiótico; heladas; sequía; *Solanum commersonii*; *Solanum tuberosum*; gen ScCBF1.

INTRODUCCIÓN

Importancia de la papa

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) se destaca por su importancia en la dieta del hombre. La papa contiene prácticamente la mayoría de los componentes esenciales de la dieta como hidratos de carbono, micronutrientes, proteínas, vitaminas y minerales esenciales para la salud. Una papa tamaño medio contiene casi la mitad de la cantidad de vitamina C necesaria a diario por un adulto y una fuente importante de vitaminas del complejo B, minerales como fósforo y el magnesio (FAO, 2008). La papa, además de utilizarse en la alimentación humana, tiene otros diferentes usos como alimento de ganado, industria alimentaria (fabricación de purés deshidratados, hojuelas crocantes, papas fritas), almidón y destilación para la obtención de alcohol (FAO, 2008).

En el mundo se consumen más de 200 millones de toneladas de papa (*S. tuberosum*) al año, con un promedio de 31 kg por persona. Ésta ocupa el cuarto lugar en importancia como alimento después del trigo, arroz y maíz, y su producción anual supera los 300 millones de toneladas para el año 2008. Actualmente representa el 50% de toda la producción mundial de raíces y tubérculos (ODEPA, 2010). En Chile la producción de papa se realiza prácticamente en todo el país, concentrándose mayoritariamente entre las áreas de Coquimbo y Los Lagos. En relación a la superficie, las Regiones Bío Bío, Araucanía, y de Los Lagos son las que presentan mayor superficie plantada, en cuanto al rendimiento nacional éste alcanza las 12 t ha⁻¹ (ODEPA, 2010).

A nivel nacional existen 156 variedades de papas registradas en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), de las cuales 31 de ellas se encuentran inscritas en el registro de variedades protegidas con derecho de propiedad intelectual (Kalazich *et al.*, 2006). De las múltiples variedades de tubérculos existentes en Chile, las más vendidas son Asterix (31,1%), seguida por la Desireé (27,3%) y la Karú (16,2%), además de las variedades Cardinal, Pukará, Rosara y Yagana (ODEPA, 2010).

Taxonomía, morfología y distribución de la papa

Taxonomía

La papa cultivada pertenece a la familia de las Solanáceas. Actualmente es conocida colectivamente bajo el nombre de *S. tuberosum* (Spooner y Salas, 2006; Andre *et al.*, 2007). Los niveles de ploidía de las papas cultivadas varían en un rango que va desde las papas diploides ($2n = 2x = 24$), triploides ($2n = 3x = 36$), tetraploides ($2n = 4x = 48$) hasta las pentaploides ($2n = 5x = 60$) (Hijmans y Spooner, 2001; Spooner *et al.*, 2004; Spooner y Salas, 2006).

Actualmente, no hay consenso en la clasificación taxonómica en las diferentes especies de papas, debido a que el límite entre especies no está definido. Spooner *et al.* (2008) clasificaron las papas nativas en cuatro especies: *Solanum ajanhuiri* (diploide), *Solanum juzepczukii* (triploide), y *Solanum curtilobum* (pentaploide) y *S. tuberosum*, con dos grupos cultivados: Andigena (Andiegenum) y Chilotanum; en el primero se incluyen todas las papas andinas, tanto diploides como tetraploides, que crecen a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta Argentina, y el segundo está conformado por las papas adaptadas a día largo, que crecen en las tierras bajas del Centro y Sur de Chile, incluyendo las Islas del Archipiélago de los Chonos (Rodríguez, 2009).

Morfología

La papa es una planta dicotiledónea, herbácea, pero puede ser considerada como perenne potencial debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos. La planta puede medir de 0,40 a 1,4 m de altura, con tallos de 5 a 19 mm de diámetro en la base, erectos, pubescentes o glabros, de color verde a púrpura (Huamán y Spooner, 2002). Los estolones son tallos laterales que crecen horizontalmente debajo del suelo y que pueden desarrollar tubérculos o crecer verticalmente desarrollando follaje normal, lo anterior sucede cuando los estolones no han sido tapados completamente con tierra (Puentes, 2004).

Las hojas son alternas, las primeras tienen aspecto simple, después vienen las hojas compuestas imparipinadas con tres pares de folíolos laterales y un folíolo terminal (Ríos, 2007). La flor corresponde a una inflorescencia cimosa, cuyas flores son hermafroditas, con cinco estambres. Cada uno de éstos posee dos anteras de color amarillo, o bien anaranjado y producen polen a través de un tubo terminal (Herrera, 2005). La raíz, es la estructura subterránea responsable de la absorción de agua.

Las raíces adventicias se desarrollan en la base del tubérculo y las yemas horizontales se alargan dando origen a tallos en forma de estolones. El crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso y muy ramificado. El tubérculo, es un tallo subterráneo, acortado, engrosado y provisto de yemas u ojos en las axilas de sus hojas escamosas. En cada ojo existen normalmente tres yemas, aunque en ocasiones puede presentar más (Herrera, 2005).

Distribución

El género *Solanum*, se encuentra distribuido desde el sureste de Norteamérica, por toda América central y Sur. Éste crece desde el nivel del mar hasta la cordillera, a 4500 m de altitud. La mayor variabilidad genética de las especies de papas, se concentra en el área de la meseta peruano-boliviana, y de las 183 especies de este género; el 74,3% es diploide, el 3,8% es triploide, el 14,8% es tetraploide, el 1,6% es pentaploide y el 5,5% es hexaploide (Contreras, 2008).

Requerimientos edafoclimáticos de la papa

La papa crece bien en climas templados con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere una estación de crecimiento con un largo mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean mayores a 30°C o inferiores a 5°C (Peralta, 2003). Si la temperatura es demasiado elevada afecta a la formación de los tubérculos y favorece el desarrollo de plagas y enfermedades. Al efectuar la plantación la temperatura del suelo debe ser superior a los 7°C, ya que si las temperaturas bajan demasiado perjudica el desarrollo de los tubérculos (Puentes, 2004).

La papa se adapta bien a diferentes tipos de suelo, sin embargo el suelo óptimo es de buena textura, aireación y profundos, entre 28 y 30 cm (Inostroza, 2009). También es importante considerar una buena preparación de suelo, que permita un buen desarrollo radicular y tuberización (Contreras, 2003).

En relación a los requerimientos hídricos de este cultivo, la humedad del suelo debe ser óptima; aunque esta especie resiste la aridez, en los terrenos secos las ramificaciones del rizoma se alargan demasiado, el número de tubérculos aumenta, pero su tamaño se reduce considerablemente. Por otra parte Haverkort (1986); citado por Bonilla (2009), menciona que la papa requiere en promedio entre 600 y 800 mm de agua según las condiciones climáticas y la duración del periodo vegetativo. Ekanayake (1994), menciona en relación al agua necesaria para el cultivo de papa, debe regarse a 0,35 bares de potencial tensiométrico del suelo para mantener un micromedio bien irrigado.

Estrés abiótico y medio ambiente

Los estreses abióticos como las temperaturas extremas y falta de agua están entre los principales factores que determinan la distribución geográfica natural de plantas y limita la producción agrícola de los cultivos, lo cual podría tener particular relevancia ante fenómenos como el cambio climático. El cultivo de la papa, no escapa a este escenario ya que según los modelos globales de circulación de la atmósfera (GCM), las producciones de papa en Chile se podrían ubicar, en áreas donde el efecto invernadero podría afectar negativamente la pluviometría y alterar el régimen habitual de temperaturas (AGRIMED, 2008).

En relación a lo anterior, cualquier alteración que se produzca en el medio ambiente generará una serie de estímulos en las plantas denominados estresores. Los factores estresantes pueden ser variaciones en la temperaturas (heladas o aumento de temperaturas sobre el nivel de tolerancia de los cultivos), cambio en la intensidad lumínica, y escasez de agua entre otros (Bonilla, 2009).

Estrés hídrico por sequía en papa

La papa es un cultivo sensible al estrés por sequía. Según Martínez y Moreno (1992), en estudios de cultivos de papas realizados en campo, se determinaron dos puntos críticos en los requerimientos hídricos; después de emergencia y durante la tuberización. En relación a la etapa de crecimiento vegetativo, el

estrés hídrico afectaría directamente el tamaño de la hoja, la longitud de las raíces y altura de la planta (Alsharari *et al.*, 2007; Hinojosa, 2009). También en esta etapa un estrés tendría como consecuencia una disminución de los tubérculos por planta que da como resultado pocos y grandes tubérculos a la cosecha (Llorens, 2007).

Según Hinojosa (2009), la cantidad de materia seca en raíces y estolones es afectada por el déficit hídrico. De igual manera señala que la sequía afecta el rendimiento del tubérculo en papa y que este bajo rendimiento es consecuencia de la reducción del follaje, disminución de la tasa fotosintética por unidad foliar y acortamiento del periodo vegetativo (Loon, 1981).

Además de la producción, las plantas de papas responden a la falta de agua con una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que les permiten tolerar en mayor o menor grado los trastornos producidos por el déficit hídrico (Montenegro, 2006).

La fotosíntesis se ve afectada por el estrés hídrico, ésta es inhibida debido a que los estomas en su función de regulador hídrico, disminuye su apertura para impedir la pérdida de agua por transpiración, como también cualquier intercambio gaseoso entre el interior de la hoja y el ambiente (Yordanov *et al.*, 2003).

El estrés hídrico también provoca una disminución del potencial hídrico de hoja, pérdida de turgencia, disminución del crecimiento y de la elongación celular (Jaleel *et al.*, 2009). Así, las plantas al ser expuestas a estrés hídrico reducen su crecimiento, ya que afectan varios procesos fisiológicos y bioquímicos, como la respiración, la translocación de carbohidratos, absorción de iones, el metabolismo de nutrientes y factores de crecimiento (Farooq *et al.*, 2008).

La presencia de compuestos osmoprotectores, han sido reportados en varios estudios de respuesta a sequía. Cambios en el contenido de prolina debido a sequía han sido reportados en varias especies (Martínez y Moreno, 1992; Parra *et al.*, 1999; García *et al.*, 2004; Avendaño *et al.*, 2005). Se ha estudiado el contenido de prolina en dos variedades de papa en condiciones de campo, los resultados mostraron mayor acumulación de prolina en aquella variedad que presentó mejor ajuste osmótico y mayor recuperación de la planta luego de un periodo de sequía (Martínez y Moreno, 1992).

Estrés por heladas en papas

En cualquier zona del mundo las heladas afectan seriamente los rendimientos y calidad del cultivo de papa. En las zonas templadas, las heladas causan daños principalmente en primavera y otoño. En los Andes de América del sur las heladas pueden ocurrir en cualquier momento del periodo vegetativo (Barrientos *et al.*, 1994; Vega y Bamberg, 1995). En las regiones Mediterráneas donde el cultivo de papa temprana se cultiva a principio de temporada (fines de otoño) y heladas a inicio de primavera pueden causar pérdidas considerables (Iovene *et al.*, 2004).

La actividad fotosintética del cultivo de papa también se ve afectada por estrés por bajas temperaturas, particularmente por la congelación, daño que a menudo es irreversible (Seppanen y Coleman, 2003). Según Chen y Li (1980), temperaturas inferiores a $-2,5^{\circ}\text{C}$ pueden causar daños en el follaje, acortar el periodo de crecimiento, y reducir los rendimientos de la papa. A nivel de tejido, las heladas pueden causar deshidratación celular, debido a la formación de hielo extracelular, si el daño es más severo éste puede dañar las membranas celulares y producir desnaturalización de las proteínas (Thomashow, 1999).

Además del daño que sufren tejidos vegetales como hojas y tubérculos, ocurren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos a nivel celular. Estos incluyen alteraciones en sus niveles de carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, reguladores del crecimiento, fosfolípidos y ácidos grasos (Li, 1984). La mayoría de éstos se gatillan a sólo pocos segundos que la planta se ve estresada por bajas temperaturas. La composición lipídica de las membranas se altera durante la aclimatación al frío. Una amplia variedad de plantas experimenta cambios en la composición y fluidez de las membranas (Palta *et al.*, 1993).

Algunas plantas, han desarrollado la capacidad para adaptarse a bajas temperaturas en un proceso llamado aclimatación a bajas temperaturas, esta capacidad se asocia con la activación de genes de respuesta a bajas temperaturas, cambios en la membrana celular y la síntesis de solutos compatibles o crioprotectores entre otros (Steponkus *et al.*, 1998; Taji *et al.*, 2002), como por ejemplo, aminoácidos libres (prolina), hidratos de carbono (sacarosa). La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en la planta cuando se encuentra en condiciones óptimas. Sin embargo en condiciones de estrés, ésta aumenta para actuar como agente osmótico, protegiendo a las plantas de la deshidratación producto de diferencial osmótico que ocurre con la formación de hielo extracelular y además tiende a bajar el punto de congelamiento intracelular (Chaman, 2007).

Respuestas moleculares a sequía y bajas temperaturas

Tanto la respuesta a bajas temperaturas como sequía, es regulada primeramente a nivel molecular por varios genes que pueden activar a su vez otros genes de respuesta a bajas temperaturas o sequía que tienen directa incidencia en varias rutas metabólicas de las plantas. Es importante destacar que entre las vías de respuesta a sequía y bajas temperaturas, actúan algunos genes en común como los factores de transcripción del tipo CBF o DREB (Figura 1), los cuales cumplen un importante rol en aclimatación y tolerancia a bajas temperaturas (Thomashow, 1999; 2001).

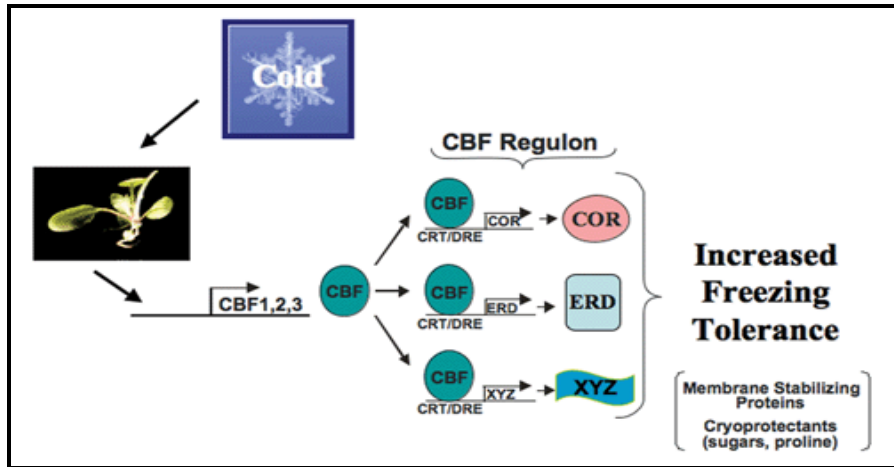


Figura 1. Modelo de las vías de regulación de genes CBF en *Arabidopsis*, en respuestas a bajas temperaturas, regulón CBF (CRT/DRE).

Figure 1. Model of regulatory pathways of CBF genes in *Arabidopsis* in response to cold, CBF regulon (CRT / DRE).

Los factores de transcripción CBF1, CBF2 y CBF3 o DREB1b, DREB1c y DREB1a, respectivamente, fueron descritos por primera vez en *Arabidopsis*. La función de estos genes está asociada directamente a la respuesta a bajas temperaturas. Estos factores de transcripción CBF, tienen la particularidad que tanto a bajas temperaturas (no inferiores a 0°C) como a la sequía conduce a una rápida inducción de otros varios genes. Los cuales a su vez, reconocen y se unen a un elemento regulatorio del tipo CRT (C-repeat)/DRE (dehydration responsive element) denominado también *Regulon CBF* que está presente en el promotor de otros genes de *Arabidopsis* que responden a sequía o a bajas temperaturas. Varios estudios indican que la activación de este *Regulon CBF* induce genes del tipo COR (regulados por bajas temperaturas), del tipo ERD y otros aún no identificados XYZ (Thomashow, 1999; 2001). La expresión del *Regulon CBF* además de aumentar la tolerancia a bajas temperaturas aumenta la tolerancia a sequía y salinidad (Baker *et al.*, 1994; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Jaglo *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2002; Kasuga *et al.*, 2004).

Este tipo de genes CBF han sido encontrados y descritos en varias especies como canola y álamo entre otros varios (Jaglo *et al.*, 2001; Benedict *et al.*, 2006). En recientes estudios realizado por Pino *et al.* (2008); Carvallo *et al.* (2011), demostraron que los genes CBF pueden tener un importante rol en tolerancia a heladas en papas; un gene del tipo CBF (denominado ScCBF1) fue clonado de *S. commersonii*, una especie silvestre de papa que es capaz de tolerar hasta -9°C. Cultivares de papas fueron genéticamente transformados con este gen ScCBF1 y evaluados para su resistencia a sequía y heladas. En un estudio reciente se evaluó la respuestas a sequía *in vitro* de papas del cultivar Cardinal genéticamente modificadas con este gen ScCBF1, los resultados mostraron que la expresión de este gen indujo tolerancia

a sequía en conjunto con la expresión de prolina (un osmoprotector) y de otros genes asociados con respuesta a sequía (Ávila, 2011).

Basados en estos antecedentes esta tesis busca estudiar la respuesta a bajas temperaturas y a sequía de variedades no transformadas genéticamente y transformadas con el ScCBF1 clonado desde *S. commersonii*. Y como objetivos específicos, determinar la tolerancia a heladas en líneas transgénicas de papas conteniendo el gen ScCBF1 clonado desde *S. commersonii*, una especie silvestre de papa altamente tolerante a heladas y estudiar la respuesta a déficit hídrico controlado de 10 genotipos de papas, desde el punto de vista del intercambio gaseoso, fotosíntesis y componentes productivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología para evaluar la respuesta a heladas en diferentes genotipos de papas

Material vegetal

Para este estudio se usaron las especies de *S. commersonii* Dun PI243503 (clon 13) y de *S. tuberosum* cv. Cardinal y cv. Umatilla transformadas genéticamente con las construcciones descritas en el Cuadro 1. El detalle de las líneas evaluadas se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Características de las construcciones genéticas utilizadas en transformación genética de papa.

Table 1. Gene constructs used in potato genetic transformation.

Nombre construcción	Promotor	Gen
Z45	35s	ScCBF1*
Z47	pSc	--
Z57	pSc	ScCBF1*

*: Skinner *et al.* (2009), GenBank: EU849672.1

Cuadro 2. Líneas de papas transgénicas evaluadas según construcción.

Table 2. Transgenic potato lines evaluated per each gene construct .

Especie	Z45	Z47	Z57
<i>S. commersonii</i>	Z45-6, Z45-21, Z45-22	Z47-1, Z47-2, Z47-3	Z57-4, Z57-5, Z57-6
<i>S. tuberosum</i> cv. Umatilla	Z45-1, Z45-5, Z45-6		
<i>S. tuberosum</i> cv. Cardinal	Z45-11, Z45-15, Z45-19		

Condiciones del experimento

Plantas de papas, tanto transgénicas como no transgénicas, provenientes de material *in vitro* se trasplantaron a macetas, siguiendo las siguientes etapas: cultivo *in vitro*, aclimatación en cámara de crecimiento, crecimiento en invernadero y test de tolerancia a heladas (Ion Leakage Test).

Las plantas fueron cultivadas y manejadas bajo condiciones controladas de luz (fotoperiodo de 16 horas día y 8 horas noche) y temperatura de 24°C. Las plantas de papas fueron establecidas en maceteros de 2 kg de capacidad, utilizando como sustrato Sunshine Mix 3. Las plantas fueron fertilizadas con salitre potásico con formulación 15% N y 14% K y regadas diariamente. En la Figura 2 se puede apreciar el proceso de crecimiento y aclimatación de las plántulas de papas, desde cultivo *in vitro* en (A) y aclimatación de plántulas en cámara de crecimiento (B y C).

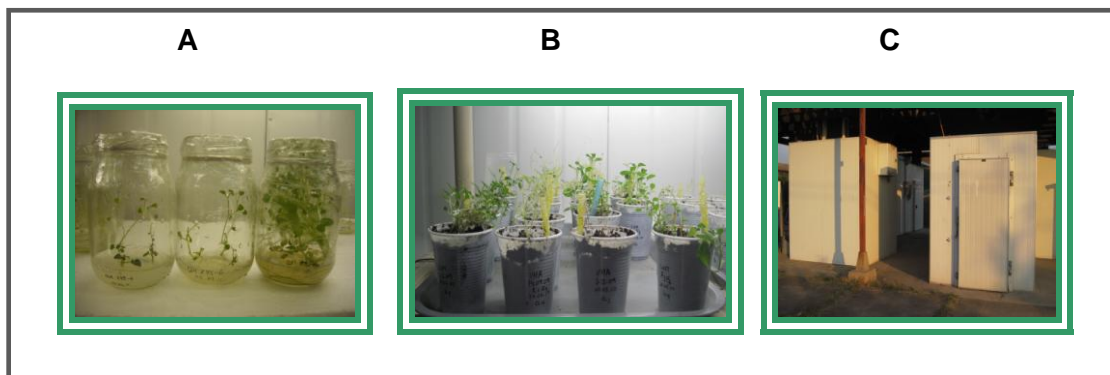


Figura 2. Aclimatación y selección de plantas. Plántulas de cultivo *in vitro* fueron trasplantadas a vasos plásticos con suelo, para posteriormente ser aclimatadas en la cámara de crecimiento y trasplantadas a los maceteros definitivos. A: Cultivo *in vitro*, B: plántulas de 1 mes de desarrollo, C: cámara de crecimiento.

Figure 2. Acclimation and plant selection, seedlings growing *in vitro* were transplanted into plastic cups with peat and these were acclimated in a growth chamber and transplanted into final pots. A: *in vitro* culture, B: seedlings of 1 month of development, C: growth chamber.

La respuesta a heladas fue evaluada en plantas no aclimatadas a bajas temperaturas (T1) y en plantas aclimatadas a 4°C (T2). En T1 se mantuvieron las plantas a una temperatura de 24°C fotoperiodo de 16:8 día: noche. Mientras que en T2 las plantas se sometieron a 4°C durante una semana, a fotoperiodo de 16:8 horas día: noche. Posteriormente, las plantas fueron sometidas a test de tolerancia a heladas.

Test de tolerancia a heladas (Ion leakage test)

La prueba de tolerancia a heladas (Ion leakage test) fue aplicado como se detalla en Pino *et al.* (2007). Brevemente, por cada planta se depositaron discos de hojas en tres tubos de ensayos (cada uno con tres discos). Los discos contenían previamente 100 uL de agua destilada como se detalla en la Figura 3. Estos tubos se colocaron en un baño ultra refrigerado (Fisher scietific, E.E.U.U) a -0,5°C durante 1 h. Luego la temperatura se bajó a -1°C y se agregaron pequeñas piezas de hielo a cada tubo para inducir congelamiento. Luego la temperatura se bajó -2°C durante una hora y posteriormente se fue reduciendo a -3°C, -4°C, -5°C, -6°C, -7°C, -8°C, -9°C, -10°C, -11°C, -12°C. Los tubos se fueron retirando a la temperatura deseada y luego del descongelamiento se evaluó rompimiento celular, usando un conductivímetro (MARCA SARTORIUS PP-20, ALEMANIA). En la Figura 4 se puede observar el baño refrigerado y conductivímetro utilizado en el test de tolerancia a heladas. En función de los resultados se calculó a qué temperatura ocurre el 50% de muerte celular (LT50).

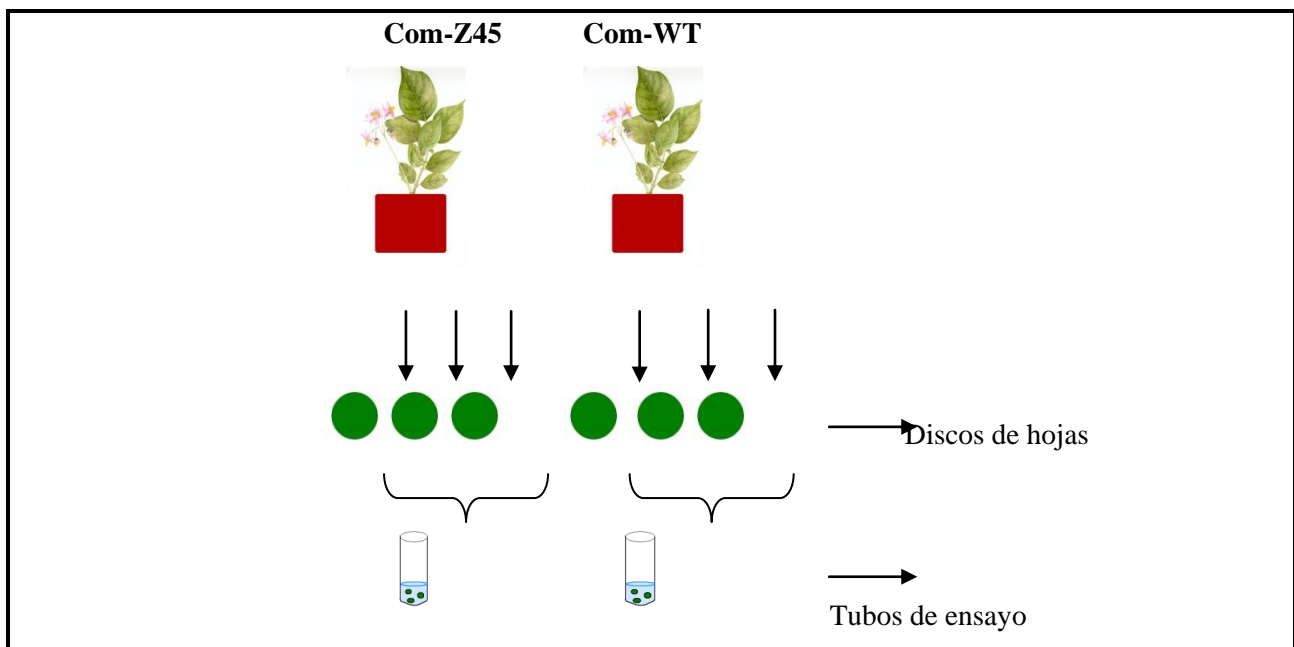


Figura 3. Diagrama de toma de muestras y test de tolerancia a heladas en hojas de papa.

Figure 3. Diagram of sampling and ion leakage test on potato leaves.

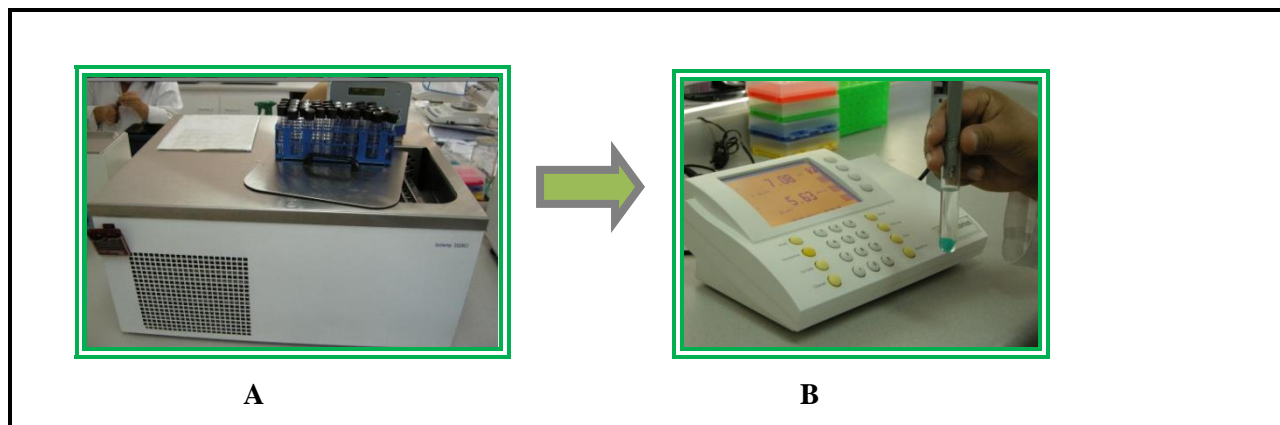


Figura 4. A: baño refrigerado para inducir el congelamiento y B: conductímetro para evaluar el rompimiento celular.

Figure 4. A: refrigerated bath to induce freezing and B: conductivity meter to evaluate of cell disruption.

Estudio de expresión génica

Mediante RT-PCR (PCR de transcriptasa reversa) se determinó la expresión génica en papas no transformadas genéticamente y en líneas transgénicas Z45. Específicamente se realizó un seguimiento a la expresión de los genes ScCBF1, D1-pirrolina-5carboxylatesynthase (P5cs) y dehydrine (Dhn10) en plantas no aclimatadas a bajas temperaturas (24°C) y plantas aclimatadas a 4°C durante 30 min, 24 h y una semana. Ubiquitín (Ubq) se usó para un control constitutivo interno para asegurar la integridad del ARN. Brevemente, el ARN total fue aislado a partir de hojas maduras, previamente almacenadas en nitrógeno líquido, a través del método TRIZOL Reagent (Invitrogen) descritas por Chomczynski y Sacchi (1987). Mediante M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) se sintetizó el cDNA a partir de 1µg de ARN utilizando 40U RNAsa OUT como inhibidor de nucleasas. Para la amplificación de los genes en estudio mediante PCR se diseñaron los siguientes primers: ScCBF1 (F: 5- tatggcggaggactaatgc-3, 5-tccacataatgatctcccatttc3) 63pb; P5sc (F:5-cgatccacaatcagagctaatc-3,R:5-gcagtcataccacctttcca-3)102pb; Dhn10 (F: 5-gctaaacccccaaaaaaactcatt-3, R: 5gtgaatgtactcgtcttttgac-3) 496pb y Ubiquitina (F: 5-gcagttggaggacggacgt-3, R: 5-gaaagctcagacaccattg-3) 155 pb. El programa utilizado fue denaturación inicial: 2 min a 94°C seguido de 35 ciclos de 40 s a 94°C; 30 s a 58°C (ScCBF1); 53°C (p5cs); 53°C (Dhn10); 60°C (Ubiquitina) y 30 s a 72°C, con una finalización de 10 min a 72°C en un termociclador Bioer XP Cyclyer. Los resultados fueron analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con Gel Red 1X (Biolabs, USA) y visualizados en un transiluminador (Ultra-LUM.INC, USA). Este estudio de expresión génica se realizó en plantas de *S. commersonii* no transformadas (Sc-WT), líneas *S. commersonii* transgénicas (Z45-6, Z45-21 Z45-22). En plantas de *S. tuberosum* cv. Cardinal no transformadas (St-WT) y líneas Cardinal transgénicas Z45-11, Z45-15 y Z45-19.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental estuvo compuesta por tres plantas por variedad por cada tratamiento (aclimatadas y no aclimatadas a 4°C durante una semana). Se realizaron tres experimentos independientes en el tiempo con tres repeticiones por genotipo y condición. La validez estadística de los resultados se obtuvo mediante análisis de varianza (ANDEVA) y para la separación de medias se utilizó el test de Duncan ($p \leq 0,05$), utilizando SAS Program VERSIÓN 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) año 2003.

Metodología para evaluar la respuesta a sequía en diferentes genotipos de papas

Material vegetal

En este estudio se evaluaron 10 genotipos de papas; *S. commersonii* Dun PI243503 (clone 13) y de *S. tuberosum* (Yagana, Karu, Cardinal, Patagonia, Pukara, Desiree, R-89054-34, R-87009-28, R-911931). No se evaluaron materiales transgénicos porque no había suficiente material disponible.

Condiciones del experimento

El experimento se realizó en la estación experimental de INIA La Platina (33°34' lat. Sur altura 625 m s.n.m.), en invernadero para evitar el efecto de precipitaciones, bajo condiciones controladas de temperatura (25°C). Las papas fueron establecidas en maceteros de 2 L de capacidad, utilizando como sustrato Sunshine mix 3. Las plantas fueron fertilizadas con salitre potásico con formulación de 15% N, 14% con una dosis de 1,0 g planta⁻¹ y fueron regadas según tratamientos descritos a continuación.

Tratamientos hídricos

Dos condiciones hídricas fueron evaluadas; T1, sin restricciones de riego (100% de reposición) y T2, con restricciones de riego (25% de reposición). Basados en que el periodo de déficit hídrico en esta especie ocurre frecuentemente en el periodo de tuberización, los tratamientos hídricos de estrés se realizaron durante dos semanas durante el periodo de plena tuberización. Posteriormente las plantas se sometieron a recuperación con riego 100% para ambos tratamientos. La distribución de las plantas en el ensayo se muestra en la Figura 5.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con bloques al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo compuesta por cuatro plantas por variedad en cada tratamiento. La validez estadística de los resultados se obtuvo mediante análisis de varianza (ANDEVA) y para la separación de

medias se utilizó el test de Duncan ($p \leq 0,05$). Se usó SAS Program versión 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) año 2003.

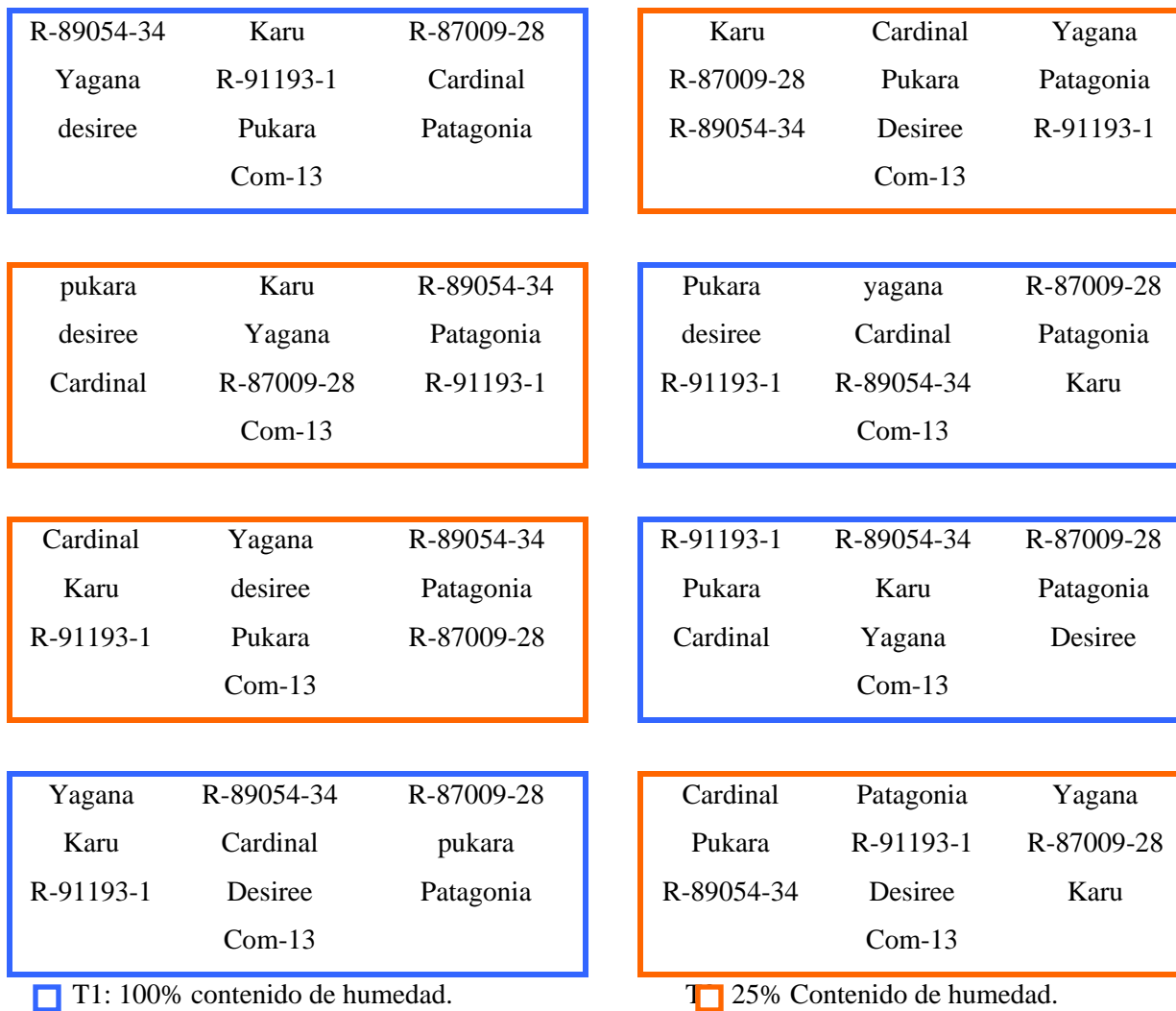


Figura 5. Distribución de los tratamientos de riego y diseño experimental utilizado en evaluación de respuesta a sequía.

Figure 5. Irrigation treatments distribution and experimental design used in drought stress response.

Variables de humedad de suelo, fisiológica y productiva

Contenido de agua en el suelo

Se midió como contenido volumétrico (%) de agua en el suelo y contenido de agua disponible (%) para las plantas utilizando sondas del tipo FDR (Decagon Devices, USA) ECH 5. Estas fueron conectadas a un data logger (EM50), el cual registró la variación del contenido de humedad por maceta cada 30 min.

Conductancia estomática

La conductancia estomática (gs) se midió en $\text{mmol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$. Se utilizó un porómetro marca Decagón, modelo SC-1(USA) (Figura 6). Los registros se realizaron diariamente antes de medio día en hojas maduras (3ª y 4ª hoja).



Figura 6. Medición de conductividad estomática, en papas regadas con un 100% y 25%. A: Pinzas, B: porómetro marca Decagón,USA.

Figure 6. Stomatal conductivity measurement in potatoes plants irrigated with 100% and 25%. A: Clips, B: leaf Porometer Decagon, USA.

Eficiencia de la fotosíntesis

El rendimiento cuántico máximo por genotipo y tratamiento se evaluó mediante relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m), utilizando el fluorómetro (Modelo FMS2 portátil HANSATECH INSTRUMENTS LTD. INGLATERRA). Para ello, cada 2 días las hojas se adaptaron a oscuridad por 30 min (Figura 7).

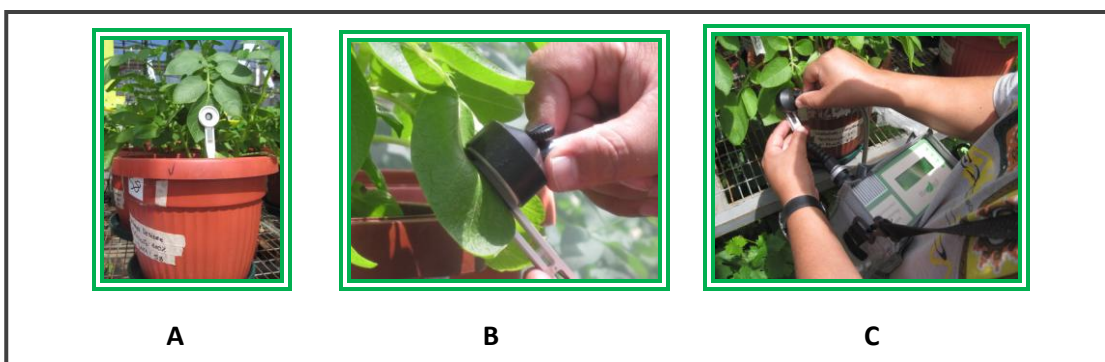


Figura 7. Mediciones realizadas con el fluorómetro (FMS2, HANSATECH) en papas regadas con un 100% y 25%. A: pinzas, B y C: mediciones.

Figure 7. Measurements made with the fluorometer (FMS2, HANSATECH) in potatoes plants irrigated with 100% and 25%. A: clips, B and C: measurements.

Intercambio gaseoso

El intercambio gaseoso fue evaluado según lo indicado por Schittenhelm *et al.* (2004) y Seppanen y Coleman (2003). Se utilizó el sistema portátil de medición de intercambio gaseoso, LI 6400XT (LICOR, Biosciences, Inc. Lincoln, Nebraska, EUA) con una cámara automática para hojas (de 6 cm² de superficie). Específicamente se analizó la tasa fotosintética en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (A) y transpiración $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (EVAP) a una temperatura constante de 25°C, concentración de CO₂ de 400 ppm y una PAR de 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron semanalmente durante todo el periodo del ensayo en hojas completamente expandidas ubicadas en la parte media de cada planta por cada variedad, tratamiento y repetición. Los registros que se muestran corresponden a los obtenidos cada 7 días durante el periodo de evaluación. En la Figura 8 se muestra el sistema portátil de medición (B) y las mediciones de intercambio gaseoso realizadas a las hojas.

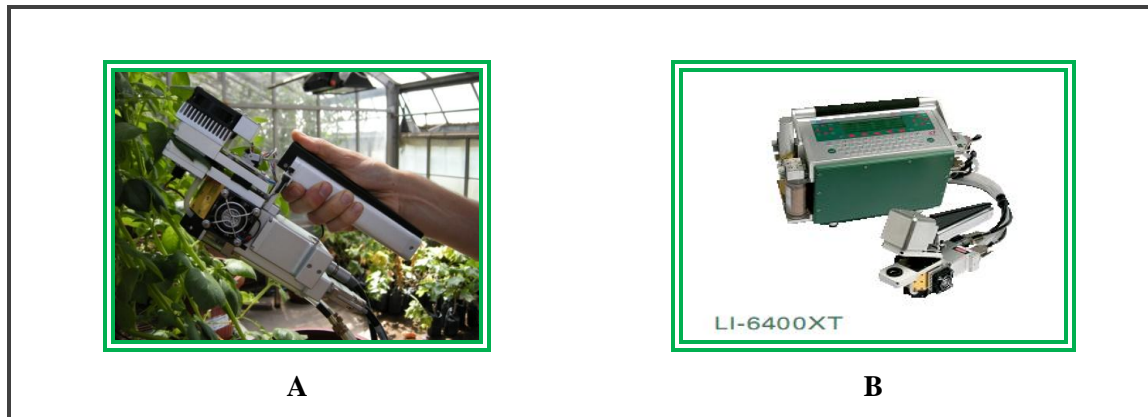


Figura 8. Mediciones de intercambio gaseoso realizadas con el sistema portátil de medición de fotosíntesis LI 6400XT (LICOR, Biosciences, Inc. Lincoln, Nebraska, EUA). A: cámara automática para hojas, B: completo sistema portátil de medición de intercambio gaseoso.

Figure 8. Measurements of gas exchange with LI-6400XT portable photosynthesis system (LICOR Biosciences, Inc. Lincoln, Nebraska, USA). A: automatic leaf chamber, B: complete gas exchange portable system.

Transpiración

Se realizaron dos mediciones de transpiración de las plantas sin estrés mediante la diferencia de peso que presentaron las macetas en el curso del día. Las plantas se regaban a las 08:00 h, posteriormente eran pesadas a las 18:00 h.

Producción por planta

La cosecha se realizó en el mes de enero en forma manual. Se contabilizaron los tubérculos por planta y el rendimiento por planta en gramos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Determinar la tolerancia a heladas en líneas transgénicas de papas conteniendo el gen ScCBF1 clonado desde *S. commersonii*, una especie silvestre de papa altamente tolerante a heladas.

La respuesta a heladas para los genotipos de *S. tuberosum* no transformada (St-WT), *S. commersonii* no transformada (Sc-WT) y líneas transgénicas de las construcciones Z45, Z47 y Z57 se grafica en la Figura 9. Para las líneas transgénicas de *S. commersonii* sólo aquellas que contienen la construcción Z45 (líneas 6, 21 y 22) mejoraron su tolerancia a heladas respecto a los controles no transformados (Sc-WT y St-WT). Las construcciones Z47 y Z57 no mejoraron la tolerancia a heladas en *S. commersonii* ni en ninguna de las otras variedades transformadas con estos genes.

En relación a las líneas transgénicas Z45 de *S. commersonii* evaluadas, se aprecia mayor tolerancia a bajas temperaturas en las líneas Z45-6 y Z45-22 con valores cercanos a $-6,5^{\circ}\text{C}$ comparada con la línea Z45-21 cercano -5°C y respecto a los controles no transformados con el gen ScCBF1. La tolerancia a heladas fue para el control *S. commersonii* no transformado de $-4,0^{\circ}\text{C}$ y para el control de papa cultivada no transformada de $-2,1^{\circ}\text{C}$ (Figura 9A).

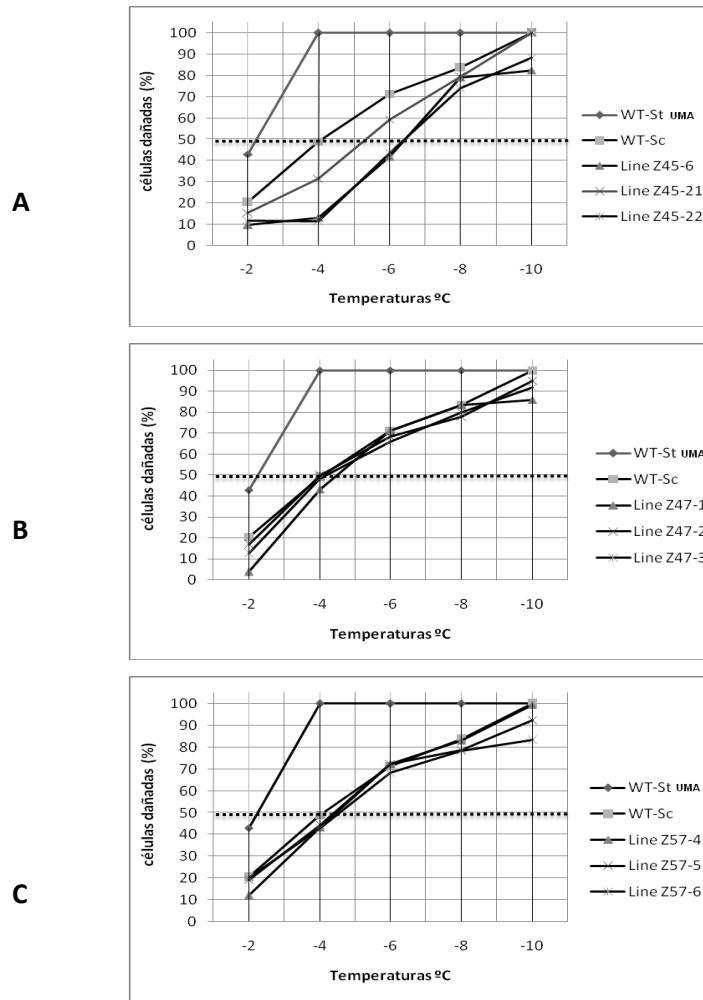


Figura 9. Prueba de tolerancia a heladas (ion leakage test) expresado como porcentaje de células dañadas a -2, -4, -6, -8, y -10°C en plantas de papas no aclimatadas a bajas temperaturas; para los genotipos de *S. tuberosum* no transformado genéticamente (WT-St-UMA), *S. commersonii* no transformado genéticamente (WT-Sc) y las líneas transgénicas de *S. commersonii* conteniendo los genes A) 35S::ScCBF1 (líneas-Z45), B) pSC (líneas-Z47) y C) pSC::ScCBF1 (líneas-Z57).

Figura 9. Frost tolerance test (ion leakage test) expressed as percentage of damaged cells at -2, -4, -6, -8, and -10 ° C in potato plants not cold acclimated; for *S. tuberosum* genetically untransformed (WT-St), *S. commersonii* genetically untransformed (WT-Sc-UMA) and *S. commersonii* transgenic lines containing genes A) 35S:: ScCBF1 (lines-Z45), B) pSC (lines-Z47) and C) pSC: ScCBF1 (lines-Z57).

En la Figura 10 se muestra el porcentaje de células dañadas por bajas temperaturas en plantas transformadas genéticamente con la construcción Z45 de *S. commersonii*, y papa cultivada *S. tuberosum* de los cultivares Umatilla y Cardinal. Los resultados indican que el cultivar Cardinal transformado genéticamente con la construcción Z45 (Figura 10C) mejoró su tolerancia a heladas al igual que *S.*

commersonii (Figura 10A). Respecto a las líneas transgénicas del cultivar Cardinal (Z45-11, Z45-15, Z45-19), la línea transgénica Z45-11 mejoró su tolerancia desde $-2,0^{\circ}\text{C}$ a $-3,2^{\circ}\text{C}$ mientras que la línea transgénica Z45-15 mejoró su tolerancia desde $-2,0^{\circ}\text{C}$ a $-3,0^{\circ}\text{C}$.

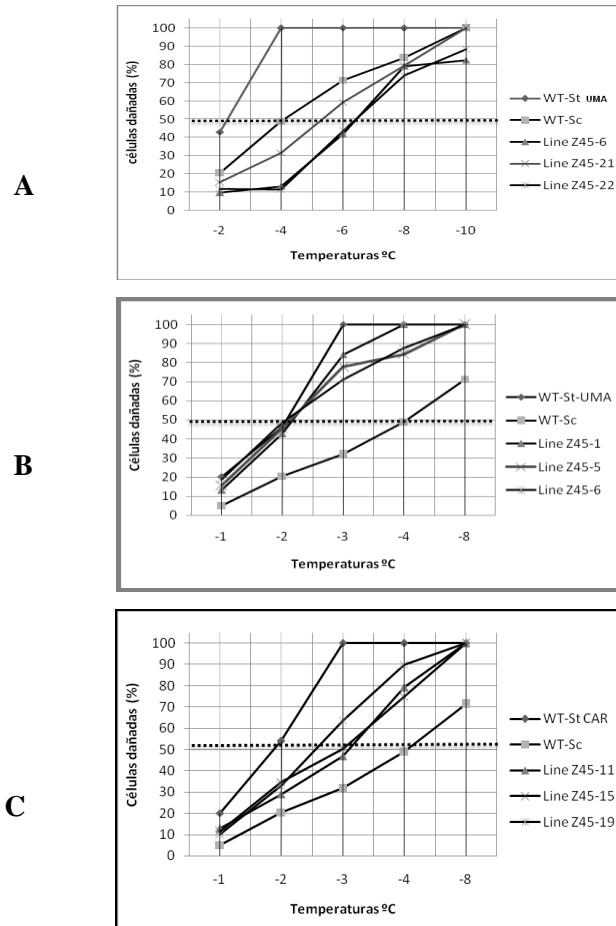
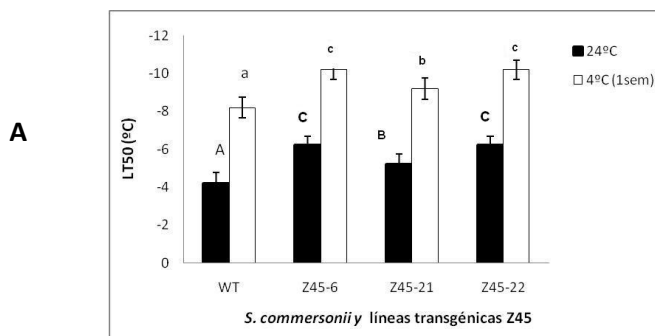


Figura 10. Prueba de tolerancia a heladas (ión leakage test) expresado como porcentaje de células dañadas a -2 , -4 , -6 , -8 , y -10°C en plantas de papas no aclimatadas a bajas temperaturas; para los genotipos de *S. tuberosum* no transformado genéticamente (WT-St-UMA), *S. commersonii* no transformado genéticamente (WT-Sc) y transformados con el gen 35S::ScCBF1 (líneas Z45), A) líneas transgénicas de *S. commersonii* (Z45-6, Z45-21, Z45-22), B) líneas transgénicas del cultivar Umatilla (Z45-1, Z45-5, Z45-6) y C) líneas transgénicas del cultivar Cardinal (Z45-11, Z45-15, Z45-19).

Figure 10. Frost tolerance test (ion leakage test) expressed as a percentage of damaged cells at -2 , -4 , -6 , -8 , and -10°C in potato plants not cold acclimated; for *S. tuberosum* genetically untransformed (WT-St), *S. commersonii* genetically untransformed (WT-Sc-UMA) and transformed with the gene 35S:: Sc- CBF1 (line Z45) A), transgenic lines of *S. commersonii* (Z45-6, Z45-21, Z45-22), B) transgenic lines of cultivar Umatilla (Z45-1, Z45-5, Z45-6) and C) transgenic lines of cultivar Cardinal (Z45-11, Z45-15, Z45-19).

La prueba de Ion Leakage Test para Umatilla no mostró diferencias en relación con las plantas no transformadas (Figura 10B). Por lo tanto, líneas transgénicas del cultivar Umatilla no fueron consideradas en análisis posteriores. Un análisis comparativo de la tolerancia a heladas en plantas aclimatadas a bajas temperaturas durante una semana y no aclimatadas, se muestra en la Figura 11A para las líneas *S. commersonii* transgénicas Z45. Líneas transgénicas (Z45-6, Z45-21, Z45-22) y no transgénicas (WT) mejoraron su tolerancia a heladas en alrededor de -4°C después de ser aclimatadas durante una semana a 4°C . Las líneas Z45-6 y Z45-22 alcanzaron a tolerar temperaturas tan bajas como $-10,2^{\circ}\text{C}$, lo que significó una mejoría de un poco más de -2°C respecto al control no transformado WT. El estudio de expresión del gen ScCBF1 mediante RT-PCR mostró que la expresión de este gen incrementa en la medida que aumenta la exposición a bajas temperaturas (Figura 11B). En *S. commersonii* control no transformado (WT), se observa expresión del gen ScCBF1 porque éste es un gen endógeno de la papa silvestre *S. commersonii*, pero su expresión es menor respecto al observado en las líneas transgénicas Z45 donde el gen es expresado constitutivamente. Además de la expresión del gen ScCBF1, se estudió la expresión de otros genes que responden a bajas temperaturas como el gen D1-pirrolina-5 carboxylatesynthase (P5cs) precursor de prolina, un osmoprotector asociado a respuesta estrés, y el gen Dhn10 que codifica para la proteína dehidrina Dhn10 la cual tiene un rol en el desarrollo de la planta y tolerancia a estrés abiótico. El gene p5cs presentó mayor expresión en la líneas transgénicas Z45, particularmente en la medida que incrementó su exposición a bajas temperaturas. Para el gen Dhn10 tanto WT como las líneas transgénicas expresaron este gen.



* Letras distintas en barras indican diferencia significativa según test de Duncan ($p \leq 0,05$)

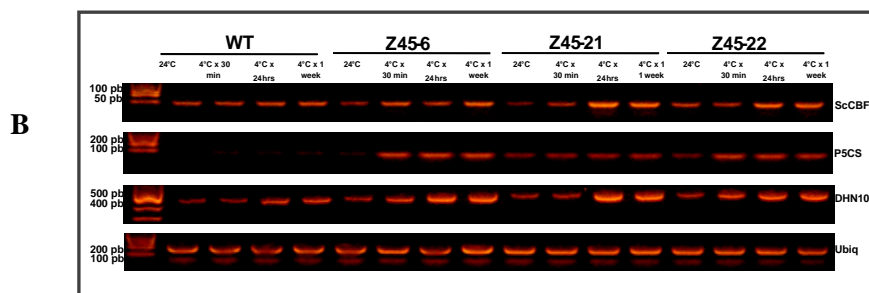


Figura 11. Prueba de tolerancia a heladas y análisis de expresión génica en plantas de *S. commersonii* no transformadas (Sc-WT) y líneas transgénicas Z45-6, Z45-21 Z45-22. A: Ion Leakage Test, temperatura letal a la cual ocurre el 50% de mortalidad de células (LT50) en plantas creciendo a 24°C (no aclimatadas) y luego de ser aclimatadas a 4°C durante una semana. B: estudio de la expresión génica usando la técnica de PCR transcriptasa inversa, para el gen ScCBF1, el gen D1-pirrolina-5carboxylatesyntasa (P5cs) y el gen Dhn10, en plantas no aclimatadas al frío (24°C) y plantas aclimatadas a 4°C durante 30 min (4°Cx30 min), 24 horas (4° C X 24 h) y una semana (4°C X 2 una semana). Ubiquitín (Ubq) se usó como control constitutivo interno.

Figure 11. Frost tolerance test and gene expression analysis in untransformed *S. commersonii* plants (Sc-WT) and transgenic lines Z45-6, Z45-21, Z45-22. A: Ion Leakage Test, lethal temperature at which occurs 50% of cell mortality (LT50) in plants growing at 24°C (non-acclimated) and after cold acclimated to 4° for a week. B: gene expression study using reverse transcriptase PCR for ScCBF1 gene, D1-pyrroline 5carboxylatesynthase (P5cs) gene and Dhn10 gene in plants growing at 24°C (non-acclimated) and after cold acclimated at 4°C for 30 min (4°Cx30min), 24 hours (4°CX 24 hours) and one week (4°C X 2 one week). Ubiquitin (Ubq) internal constitutive control.

Respecto a *S. tuberosum* cv. Cardinal, según los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas ($P = 0,3119$) entre plantas no aclimatadas y plantas aclimatadas durante una semana a 4°C

(Figura 12A). Sin embargo las líneas transgénicas mejoraron su tolerancia a heladas en $-0,5$ a $-1,3^{\circ}\text{C}$ respecto a su control sin el gen (WT). La línea Cardinal transgénica Z45-19 fue capaz de tolerar hasta $-3,3^{\circ}\text{C}$ versus su control que toleró hasta $-2,0^{\circ}\text{C}$. Este grado de tolerancia a heladas también estuvo relacionado con la expresión del gen introducido ScCBF1 y los genes asociados a respuesta estrés como D1-pirrolina-5 carboxylatesynthase (P5cs) y el gen Dhn10. El mayor nivel de expresión del gen ScCBF1, estuvo asociado con mayor expresión de los genes P5cs y Dhn10 particularmente después de ser aclimatadas a 4°C por 24 horas (Figura 12B).

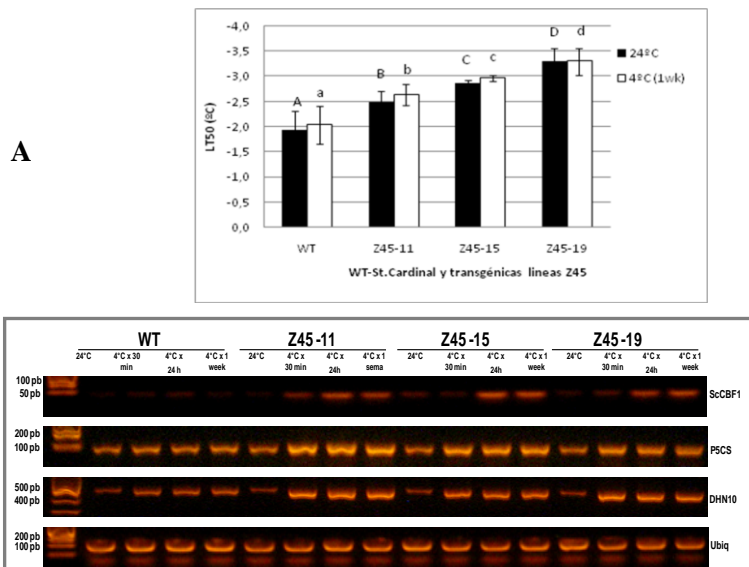


Figura 12. Prueba de tolerancia a heladas y expresión del gen ScCBF1 en plantas de *S. tuberosum* cv. Cardinal no transformadas (St-WT) y líneas Cardinal transgénicas Z45-11, Z45-15, Z45-19. A: Ion Leakage Test, temperatura letal a la cual ocurre el 50% de mortalidad de células (LT50) en plantas creciendo a 24°C (no aclimatadas) y luego de ser aclimatadas a 4°C durante una semana. B: estudio de expresión génica usando la técnica de PCR transcriptasa inversa, para el gen ScCBF1, el gen D1-pirrolina-5carboxylatesynthase (P5cs) y el gen Dhn10, en plantas no aclimatadas a bajas temperaturas (24°C) y plantas aclimatadas a 4°C durante 30 min (4°C X 30 min), 24 horas (4°C X 24 h) y una semana (4°C X una semana). Ubiquitín (Ubq) se usó como control constitutivo interno.

Figure 12. Frost tolerance test and gene expression analysis in untransformed *Solanum tuberosum* cv. Cardinal untransformed (St-WT) and transgenic lines Cardinal Z45-11, Z45-15, Z45-19. A: Ion Leakage Test lethal temperature at which occurs 50% of cell mortality (LT50) in plants growing to 24°C (non-acclimated) and after being acclimated to 4°C for a week. B: study of gene expression using reverse transcriptase PCR for ScCBF1 gene, D1-pyrroline 5carboxylatesynthase gene (P5cs) and Dehydrin gene (Dhn10) in plants grown to 24°C and cold acclimated plants at 4°C for 30 min (4°C X 30 min), 24 h (4°C X 24 h) and one week (4°C X one week). Ubiquitin (Ubq) internal constitutive control.

En previos estudios la expresión del Regulon CBF además de aumentar la tolerancia a bajas temperaturas aumenta la tolerancia a sequía y salinidad (Baker *et al.*, 1994; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Jaglo *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 2002; Kasuga *et al.*, 2004). Este estudio ratifica que cuando existe expresión de este tipo de factores de transcripción mejora la tolerancia a bajas temperaturas y la expresión de genes que de alguna forma protegen a la planta de las bajas temperaturas, particularmente de la formación de hielo. La expresión de P5CS está directamente asociada a la síntesis de prolina, aminoácido que cumple un importante rol como agente osmótico, protegiendo a las células de deshidratación (Chaman, 2007). Es importante destacar que el daño por congelamiento implica deshidratación celular por diferencias de potenciales. Por otra parte, varios estudios han mostrado que plantas más tolerantes a bajas temperaturas presentan mayor expresión de proteínas del tipo dehidrasas, que actúan como chaperonas, estabilizando proteínas, membranas y otras, ante condiciones de estrés (Close, 1996; 1997), en ambas especies de papas evaluadas se observó que la expresión de Dhn10 incrementó con las bajas temperaturas y con la expresión del gene ScCBF1, sugiriendo que este gene podría inducir estos tipos de moléculas que estaría ejerciendo un rol protector contra bajas temperaturas y con ello mejorando la tolerancia a heladas. Es importante destacar que éstos son algunos de los aspectos que estarían siendo influenciados por ScCBF1, y que resta estudiar otros varios aspectos que no han sido abordados en esta tesis, como ultra estructura de la hoja según lo reportado por Pino *et al.* (2008; 2009).

En relación a los resultados de esta investigación se observaron respuestas similares a los descritos en cuanto a tolerancia a heladas para *S. commersonii* y *S. tuberosum* cv. Cardinal, sin embargo la variedad Umatilla transformada con el gen ScCBF1 de *S. commersonii* no presentó mayor tolerancia a las bajas temperaturas comparadas con estas mismas sin transformar, lo cual estaría dado porque el nivel de expresión que logró este gen en Umatilla fue muy inferior al logrado en Cardinal transgénica.

Objetivo 2. Respuesta a déficit hídrico controlado de 10 genotipos de papas, desde el punto de vista del intercambio gaseoso, fotosíntesis y componentes productivos

La respuesta a sequía se evaluó en cultivares de papa cultivada no transgénicos ya que no se constaba con plantas suficientes para realizar la evaluación de tolerancia a heladas y sequía.

Conductancia estomática

Durante la aplicación del estrés hídrico la conductancia estomática disminuyó en los distintos genotipos evaluados (Figura 13). Además, se observan diferencias en el tipo de respuesta entre genotipos. Para *S. commersonii*, una variedad de papa silvestre tolerante a sequía, se observa que la pendiente de descenso es menos pronunciada que el resto de los genotipos. A dos días bajo sequía, la conductancia estomática descendió abruptamente en cultivares como Desiree, alcanzando un 50%. A los cuatro días bajo sequía,

la conductancia estomática disminuyó a menos de la mitad de su capacidad en cultivares como Cardinal, Desiree, Patagonia y R91193-1. Las diferencias en conductividad estomática entre los genotipos fueron significativas desde las primeras etapas de estrés por sequía ($P < 0,0001$). Es importante destacar que los cultivares Desiree, Patagonia y la línea avanzada R91193-1 fueron las más afectadas desde el punto de vista del rendimiento.

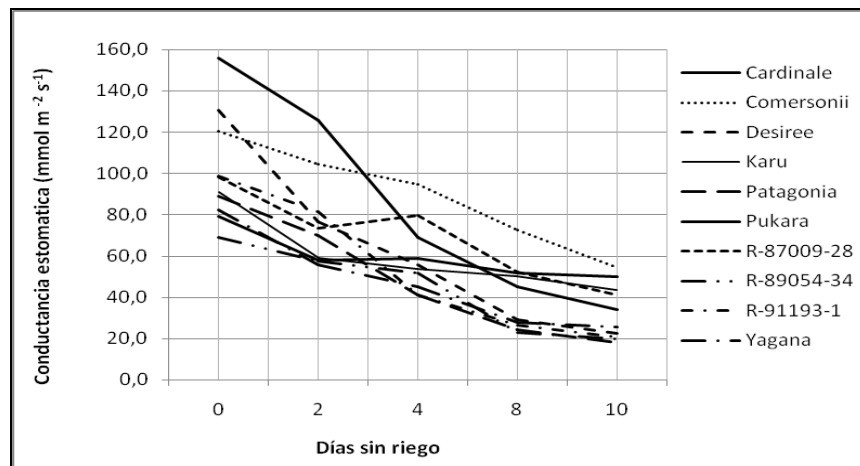


Figura 13. Conductancia estomática [$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$] después de 2, 4, 8, y 10 días bajo estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) en *S. commersonii* y 10 genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Figure 13. Stomatal conductance [$\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$] after 2, 4, 8, and 10 days under water stress (25% replacement of evaporated water) in *S. commersonii* and 10 genotypes of *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Mediciones de eficiencia de la fotosíntesis (Fv/Fm)

Este parámetro fisiológico, mide la variable de fluorescencia máxima después de un periodo de adaptación a la oscuridad, representa el rendimiento cuántico máximo del PSII. Tres de los 10 genotipos evaluados comenzaron a registrar estrés hídrico a partir del cuarto día bajo sequía, con valores Fv/Fm inferiores a 0,800; estos cultivares fueron Patagonia, Pukará y Yagana. Después de 8 días bajo estrés hídrico, sólo *S. commersonii* y la línea tuberosum R89054-34 no registraron estrés de acuerdo a fluorescencia clorofila con valores de Fv/Fm de 0,823 y 0,813 respectivamente. Particularmente, en la papa silvestre *S. commersonii* no se registraron valores inferiores a 0,800 aun después de 10 días bajo estrés por sequía. La diferencia entre los diferentes genotipos evaluados fueron significativas luego de 8 días bajo restricciones hídricas con un valor $P < 0,004$ (Figura 14).

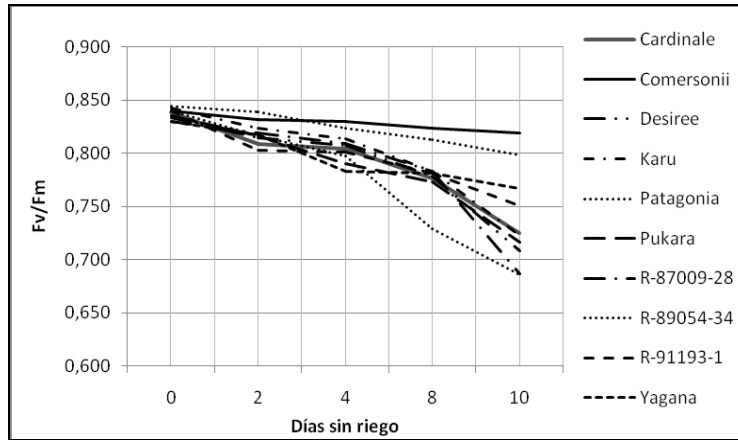


Figura 14. Variación de la fluorescencia de clorofila F_v / F_m , después de 2, 4, 8, y 10 días bajo estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) en *S. commersonii* y 10 genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Figure 14, Variation of chlorophyll fluorescence F_v / F_m after 2, 4, 8, and 10 days under water stress (25% replacement of evaporated water) in *S. commersonii* and ten genotypes of *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karú, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Fotosíntesis neta

Respecto a los resultados obtenidos en la tasa fotosintética, se observó una disminución general para todos los genotipos cuando fueron sometidos a sequía, pero en *S. commersonii* siempre fue mayor en comparación con el resto de los genotipos evaluados, como muestra la Figura 15. Luego de una semana de sequía, los genotipos que redujeron su capacidad fotosintética en más de un 50% fueron Pukará, Yagana, la línea R87009-28 y línea R91193-1. Las diferencias en fotosíntesis neta entre los genotipos fueron significativas desde las primeras etapas de estrés por sequía ($P < 0,0001$).

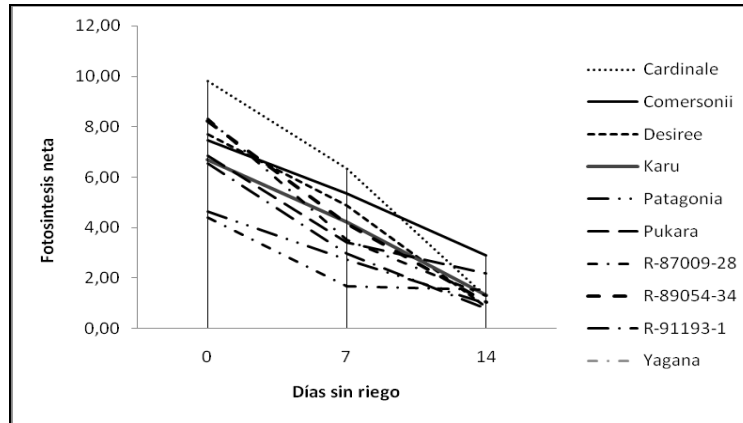


Figura 15. Disminución de la tasa fotosintética neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), después de 0, 7 y 14 días bajo estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) en *S. commersonii* y 10 genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Figure 15. Decrease in net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), after 0, 7 and 14 days under water stress (25% replacement of evaporated water) in *S. commersonii* and 10 genotypes of *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Transpiración

En relación a los resultados obtenidos al evaluar la transpiración por diferencia de peso al principio y final del ensayo, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre los genotipos evaluados respecto al agua evapotranspirada al final del periodo de evaluación ($P= 0,5448$) (Figura 16).

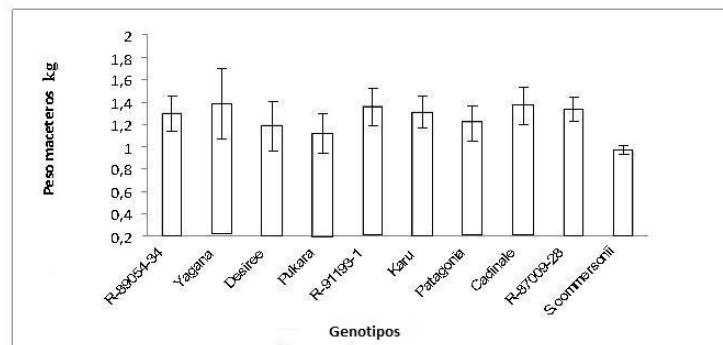


Figura 16. Diferencias de pesos por maceta entre el inicio y final del periodo en que fueron sometidos a estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) en *S. commersonii* y genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Figure 16. Pot weights differences between the beginning and end period in which they were subjected to water stress (25% replacement of evaporated water) in *S. commersonii* and 10 genotypes of *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Varios estudios relacionados con las respuestas fisiológicas frente a estrés por déficit hídrico afirman que las plantas bajo un déficit hídrico, los estomas comienzan a cerrarse provocando una reducción en la transpiración y la fotosíntesis (Acevedo *et al.*, 1998). Del mismo modo Yordanov *et al.* (2003) afirman que la fotosíntesis se ve afectada como consecuencia de una disminución de la apertura estomática para evitar la pérdida de agua por transpiración. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los obtenidos para fotosíntesis, sin embargo respecto a la transpiración por diferencia de peso, ésta no presentó diferencias significativas.

Componentes productivos

Los distintos genotipos de papas sometidos durante dos semanas a sequía, en pleno periodo de tuberización, experimentaron una disminución significativa de la producción por planta (Figura 17). Las diferencias fueron significativas tanto para las variedades ($P=0,0009$) como para los tratamientos ($P<0,0001$). Los genotipos que mostraron mayores pérdidas por planta fueron Pukará, Desiree y Patagonia con pérdidas cercanas al 30%. Mientras la línea R89054-34 fue la menos afectada al ser sometida a estrés hídrico controlado, la producción por planta disminuyó en un 15%.

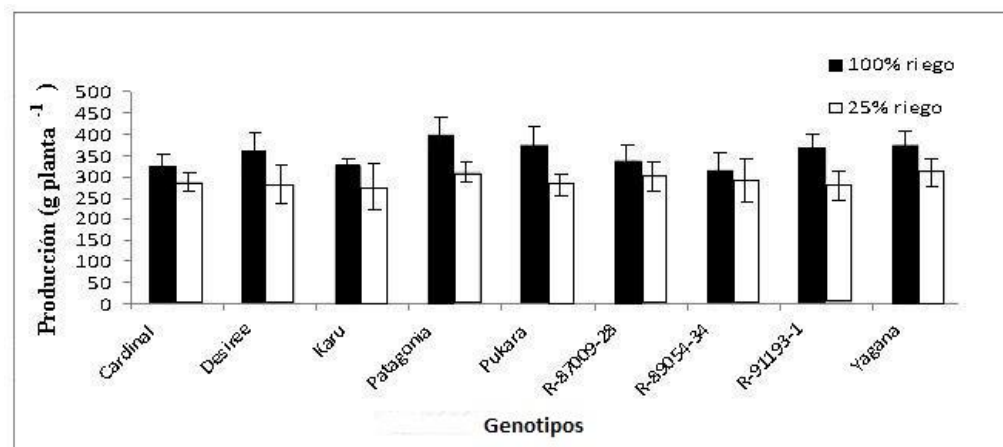


Figura 17. Rendimientos por planta (gramos) en papas regadas sin restricción (100% de riego) y luego de ser sometidos a estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) durante la tuberización en 10 genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Figure 17, Yield per plant (gram) in irrigated potatoes without watering restriction (100% irrigation) and after being subjected to water stress (25% replacement of evaporated water) during tuberization, in 10 *S. tuberosum* genotypes (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Considerando que el periodo de estrés por sequía se realizó mientras las plantas estaban en tuberización, tanto el número de tubérculos como el tamaño de los tubérculos debió ser afectado negativamente. Los resultados mostrados en el Cuadro 3, indican que la mayoría de los genotipos evaluados disminuyó el número de tubérculos por planta al ser sometidos a los tratamientos de sequía, excepto el cultivar Karú y las líneas avanzadas R-87009-28 y R-91193-1 que mantuvieron el número de tubérculos, claro, presentaron menor tamaño y peso. La línea avanzada R89054-34, que fue la menos afectada al ser sometida a estrés hídrico controlado, disminuyó el número de tubérculos por planta de 9 a 8 y prácticamente no presentó variaciones en el peso de tubérculos. Contrariamente, los genotipos Pukara y Desire que fueron más afectados por el tratamiento de sequía en términos de pérdida de peso del tubérculo y número de tubérculos. Yagana también disminuyó el número de tubérculos de 14 a 11 en forma importante pero hubo una compensación en la pérdida de peso individual de éstos.

Cuadro 3. Comportamiento del rendimiento de tubérculos en papas regadas sin restricción de agua (100% de riego) y luego de ser sometidos a estrés hídrico (25% de reposición de agua evaporada) durante la tuberización en nueve genotipos de *S. tuberosum* (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukará, Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Table 3. Behavior of potato tuber yield in plants without watering restriction (100% irrigation) and after being subjected to water stress (25% replacement of evaporated water) during tuberization in nine *S. tuberosum* genotypes (Cardinal, Desiree, Karu, Patagonia, Pukara Yagana, R87009-28, R89054-34, R91193-1).

Genotipos	N° de tubérculos por planta		Peso de tubérculo (g)	
	100% riego	25% riego	100% riego	25% riego
Cardinal	11	10	32,7	38,1
Desiree	9	7	39,5	35,3
Karu	10	10	35,1	27,7
Patagonia	10	7	43,5	48,3
Pukara	9	7	50,3	41,4
R-87009-28	15	14	24,4	20,8
R-89054-34	9	8	40,4	39,6
R-91193-1	6	7	75,5	43,7
Yagana	14	11	28,1	29,9
	P value (tratamiento) < 0,05		P value (tratamiento)= 0,0655	
	P value (genotipo) < 0,0001		P value (genotipo) < 0,0001	
	CV 23,0		CV 36,3	

Estudios realizados por Canadá-Saskatchewan irrigation Diversification Centre (CSIDC) en 1999 con diferentes variedades de papas encontró que un déficit de agua en periodo de iniciación de tubérculo puede reducir la cantidad de éstos, en tanto que un déficit de agua en etapa de llenado puede producir una disminución del tamaño de éstos. De igual manera se observó que la proporción de tubérculos pequeños aumenta en condiciones de estrés hídrico, con bajos niveles de agua aplicada y también con exceso de ella (Puentes, 2004). Estos estudios coinciden con nuestros resultados ya que en la mayoría de los cultivares se observó una disminución del calibre y/o número de tubérculos.

CONCLUSIONES

- El análisis comparativo de la tolerancia a heladas en líneas transgénicas de *S. commersonii*, portando las construcciones Z45, Z47 y Z57 mostró diferencias significativas. Aquellas líneas transformadas genéticamente con el gen ScCBF1 bajo un promotor constitutivo (construcción Z45), mejoraron significativamente su tolerancia a heladas en comparación con su control sin transformar y con las líneas transgénicas Z47 y Z57. Además, los resultados mostraron que las líneas transgénicas Z45 al ser aclimatadas a 4°C durante una semana, mejoraron su tolerancia a heladas respecto a estas mismas sin aclimatar.
- En relación a *S. tuberosum* cv. Cardinal transformada genéticamente con el gen scCBF1 bajo un promotor constitutivo (construcción Z45), mejoró significativamente su tolerancia a heladas en comparación con su control sin transformar. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las plantas aclimatadas y no aclimatadas a bajas temperaturas.
- Respecto a *S. tuberosum* cv. Umatilla transformada genéticamente con el gen ScCBF1, no se observaron diferencias significativas en tolerancia a heladas respecto al control no transformado, para ninguna de las construcciones evaluadas.
- Al estudiar la respuesta a déficit hídrico en *S. commersonii* y nueve genotipos de papa cultivada *S. tuberosum* (Yagana, Karu, Cardinal, Patagonia, Pukara, Desiree, R-89054-34, R-87009-28 y R-911931), los resultados mostraron que la conductancia estomática, la fluorescencia de la clorofila y la tasa fotosintética disminuyeron significativamente en la medida que aumentaron los días bajo déficit hídrico controlado. *S. commersonii* fue menos afectada que papa cultivada.
- En relación a los componentes productivos evaluados bajo sequía en Yagana, Karu, Cardinal, Patagonia, Pukara, Desiree, R-89054-34, R-87009-28 y R-911931, se observó una disminución significativa en la producción por planta en todos los genotipos, entre un 15 y 30%. La línea R89054-34 fue la menos afectada. De igual forma en la mayoría de los genotipos evaluados disminuyó el número de tubérculos por planta, excepto en el cultivar Karu y en la línea R-87009-28 y línea R-91193-1, los cuales mantuvieron el número de tubérculos por planta pero disminuyeron su calibre significativamente.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue ejecutada por el Instituto de Investigación Agropecuaria INIA-La Platina y financiada por el proyecto FONDECYT de iniciación 11075021, y el proyecto INIA-MINAGRI 501364-70, FTG- 8038 (FONTAGRO ATN/OC-11943) bajo la dirección de la Dra. María T. Pino.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, E., H. Silva y P. Silva. 1998. Tendencias actuales de la investigación en la resistencia al estrés hídrico de las plantas cultivadas. Universidad de Chile. Boletín técnico de la Facultad de ciencias agronómicas y forestales (Chile) 49: 1-28.
- Agrimed, 2008. Impactos productivos en el sector silvoagropecuario de Chile frente a escenarios de cambios climáticos. Disponible en <http://www.sinia.cl/1292/article-46115.html>. Leído el 23 de agosto del 2010.
- Alsharari, S., A.A. Alsadon, and A.R. Alharbi. 2007. Evaluation of drought tolerance of potato cultivars under greenhouse conditions. *Acta Horticulturae* 747:67-74.
- Andre, C.M., M. Ghislain, P. Bertin, M. Oufir, M.R. Herrera, L. Hoffmann, J.F. Hausman, Y. Larondelle, and D. Evers. 2007. Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant y mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:366-378.
- Avendaño, C., Trejo, C. López, C. Molina, J. Santa cruz, y F. Castillo. 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia* 30:560-564.
- Ávila, A.A. 2011. Efecto de la expresión del gen ScCBF1 sobre la respuesta a diferentes niveles de disponibilidad hídrica *in vitro* en papa cultivada *Solanum tuberosum* var. Cardinal. 75 p. Tesis Ingeniero en Biotecnología. Universidad Tecnológica de Chile. Santiago, Chile.
- Barrientos, M., E. Mol, A. Peruzzo, A. Contreras, and M. Alberdi. 1994. Responses to cold of chilean wild *Solanum* species. *Environmental and Experimental Botany* 34:47-54.
- Baker, S., K. Wilhelm, and M. Thomashow. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* 24:701-713.
- Benedict, C., J.S. Skinner, R. Meng, Y. Chang, N.P.A. Bhalerao, C.E. Finn, T.H.H. Chen, and V. Hurry. 2006. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant, Cell and Environment* 29:1259-1272.
- Bonilla, A. 2009. Evaluación y selección agronómica de cuarenta genotipos de papas (*Solanum Tuberosum* L.) para tolerancia a estrés hídrico en tres localidades de la provincia de Chimborazo. 89 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica De cimborazo . Facultad de Recursos Naturales. Riobamba, Ecuador.
- Carvalho, M., M. T Pino, Z. Jeknic, C. Zou, C. Doherty, S. Shiu, T. Chen, and M. Thomashow. 2011. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that

- differ in freezing tolerance-*Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 62 (11): 3807-3819.
- Contreras, A. 2003. Papa. p. 599-696. In Faiguenbaum, H., M (Ed.). Labranza, siembra y producción de los principales cultivos de Chile. Ograma S.A. Santiago, Chile.
- Contreras, A. M. 2008. Uso de especies silvestre y cultivada en el mejoramiento de la papa. *Agro sur* 36:115-129.
- Chaman, B. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. Inducido por NaCl. *Arnaldoa* 14: 251- 258.
- Chen, T.H.H., and P. H. Li. 1980. Characteristics of cold acclimation and de acclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology* 65:1146-1148.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Close, T. J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiology Plant* 97: 795-803.
- Close, T. J. 1997. Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiology Plant* 100: 291-296.
- Ekanayake, I. 1994. Estudios sobre estrés por sequía y necesidades de riego en la papa. 40 p. Guía de Investigación CIP N° 19. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- FAO. 2008. Año internacional de la papa 2008 nueva luz sobre un tesoro enterrado. Disponible en <http://www.potato2008.org/es>. Leído el 20 de agosto del 2010.
- Farooq, M., S.M.A. Basra, A. Wahid, Z.A. Cheema, M.A. Cheema, and A. Khaliq. 2008. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy Crop Science* 194:325–333.
- García, D., C. Petzall, y M. Castrillo. 2004. Respuestas al déficit hídrico en las variedades de tomate Río Grande y PERA QUIBOR. *Agronomía Tropical* 54: 411-433.
- Herrera, G. 2005. Evaluación de Chlorpropham como inhibidor de brotes en las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Desirée, Yagana-INIA y Asterix. 96 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile.
- Hijmans, R.J., and D.M. Spooner. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany* 88: 2101-2112.
- Hinojosa, L. 2009. Estudio del comportamiento agronómico de genotipos de papa (*Solanum* ssp.) bajo estrés hídrico en invernadero. *Rumipamba* 23:1.
- Hsieh, T., J., Lee, Y. Charng, and M. Chan. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* 130: 618–626.

- Huamán, Z., and D. Spooner. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum sect. Petota*). *American Journal of Botany* 89: 947–965.
- Inostroza, J. 2009. Manual de papa para la Araucanía: manejo y plantación. 133 p. Boletín INIA N° 147. Instituto de Investigaciones Agropecuaria, Centro Regional de Investigación Carillanca. Chile.
- Jaglo-Ottosen, K., S. Gilmour, D. Zarka, O. Schabenberger, and M. Thomashow. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces cor genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106.
- Jaglo, K., S. Kleff, K. Amundsen, X. Zhang, V. Haake, J. Zang, T. Deits, and M. Thomashow. 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/ Dehydrationresponsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127:910–917.
- Jaleel, C. A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, Al-Juburi, H.J. Somasundaram, and R. Panneerselvam. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 11:100-105.
- Kalazich, J., H. López, y B. Sagredo. 2006. Manual de producción de papa para la agricultura familiar campesina (A.F.C). 172 p. Boletín INIA N° 147. Instituto de Investigaciones Agropecuaria, Centro Regional de Investigación La Platina. Chile.
- Kasuga, M., S. Miura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi. 2004. A combination of *Arabidopsis* DREB1A gene and stress inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant and Cell Physiology* 45: 346-350.
- Leung, J. and Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49: 199-222.
- Li, P.H. 1984. Subzero temperature stress physiology of herbaceous plants. *Horticultural Reviews* 6:373-416.
- Loon, V. 1981. The effect of water stress on potato growth, development and yield. *American Journal of Potato Research* 58: 51-69.
- Llorens, F. 2007. Producción de papa temprana en la comuna de Maullín, Xª Región: propuesta y evaluación de un manejo agronómico. 88 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile.
- Martínez, C., y U. Moreno. 1992. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal* 4:33-38.
- Montenegro, R.M. 2006. Caracterización fisiológica de tres proteáceas chilenas en respuesta al déficit hídrico. 56 p. Tesis Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

- ODEPA. 2010. El mercado de la papa 2009-2010. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl>. Leído el 14 de noviembre del 2010.
- Palta, J.P., B.D. Whitaker, and L.S. Weiss. 1993. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation in *Solanum* species. *Plant Physiology* 103:793-803.
- Parra, R., J. Rodríguez, y V. Gonzales. 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra Latinoamérica* 17: 125-130.
- Peralta, J. 2003. Estrategia para el riego en papa. p. 89-96. *In* Avances en producción de papas en la IX región. Temuco, Chile. 3 de septiembre de 2003. INIA Carillanca. Temuco, Chile.
- Pino, M.T., J. Skinner, Z. Jeknić, E. Park, P. Hayes, M. Thomashow, and T. Chen. 2007. Use of a stress inducible promoter to drive Ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal* 5:591-604.
- Pino, M.T., J. Skinner, Z. Jeknić, P. Hayes, A. Soeldner, M. Thomashow, and T. Chen. 2008. Ectopic At CBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environment* 31: 393-406.
- Puentes, A. 2004. Efecto de diferentes niveles de agua aplicada a través de riego por goteo, durante la etapa de llenado de tubérculos, sobre el rendimiento y distribución de calibres de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Temporada 2000/2001. 62 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile.
- Ríos, B. 2007. Distribución y variabilidad de *Ralstonia solanacearum* E.F.Smith, agente causal de marchitez bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), en tres departamentos del norte de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega). 44 p. Trabajo de Diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, Nicaragua.
- Rodríguez, L. E. 2009. Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). *Agronomía Colombiana* 27:305-312.
- Schittenhelm S., U. and E. Menge-Hartmann, Oldenburg. 2004. Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and yield of phytochrome-B-overexpressing potatoes under different light regimes. *Crop Science*. 44: 131-143.
- Seppanen, M.M., and G.D. Coleman. 2003. Characterization of genotypic variation in stress gene expression and photosynthetic parameters in potato. *Plant Cell Environment*. 26:406-410.
- Skinner, J.S., M.T. Pino, and T.H.H. Chen. 2009. Differential overexpression effects of three *Arabidopsis* CBFs on freezing tolerance and cold acclimation capacity of *Solanum commersonii*, a hardy and cold acclimation-competent potato species. databases Cited for: Nucleotide Sequence GenBank: EU849672.1.

- Steponkus, P.L., R.A. Uemura, S. Joseph, J. Gilmour, and M.F. Thomashow. 1998. Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14570-14575.
- Spooner, D.M., R.G. van den Berg, A. Rodriguez, J. Bamberg, R.J. Hijmans, and S. Lara-Cabrera. 2004. Wild potatoes (*Solanum* section Petota; of North and Central America). *System Botanic Monographie* 68:1-209.
- Spooner, D.M., and W.L.A. Hettterscheid. 2005. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. p. 285-307. In Motley, T.J., N. Zerega, and H. Cross (Eds.). Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, y conservation of crops. Columbia University Press, NY.
- Spooner, D.M., and A. Salas. 2006. Structure, biosystematics, and genetic resources. p. 1-39. In Gopal, J., and S.M.P. Khurana (Eds.). Handbook of potato production, improvement, and postharvest management. Haworth's Press, Inc., Binghamton, NY.
- Spooner, D., F. Rodríguez, Z. Polgár, H.E. Ballard, and S.H. Jansky. 2008. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. The plant genome. *Crop Science* 48(S1): S27-S36.
- Taji, T., C. Ohsumi, S. Iuchi, M. Seki, M. Kasuga, M. Kobayashi, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinosaki. 2002. Important role of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29:417-426.
- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:571-599.
- Thomashow, M.F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!. *Plant Physiology* 125:89-93.
- Vega, S.E., and J.B. Bamberg. 1995. Screening the US potato collection for frost hardiness. *American Journal of Potato Research* 72:13-21.
- Yordanov, I., V. Velikova, and T. Tsonev. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bularian Journal Plant Physiology., Special Issue* 2003, p. 187–206.

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN DE SNPs MEDIANTE GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN
PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

por

Bettina LADO LINDNER

Orientador: PhD. Jarislav VON ZITZEWITZ

Co-Orientador: PhD. François BELZILE

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de *Magister* en Biotecnología**

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Ing. Agr. (PhD) Ignacio Aguilar, Ing. Agr. (PhD) Lucia Gutiérrez, Ing. Agr. (PhD) Omar Borsani y el Lic. (PhD) Sabina Vidal el día 5 de Diciembre del 2012. Autor: Bettina Lado. Director: BSc. (PhD) Jarislav von Zitzewitz. Co-Director: BSc. (PhD) François Belzile.

Agradecimientos

A mi tutor, Jarislav von Zitzewitz, por haberme guiado en este trabajo y estar cuando era necesario, porque fue un camino de aprendizaje para ambos yo como estudiante y él como tutor, por que supo ser un muy buen tutor y sobre todo buena persona.

A mi co-tutor François Belzile, por haberme re-direccionado en mi trabajo y ser la guía que necesitaba en un momento de este largo camino. Por haberme abierto las puertas y hecho sentir tan a gusto durante los meses que pase en su laboratorio en la Universidad Laval, Quebec. Gracias a todo su equipo, quienes formaron parte de una experiencia muy importante en este recorrido, Aurelie, Humira, Elmer, Maxime, Gabrielle y Martin.

A Omar Borsani y el Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía por haberme abierto las puertas y apoyado principalmente en los comienzos de este recorrido, donde más lo necesite. Por su buena onda y el tiempo compartido.

A Ivan Matus y Luis Inostroza quienes aportaron los datos fenotípicos medidos a campo en Chile.

A Joanna Lado y Matías Manzi por su contribución y tutoría informal en este trabajo, y sobre toda las cosas por el “aguante de cabeza” en algunos de los momentos más críticos de este proceso.

A los compañeros de INIA “La Estanzuela” por hacer muchos momentos de ardua labor fáciles de llevar. Gracias también al apoyo por parte de algunos investigadores de INIA, principalmente a Federico Condón y Martín Quincke que aportaron su cuota de conocimiento ha este trabajo.

A mi compañeras de Laboratorio Paula Silva y Luciana Landechea por colaborar de diversas formas siempre que fue necesario, gracias.

A los amigos de la vida, que me recargan las energías y renuevan las motivaciones que me permiten seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi familia por su apoyo incondicional, una vez más. Por ser la fuerza de movimiento en lo momentos en que era más fácil bajar los brazos y por mostrarme que el sacrificio muchas veces es necesario para alcanzar nuestras metas. Porque son la piedra fundamental para que esto haya sido posible.

Finalmente este trabajo no podría haber sido logrado sin el financiamiento del FONDO REGIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (FONTAGRO)-8038, titulado: “Aumento de la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo en Sudamérica ante el cambio climático”, ni sin el apoyo del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
1. <u>INTRODUCCION</u>	10
1.1. BREVE HISTORIA DE LA AGRICULTURA Y EL MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	10
1.2. CULTIVO DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	11
1.3. MÉTODOS DE MEJORA GENÉTICA.....	12
1.3.1. MARCADORES MOLECULARES.....	13
1.3.1.1. Identificación de SNPs	14
1.4. SNPs EN EL ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE POBLACIONES Y ANALISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	21
1.5. ASOCIACIONES ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO.....	22
1.6. SELECCIÓN GENOMICA Y MEJORAMIENTO VEGETAL.....	25
1.7. OBJETIVOS.....	27
2. <u>METODOLOGÍA</u>	28
2.1. GENOTIPADO.....	28
2.2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES.....	28
2.2.1. Pipeline de Tassel.....	29
2.2.2. Pipeline con genoma de referencia.....	30
2.3. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE SNPs (PIPELINES).....	31
2.4. VALIDACIÓN DE SNPs.....	31
2.5. Comparación entre matrices genéticas con sub-grupo de datos.....	31

2.6. Análisis de estructura de la población.....	32
2.7. Comparación entre matrices de coancestría y de parentesco con marcadores.....	32
2.7.1. Mapeo de SNPs.....	32
Análisis de desequilibrio de ligamiento.....	33
2.7.2. Predicciones fenotípicas.....	33
3. <u>RESULTADOS</u>	36
3.1. GENOTIPADO.....	36
3.2. COMPARACIÓN ENTRE PIPELINES.....	38
3.3. VALIDACIÓN DE LOS SNPs IDENTIFICADOS.....	40
3.3.1. Análisis de correlación entre matrices genéticas.....	41
3.3.2. Análisis de estructura de la población.....	42
3.3.3. Mapeo de SNPs y análisis de desequilibrio de ligamiento.....	43
3.3.4. Predicciones fenotípicas.....	46
4. <u>DISCUSIÓN</u>	50
4.1. IDENTIFICACIÓN DE SNPs.....	51
4.2. VALIDACIÓN DE SNPs.....	53
4.2.1. Correlación entre matrices genéticas.....	54
4.2.2. Correlación entre marcadores y pedigrí.....	54
4.2.3. Mapeo de SNPs.....	55
4.2.4. Predicciones fenotípicas.....	56
5. <u>CONCLUSIONES</u>	59
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	60
7. <u>ANEXOS</u>	78

RESUMEN

En mejoramiento genético de cultivos la posibilidad de predecir comportamientos fenotípicos de los distintos cultivares en el campo se ha incrementado debido a los recientes avances en las tecnologías de análisis molecular. Sin embargo, en el caso de trigo (*Triticum aestivum*), existen limitaciones para aplicar algunas de las nuevas tecnologías de identificación de marcadores moleculares, debido a la complejidad de su genoma. En este sentido, el objetivo de este trabajo es aplicar y validar una nueva metodología para identificar variaciones en una sola base (SNPs) en el genoma de trigo. Dicha metodología es sencilla y comprende la construcción y secuenciación de librerías genómicas, a través de la técnica conocida como “Genotipado por Secuenciación”, permitiendo reducir costos en relación a otros métodos. Las muestras de ADN genómico son secuenciadas para posteriormente realizar la identificación de SNPs a través del análisis bioinformático de las secuencias, por dos metodologías diferentes. En la primera (PipT) se comparan entre sí los fragmentos de ADN de las distintas muestras para identificar posibles variaciones entre ellas y en la segunda (PipRef), la comparación se realiza con un ensamblado del genoma de trigo disponible. El método PipT fue el método seleccionado debido a que identificó SNPs con mejores características. El filtrado de falsos SNPs es un paso fundamental en el proceso. Se identificaron 28.199 SNPs en 382 muestras de trigo. Estos SNPs se utilizaron para realizar predicciones fenotípicas de un carácter con baja heredabilidad (rendimiento) y un carácter con alta heredabilidad (peso de mil granos), en dos condiciones ambientales contrastantes: riego y seco. Esto permitió comparar los resultados obtenidos con los datos reales, previamente conocidos, por el método de validaciones cruzadas. Los datos fenotípicos presentaron variación espacial, por lo que se evaluaron distintos modelos para corregir la tendencia encontrada, seleccionando un modelo de ajuste que utiliza medias móviles como covariable. La correlación de las predicciones en rendimiento ajustando por bloques incompletos (diseño a campo) fue de 0,354 y 0,311, obteniéndose una mejora significativa al aplicar el ajuste espacial, en el cual los valores ascendieron a 0,396 y 0,357 en riego y seco, respectivamente. Para peso de mil granos, carácter con mayor heredabilidad, las correlaciones fueron de 0,751 y 0,748 con el ajuste del diseño, frente a 0,787 y 0,799 con ajuste espacial, en riego y seco, respectivamente. Estos resultados permiten concluir que el método desarrollado puede ser aplicado en forma efectiva para detección de SNPs en trigo y que los mismos son válidos tanto para la predicción del peso de mil granos como del rendimiento. Lo anterior constituye una herramienta muy

potente que podría ser utilizada en la selección de material genético dentro de los programas de mejoramiento genético de trigo.

SUMMARY

In crop breeding, the interest of predicting phenotypic behaviors of cultivars in the field has increased due to recent advances in molecular breeding technologies. However the complexity of wheat genome presents some limitation for applied new technologies in molecular markers identification with Next Generation Sequencing (NGS) technologies. Therefore, we applied “Genotyping by Sequencing” (GBS), a recently developed method to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), in the genome of 382 individuals of wheat (*Triticum aestivum*). GBS involves the construction and sequencing of genomic libraries; a simple and low-cost method directly applicable to plant and animal breeding programs. Genomic DNA samples were sequenced to subsequently perform the identification of SNPs through two different bioinformatic analysis methods, which compare the DNA fragments of different samples to identify variations between them or against a pseudo reference genome of wheat. The first one identified SNPs with better characteristics and therefore was used for all subsequent analysis. The step in filtering false SNPs was essential in deciding between these two analyses. 28,199 SNPs were identified in 382 samples of wheat. These SNPs were used to predict a low heritable phenotype (yield) and a highly heritable phenotype (thousand kernel weight), derived from two fields with two different environmental conditions: irrigated and without irrigation. This allowed comparing genomic predictions with the actual data by performing cross-validations. The phenotypic data showed spatial variation. Therefore, different models were tested to correct the trend found in the field, where the model that best fits the data was the one using moving-means as a covariate. The correlations of the predicted yields, adjusted for the incomplete block field design, were 0.354 and 0.311 and with spatial adjustment were 0.396 and 0.357, in irrigated and without irrigation, respectively. For thousand kernel weight, correlations were 0.751 and 0.748 with field design adjustment and 0.787 and 0.799 with spatial adjustment in irrigated and without irrigation respectively. These results allow concluding that the developed method can be applied effectively for SNPs detection in wheat being valid for thousand kernel weight and yield predictions. Finally, this is a powerful tool that could be applied in selection of genetic materials inside a breeding program.

ABREVIATURAS

SNP – Polimorfismo en una sola base de ADN

NGS – Secuenciación por técnicas de nueva generación

GBS – Genotipado por secuenciación

PCA – Análisis de componentes principales

PCoA – Análisis de coordenadas principales

LD – Desequilibrio de ligamiento

GS – Selección Genómica

GEBV – Valores de cría genéticos estimados

PipT – Pipeline de Tassel

PipRef – Pipeline con genoma de referencia

LS – Diseño de Látice Simple

FC – Diseño de Filas y Columna

BCA_MVNG – Diseño de bloques completos al azar con medias móviles como covariable

MVNG – Diseño de regresión lineal con medias móviles como covariable

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BREVE HISTORIA DE LA AGRICULTURA Y EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

La agricultura puede definirse como “arte, ciencia e industria que se ocupa de la explotación de plantas y animales para el uso humano”. La agricultura moderna depende en gran medida de otras ciencias como la ingeniería, ciencias biológicas y físicas, así como también de la tecnología disponible. Existen diversas teorías de las causas que impulsaron el desarrollo de la agricultura. Una de ellas habla de causas multivariadas en las cuales intervienen la presión por la necesidad de recursos (presiones poblacionales), los cambios climáticos y el desarrollo tecnológico (Flannery, 1982; McNeish, 1992). Se estima que la agricultura como tal se inicia en el año 10.000 a.C., y luego de 3000 años se convierte en la principal forma de obtener alimentos en diversas sociedades en todo el mundo. La agricultura no sólo permitió el crecimiento de las poblaciones, dada la mayor abundancia de alimentos, sino que permitió la conquista de nuevos territorios en los cuales no se podía vivir anteriormente.

Los primeros cultivos se domesticaron en Medio Oriente entre los años 9600 y 8500 a.C., siendo el trigo (*Triticum monoccocum* y *T. diccicum*) y la cebada (*Hordeum vulagre*) los primeros cereales en ser domesticados. En China, en el año 7500 a.C., aparecen los primeros indicios de cultivo de arroz (*Oryza sativa*) y soja (*Glycine max*) (Diamond, 2002). La domesticación de plantas implica modificar artificialmente un esquema genético generado a través de la selección natural, con el objetivo de adaptar las plantas a las distintas características de las zonas habitadas por el hombre. Esta selección favorece la sobrevivencia de características deseadas en estas poblaciones de cultivos, en detrimento de las indeseables. Por lo tanto, la domesticación es definida como un proceso de selección genética continuo llevado a cabo por el hombre. (Gepts y Papa, 2002; Gepts, 2004).

El mejoramiento genético vegetal puede definirse como la ciencia cuyo objetivo es modificar genotipos, mejorándolos con un fin determinado de acuerdo a las necesidades del hombre (Frankel, 1958). El principal objetivo de la domesticación de cultivos ha sido el incremento del rendimiento, con el fin de aumentar la disponibilidad de alimento para el ser humano. Existen ciertas condiciones necesarias dentro de un proceso de mejora genética vegetal, entre las que destacan, la existencia de variabilidad genética o la capacidad de crearla, la capacidad para detectar dichas diferencias con potencial valor para el hombre y la manipulación de

dicha variación que permita obtener cultivares agrónomicamente estables (Zamir, 2001). Los mayores avances en el mejoramiento genético de plantas se han producido en la era moderna, debido a algunos descubrimientos científicos claves. Las primeras evidencias son aportadas en 1694 por Camerarius, quien describe la sexualidad en las plantas (Zirkle, 1935 revisado por Rieseberg y Carney, 1998). Luego en 1717, Fairchild produce artificialmente la primera planta híbrida de clavel (Rieseberg y Carney, 1998) y en 1859 Darwin publica el “Origen de la especie”, libro en el cual postula su teoría sobre la selección natural y la evolución. Posteriormente, en 1866, Mendel realiza sus primeros experimentos que dieron origen a las conocidas “Leyes de Mendel”. A partir de estos conocimientos, ya en el siglo XX se producen un gran número de descubrimientos en el área de la genética y el mejoramiento vegetal, los cuales han aportado las bases para entender los mecanismos que operan en la selección natural (Bringham, 1981; Borlaug, 1983). Dichos descubrimientos han aportado información para determinar los patrones de evolución de las especies cultivadas, variaciones mendelianas, hibridación intra-específica y poliploidía, estos patrones que se han utilizado por los mejoradores son los mismos mecanismos que han formado parte de la selección natural (Vaughan et al., 2007)

Una de las mayores contribuciones de los procesos de mejora genética ha sido la adaptación de variedades a nuevas áreas, lo que requiere ajustar el ciclo de crecimiento y los requerimientos del cultivo a las características de la nueva región. Otros aportes importantes han sido la mejora en características agrónomicas, entre las que se destacan resistencia a enfermedades y plagas, la tolerancia a condiciones ambientales adversas como por ejemplo, altas y bajas temperaturas y déficit hídrico (Cornide, 2001).

1.2. CULTIVO DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

El trigo es uno de los principales cultivos a nivel mundial, siendo el pilar básico para la alimentación humana. Actualmente la producción mundial de trigo se ubica en el quinto lugar con 653 millones de toneladas y ocupa el primer lugar en hectáreas sembradas (FAO-STAT, 2010). Los principales países productores son: China, India, Estados Unidos, Francia y la Federación Rusa, en el hemisferio sur Australia, Argentina y Brazil (FAO-STAT, 2010). En Uruguay, el trigo es el principal cultivo de invierno, y su producción ha ido en aumento en los últimos años, con una producción de 205 mil toneladas en la zafra 2002/03 a 1.300 miles

de toneladas en 2010/11 (DIEA-MGAP, 2011). Esto lo convierte en el segundo cultivo en importancia después de la soja (FAO-STAT, 2010).

El trigo es una especie autógena y hexaploide, producto de la hibridación de 2 especies de *T. turgidum* (el cual posee los genomas A y B) y *Aegilops tauschii* (que aporta el genoma D) (McFadden y Sears 1946, Kihara et al., 1944 revisado por Chao et al., 2010). A su vez, la especie *T. turgidum* es producto de una hibridación previa de *T. uratu* (genoma A) y *A. speltoides* (genoma B) (Sarkar y Stebbins, 1956; Dvorák y Zhang, 1990; Dvorák et al., 1993). En este sentido, la característica poliploide del trigo ha dificultado el desarrollo de mapas genéticos, así como el estudio de caracteres de herencia compleja, ya que las variables agronómicas se ven influenciadas por genes provenientes de 3 genomas distintos. Algunas de estas dificultades han sido superadas con la construcción de plantas nulisómicas (Lafever y Patterson, 1964) y monosómicas (Allan y Vogel, 1964), las cuales poseen un menor número de cromosomas que las plantas normales. A su vez, el genoma de trigo presenta otras características, como su gran tamaño (16Gb, cinco veces el genoma humano), un alto número de regiones repetidas (80%) (Bennett y Smith, 1976;) y un 25 a 30 % de sus genes duplicados (Dubcovsky et al., 1996; Akhunov et al., 2003) que dificultan el desarrollo de análisis genéticos precisos en esta especie. Posee una gran ventaja ya que, al ser una especie autógena, presenta bajos niveles de heterocigocidad y bajas proporciones de flujo génico (<1 %) debido a un reducido nivel de polinización cruzada (Martin, 1990; Gustafson et al., 2005).

Uruguay fue el país pionero en América Latina en lo referente al mejoramiento del cultivo de trigo con los trabajos desarrollados por el Dr. Alberto Boerger (Bonfanti, 2010). La creación del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) permitió intensificar la colaboración entre México y otros países y el envío de materiales al resto del mundo (Heisey et al., 2002). Por lo tanto, la investigación en mejoramiento genético en el cultivo de trigo en Uruguay es un pilar fundamental que aporta al desarrollo económico del país y del mundo.

1.3. MÉTODOS DE MEJORA GENÉTICA

Los métodos clásicos de mejora genética de cultivos (cruzamiento, retrocruzamiento y selección a campo de genotipos más promisorios) han sido y siguen siendo fundamentales en la obtención de cultivares con las características fenotípicas y agronómicas deseadas

(Koebner y Summers, 2003). Por otro lado se han desarrollado nuevos métodos que apuntan a la creación de variabilidad genética. En 1920 se descubre la posibilidad de generar mutaciones en el genoma, exponiendo la planta a radiaciones o por medio de compuestos químicos, lo que permitió obtener variedades comerciales empleadas actualmente (Peterson y Shama, 2005). Este momento podría considerarse el comienzo de la incorporación de técnicas biotecnológicas o de ingeniería genética en la mejora clásica de los cultivos. Estas herramientas ofrecen diversas ventajas, entre las que se destacan la inclusión de genes de interés presentes en otras especies dentro del cultivo objetivo del mejoramiento (transgénesis) y la posibilidad de acortar los tiempos en la obtención de un cultivar con las características deseadas. La selección asistida por marcadores moleculares se incluye dentro del grupo de métodos que permiten reducir estos tiempos, y se basan en la identificación de marcadores asociados a genes de interés, lo que permite seleccionar materiales por sus características genéticas (Koebner y Summers, 2003). El éxito de la selección mediante características genéticas depende en gran medida del número de genes involucrados en el control genético del carácter, de las relaciones inter-alélicas (dominancia o recesividad) y de la influencia del ambiente, medida comúnmente mediante el parámetro conocido como heredabilidad (Mackay et al., 2009). La heredabilidad se define como la proporción de variación fenotípica en una población que puede ser explicada por la varianza genética entre los individuos (Holland et al., 2003). El interés de la aplicación de estos marcadores dentro de un programa de mejoramiento genético, surge con diversos objetivos entre los que se destacan la posibilidad de identificar factores genéticos útiles en poblaciones, introgresar genes de interés en líneas de mejoramiento, estudiar la interacción genotipo ambiente, monitorear la diversidad genética e identificar cultivares y/o germoplasma con un mayor potencial agronómico (Sorrels, 1998; Stuber et al, 1999).

1.3.1. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares surgen como una herramienta útil para alcanzar los objetivos de la mejora genética, permitiendo conjugar la variabilidad genotípica y fenotípica, siendo utilizados como criterio de selección (Bonnett et al., 2005). Hasta hace pocos años la única herramienta disponible para genotipar el ADN eran los marcadores del tipo microsatélites (SSR), polimorfismo en el largo de los fragmentos amplificados (AFLPs), polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLPs), entre otros. Estos métodos, requieren la

inversión de mucho tiempo y recursos, tanto para su desarrollo como para su aplicación en la evaluación de poblaciones, principalmente cuando es necesario evaluar un gran número de marcadores en diversos individuos (Gupta et al., 2008). Estos marcadores mostraron ser muy efectivos a la hora de identificar los efectos de genes que codifican características simples. En cambio, no sucedió así en el caso de características complejas, en las cuales interactúan muchos genes, cada uno de ellos en distinta proporción (Collard et al., 2005; Buerstymayr et al., 2009). Otro tipo de marcador empleado: los SNP, polimorfismos en una sola base. Este tipo de marcador ha cobrado importancia en los últimos tiempos debido a su abundancia en el genoma y a las tecnologías desarrolladas para su identificación (Gupta et al., 2008).

Dentro de las nuevas tecnologías que permiten identificar SNPs se encuentran los microarreglos (Jaccoud et al., 2001), que han significado un avance en la caracterización genotípica, dado que permiten una cobertura de alta densidad de marcadores y aceleran los tiempos de evaluación. Sin embargo, esta sigue siendo una tecnología muy costosa que requiere inversión de tiempo y recursos para ser desarrollada (Akbari et al., 2006). Estas limitantes han conducido al desarrollo de nuevas tecnologías que permiten el genotipado de miles de marcadores en cientos de individuos, sin la necesidad de una identificación previa de los mismos (Hyten et al., 2010c). Dentro de estas nuevas tecnologías se encuentran los métodos de preparación de librerías, la secuenciación y el análisis bioinformático para identificar SNPs, los cuales se basan en la re-secuenciación del genoma en pequeños fragmentos de ADN de las distintas muestras a genotipar. La alineación de estos fragmentos entre sí y/o contra un genoma de referencia, permite identificar variaciones genéticas de cambios en una única base nucleotídica, inserciones y/o deleciones de las mismas. Este tipo de secuenciación a gran escala permite identificar un elevado número de marcadores en el genoma, a un costo más reducido, haciendo posible su utilización como herramienta de apoyo a los programas de mejoramiento de cultivos vegetales (Ingvarsson y Street, 2011)

1.3.1.1. Identificación de SNPs

Métodos de preparación de librerías genómicas

Existen diversas técnicas de preparación de librerías, las cuales, permiten preparar el ADN que va a ser secuenciado. Actualmente, los métodos más utilizados se centran en el uso de enzimas de restricción, las cuales realizan cortes en regiones específicas del genoma, que

permitan obtener una representación reducida de este. Existen distintos métodos que utilizan enzimas de restricción, los principales son, la secuenciación de representación reducida (RRL), la secuenciación de ADN asociada a los sitios de restricción (RAD-seq) y la secuenciación de baja cobertura para genotipado (Davey et al., 2011, Figura 1). Una de las grandes ventajas del uso de enzimas de restricción, es la posibilidad de excluir regiones altamente repetidas en el genoma, debido a que existen enzimas que son sensibles a las regiones metiladas y no son capaces de cortar en estos sitios (Davey et al., 2011). Todos los métodos de preparación de librerías con enzimas de restricción involucran la digestión del ADN genómico (con una o más de estas enzimas) y selección o reducción en el número de fragmentos, para la posterior secuenciación de los fragmentos seleccionados (Davey et al., 2011).

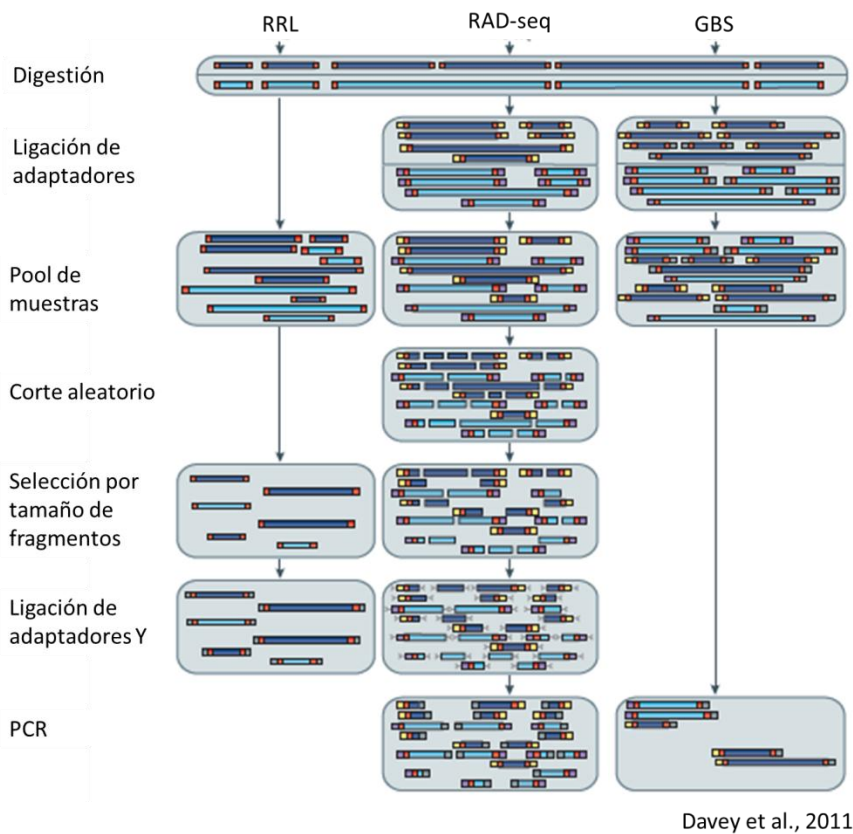


Figura1. Esquema de la preparación de librerías de ADN por distintos métodos que utilizan enzimas de restricción, secuenciación de representación reducida (RRL), secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción (RAD-seq) y Genotipado por Secuenciación (GBS).

Este trabajo, se ha centrado en la evaluación de un método denominado Genotipado por Secuenciación (GBS), el cual se clasifica dentro del grupo de los métodos de secuenciación

de baja cobertura (Davey et al., 2011). Estos son métodos que permiten secuenciar un gran número de individuos, aunque con una menor cobertura en cada uno de ellos. Si bien en estos casos, se reduce la cobertura de marcadores por individuo, el método supone que un subgrupo de diferentes marcadores son genotipados en distintos individuos. La estrategia entonces es poder utilizar marcadores que estén respaldados por un gran número de lecturas y mejorar la cobertura por medio de la imputación de los genotipos sin información dentro de la población de individuos que han sido secuenciados conjuntamente. Una ventaja muy importante de este método es su sencillez y el bajo costo por muestra (Elshire et al., 2011).

El primer paso en la aplicación de esta técnica es la obtención y posterior normalización de ADN de alta pureza. Este paso asegura que todas las muestras contienen la misma cantidad de ADN para ser secuenciado. A continuación, se colocan 2 adaptadores, los cuales van a ligarse al ADN. Estos adaptadores son oligonucleótidos que cuentan con: la secuencia complementaria al oligo que se encuentra unido a la celda de flujo del secuenciador, la secuencia de los oligonucleótidos usados para amplificar las lecturas y los sitios de restricción correspondientes. Uno de ellos cuenta también con el código de barras que permite identificar las muestras. Es importante que los adaptadores se encuentren a la misma concentración antes de ser adicionados en las distintas muestras. El siguiente paso consiste en la digestión del ADN con las enzimas de restricción, a continuación se agrega el adaptador junto con una enzima ligasa, ocurriendo la unión del ADN a los correspondientes adaptadores. Debido a que cada muestra se encuentra identificada con su código de barras, es posible secuenciar conjuntamente 96 o más muestras y formar el multiplex. A continuación, el pool de ADN se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa o Polymerase Chain Reaction (PCR) y se realiza una limpieza para eliminar posibles “artefactos”. Para finalizar, la calidad de la librería se confirma por electroforesis en gel de agarosa y su concentración se mide con la técnica de PicoGreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR) (Ahn et al., 1996) (Figura 2). Una vez alcanzado este punto, el material se secuencia masivamente. Esta tecnología de caracterización genotípica se ha aplicado recientemente con éxito en especies alógamas como maíz (Elshire et al., 2011), switchgrass (Grabowski et al., 2012), vid (Baldo et al., 2012) y eucalipto (Grattapaglia, 2012), y también especies autógamias como ser cebada (Elshire et al., 2011) y trigo (Poland, et al. 2012a).

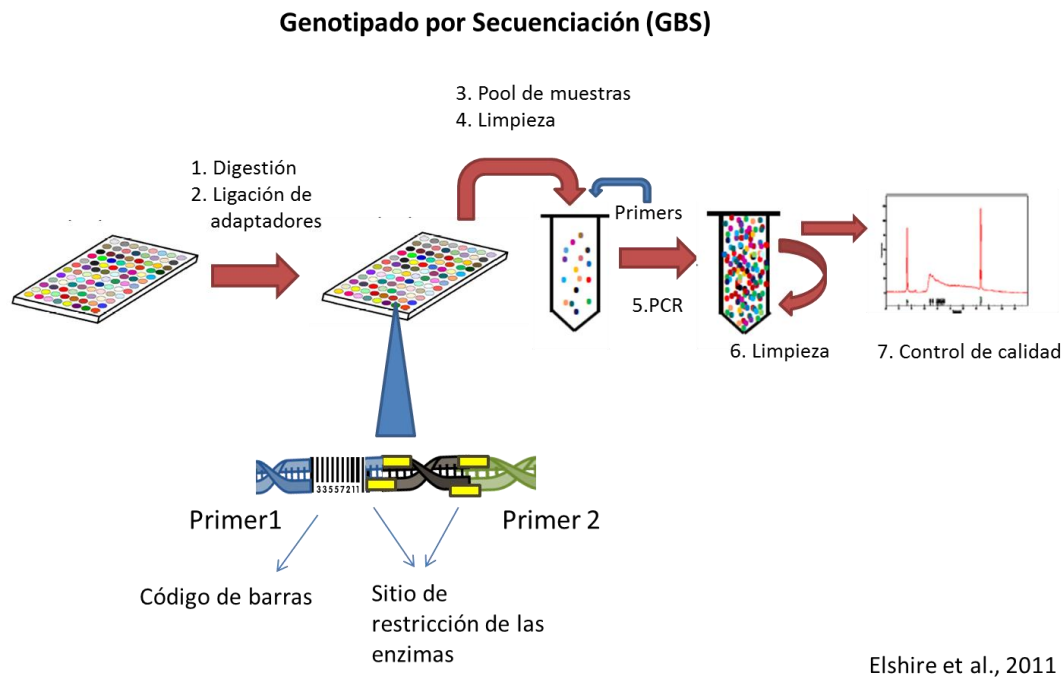


Figura 2. Esquema de la metodología de Genotipado por Secuenciación, en el cual se indica detalladamente los sucesivos pasos de la técnica.

Métodos de secuenciación masiva

La primera tecnología desarrollada con el fin de secuenciar el genoma ha sido el método de secuenciación automática Sanger (Sanger et al., 1977), la cual se aplicó para lograr la secuenciación del genoma humano (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). La tecnología Sanger se clasifica dentro del grupo de tecnologías de primera generación. La concentración de recursos en esta área permitió el desarrollo de nuevas tecnologías denominadas de secuenciación masiva o “Next Generation Sequencing” (NGS). Dentro de las NGS se pueden clasificar las tecnologías de segunda, tercera y cuarta generación. La principal ventaja de las tecnologías de segunda generación es su capacidad para generar mucha información con menos recursos, existiendo distintas plataformas desarrolladas para la secuenciación (Metzker et al., 2010; Niedringhaus et al., 2011). Las tecnologías de tercera y cuarta generación se diferencian de las de segunda generación porque se secuencian una única molécula de ADN (Levene et al., 2003). Lo anterior permite evitar el paso de amplificación, en el cual es posible generar errores de secuenciado. En el caso de las llamadas metodologías de cuarta

generación, existe también un cambio en el detector, en el cual se reemplaza la fluorescencia por una señal eléctrica (Branton et al., 2008).

Este trabajo se centra en la aplicación de técnicas de segunda generación, dado que las de tercera y cuarta generación se encuentran aún en proceso de desarrollo (Niedringhaus et al., 2011). Como se ha comentado, existen distintas plataformas desarrolladas para la aplicación de las técnicas de NGS y la elección de las plataformas de secuenciación depende de cuales sean los objetivos. Las principales plataformas comerciales en la segunda generación de NGS son: Roche/454®, Illumina/Solexa® y Applied Biosystems/SOLID®. Las diferentes plataformas se distinguen por las tecnologías utilizadas para secuenciar: las plataformas de Roche e Illumina utilizan la llamada secuenciación por síntesis (Niedringhaus et al., 2011), mientras que SOLID®, de Applied Biosystems aplica un método de secuenciación por ligación (McKernan et al, 2009). A su vez, mientras Roche usa el método de emulsión por PCR para amplificar las moléculas de ADN, Illumina utiliza la amplificación en fase sólida, diferenciándose ambas también en las tecnologías de detección de fluorescencia (Metzker, 2010). A la hora de escoger una u otra plataforma de secuenciación es importante conocer las diferencias en los tipos de datos que generan, como por ejemplo, distintas puntuaciones de calidad de las bases, diferencias en la precisión de la secuenciación y en el largo de las secuencias, entre otras.

En este trabajo se utilizó la plataforma Solexa® de Illumina, en la cual, los oligonucleótidos de secuencia complementaria a los adaptadores de los fragmentos de ADN de las librerías, se encuentran unidos covalentemente a la celda de flujo del secuenciador. Los fragmentos de ADN se inmovilizan en la celda de flujo al hibridar con los oligonucleótidos, luego se unen separados entre sí permitiendo que ocurra la formación de los clusters de moléculas de ADN idénticas. La formación de clusters se produce porque cada molécula de ADN hibrida a través de su extremo libre, con el segundo adaptador, a un nuevo oligo vecino unido a la celda, formando lo que se llaman puentes de amplificación (Figura 3). Una vez formado los mismos, una polimerasa se encarga de copiar la hebra, la cual es clivada y desnaturalizada (Figura 3). Este proceso se repite muchas veces hasta formar los clusters, los cuales cuentan con aproximadamente 1000 moléculas idénticas de ADN simple hebra. En cada celda de flujo es posible formar más de 150 millones de clusters. Es importante conocer este proceso, ya que durante el mismo es posible que se introduzcan errores, siendo fundamental su consideración para la correcta detección de SNPs. A continuación, el chip se transfiere a la

plataforma de fluidos de Illumina para la secuenciación propiamente dicha. La secuenciación se inicia con la hibridación de un cebador complementario al adaptador en el cual se va a anclar la polimerasa para iniciar la elongación, la cual adiciona de uno en uno, nucleótidos marcados fluorescentemente con 4 colores diferentes. Luego de agregar cada nucleótido, se cumple un paso de lavado, el cual es seguido del registro fluorescente por parte del detector. Para finalizar, tanto el terminador como el marcador fluorescente son removidos, cerrando el ciclo con un nuevo lavado. Estos pasos se repiten numerosas veces y cada secuencia de pasos es denominada ciclo. Este sistema es capaz de producir lecturas de un largo de 100 pb ya que para obtener mayores tamaños sería necesario incrementar el número de ciclos, existiendo una mayor probabilidad de producir un desfase en la elongación de las hebras de ADN (Erlich et al., 2010). Si esto ocurre, la presencia de una población heterogénea de lecturas dentro de un cluster produce ruido de fondo, el cual disminuye la pureza de la señal y por ende, la precisión. Esta limitación no es tan significativa en la plataforma de 454® de Roche, donde se obtienen lecturas de largos mayores entre 400 y 500 pb (Knierim et al., 2011).

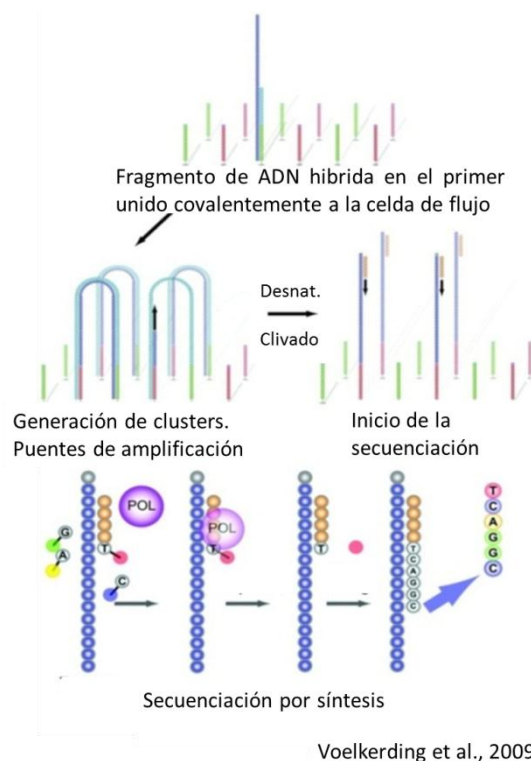


Figura 3. Esquema representativo del proceso de secuenciación de ADN mediante la plataforma Illumina/Solexa. Se detalla la unión del fragmento de ADN a la celda de flujo, la formación de los puentes de amplificación y los clusters correspondientes y por último, la secuenciación mediante la adición de nucleótidos marcados fluorescentemente.

El error más común producido por esta metodología es la sustitución de una base nucleotídica por otra. Esto es aún más frecuente cuando el nucleótido anteriormente adicionado es una Guanina (Dohm et al., 2008). También se ha registrado una mayor pérdida de fidelidad al secuenciar regiones ricas en repetidos AT y GC, probablemente debido a errores durante la amplificación en la construcción de los clusters (Dohm et al., 2008; Hillier et al., 2008; Harismendy et al., 2009). A pesar de que la plataforma Illumina presenta limitaciones, la cantidad de datos que genera y la accesibilidad en relación a los costos, en comparación con otras plataformas, hace que sea una de las tecnologías más utilizadas actualmente. Es una tecnología que ha sido exitosamente aplicada en la secuenciación y genotipado de genomas de grandes tamaños, como por ejemplo trigo y maíz (Akhunov et al., 2009, Elshire et al., 2011).

Identificación de SNPs – Análisis bioinformático

Una vez generados los datos de secuenciación, el desarrollo en el área de la tecnología y la bioinformática permite disponer de las herramientas necesarias para identificar posibles marcadores a partir de las secuencias crudas provenientes del secuenciador. Para analizar estos datos es necesario contar con procesadores que permitan almacenar y procesar Giga a Terabytes de datos. No existe una metodología estándar para el análisis de secuencias, variando con la especie en estudio, así como también con los métodos de construcción de librerías y de secuenciación que se utilicen (Nielsen et al., 2011).

Un proceso factible para el análisis de los datos es la división en dos etapas. La primera, que comprende el procesamiento de secuencias y el alineamiento las mismas (ya sea contra un genoma de referencia o entre las mismas secuencias) y la segunda, culminaría con la identificación de los SNPs y el genotipado (Yang et al., 2010). El objetivo del análisis es alinear las secuencias provenientes de la re-secuenciación del genoma, con el fin de identificar posibles variaciones entre los genotipos que han sido re-secuenciados. Estas variaciones pueden identificarse al ser comparadas contra un genoma de referencia (Deschamps et al., 2010; Wu et al., 2010; Varala et al., 2011; Hendre et al., 2012) o también en ausencia de este, siendo más complejo el análisis en este último caso. La ausencia de genoma de referencia introduce una dificultad en el análisis y para sortearla se han desarrollado diversas estrategias. Una de ellas consiste en la construcción de un genoma *de*

novo mediante el ensamblado de secuencias obtenidas con la plataforma 454 de Roche (Hyten et al., 2010c; You et al., 2011). Una segunda estrategia se basa en el alineamiento de las secuencias de los distintos genotipos entre sí, con el fin de identificar las variaciones genéticas deseadas (Ratan et al., 2010; Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012a). Una vez realizado el alineamiento, el siguiente paso, es la identificación de posibles candidatos a SNPs y la obtención de los genotipos correspondientes a las distintas muestras. Finalmente es necesario filtrar falsos SNPs provenientes de errores de secuenciación, secuencias homeólogas o parálogas. Existen diversas herramientas disponibles para la realización de estos análisis, algunos de los paquetes informáticos son: Fastxtoolkit (Blankenberg et al., 2010a y 2010b), SAMtools (Li et al. 2009), vcftools (Danecek et al., 2011), GATK (McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011) y varscan (Koboldt et al., 2009).

1.4. SNPs EN EL ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE POBLACIONES Y ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Los polimorfismos entre las distintas variedades de un cultivo son indicativos de la diversidad genética presente entre los individuos (Zhang et al., 2011). En poblaciones menos diversas se obtiene un menor número de estos marcadores, dado que los individuos poseen un genoma más similar, situación que ocurre en análisis de poblaciones de mapeo biparentales (Hyten et al., 2010a). El conocimiento de la diversidad genética y de la estructura poblacional entre los individuos es muy importante a la hora de escoger una estrategia en la mejora genética de un cultivo (Chen et al., 2012). En este sentido, la posibilidad de encontrar genes que expresen características de interés en el cultivo, depende en gran medida de la variabilidad genética que exista dentro de los individuos de la población (Flint-García et al., 2005). La estructura de la población está definida por la formación de subpoblaciones que poseen mayores valores de parentesco genético entre sí por haber co-evolucionado separadamente. Estudiar la estructura de la población nos permite conocer la historia de un programa de mejoramiento, que incluye los ancestros pre-domesticados, el sistema de mejoramiento usado y la complejidad de las prácticas de mejoramiento aplicadas (Xie et al., 2008). El genotipado con marcadores en el conjunto de individuos a estudiar nos permite construir matrices de distancias genéticas, las cuales son valores de pares de individuos que indican el grado de cercanía genética entre dicho par (Guo et al., 2011).

Para poder analizar los datos generados existen diferentes métodos que facilitan su interpretación. Los análisis más comúnmente aplicados son análisis de componentes principales (PCA, “Principal Component Analysis”) o análisis de coordenadas principales (PCoA, “Principal Coordinate Analysis”), análisis de clúster de clasificación supervisada y no supervisada. El PCA es un análisis sencillo, que permite identificar patrones en los datos, resaltando sus diferencias y similitudes, mediante la disminución de las dimensiones de estos para facilitar su interpretación (Smith, 2002). El PCoA posee una base similar que el PCA pero está diseñado para aplicarse en caso de tener matrices de distancia genética, siendo útil para obtener información de estructura de los resultados en base a los datos genéticos obtenidos (Dreisigacker et al., 2005; Zhang et al., 2011).

La información de pedigrí, que reconstruye la historia de cada línea, también permite obtener matrices de parentesco entre los individuos. Algunos trabajos demuestran que las matrices de parentesco construidas a partir de marcadores moleculares exhiben mayor precisión a la hora de establecer estas relaciones genéticas (Almaza-Pinzón et al., 2003; Condón et al., 2008).

Por otro lado, el análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) es comúnmente utilizado para identificar grupos de asociación entre marcadores (grupos de LD). Estos grupos permiten construir haplotipos o grupos de marcadores que segregan juntos en las líneas en estudio, eliminando del análisis datos redundantes y generando marcadores poli-alélicos (Akey, 2001; Wall y Pritchard, 2003). Esto es posible debido a que marcadores cercanos en el genoma tienden a segregar juntos durante la meiosis, cuando se dan los procesos de recombinación entre los cromosomas (Flint-García et al., 2003; Gupta et al., 2005). Existen distintas formas de calcular este valor de LD entre pares de marcadores, los más utilizados son r^2 y D' . D' solo estima diferencias de recombinación, mientras que r^2 además, toma en cuenta la historia de mutaciones (Jorde, 2000; Ardlie et al., 2002). En un cultivo con alto desequilibrio de ligamiento como el trigo (Somers et al., 2007) se esperaría que se formaran diversos grupos de ligamiento si se cuenta con un buen número de marcadores moleculares ordenados a lo largo del genoma.

1.5. ASOCIACIONES ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO

La expresión de un fenotipo en un individuo depende tanto del componente genético como de los factores ambientales en los cuales está expuesto. Los factores ambientales incluyen

características intrínsecas de un determinado sitio, variables climáticas, de manejo del cultivo, entre otras. Los factores genéticos básicamente están determinados por el ADN de cada una de las plantas. Si bien esta es una subdivisión ampliamente aceptada, ambos factores no son independientes, y en función de la característica fenotípica que se considere, pueden estar más o menos relacionados entre sí (Bnejdi y Gazzah, 2010; Chenu et al., 2011). La heredabilidad es un factor característico de las variables fenotípicas que permite estimar el grado de interacción entre los dos factores en la expresión del fenotipo de interés. En definitiva, nos indica cuánto de la variable está explicado por la genética de la planta y cuanto es debido al ambiente, siendo las características con alta heredabilidad menos influenciadas por este (Holland et al., 2003; Wray y Visscher et al., 2008). Algunos de los caracteres son de herencia simple o cualitativa, en los cuales intervienen pocos genes de efectos aditivos (el efecto del heterocigoto tiene un efecto promedio entre ambos alelos). Estos caracteres han sido ampliamente estudiados y no constituyen actualmente un objetivo en la mejora genética de cultivos. Las características de mayor importancia agronómica, como ser rendimiento, calidad y resistencia a enfermedades, presentan en general herencia compleja o cuantitativa. Lo anterior refiere a que están determinadas por numerosos genes que contribuyen diferencialmente en la determinación del fenotipo (Mackay et al., 2009). Lo que mayoritariamente ocurre es que existen pocos genes de efectos mayores que son fáciles de detectar y varios genes de efectos menores, que tienen acción pleiotrópica sobre el carácter estudiado (Robertson, 1967; Kearsey y Farquhar, 1998). El efecto genético no es únicamente aditivo, existe un componente que es no aditivo en el cual intervienen otros tipos de acciones genéticas, por ejemplo, dominancia completa o incompleta y epistasia, que complejizan aún más los análisis (Carey, 2000). Por lo tanto, los estudios que buscan detectar posibles asociaciones entre el genotipo y el fenotipo deben tener en cuenta esta diversidad de factores a la hora de identificar genes involucrados en diferentes características o identificar genotipos que posean el fenotipo deseado.

El análisis de locus de carácter cuantitativo (QTL, “Quantitative Trait Locus”) comenzó a cobrar importancia entre la década del 80 y el 90 con los primeros estudios llevados a cabo en tomate y maíz (Paterson et al., 1988, Stuber et al., 1992). Este análisis posee como objetivo principal identificar el número, la posición y el efecto, de los genes involucrados en un carácter de herencia cuantitativa (Lande y Thompson, 1990). El QTL se define como aquella región, en alguna parte del genoma, que está involucrada en la expresión del carácter cuantitativo (Collard et al., 2005). El análisis de QTL se lleva a cabo en poblaciones de

mapeo biparentales que permitan identificar marcadores moleculares que segreguen junto a los QTL de interés, es decir, que se encuentren en mayor proporción en los individuos con el fenotipo de interés (Huang et al., 2011). Estos marcadores tienen una dirección en el genoma y permiten asignar una localización aproximada a los QTL. Esta metodología fue ampliamente aplicada a distintos cultivos, permitiendo identificar regiones genómicas involucradas en la expresión de caracteres complejos (Andaya y Mackill, 2003; Kirigwi et al., 2007; Cuesta-Marcos et al., 2009). Estos trabajos no solo permitieron avanzar en el conocimiento de los mecanismos genéticos subyacentes, sino que también aportaron una herramienta en la selección y manipulación de los caracteres (Tanksley y Nelson, 1996). Una de las limitaciones de este tipo de análisis, es la necesidad de contar con poblaciones segregantes y balanceadas para la obtención de una base genética similar en la población, lo cual facilita la detección de diferencias debido al carácter en estudio (Huang et al., 2011). Otra limitante es la necesidad de contar con un mapa de ligamiento para la población a analizar (Hori et al., 2003). A su vez, para su aplicación en el marco de un programa de mejoramiento, los QTL conocidos deben ser previamente validados en la población local (Parisseaux y Bernardo, 2004; Ordas et al., 2010; Castro et al., 2012). Una vez realizada esta validación, la selección de los QTL con marcadores moleculares implica pasos de amplificación y corrida de geles en cientos a miles de individuos para múltiples QTL.

Como alternativa al análisis de QTL existe el Mapeo asociativo, el cual se centra en la búsqueda de asociaciones de marcadores con fenotipos de interés, basándose en el concepto de LD entre genes y marcadores (Myles et al., 2009). Estos análisis intentan eliminar la necesidad de desarrollar poblaciones de mapeo para la identificación de asociaciones genéticas (Filt-García et al. 2003; Varshney et al. 2005), trabajando directamente con los individuos que componen el programa de mejoramiento. Existen diferentes variables que afectan este tipo de análisis como ser el grado de LD, la estructura de la población (Pitchard et al., 2000), la deriva génica y selección (Filt-García et al., 2003). Debido a lo anterior, previo a la realización de estos análisis es necesario conocer las características genéticas del material en estudio, así como la estructura de la población, ya que de esto dependerá en gran medida la cantidad de marcadores y el número de individuos necesarios para los análisis. Recientemente, con el desarrollo de nuevas tecnologías de obtención de marcadores es posible obtener altas densidades de marcadores distribuidas a lo largo del genoma, lo cual permite realizar estudios de asociación conocidos como “Genome Wide Association Mapping” (GW-AM). Este tipo de estudios permiten realizar simultáneamente asociaciones

marcador – fenotipo en todo el genoma mediante un análisis de modelos mixtos (von Zitzewitz et al., 2011).

La selección genómica (SG) por su parte, es una nueva metodología de selección por marcadores propuesta por Meuwissen et al. (2001), en la cual se seleccionan los mejores individuos basándose en el valor de cría genético estimado (GEBV). Esta terminología, poco difundida hasta el momento en el mundo vegetal, pero inicialmente utilizada por medio de selección con matrices de pedigrí, es ampliamente utilizada en animales, donde cada animal posee un valor de cría genético (Hayes et al, 2009; Nayaka y Isobe, 2012). El principio de este análisis es realizar predicciones fenotípicas en base al genotipo de los individuos. Para esto es necesario entrenar un modelo con información genética y fenotípica de un conjunto de individuos que formen parte del programa de mejoramiento. Este modelo entrenado es capaz de predecir el comportamiento fenotípico de variedades que no presentan información fenotípica (Meuwissen et al., 2001; Heffner et al., 2011). A diferencia del análisis de QTL, SG permite analizar toda la varianza genética de cada individuo mediante la suma de los efectos de los alelos de GEBV (Heffner et al., 2009), por lo que se espera capturar regiones genómicas con menor efecto en el fenotipo, las cuales se enmascaran en un análisis de QTL clásico (Goddard y Hayes, 2009). Existen diversos estudios en plantas que demuestran el éxito de la selección genómica (de los Campos et al., 2009; Heffner et al., 2009; Crossa et al., 2010; Iwata y Jannink, 2011; Resende et al., 2011). El paso siguiente sería comenzar a aplicar esta metodología en un programa de mejoramiento.

1.6. SELECCIÓN GENÓMICA Y MEJORAMIENTO VEGETAL

La SG podría constituirse como una herramienta clave en los programas de mejoramiento tanto vegetal como animal, permitiendo la predicción de caracteres fenotípicos complejos. Actualmente, para poder seleccionar líneas experimentales de trigo con alto potencial de rendimiento y niveles aceptables de tolerancia a estrés biótico y abiótico, es necesario esperar al desarrollo de la planta bajo diferentes condiciones de crecimiento y evaluar el comportamiento de los distintos genotipos en estas condiciones (Heffner et al, 2010). Un programa de mejoramiento se inicia con un gran número de cruzamientos iniciales, el cual dependerá de las capacidades de los programas de mejoramiento. En el caso del programa de mejoramiento genético de trigo de INIA La Estanzuela, el proceso se inicia con unos 600

cruzamientos. La generación F1 pasa inmediatamente a F2 dado que en F1 no existen variaciones, por ser todos los individuos genéticamente idénticos. En la población F2 es clave la correcta selección de los genotipos, ya que es la generación en la cual ocurren las mayores variaciones entre los individuos. En esta generación se selecciona por caracteres simples, los cuales poseen en general, altos valores de heredabilidad (por ej.: resistencia a algunas enfermedades, altura de planta, tamaño de grano, entre otros). A continuación, los diferentes genotipos se autofecundan hasta la generación F6 y en cada una de las generaciones se realiza selección por fenotipo. Recién a nivel de F5 y F6 se comienza a seleccionar por rendimiento, dado que se cuenta con un menor número de individuos, lo cual permite realizar ensayos a mayor escala. Finalmente, se cuenta con un grupo de individuos preliminares que serán seleccionados y evaluados por rendimiento, obteniendo los genotipos finales que son evaluados en distintos ambientes y con las repeticiones correspondientes. Los individuos con mejores rendimientos y que no presenten ninguna característica indeseable son seleccionados y denominados “elite”. Las variedades elite son evaluadas durante 3 años en un programa de evaluación antes de poder ser liberadas. Todo este proceso lleva entre 10 y 15 años. (M. Quincke, com pers, 2012).

Con el objetivo de acortar estos tiempos y aumentar la eficiencia en combinación con métodos de avance generacional (haploides duplicados, descendencia por semilla única en autógamias y avance generacional fuera de época, entre otros), la SG busca inferir esta información, basándose en el ADN del individuo (Heffner et al., 2011). Uno de los objetivos más interesantes, dentro de un programa de mejoramiento, es poder realizar SG en la generación F2, seleccionando desde el comienzo los genotipos de interés. Otro desafío de la SG es predecir los cruzamientos que generan individuos con mayores potenciales (Endelman et al., 2011). Para realizar estas predicciones son necesarias diversas herramientas que se encuentran aún en desarrollo. Las principales son:

- Amplia y densa cobertura de marcadores a lo largo de todo el genoma. Es importante enfatizar que esta herramienta debe ser accesible (en referencia a su simplicidad y costos) de ser aplicada en un programa de mejoramiento (Elshire et al., 2011, Poland et al., 2012a).
- Métodos de fenotipado de alta precisión (revisado por Cabrera-Bosquet et al., 2012).
- Desarrollo de modelos estadísticos adecuados que permitan realizar los análisis para calcular los valores de cría estimados (Meuwissen et al., 2001; Crossa et al., 2010).

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo general

Ajustar y validar una metodología de identificación de SNPs para su aplicación en programas de mejoramiento genético de trigo.

1.7.2. Objetivos específicos

- I. Ajustar y validar una metodología de análisis bioinformático para la identificación de marcadores, mediante el análisis 384 genotipos de trigo de los programas de mejoramiento genético de INIA Uruguay e INIA Chile.
- II. Validar la metodología de selección genómica como herramienta de selección en el mejoramiento genético de trigo.

2. METODOLOGÍA

2.1. GENOTIPADO

Los trabajos se llevaron a cabo a partir de una selección 384 materiales pertenecientes a los programas de mejoramiento de INIA Chile e INIA Uruguay, de los cuales 186 genotipos pertenecen al programa de mejoramiento de Uruguay y 198 al de Chile. Para la extracción de ADN se utilizaron 100 mg de tejido vegetal, empleando el kit de extracción DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen), asegurando la pureza necesaria para el análisis. La concentración y pureza del ADN en las muestras se determinó por espectrofotometría y mediante la utilización de geles de agarosa al 1 %.

Para la construcción de las librerías se prepararon diluciones a una concentración de 20 ng/μl de ADN, en un volumen total de 15 μl de buffer de dilución (Qiagen), las cuales se enviaron al laboratorio de secuenciación del Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) de la Université Laval (Quebec, Canadá). Las librerías se construyeron según el protocolo propuesto por Elshire et al. (2011), modificado con enzimas de restricción PstI/MspI (Poland et al., 2012a). Posteriormente las muestras fueron enviadas a la Universidad de McGill de Montreal para su secuenciación en la plataforma Illumina/Solexa®.

2.2. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES

Los datos de la secuenciación fueron recibidos en un archivo crudo proveniente del secuenciador, en formato Fastq. En un principio se analizó la calidad de las secuencias y la distribución nucleotídica, utilizando el software Galaxy (<http://galaxy.psu.edu/>). A continuación, se estudió la distribución de las secuencias en las 96 muestras de cada línea de la celda de flujo, para constatar si todas las muestras presentaban lecturas y evaluar la distribución entre las distintas muestras.

Se identificaron SNPs mediante dos metodologías diferentes de análisis de datos. La primera metodología empleada fue desarrollada en el Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA, www.maizegenetics.net) y se denominó Pipeline de Tassel (PipT), permite identificar variaciones en los fragmentos secuenciados sin la necesidad de contar con un

genoma de referencia. La segunda metodología, desarrollada para el cultivo de soja en la Universidad de Laval, Quebec, Canadá (sin publicar), se diferencia de la anterior por contrastar los individuos contra un genoma de referencia. En este trabajo se realizó una adaptación de la misma para poder ser aplicada en el cultivo de trigo, el cual carece (por el momento) de un genoma de referencia. Ambas metodologías se iniciaron con la identificación de los códigos de barras y adaptadores asignados a las distintas lecturas de cada muestra (llamaremos lecturas a las secuencias provenientes del secuenciador Illumina), descartando lecturas que no cumplieron con los requisitos de calidad. Para trabajar con las lecturas fue necesario eliminar los códigos de barras que no forman parte real de la secuencia del genoma. A partir de este punto, ambas metodologías operan de un modo diferente con el fin de identificar las variaciones en una sola base. Una vez identificadas estas variaciones, se filtraron SNPs para eliminar la mayor cantidad de falsos marcadores. Ambas metodologías se detallan a continuación.

2.2.1. Pipeline de Tassel

A continuación se describe el análisis de los datos obtenidos en la secuenciación, mediante la aplicación del protocolo obtenido en USDA, Kansas, EE.UU. En el primer paso se seleccionaron las lecturas válidas y se contabilizó el número de veces que se repitió cada lectura. Las lecturas seleccionadas fueron aquellas que contaron con el código de barras seguido del sitio de restricción de la enzima y que no presentaron ninguna N (bases no identificadas durante la secuenciación en esa posición) en las primeras 64 pb. Estas lecturas fueron cortadas en fragmentos de 64 pb y colocadas en un nuevo archivo, el cuál contiene secuencias que se denominan tags. Estas secuencias representan un conjunto de lecturas idénticas, identificándose la cantidad de secuencias que conforman este grupo.

En el siguiente paso se identificaron las muestras que presentaron cada lectura correspondiente. Las muestras se procesaron de la misma manera detallada en el paso anterior, obteniéndose un archivo que contiene las distintas tags en las filas y los individuos (muestras) en las columnas. Cuando la tag correspondiente estaba presente en la muestra se asignó un valor en la matriz que corresponde al número de lecturas que formaban dicha tag en esa muestra y por el contrario, si dicha tag no estaba presente en la muestra, se asignó un valor de 0.

Es importante aclarar que para cumplir con los dos pasos anteriores es necesario construir un archivo en el cual se identifica a cada muestra con su código de barras, este archivo se conoce como “Key”. Paralelamente, es necesario también, proporcionar información sobre que enzima de restricción fue utilizada en la construcción de las librerías de GBS (en este trabajo fueron utilizadas las enzimas PstI-MspI). Al finalizar este paso se cuenta con la información organizada para poder avanzar en la realización de alineamientos de a pares entre las tags para poder identificar los posibles SNPs. Una vez identificados los SNPs se colocan en formato HapMap para poder continuar el análisis.

2.2.2. Pipeline con genoma de referencia

En esta segunda metodología de análisis, desarrollada en la Universidad Laval, Quebec, Canadá para el genoma de soja (sin publicar), el análisis se inició con la separación de secuencias por código de barras comunes. Se generó un archivo fastq para cada muestra secuenciada. A continuación, las muestras fueron cortadas en fragmentos para eliminar el código de barras y el adaptador; todas las lecturas se redujeron a un tamaño no mayor de 104 pb, eliminando los fragmentos conformados por menos de 35 pb. Como se ha mencionado, esta metodología requiere de un genoma de referencia, por lo que se utilizó un ensamblado del genoma de trigo, disponible en (bio-sanger.bio.bris.ac.uk). El ensamblado fue construido secuenciando la variedad *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring en la plataforma Roche/454® con cobertura 5x.

A continuación, se alinearon una a una las distintas muestras “contra” el genoma de referencia, utilizando el algoritmo Burrows-Wheeler del paquete bwa (Li y Durbin, 2009).

Como resultado de este alineamiento se obtiene, para cada una de las muestras, un archivo que contiene información del alineamiento con el genoma de referencia. Para la identificación de SNPs en el conjunto de muestras, se utilizó el paquete de herramientas conocido como SAMtools (Li, 2009) y se obtuvo un único archivo (con extensión bcf) que contiene los candidatos a SNPs por muestra. El archivo obtenido en el paso anterior necesita ser filtrado dado que contiene muchos SNPs, pero la información es incompleta. Para filtrar este archivo se utilizó el paquete de herramientas llamado vcftools (Danecek et al., 2011). Luego de realizada la filtración, se obtuvo un archivo final con extensión vcf que puede ser

convertido en otros formatos (por ejemplo, plink), dependiendo del tipo de análisis a desarrollar.

2.3. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE SNPs (PIPELINES)

Una vez obtenidos y filtrados los SNPs, se compararon ambas metodologías tomando como indicadores el análisis de la cantidad de datos faltantes por SNP y por muestra, el contenido de heterocigotos y la frecuencia alélica. Para llevar a cabo estos análisis se utilizó el software R (<http://cran.r-project.org/>).

2.4. VALIDACIÓN DE SNPs

Para confirmar si los SNPs identificados son verdaderas variaciones entre individuos ubicados en una misma región genómica, se seleccionaron distintos métodos de validación de los mismos, los cuales se interrelacionan entre si y se describen a continuación.

2.4.1. Comparación entre matrices genéticas con sub-grupos de datos

En este procedimiento de validación, el total de SNPs candidatos identificados se dividieron al azar formando dos subgrupos, y se calcularon matrices de relaciones aditivas (A) entre los individuos para cada grupo. La matriz A se calcula de la siguiente forma (VanRaden, 2008):

$$A = WW^T/c \quad W_{im} = X_{im} + (1 - 2p_m)$$

$$c = 2\sum_m p_m (1 - p_m)$$

p_m es la frecuencia del alelo 1 en el marcador m, X es la matriz de marcadores codificada como -1, 0, 1; m: marcadores; i: individuos.

Como se cuenta con una gran proporción de datos perdidos, debido a las características de la metodología de genotipado utilizada (GBS), se imputaron los datos faltantes (Poland et al., 2012a) utilizando el paquete rrBLUP (Endelman et al., 2011) disponibles en el software R. Para realizar las comparaciones, mediante la correlación de Pearson con el test de Mantel (paquete vegan del software R), se utilizaron los datos con y sin imputación (la imputación se realizó por separado en cada subgrupo de los SNPs).

Este método podría considerarse de screening para la validación, dado que, si los SNPs son verdaderas variaciones en el genoma, se cuenta con suficientes marcadores para esperar obtener matrices muy parecidas al calcularlas con la mitad de los SNPs identificados.

Finalmente, se calcula las matrices de relaciones aditivas con el total de los SNPs obtenidos en PipT y PipRef, por separado, y se comparan ambas matrices entre sí.

2.4.2. Análisis de la estructura poblacional

A continuación se propone validar los SNPs mediante el análisis del relacionamiento genético entre los individuos. Por lo tanto, a partir de la matriz de relaciones genéticas aditivas (calculada con el conjunto de marcadores en el paso anterior) se realizó un análisis de coordenadas principales, que permite interpretar los datos disminuyendo sus dimensiones a 2 vectores principales. Este análisis se realizó con el objetivo de identificar sub-poblaciones dentro de los 382 individuos. Como herramienta informática en este caso se utilizó en paquete ape disponible en R (Paradis et al., 2004).

2.4.3. Comparación entre matriz de coancestría y de parentesco con marcadores

En este método de validación de SNPs, se construyó una matriz de coancestría (COP), utilizando los datos de pedigrí disponible para 177 de las 182 líneas uruguayas genotipadas. La matriz de relaciones genéticas (K) se calculó utilizando el paquete Efficient Mixed-Model Association (EMMA) de R (Kang et al., 2008), de la forma:

$$K = \sum_h L_h * W * x_h$$

L_h es la matriz de marcadores codificada 0 y 1; W es una matriz que asigna peso diferencial a cada SNP (en este caso es una matriz diagonal de 1); x_h es el efecto aleatorio del alelo.

Una vez definidas ambas matrices se compararon entre sí mediante la evaluación de la correlación de Pearson. La matriz de coancestría se construye utilizando los software ORDARCH y GENARCH (F. Condón, INIA, Uruguay) y el paquete pedigrí disponible en el software R (Coster, 2011). El objetivo de esta metodología es transformar los datos de marcadores moleculares y de pedigrí en datos de relaciones genéticas entre individuos, para poder comparar ambas informaciones.

2.4.4. Mapeo de SNPs

Otra forma de validar los SNPs es evaluar su distribución en el genoma de trigo, con el objetivo de observar cómo se distribuyen los marcadores en los distintos cromosomas y genomios de trigo. En esta metodología, se utilizaron las 2 bases de datos de trigo para mapear las tags que contienen los SNPs identificados. Una de las bases de datos disponibles fue generada por Poland et al. (2012a) y la otra pertenece al consorcio de trigo y está disponible en <http://urgi.versailles.inra.fr/>. Como herramienta informática para el mapeo se utilizó el paquete standalone blast-ncbi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La base de datos generados Poland et al. (2012a) está compuesta de tags secuenciadas por la metodología de GBS, en la cual se utilizó una población segregante de dobles haploides y se construyó un mapa de bins que permite ordenar las tags dentro de cada cromosoma con ayuda de otros marcadores moleculares. Por otra parte la base de datos de URGI únicamente nos permite asignar en que brazo del cromosoma se encuentra cada SNP.

2.4.5. Análisis de desequilibrio de ligamiento

Esta metodología de validación de SNPs analiza la existencia de desequilibrio de ligamiento utilizando los resultados obtenidos en el punto anterior. A partir de los SNPs mapeados se analizó el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores con los genotipos de los 382 individuos. Se obtuvo el r^2 para todos los pares de marcadores, utilizando como herramienta informática el paquete trio (Schwender et al., 2012), disponible en el software R. A continuación utilizando el paquete LDheatmap (Shin et al., 2006) se evaluó la presencia o ausencia de desequilibrio de ligamiento entre marcadores. El objetivo de este análisis es determinar si los marcadores, ordenados en el cromosoma, forman grupos de asociación a lo largo del cromosoma.

2.4.6. Predicciones fenotípicas.

Con el objetivo de validar los SNPs, en su aplicación en el cálculo de predicciones fenotípicas a partir de los genotipos secuenciados, se utilizaron datos de rendimiento y peso de mil granos obtenidos a campo (para todos los individuos) en Santa Rosa, Chile. El ensayo fue sembrado bajo un diseño de alfa látice, con 400 genotipos distribuidos en 20 bloques de 20 tratamientos por bloque, con dos repeticiones por tratamiento. El mismo ensayo se realizó bajo 2 condiciones hídrica contrastantes, riego y seco.

Debido a la existencia de variación espacial en los ensayos a campo (correlación entre los residuales de las variables fenotípicas), se evaluaron distintos modelos con el objetivo de lograr el mejor ajuste de la medias. Se planteó la evaluación de 4 modelos distintos: Látice Simple (LS, diseño planteado a campo), filas y columnas (FC), bloques completos al azar con medias móviles como covariable (BCA_MVNG) y una regresión lineal con la medias móviles como covariable (MVNG). Los datos se analizaron utilizando los paquetes lme4 y mvngGrAd disponibles en el software R.

Los primeros tres modelos evaluados se plantearon como modelos mixtos de la siguiente forma:

$$y = Xb + Zu + e$$

en el cual X es la matriz de diseño de efectos fijos, b es el vector de los efectos fijos (BLUE), Z es la matriz de diseño de los efectos aleatorios, u es el vector de efectos aleatorios (BLUP) y e comprende los errores experimentales del modelo.

En el caso de los modelos LS y FC, X está compuesta por las repeticiones. Mientras que para BCA_MVNG además de las repeticiones se incluye la covariable (x_i) de las medias móviles en los efectos fijos del modelo. En el caso de LS los efectos aleatorios son los tratamientos y bloques anidados en las repeticiones; en el caso de FC, dichos efectos están constituidos por los tratamientos y las filas y columnas anidadas en las repeticiones y, en el caso de BCA_MVNG, por los tratamientos. El modelo MVNG considera la covariable (x_i) de las medias móviles como regresor en el modelo. $x_i = y_i - \bar{y}_{grid}$, donde y_i es el valor fenotípico de cada observación y \bar{y}_{grid} es la media fenotípica de las observaciones que se consideran dentro del grid. El grid fue construido utilizando el paquete movingGrid de R (Technow, 2011; Figura 4).

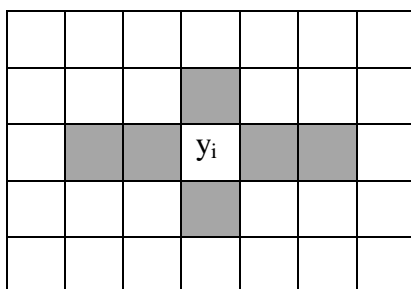


Figura 4. Los plot señalados son los que forman parte del grid con el cual se calcula la media móvil, que posteriormente se emplea para restar al valor de y_i en el cálculo de la covariable.

Tabla 1. Descripción detallada de las ecuaciones que representan los 4 modelos usados para ajustar las medias fenotípicas en el campo.

	Modelos
LS	$y = g_i + rep_j + bl(rep)_{ijk} + e_{ijk}$
FC	$y = g_i + rep_j + fil(rep)_{jk} + col(rep)_{jl} + e_{ijkl}$
BCA_MVNG	$y = g_i + \beta x_j + rep_k + e_{ijk}$
MVNG	$y = u + \beta x_i + e_i$

g: tratamientos, rep: repeticiones, bl(rep): bloques incompletos anidados dentro de las repeticiones, fil(rep): filas anidadas en repeticiones, col(rep): columnas anidadas en repeticiones, e: residual, x: covariable calculada como el valor fenotípico del plot menos la media fenotípica de las parcelas vecinas que forman el grid. LS: Diseño de campo, alfa látice simple; FC: modelo de análisis de filas y columnas anidadas en las repeticiones; BCA_MVNG: modelo de bloque completos con medias móviles como covariables; MVNG: modelo lineal medias móviles como covariable.

Luego de ajustar los datos se obtuvieron los BLUP (con el efecto genético de cada genotipo) en cada uno de los modelos, para realizar las predicciones fenotípicas con el paquete rrBLUP (ridge regression) disponible en R. Del set de 382 individuos, de los que se obtuvieron datos genotípicos, previo a la obtención de los BLUP, se eliminó la variedad 209 por presentar muy baja cobertura en la parcela. Los 381 genotipos se repartieron aleatoriamente en 7 sets (3 set con 55 individuos y 4 set con 54) para realizar la validación cruzada (Legarra et al., 2008). Seis sets (86% de individuos) fueron utilizados para entrenar el modelo de predicción. Una vez calculados los parámetros del modelo, se predijeron los valores de cría estimados (GEBV) para el set restante de validación. A continuación, se determinó la correlación entre los GEBV predichos por el modelo y los BLUP (anteriormente calculados) en el set de validación. Se realizan 10 aleatorizaciones diferentes; en cada aleatorización se determina la correlación intercambiando el set de validación hasta validar en los 7 sets. Para realizar las predicciones se utilizó el método de Genomic BLUP (G-BLUP, equivalente a Ridge Regresión) y G-BLUP utilizando el Kernel GAUSS que considera efectos epistáticos (Gianola y van Kaamm, 2008) y que se encuentra disponible en el paquete rrBLUP (Endelman, 2011).

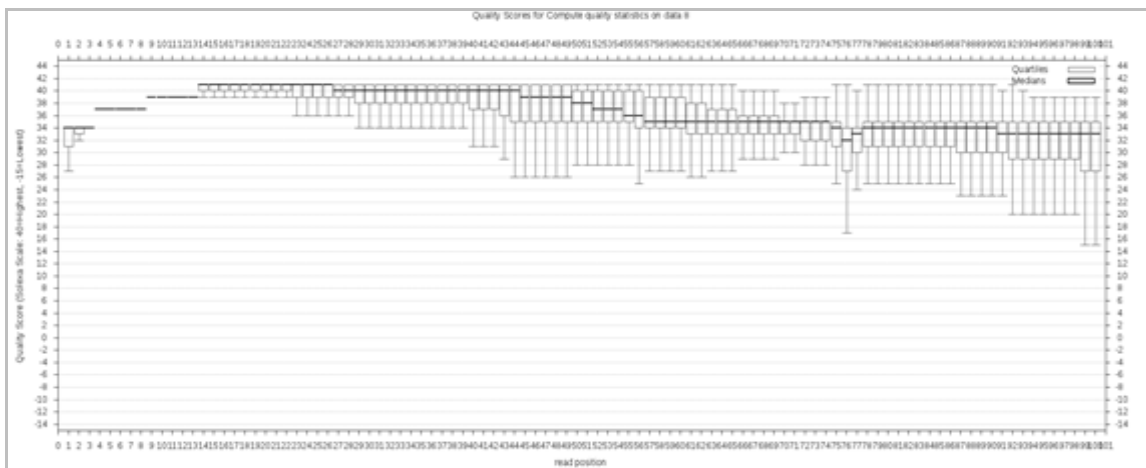
3. RESULTADOS

3.1. GENOTIPADO

Los resultados obtenidos son producto de la secuenciación de 384 genotipos de trigo provenientes de los programas de mejoramiento de INIA Chile e INIA Uruguay. Las librerías se construyeron con el método de GBS y la plataforma de secuenciación utilizada fue Illumina/Solexa HiSeq 2000. Producto de la secuenciación de las muestras se obtuvieron 4 archivos provenientes de 4 líneas distintas de la celda de flujo del secuenciador. Cada archivo contiene secuencias mezcladas provenientes de 96 muestras en formato Fastq.

La calidad de los fragmentos resultó aceptable hasta el final de cada secuencia (108 pb). Si bien se observó un descenso hacia el extremo 3' de los fragmentos, en ningún caso fue inferior de 30 de valor promedio (0.1 % de error) (Figura 5). La distribución nucleotídica de los fragmentos permitió verificar que los nucleótidos se presentaron con igual probabilidad en cada posición, en el conjunto de secuencias. Se observó además, distorsión en las primeras bases donde se encuentran los códigos de barras, seguidos por el sitio de restricción de la enzima (Figura 6).

La calidad de la secuenciación resultó similar en las distintas líneas estudiadas, a modo de ejemplo se presenta la figura 5.



Fig

ura 5. Distribución de la calidad en la secuenciación para cada una de las bases en el conjunto de fragmentos para una de las líneas del secuenciador.

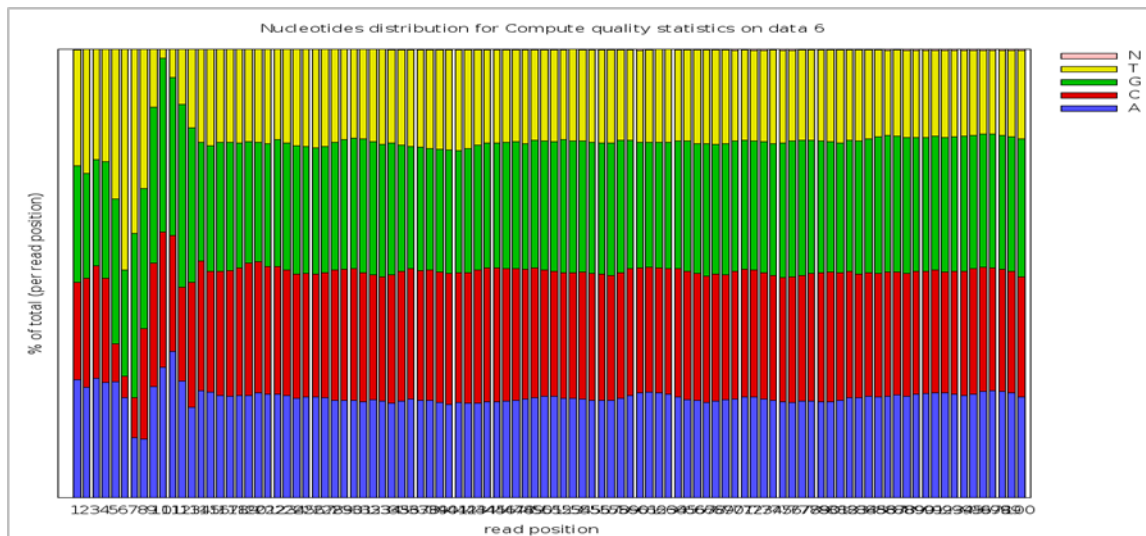


Figura 6. Distribución nucleotídica en los fragmentos en función de la posición de las bases en el fragmento de ADN secuenciado. N, no identificada; T, timina; G, guanina; C, citosina; A, adenina.

El análisis de la distribución de las lecturas por muestra fue posible al separar las secuencias por código de barras, asignando cada fragmento de ADN a la muestra de la cual proviene. Dos de las muestras secuenciadas en la línea 4 no presentaron fragmentos de ADN, lo que redujo el número total de muestras a 382 genotipos. En el resto de las muestras, la cantidad de lecturas fue aceptable, con variaciones en el número de secuencias identificadas (Tabla 2). La línea número 4 fue la que presentó mayor porcentaje de fragmentos perdidos por no presentar código de barras y/o el sitio de restricción de la enzima. La media de secuencias por muestra fue similar en todas las líneas (aproximadamente 1 % de las secuencias totales).

Tabla 2. Análisis de la distribución de las secuencias por línea del secuenciador.

	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 4
Número total de fragmentos	165.943.288	175.654.571	153.151.244	181.354.392
Fragmentos descartados (%)	5	4	4	18
Fragmentos en 96 muestras	157.317.160	148.399.361	147.498.032	149.099.411
Media por muestras	1.638.720	1.769.106	1.536.438	1.586.148
Desviación estándar	322.839	630.338	394.675	613.719
Número de muestras	96	96	96	94

Debido a que no se detectó ninguna anomalía que ponga en duda la integridad de la secuenciación, se procedió a la identificación de SNPs.

A continuación, se presentan los resultados de la identificación de SNPs para las dos metodologías planteadas, Pipeline con genoma de Referencia (PipRef) y Pipeline de Tassel (PipT, sin genoma de referencia). La identificación de SNPs por el método de PipRef, permitió identificar más de 200 mil SNPs, muchos de los cuales no contaban con suficiente información y otros eran falsos SNPs. Luego de establecer un mínimo de 2 lecturas para identificar el genotipo en cada muestra (de lo contrario se consideró dato perdido) y establecer un número de lecturas promedio menor a 2 y mayor a 10 (en el conjunto de las muestras), se identificaron aproximadamente 83.000 SNPs. En el conjunto de estos SNPs se identificó una alta proporción de ellos con muy baja frecuencia alélica (datos sin presentar). Los dos últimos filtros eliminaron SNPs con frecuencia alélica, menor a 0.01 y la presencia de más de 3 SNPs en una distancia de 100 pb, permitiendo identificar los 32.160 SNPs con los cuales se realizaron los subsiguientes análisis.

Por su parte el procesamiento de las secuencias según la metodología establecida en PipT permitió identificar 28.199 SNPs.

3.2. COMPARACIÓN ENTRE PIPELINES

Se evaluó la distribución y características de los SNPs identificados, por dos metodologías, a través del análisis de secuencias obtenidas por GBS. La baja cobertura de GBS determinó la alta proporción de datos perdidos en el conjunto de las muestras estudiadas. En el estudio de la distribución de la cantidad de datos presentes por muestra, una alta proporción de individuos (73 %) presentaron distribución normal con media aproximada del 50% de datos presentes. Sin embargo, se registró un elevado número de muestras (27 %) en las cuales se identificó menos del 30 % de los alelos (Figura 7A). Al analizar este comportamiento para cada línea de la celda de flujo (Figura 7B, Anexo 1), se identificó que dichas muestras se ubicaron mayoritariamente en la línea número 1. El análisis de la profundidad de los fragmentos de cada una de las líneas, permitió determinar la existencia de menor número de fragmentos, de profundidades (número de veces que se encuentra repetida la secuencia) entre 3 y 16, en la línea 1 con respecto a las otras tres líneas (Anexo2).

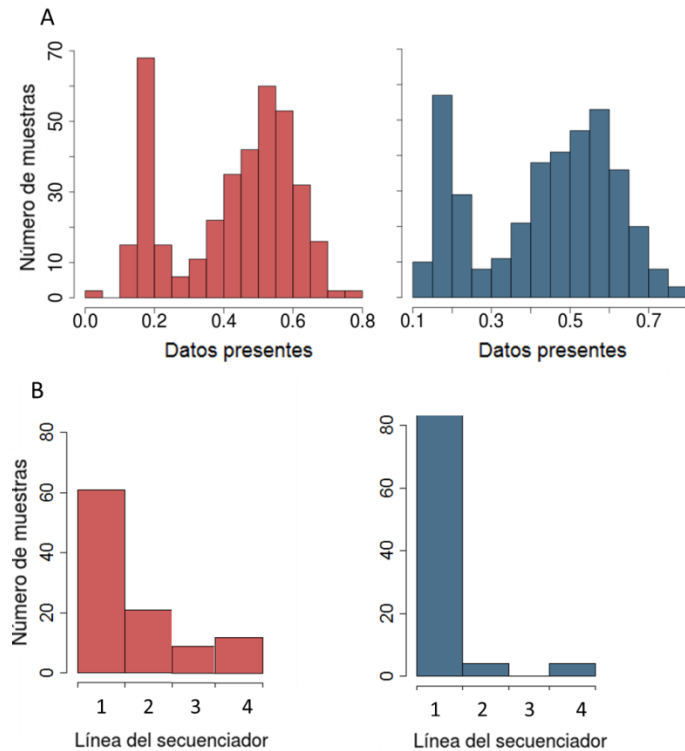


Figura 7. A) Distribución de los datos presentes en el conjunto de muestras. B) Distribución por línea del secuenciador de las muestras con más de un 70% de datos perdidos. En rojo se muestra la distribución para los SNPs obtenidos en el PipT y en azul para PipRef.

Cuando se estudió la distribución del número de SNPs según la proporción de muestras con datos presentes (Figura 8), se verificó que en ambos pipelines, la mayoría de los SNPs presentaron entre un 50 y un 70 % de datos perdidos. No se registraron SNPs con más de un 80 % de datos perdidos, ya que éste fue un criterio de filtro de falsos SNPs. Como se ha mencionado anteriormente, en ambos pipelines se filtraron los SNPs que presentaban una frecuencia alélica menor a 0.01. Se observaron diferencias entre ambas metodologías, en la proporción de SNPs con baja frecuencia alélica. En PipRef se registraron 8.800 SNPs con frecuencias alélicas entre 0.01 y 0.05, mientras que en PipT se registraron 913 SNPs en dicho intervalo de frecuencias (Figura. 8B).

Al analizar la proporción de SNPs heterocigotos en cada una de las muestras se observaron diferencias sustanciales entre ambas metodologías. En el método de PipT el 89 % de las muestras presentaron baja proporción de heterocigotos (<2 %) y ninguna muestra con más de 10%. Por lo contrario, utilizando el PipRef se observó una mayor proporción de SNPs heterocigotos (75 % de la muestras con más del 2% de los SNPs heterocigotos, Figura 9).

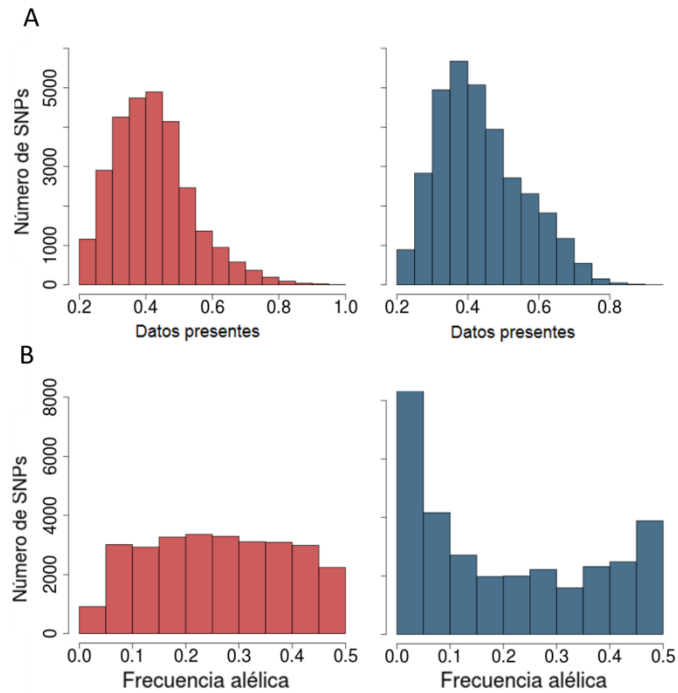


Figura 8: A) Número de SNPs según la proporción de individuos en los que esta presentes. B) Distribución de los alelos con menor frecuencia. En color rojo se presenta la distribución para los SNPs obtenidos por PipT y en azul para PipRef.

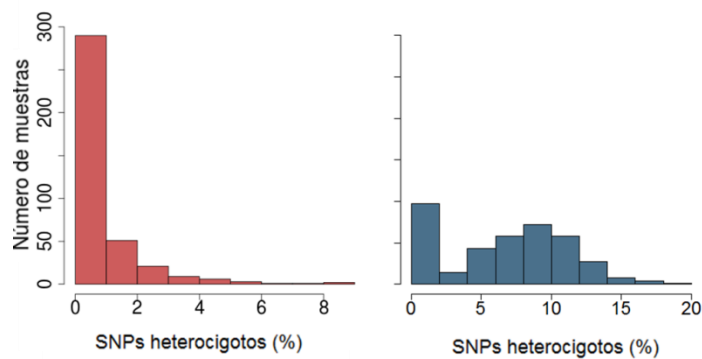


Figura 9: Proporción de SNPs heterocigotos en los 382 genotipos secuenciados. En color rojo se muestran los heterocigotos para PipT y en azul, para PipRef.

3.3. VALIDACIÓN DE LOS SNPs IDENTIFICADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos con los métodos de validación de SNPs propuestos.

3.3.1. Análisis de correlación entre matrices genéticas

Se presentan los resultados obtenidos de las correlaciones entre las matrices de distancia genéticas calculadas con los subconjuntos de SNPs. Las matrices se obtienen con y sin imputación de los datos, por lo que se calcularon dos valores de correlaciones para cada pipeline.

En el estudio de la correlación entre las matrices de distancia genética, calculadas con los SNPs obtenidos por PipT (14.099 SNPs en cada una de las matrices), se obtuvo un valor de correlación de Pearson de 0,93 ($p < 0,001$). Este resultado se obtuvo a través del cálculo de la matriz de parentesco con un elevado número de datos perdidos (aproximadamente 50 % de los datos). Por lo tanto, al imputar dichos datos (utilizando la media entre columnas y filas de la matriz), se observó una mejora en la correlación entre ambas matrices, obteniéndose un valor de correlación de 0,97 (test de mantel $p < 0,001$; $r^2 = 0,94$). Estos mismos análisis se realizaron con los datos de PipRef, y en el mejor de los casos (con imputación de datos), se obtuvo un valor r^2 de 0,82 ($r = 0.91$, $p < 0.001$, Figura 10B).

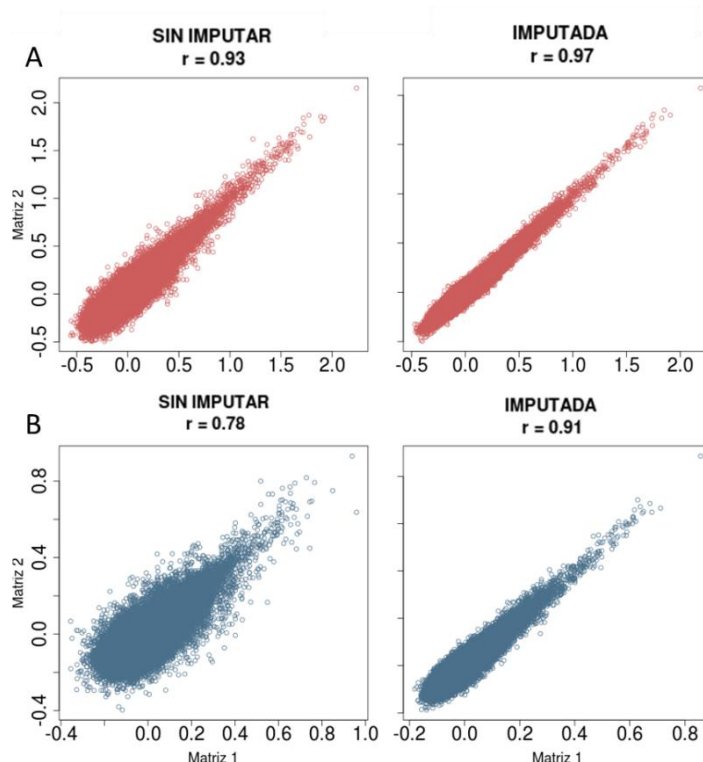


Figura 10: A) Correlación de las matrices genéticas sin (izq.) y con imputación (der.), para PipT. B) Correlación de las matrices genéticas sin (izq.) y con imputación (der.), para PipRef.

A continuación se analizó la correlación de las matrices de relaciones genéticas calculadas con el conjunto de los SNPs identificados en cada uno de los pipelines. La correlación de la distancia genética entre individuos en ambas matrices fue aceptable ($r = 0.93$, $p < 0.001$), aunque presentó diferencias entre ambos conjuntos de datos. También se observaron diferencias en el rango de valores de distancia entre matrices; mientras que para PipRef los valores oscilaron entre -0,2 y 0,8, para PipT, se obtuvieron valores entre -0,5 y 2,0 (Figura 11).

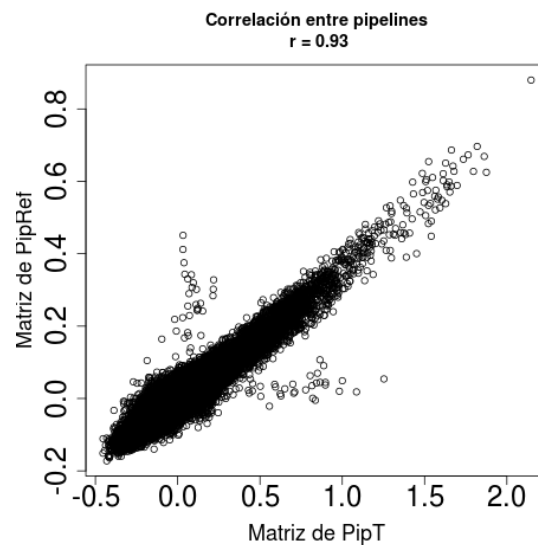


Figura 11. Plot de correlación entre las matrices de parentesco, calculadas utilizando la matriz de SNPs de cada pipeline.

Al realizar la comparación de datos de los SNPs identificados utilizando ambos pipelines, se observaron mayores correlaciones entre matrices de distancia genética para el PipT, el cual a su vez, presentó menores niveles de heterocigocidad en los SNPs identificados y una mejor distribución de las frecuencias alélicas. Por lo tanto, se continuó la validación de SNPs únicamente para la metodología PipT.

3.3.2. Análisis de la estructura poblacional

Se conoce tanto la información de procedencia como el pedigrí de los genotipos considerados en el estudio. Con el objetivo de relacionar estos datos con los datos genéticos y evaluar como se agrupan las muestras, se realizó un análisis de PCoA de la matriz de distancia genéticas calculada con el conjunto de los SNPs. A continuación, se calculó la matriz de

coancestría para los 177 individuos (que presentaban suficiente información de sus ancestros) del total de 182 materiales uruguayos genotipados y se correlacionó con la matriz genética.

En el análisis de coordenadas principales se identificaron 2 grupos, el grupo 1 formado principalmente por materiales uruguayos y el grupo 2 por materiales chilenos, si bien existe una proporción de materiales que se entrecruzan (Figura 12). La correlación entre la matriz de coancestría y la matriz de relaciones genéticas fue 0,51 ($p < 0.0001$). Los valores de la matriz de distancia genética calculada con los marcadores moleculares oscilaron entre 0,577 y 0,990, con media 0,682 y mediana 0,975, sin tomar en cuenta la diagonal. Por otro lado, la matriz de coancestría presentó valores entre 0,0003 y 0,779, con media 0,031 y mediana 0,061. El promedio del número de generaciones utilizadas para la construcción de la matriz COP fue de 18 generaciones, con un mínimo de 11 y un máximo de 26 generaciones.

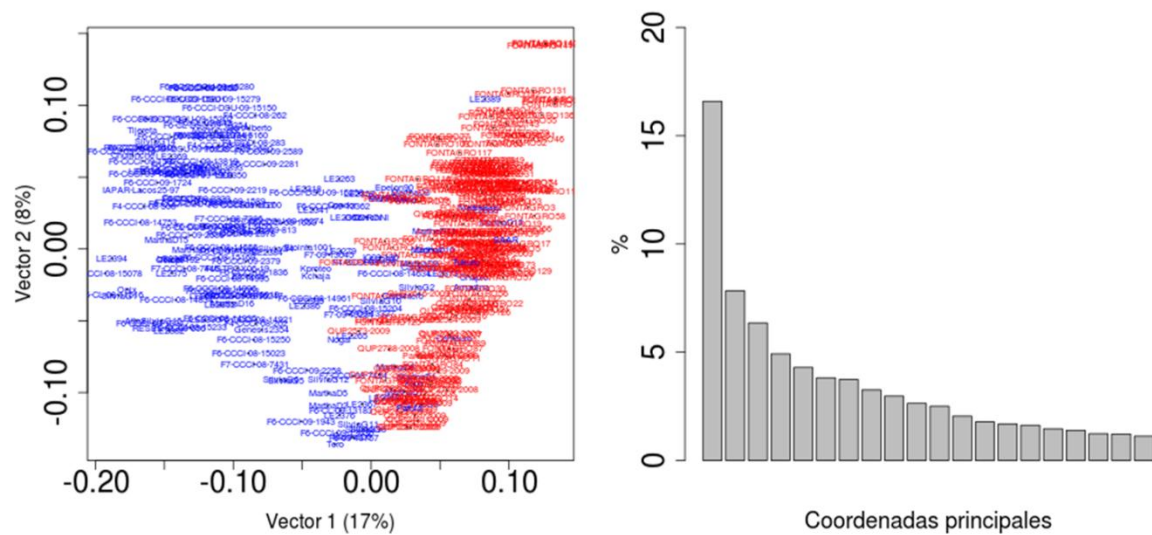


Figura 12. Análisis de coordenadas principales. En color azul se destacan las variedades de Uruguay y en rojo las de Chile. A la izquierda se presenta la proporción de varianza explicada por las primeras 20 coordenadas principales.

3.3.3. Mapeo de SNPs y análisis de desequilibrio de ligamiento (LD)

Se realizó un mapeo de los SNPs en las bases de datos disponibles (Poland et al. 2012a y base de datos del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)). En el mapeo de los SNPs en referencia a la base de datos de Poland et al. (2012a) se localizaron el 45 % de los

SNPs identificados (12.587); los SNPs se asignaron a un cromosoma y se ordenaron según los datos del mapa de bin de la base de datos. El alineamiento con la base de datos del URGI, INRA (<http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Wheat>) nos permitió identificar el cromosoma en el cual se encuentran el 64 % de los SNPs (17.754) aunque no fue posible identificar la posición exacta, ni el orden de los SNPs dentro del cromosoma. Se identifican SNPs en todos los cromosomas y la distribución fue similar en ambas base de datos (Figura 13). Para los siete cromosomas se identificaron menos SNPs en el genoma D (Figura 13).

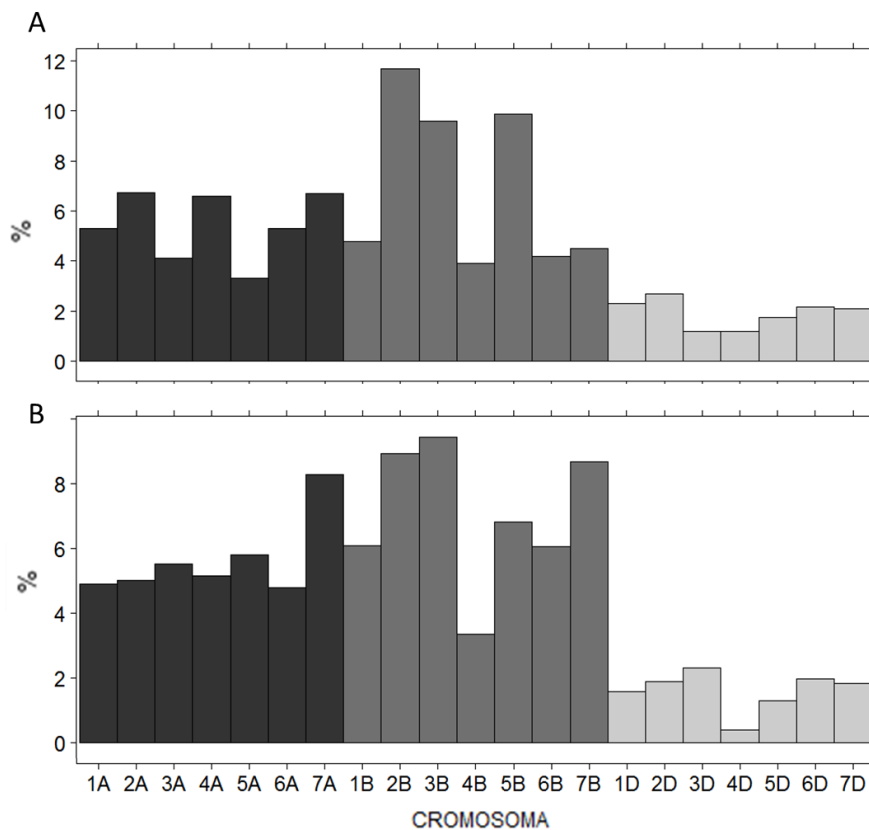


Figura 13. Distribución de los SNPs en los distintos cromosomas. A) Mapeo de SNPs en la base de datos de [www.urgi.versailles.inra.fr/Species/Wheat/](http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Wheat/). B) Mapeo de SNPs en la base de datos Poland et al. (2012a).

En el análisis de LD para los SNPs mapeados se obtuvieron distintos grupos de ligamiento (Figura 14). En la Figura 15 se presenta el mismo análisis pero para la base de datos de URGI, la cual no permite ordenar los SNPs dentro del cromosoma. Por lo tanto, los grupos de ligamiento se distinguen con menor claridad y únicamente es posible identificar algún grupo aislado cuando se grafican conjuntamente varios cromosomas.

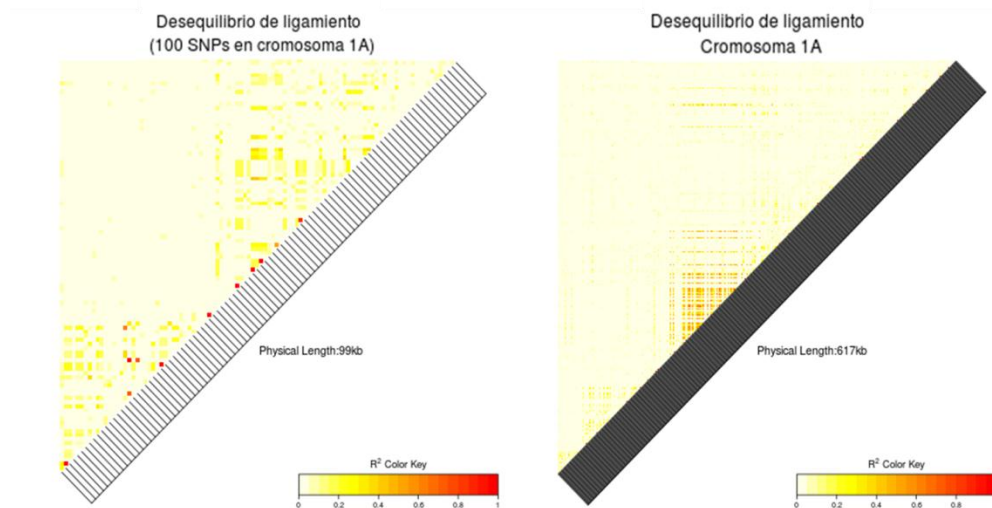


Figura 14. Análisis de desequilibrio de ligamiento. A) LD para los primeros 100 SNPs. B) LD a lo largo del cromosoma 1A (618 SNPs). El valor de r^2 se codifica con un código de colores que oscila de blanco-amarillo ($r^2=0$) a rojo ($r^2=1$).

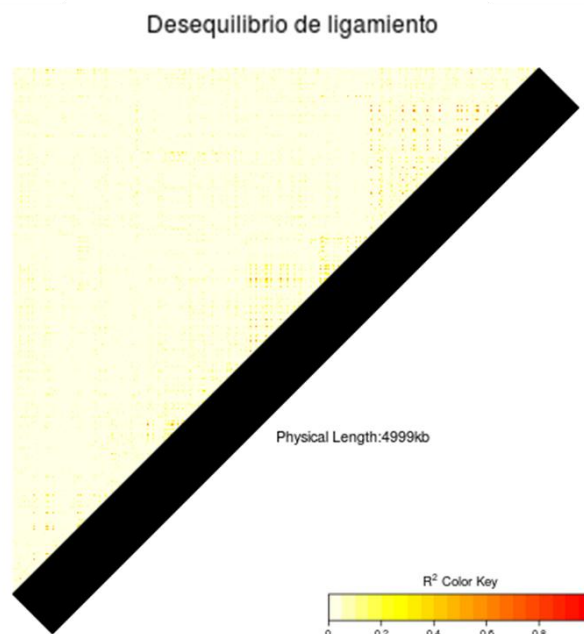


Figura 15. LD para los primeros 5000 SNPs que se mapearon utilizando el BLAST de URGI. La escala de colores que oscila entre blanco y el rojo indica el valor de r^2 de 0 a 1, respectivamente. Los 5000 SNPs comprenden los cromosomas 1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4A, 4B y 4D.

3.3.4. Predicciones fenotípicas

Las variables elegidas para realizar las predicciones fueron rendimiento y peso de mil granos, que son variables con distintas características de heredabilidad. Se estudiaron las variables individualmente en cada uno de los ambientes (riego y seco). Ambas características se ajustaron a una distribución normal (Figura 16).

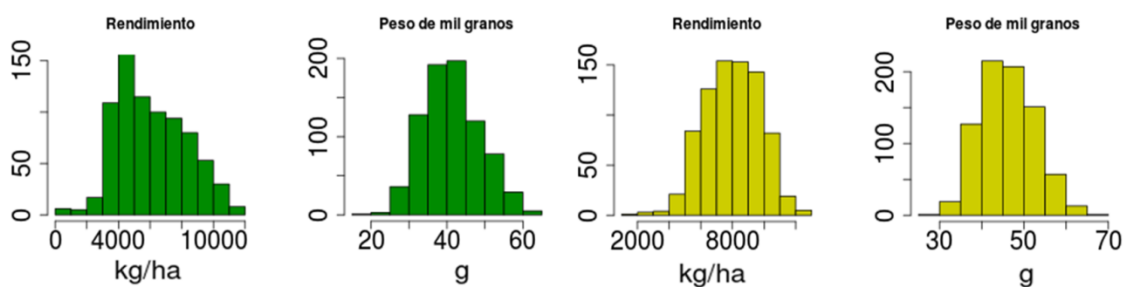


Figura 16. Distribución de las variables rendimiento y peso de mil granos. En verde se muestra Riego y en amarillo Secano.

El análisis de los residuales para los datos fenotípicos obtenidos en el campo (modelo de látice simple, LS), permitió observar la existencia de correlación entre ellos, lo cual es consistente con la presencia de variación espacial en el campo (Figura 17). Por lo tanto, se plantearon 3 modelos de corrección de dicha variación espacial: FC, BCA_MVNG y MVNG, con el objetivo de obtener las mejores medias ajustadas, que eliminen la correlación existente debido a la variación espacial y permitan obtener mejores predicciones.

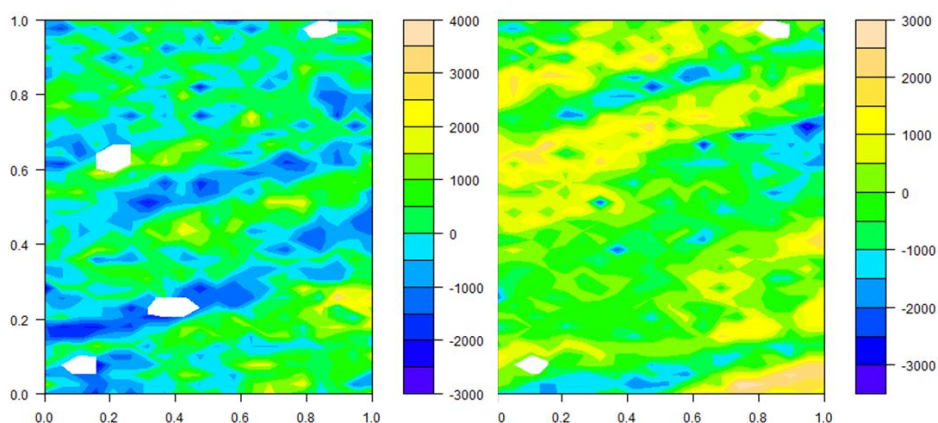


Figura17. Distribución espacial de los residuales ajustados con el diseño de látice simple (LS). En ambos ambientes, se asigna una coordenada espacial a cada valor de los residuos. Los colores indican los valores de los residuales: en azul valores negativos y en amarillo

valores positivos y en verde valores intermedios. A la izquierda se observan los valores obtenidos para los genotipos en condición de riego y a la derecha de seco.

En el análisis de las medias ajustadas por tratamiento, para los 4 modelos y las medias sin ajustar, se observó una menor desviación para BCA_MVNG y MVNG en el conjunto de los datos (Figura 18).

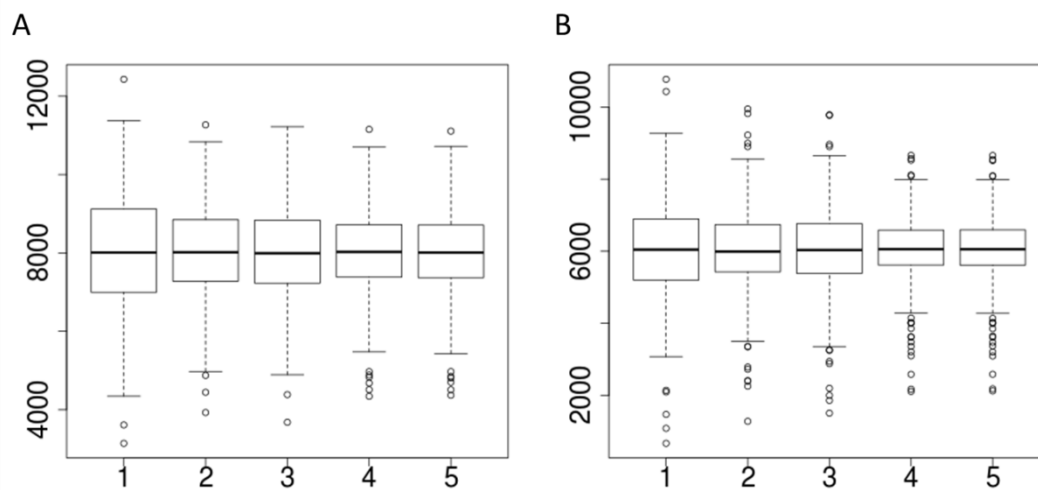


Figura 18. Medias ajustadas para los tratamientos sin ajustar-control (1) y para cada uno de los modelos evaluados: BI (2), FC (3), BCA_MVNG (4) y MVNG (5), en condiciones de riego (A) y seco (B).

Con el objetivo de evaluar la efectividad del ajuste de los distintos modelos, se graficó la distribución espacial de los residuales para cada modelo (Figura. 19, se grafica para riego a modo de ejemplo dado que seco presenta similar comportamiento). Se observó que los modelos BCA_MVNG y MVNG corrigieron la tendencia encontrada en los residuales del modelo LS. El perfil de los residuales del modelo con corrección por filas y columnas fue similar al encontrado en el ajuste con el modelo del diseño experimental.

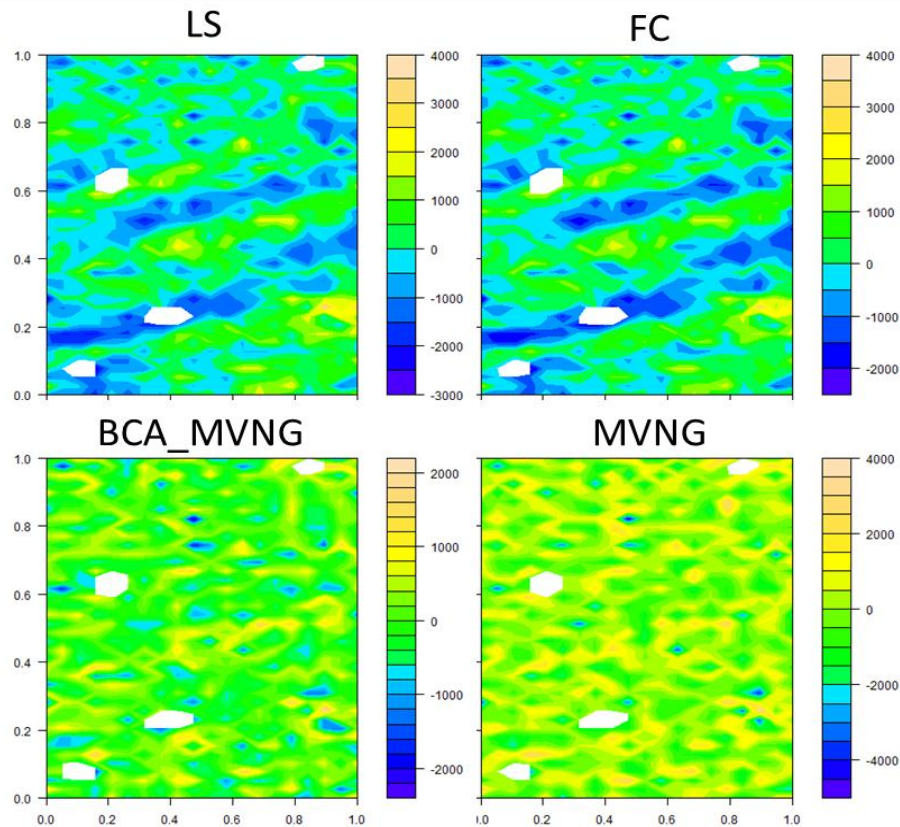


Figura 19. Distribución de los residuales obtenidos con cada uno de los modelos de ajuste. A cada valor de residual se le asigna la posición en el campo y con los colores se indica la magnitud.

Con el objetivo de comparar los modelos para cada una de las variables, se calculó la heredabilidad, obteniéndose un valor en 3 de los 4 modelos, dado que para el modelo MVNG no se conoce el dato de la varianza entre los tratamientos. La heredabilidad fue más alta para la variable peso de mil granos que para rendimiento, aumentando la misma en ambos casos al ajustar los datos fenotípicos con el modelo BCA_MVNG. Este aumento fue más significativo en el caso del rendimiento (Tabla 3). Luego de ajustar los modelos, se obtuvieron los BLUP (los mejores predictores lineales insesgados), a partir de los cuales se realizaron las predicciones en ambas variables (Tabla 4). La validación cruzada permitió evaluar la precisión de las predicciones, mediante correlaciones entre los GEBV y los BLUP obtenidos con los distintos modelos. Las predicciones presentaron mejor correlación para la variable peso de mil granos que para rendimiento. En cuanto a las predicciones de los distintos modelos, la mayor precisión fue la de los modelos que incluyen las medias móviles como

covariable, siendo MVNG el modelo que presentó los valores más altos de correlación (Tabla 4). En los modelos FC y LS se observan valores de correlación similares.

Tabla 3. Heredabilidad de las variables rendimiento y peso de mil granos, bajo condiciones de riego y seco.

Modelos	Rendimiento		Peso de mil granos	
	H riego	H seco	H riego	H seco
LS	0,42	0,33	0,88	0,79
FC	0,44	0,37	0,88	0,81
BCA_MVNG	0,57	0,56	0,89	0,82

FC: ajuste con modelo de filas y columnas; LS: ajuste con el modelo de diseño un alfa látice simple; BCA_MVNG: ajuste con modelo de diseño de bloque completos al azar con medias móviles como covariable

Tabla 4. Correlaciones entre los GEBV y los BLUP en la población de validación, para rendimiento (Rend.) y peso de mil granos (P1000g), con los 4 modelos planteados y para las medias sin ajustar, en los ambientes evaluados (riego y seco).

		Rend. riego	P1000g riego	Rend. seco	P1000g seco
Sin ajustar	RR	0,174±0,057	0,794±0,022	0,129±0,051	0,752±0,023
	GAUSS	0,337±0,090	0,794±0,022	0,285±0,108	0,754±0,025
FC	RR	0,221±0,061	0,755±0,021	0,171±0,068	0,766±0,019
	GAUSS	0,341±0,084	0,753±0,022	0,315±0,092	0,767±0,019
LS	RR	0,245±0,060	0,751±0,023	0,191±0,061	0,745±0,026
	GAUSS	0,361±0,074	0,751±0,031	0,324±0,078	0,748±0,027
BCA_MVNG	RR	0,246±0,077	0,752±0,022	0,219±0,060	0,764±0,019
	GAUSS	0,374±0,078	0,753±0,023	0,339±0,086	0,764±0,021
MVNG	RR	0,278±0,068	0,787±0,019	0,216±0,065	0,799±0,021
	GAUSS	0,396±0,070	0,787±0,020	0,357±0,084	0,799±0,02

Sin ajustar: medias fenotípicas con promedios simples; FC: ajuste con modelo de filas y columnas; LS: ajuste con el modelo de diseño un alfa látice simple; BCA_MVNG: ajuste con modelo de diseño de bloque completos al azar con medias móviles como covariable; MVNG: ajuste de un modelo de regresión lineal con medias móviles como variable regresora.

4. DISCUSIÓN

La mejora genética ha permitido incrementar los niveles de producción mundial de los cultivos a lo largo de la historia (Prakash, 2001). Los descubrimientos en el área genética y biotecnológica logrados durante el último siglo no solo aportaron las bases teóricas para comprender los mecanismos que operan en la mejora de los cultivos, sino que también brindaron nuevas herramientas para la manipulación de esos mecanismos. La primera herramienta biotecnológica utilizada fue la irradiación y modificación química de cultivos con el objetivo de crear variabilidad genética (Prakash, 2001). Hoy en día este objetivo se busca también mediante la transgénesis, que es un método más específico y permite mayor variación genética por expresión de genes provenientes de diferentes especies (Prakash, 2001; Abdul et al., 2009). Junto a las metodologías de transgénesis se aplican métodos de identificación y selección de genes por marcadores moleculares que son menos costosos y controversiales que los primeros (Zamir, 2001). La generación de nuevos cultivares depende directamente de la capacidad de mejorar la expresión de características complejas, es decir, influenciadas por varios genes (Khush, 2001). Sin embargo, los métodos hasta ahora existentes, que permiten asociar la información genética a la expresión fenotípica de estos caracteres presentan ciertas limitaciones, debido a las interacciones genéticas y al alto número de genes involucrados en la expresión de las variables (Verhoeven et al., 2010; Lu et al., 2011).

Por otro lado, el desarrollo tecnológico en el área de la secuenciación ha dado el puntapié inicial para la puesta a punto de técnicas de genotipado masivo, en las que se propone disminuir costos y simplificar la metodología de obtención de marcadores moleculares.

En el último tiempo se han llevado a cabo distintos trabajos, con el objetivo de obtener marcadores moleculares, utilizando dichas tecnologías en distintas especies, como ser *Aegilops tauschii* (You et al., 2011), soja (Deschamps et al., 2010; Wu et al., 2010; Varala et al. 2011), trigo (Trebbi et al., 2011) y frijol (Hyten et al., 2010c). Es importante destacar que la aplicación de esta metodología para la identificación de marcadores en el genoma de trigo presenta dificultades debido a las características complejas de su genoma. La presencia de cromosomas homeólogos y la alta proporción de regiones repetidas en genomas poliploides como el de trigo, son 2 obstáculos en la identificación de SNPs (Akhunov et al., 2009). En este sentido, para evitar la identificación de falsos SNPs por homeólogos o parálogos, es importante tener en cuenta que la diversidad entre estas regiones es mayor que la diversidad entre distintos cultivares de trigo. Se ha determinado que la frecuencia de encontrar un SNP

entre variedades de trigo oscila entre 1 en 200 a 613 pb, mientras que para regiones homeólogas, la misma asciende a 1 en 24 a 61 pb (Somers et al., 2003; Schnurbusch et al., 2007; Barker y Edwards, 2009). Recientemente se propuso el genotipado por secuenciación como una herramienta alternativa para la identificación de SNPs en trigo (Poland, et al. 2012a), sacrificando la “representación” del genoma en lo fragmentos re-secuenciados, por una mayor cobertura de cada uno de los fragmentos (menos fragmentos que se secuencien más veces). Otras alternativas en este sentido se plantean con la construcción de librerías de representación reducida del genoma, las cuales permiten disminuir aún más la “representación” de los fragmentos aumentando su cobertura (Hyten et al., 2010b; Varala et al., 2011).

La necesidad de desarrollar nuevas metodologías para la selección de características complejas junto a los avances en el área del genotipado, han llevado al desarrollo de nuevas metodologías de selección, como ser la selección genómica. Cabe destacar que en estas técnicas no solo es importante la calidad de los datos genotípicos, sino también la de los datos fenotípicos utilizados para entrenar los modelos de selección (Cabrera-Bosquet et al., 2012).

Con el objetivo de incorporar estas nuevas metodologías a los programas de mejoramiento en Uruguay, es que se propuso aplicar GBS en 384 genotipos de trigo ajustando un método bioinformático de identificación de SNPs para ser utilizando en SG. El análisis de los datos fenotípicos obtenidos a campo permitió introducir en el trabajo la evaluación de nuevos modelos de corrección espacial, aportando una herramienta para su aplicación en ensayos de evaluación de genotipos en programas de mejoramiento genético.

4.1. IDENTIFICACIÓN DE SNPs

Para el análisis de la información brindada por el secuenciador es recomendable estudiar la distribución de calidad de la bases en el conjunto de fragmentos obtenidos; lo que permite detectar la existencia de algún problema durante la secuenciación (DeWit et al., 2012). En este trabajo, la calidad de los fragmentos es elevada hasta el final de la secuenciación, disminuyendo hacia el extremo 3'. A su vez, la media y el primer cuartil, de la distribución de la calidad de la bases en el conjunto de fragmentos, se mantuvieron cercanas a 30, que indican una probabilidad de error de uno en mil (DeWit et al, 2012).

El análisis de profundidad de las secuencias (número de veces que se encuentra repetida) por línea del secuenciador indica que, aproximadamente un 2,5 % del total de secuencias se encuentran repetidas. Cada una de las muestras está representada por el 1 % del total (millón y medio de secuencias) de fragmentos de ADN en la línea del secuenciador. Lo anterior indica que hay una gran proporción de información que se descarta, dado que secuencias de única repetición no son tomadas en cuenta en los análisis posteriores, debido a que existe una alta probabilidad de que se deban a errores durante la secuenciación o amplificación (Elshire et al., 2011; Varala et al., 2011). Por lo tanto el incrementar la precisión durante la secuenciación y evitar los pasos de amplificación son dos factores a tener en cuenta para un uso más eficiente de la información obtenida (Metzker, 2010; Niedringhaus et al., 2011).

La identificación de SNPs utilizando las metodologías PipRef y PipT produjo resultados que se diferencian manteniendo algunos puntos en común. La principal diferencia entre ambas radica en el método de alineación de los fragmentos durante el proceso de análisis de posibles variaciones. En PipRef fue necesario contar un ensamblado de secuencias para utilizarlo como genoma de referencia, ya que en el caso del trigo aún no se dispone de esta herramienta. Es importante destacar que la calidad de este ensamblado es una limitante en la aplicación de esta metodología. Las limitaciones en este caso están dadas por la cobertura del genoma que está representada en el ensamblado y por los posibles errores existentes en el mismo (Hyten et al., 2010c; Alkan et al., 2011; Helyar et al., 2012). En el caso de PipT no es necesario contar con un genoma de referencia, sino que se realizan alineamientos de a pares entre las secuencias generadas. Una limitante de esta metodología es que se requiere un buen número de secuencias repetidas para asegurar el SNP (Poland et al. 2012a y 2012b), dado que ambos alelos están determinados únicamente por el conjunto de secuencias re-secuenciadas (Ratan et al., 2010; Elshire et al., 2011). En este caso el contar con un genoma de referencia permitiría ser menos exigente en este punto. En el caso de PipRef es necesario contar con al menos 2 secuencias para llamar a cada genotipo (asignarle un alelo u otro a la muestra), tomando también en cuenta SNPs en función de la profundidad media en el conjunto de individuos entre un máximo y un mínimo. El valor medio mínimo de profundidad permite asegurarse que las lecturas se encuentran distribuidas en cierta proporción de las muestras y que no se encuentran concentradas en pocos individuos (Tebbi et al., 2011). En este sentido se establece un umbral de valor medio máximo de profundidad, a modo de eliminar secuencias que provengan de zonas repetidas del genoma (Wu et al., 2010). Estos son parámetros que se pueden modificar en busca de optimizar la identificación de SNPs (Nielsen

et al., 2011). Otra de las diferencias importantes entre ambas metodologías es el tamaño de fragmento, para PipT es de 64pb y en el caso de PipRef un promedio de 80–85 pb. Cuanto más largo es el fragmento, con mayor exactitud se produce el alineamiento entre secuencias, asignando la dirección correcta en el caso de alinear contra una referencia (Harismendy et al., 2009). Los SNPs identificados mediante ambos pipelines mostraron un perfil de proporción de SNPs por muestra similar. Una característica negativa de GBS es que se genera una elevada cantidad de datos faltantes (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012a y 2012b); la mayoría de las muestras presentaron un promedio del 50 % de los SNPs sin datos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Poland et al. (2012a y 2012c). Una forma de resolver esta dificultad es genotipar un gran número de muestras que permitan inferir información unas a otras mediante la imputación de los datos. Poland et al. (2012c) describen distintas metodologías de imputación de datos, midiendo la eficiencia de la imputación simulando datos perdidos.

Los SNPs identificados por ambos pipelines presentaron distribuciones similares de datos faltantes en el conjunto de muestras. La principal diferencia entre ambas metodologías radica en las frecuencias alélicas de los SNPs y el número de SNPs heterocigotos. Al establecer un filtro por máxima frecuencia alélica 0,01 se filtraron alelos presentes en menos del 1% de las muestras (Kim et al., 2011). La frecuencia alélica en el conjunto de SNPs identificados por PipT presentó una distribución homogénea, con un menor número de SNPs de frecuencia alélica entre 0,01 y 0,05. Por otro lado, con PipRef se obtuvo una alta proporción de SNPs con valores de frecuencia alélica entre 0,01 y 0,05. La proporción de SNPs heterocigotos también aumenta significativamente al utilizar PipRef, a pesar de que en trigo (especie autógena) se espera baja proporción de heterocigosis (Enjalbert y David, 2000).

4.2. VALIDACIÓN DE SNPs

Para la validación de los SNPs se utilizaron distintas estrategias para decidir si la información de los marcadores obtenida a partir del conjunto de datos, representa una información coherente acerca de los individuos cuyas muestras han sido secuenciadas. Todas las metodologías propuestas utilizan el conjunto de los datos para su validación, ya sea mediante el cálculo de matrices de distancia genética, mediante mapeo y análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs o a través de la realización de predicciones fenotípicas. En diferentes

trabajos es común realizar validación mediante la amplificación y re-secuenciación por el método de Sanger de un determinado número de SNPs escogidos al azar, en distintos genotipos (Wu et al., 2010; Deschamps et al., 2010; You et al., 2011). En este trabajo se descartó la aplicación de este método de validación, ya que al contar con 28.199 SNPs detectados sería necesario validar al menos de 100 SNPs en por lo menos 8 genotipos. Lo anterior será costoso y aportaría la misma información que los métodos de validación planteados en este trabajo.

4.2.1. Correlación entre matrices genéticas

Las distancias genéticas entre los individuos, calculadas a partir de subgrupos de SNPs divididos aleatoriamente, mostraron buena correlación, que aumentó al imputar los datos faltantes. El valor de correlación de las matrices fue mayor para los SNPs identificados mediante PipT que mediante PipRef. Lo anterior es un indicador de que los SNPs identificados en PipRef estarían introduciendo errores en el cálculo de distancias genéticas, probablemente debido a un mayor número de falsos SNPs (Hamblin et al., 2007; Chao et al., 2009). Sin embargo, las distancias genéticas calculadas con los SNPs identificados mediante PipT correlacionó muy bien ($r=0.93$, $p<0.001$) con las distancias calculadas con los SNPs identificados en PipRef. Esto nos indica que ambas matrices poseen información común (Chao et al., 2009). En base a lo descrito anteriormente y considerando también un mayor número de heterocigotos y alelos con bajas frecuencias en el caso de PipRef, se decidió seleccionar la metodología de PipT para continuar el proceso de validación. Sin embargo, cabe considerar que la limitante de la ausencia del genoma de referencia en el caso de trigo puede ser levantada conforme surjan nuevas investigaciones en la temática. PipRef ha sido aplicado exitosamente al cultivo de soja (con algunas variante en los filtros por tratarse de otra especie) que cuenta con un genoma de referencia (com. pers., F. Belzile, Universidad de Laval Quebec).

4.2.2. Correlación entre SNPs y Pedigrí

El análisis de coordenadas principales, a partir de la matriz de distancias genéticas entre individuos, si bien mostró separación entre los materiales chilenos y uruguayos, ambos

grupos se mezclan. La mezcla de materiales entre ambos grupos se explica por la presencia de ancestros comunes a ambos programas de mejoramiento, provenientes de CIMMYT. Lo anterior es una característica deseable para su aplicación en genética asociativa o selección genómica, evitando los problemas que generan una población altamente estructurada (Jannink y Walsh, 2002; Breseghello y Sorrells, 2006).

La correlación entre la matriz de coancestría calculada con el pedigrí y la matriz de parentesco genética es mayor que la descrita por Almanza-Pizón et al. (2003) para marcadores SSR y AFLP, de todos modos siguen siendo valores de correlación medios ($r=0.51$, $p<0.001$). Esto podría deberse a las limitaciones para establecer relaciones entre líneas por su pedigrí, dada la falta de información para extender los pedigrís de cada genotipo. En general en trigo se ha visto que los marcadores moleculares son más sensibles para establecer relaciones entre individuos (Manifesto et al., 2001; Almaza-Pinzón et al., 2003; Fufa et al., 2005). Los valores de distancia genéticas de las matrices de coancestría son mayores (más cercanos a 0, valor que representa una distancia genética infinita) que los valores de las matrices de parentesco genéticas. Si bien estas limitaciones no permite llegar a una conclusión definitiva, la correlación entre marcadores y pedigrí es mayor a la hallada con marcadores SRR y AFLP (Manifesto et al., 2001; Almaza-Pinzón et al., 2003).

Por otro lado, la correlación entre matrices de parentesco genéticas y coancestría depende mucho de la calidad de los datos con los que se trabaje. Se supone que si tenemos una cobertura ideal de marcadores y una base de datos de pedigrí completa, estas dos matrices tenderían a correlacionar muy bien, pero estas situaciones son ideales. Crossa et al. (2010) muestra que el uso de las dos matrices aportan información complementaria en los análisis que incluyen datos genéticos.

4.2.3. Mapeo de SNPs

El mapeo de SNPs en una base de datos es una herramienta útil en la validación de estos marcadores. Referenciar una alta proporción de los SNPs a un cromosoma permite tener una idea de cómo es su distribución en los distintos cromosomas y genomas (Chao et al., 2009). A su vez la comparación del nivel de polimorfismo identificado en los cromosomas con el hallado en otros trabajos nos podría aportar nueva evidencia en la validación. Por otro lado, el orden de los marcadores dentro del cromosoma y el cálculo del valor de r^2 entre los

marcadores permitieron identificar la formación de grupos de ligamiento dentro del cromosoma. Estas asociaciones aportan evidencias que ayudan a confirmar la veracidad de los SNPs identificados (Chao et al., 2010)

El genoma D presentó significativamente menor número de SNPs que los otros dos homeólogos A y B, confirmando lo descrito en otros estudios llevados a cabo en trigo (Chao et al., 2009 y 2010; Allen et al., 2011). A su vez, en la gran mayoría de los cromosomas el genoma B presenta mayor cantidad de SNPs que el genoma A, situación que también se ha descrito en trabajos previos (Gu et al. 2004; Chao et al., 2009).

Una limitación en este análisis es la imposibilidad de establecer una dirección genética de los SNPs en los cromosomas, debido a que las bases de datos utilizadas para mapeo no poseen dicha información. Sin embargo, al ordenar los SNPs según el mapa de bins de Poland et al. (2012a), se pudo identificar la formación de grupos de ligamiento a lo largo del cromosoma. Lo anterior es un indicio de la identificación verdadera de variaciones entre individuos, dado que se espera que los falsos SNPs sean espurios en el conjunto de individuos (Gupta et al., 2005).

4.2.4. Predicciones fenotípicas

Como último método de validación se planteó realizar predicciones fenotípicas y estudiar su precisión mediante validación cruzada. Para realizar las predicciones fenotípicas a partir de los 28.199 SNPs identificados, se utilizaron los datos obtenidos a campo de 381 del total de las variedades genotipadas. Las variables escogidas en la validación fueron rendimiento y peso de mil granos. El rendimiento, es una variable de interés y de difícil predicción, dado que está influenciada por muchos genes que actúan sobre diversas características (Wu et al., 2012). El peso de mil granos es uno de los componentes de rendimiento, presentó un mayor valor de heredabilidad que el anterior, lo que presupone mejores predicciones (Iwata y Jannink, 2011).

A diferencia de lo encontrado en las simulaciones planteadas por Gezan et al. 2010 el diseño de filas y columnas no mostró mejoras con respecto al diseño de látice simple realizado a campo, no siendo adecuado para la corrección de variación espacial detectada en los datos. Coincidiendo con los trabajos de Townley-Smith y Hurd (1973) y Gezan et al. (2010) se

propuso incluir en los modelos las medias móviles como covariables, seleccionando el modelo lineal que incluye dicha covariable como único componente regresor.

Un diseño a campo en el cual se controle el efecto diferencial, de los principales efectos ambientales, sobre los genotipos para evaluarlos aplicando la corrección según el diseño planteado; es el escenario ideal para llevar a cabo los ensayos (Edmondson, 2005). Sin embargo, por diversos factores que van desde el no conocimiento del campo hasta limitaciones en la disponibilidad de materiales, hacen que el planteo de un buen diseño previo no siempre sea posible (Cullis et al., 2006; Leiser et al., 2012). En los últimos tiempos se han publicado algunos trabajos que proponen distintos modelos para ajustar la variación espacial post obtención de los datos. Los principales modelos de corrección espacial existentes son el ajuste por filas y columnas, asociando este dato a cada valor fenotípico (Piepho y Williams, 2010), ajuste mediante la correlación de errores con distintas estructuras de covarianza (Federer, 2003), ajuste aplicando el método de vecinos más cercanos (Papadakis, 1937; Müller et al., 2010) y ajuste usando medias móviles (Townley-Smith y Hurd, 1973; Peiris et al., 2008). Para seleccionar los modelos es importante considerar el tipo de variación espacial encontrada (local, general, con tendencia, en focos, etc), ya que los distintos métodos muestran mejores o peores performances dependiendo del tipo de variación existente (Gezan et al., 2010)

Utilizando un modelo de regresión lineal con medias móviles como covariable, los valores de precisión en las predicciones de rendimiento fueron menores que los obtenidos por Crossa et al. (2010) para trigo y mayores que los presentados por Heffner et al. (2011) y Poland et al. (2012a). En cambio para la variable peso de mil granos las correlaciones fueron mayores a las encontradas en Poland et al. (2012c). Es importante destacar, que la precisión en las predicciones depende, entre otros factores, de la calidad de los datos fenotípicos; la relación entre la población de entrenamiento y validación: tipo de población (emparentada o diversa) y del número de individuos que componen cada población; de los modelos de predicción utilizados; de la especie en estudio y de la variable estudiada (Crossa et al., 2010; Heffner et al., 2011; Burgueño 2012; Nakaya e Isobe, 2012; Poland et al., 2012c; Resende et al., 2012).

Heffner et al. (2010) analizaron las condiciones de los programas de mejoramiento genético de maíz y trigo invernal de la Universidad de Cornell. Estos trabajos han demostrado que mediante la aplicación de selección genómica, obteniendo una precisión de 0.30 en la validación de las predicciones de rendimiento en trigo, es posible obtener mejores ganancias

genéticas que con la aplicación de la selección clásica por marcadores. Los resultados de este trabajo son un indicio promisorio para la futura aplicación de selección genómica, dado los valores de correlación obtenidos en las validaciones cruzadas (0.40 y 0.36 para riego y seco, respectivamente).

Una de las limitaciones que presentan las predicciones realizadas con los datos fenotípicos radica en que la información proviene de dos ambientes (riego y seco) con el mismo patrón de correlación entre los residuales. Aumentando la cantidad de ambientes y mediante un análisis de multi-ambiente las predicciones obtenidas podrían mejorar (Burgueño et al., 2012). Otra información que puede ser incluida en el modelo con el objetivo de mejorar las predicciones es la matriz de coancestría calculada con los datos de pedigrí, como se demuestra en Crossa et al., (2010).

Finalmente, cabe destacar que el modelo de predicción puede ser ajustado utilizando distintas metodologías que tomen en cuenta de diferencialmente el efecto de los marcadores. Alguno de estos métodos es capaz de asignar valores diferenciales dependiendo de la localización de los marcadores (Crossa et al. 2010). En nuestro caso los modelos se ajustaron con el método de G-BLUP o *ridge regresión* (RR), el cual asume que todos los marcadores tienen la misma distribución con media 0 y la misma varianza, y con el método de GAUSS. Este último, utiliza un *kernel* diferente para el cálculo de la matriz de Kinship, que permite considerar interacciones epistáticas entre marcadores (Gianola y van Kaam, 2008; Endelman; 2011)

La Selección Genómica es un método que propone acortar los tiempos y aumentar la eficiencia de mejoramiento, pero su aplicación depende de la calidad de los datos fenotípicos y genotípicos obtenidos. Este trabajo permitió validar un procedimiento de identificación de SNPs para su aplicación directa en un modelo de selección genómica. Para que esto sea exitoso, es condición necesaria aunque no suficiente, contar con un buen diseño a campo que permita obtener datos fenotípicos confiables. En este sentido, contar con herramientas que permitan ajustar y corregir datos fenotípicos post-diseño puede mejorar mucho la precisión de la selección.

5. CONCLUSIONES

La aplicación de genotipado por secuenciación como herramienta para la identificación de SNPs fue exitosa en variedades de trigo provenientes de un programa de mejoramiento, identificándose un alto número de polimorfismos de una sola base que están distribuidos en los distintos cromosomas, formando grupos de ligamiento.

El método de genotipado por secuenciación permitió obtener una densidad adecuada de marcadores genéticos, lo que lo convierte en una herramienta promisoría para su aplicación en un programa de mejoramiento genético de trigo. La mayor limitación en la técnica radica en la disponibilidad de datos en relación al genoma de trigo, lo cual limita su aplicación para mapeo asociativo o análisis de QTL en trigo.

El análisis de las variables mediante la corrección de la variación espacial existente, permitió potenciar las predicciones realizadas mediante selección genómica en el cultivo de trigo.

Si bien la Selección Genómica es una metodología que continúa en desarrollo, este trabajo aporta evidencias que indican que sería un método aplicable en los programas de mejoramiento genético de trigo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, R., Zhiying, M. and Wang, H. (2009). Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L): A Review. *Triticeae Genomics and Genetics*. 1(2):1–7.
- Ahn, S. J., Costa, J. and Emanuel, J. R. (1996). PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic acids research*. 24(13):2623–5.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., et al. (2006). Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 113(8):1409-1420.
- Akey, J., Jin, L. and Xiong, M. (2001). Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *European journal of human genetics: EJHG*. 9(4):291–300.
- Akhunov, E. D., Goodyear, A. W., Geng, S., Qi, L.-li, Echaliier, B., Gill, B. S., Gustafson, J. P., et al. (2003). The Organization and Rate of Evolution of Wheat Genomes Are Correlated With Recombination Rates Along Chromosome Arms. *Plant and Soil*. 753-763.
- Akhunov, E., Nicolet, C. and Dvořák, J. (2009). Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *TAG. Theoretical and Applied Genetics*. 119(3), 507-17.
- Alkan, C., Sajjadian, S. and Eichler, E. E. (2011). Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nature Methods*. 8(1):61–65.
- Allan, R.E. and Vogel O.A. (1964). F2 Monosomic Analysis of Coleoptile and First-Leaf Development in Two Series of Wheat Crosses. *Crop Science*. 4(3):338-339.
- Allen, A. M., Barker, G. L. a, Berry, S. T., Coghill, J. a, Gwilliam, R., Kirby, S., Robinson, P., et al. (2011). Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant biotechnology journal*. 9(9):1086–99.
- Almaza-Pinzón, M.I., Khairallah, M., Fox, P.N. and Warburton, M.L. (2003) Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. *Euphytica*. 130:77-86.

- Andaya, V. C. and Mackill, D. J. (2003). Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal of experimental botany*. 54(392):2579–85.
- Ardlie, K.J.; Kruglyak, L. and Seielstad, M. 2002. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews. Genetics*. 3:299-309.
- Baldo, A.M., Yang, Y., Ramming, D.W. and Zhong G-Y. (2012) Genotyping by Sequencing in Grape - Stacks or Tassel?. *International Plant and Animal Genome Conference*. [En línea]. <https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper1731.html>
- Barker, G.L.A and Edwards, K.J. (2009). A genome-wide analysis of single nucleotide polymorphism diversity in the world's major cereal crops. *Plant Biotechnology Journal*. 7: 312-317.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., et al. (2010a). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 19(January), Unit 19.10:1-21.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J. and Nekrutenko, A. (2010b). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 26(14):1783-5.
- Bnejdi, F. and Gazzah, M. E. (2010). Epistasis and genotype-by-environment interaction of grain protein content in durum wheat. *Genetics and molecular biology*. 33(1):125–130.
- Bonfanti, D. (2010) Elites, Estado y técnicos extranjeros en los procesos de innovación agrícola en el Uruguay de los centenarios (1910-1930). *Revista Encuentros Latinoamericanos*. 10/11. Disponible en <http://enclat.fhuce.edu.uy/index.php> (verificado 05 Nov 2012)
- Bonnett, D. G., Rebetzke, G. J. and Spielmeier, W. (2005). Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Molecular Breeding*. 15(1):75–85.
- Borlaug, N.E. (1983). Contribution of conventional plant breeding to food production. *Science*. 219(4585):689-693

- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. a, Butler, T., Di Ventra, M., et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature biotechnology*. 26(10):1146-53.
- Bresegghello, F. and Sorrells, M. E. (2006). Association Analysis as a Strategy for Improvement of Quantitative Traits in Plants. *Crop Breedng and Genetics*. 46:1323–1330.
- Buerstymayr, H., Ban, T. and Anderson, J. A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*. 128:1-26.
- Burgueño, J., de los Campos, G., Weigel, K. and Crossa, J. (2012). Genomic Prediction of Breeding Values when Modeling Genotype × Environment Interaction using Pedigree and Dense Molecular Markers. *Crop Science*. 52(2):707.
- Cabrera-Bosquet, L., Crossa, J., von Zitzewitz, J., Dolors Serret, M. and Araus, J. L. (2012). High-throughput phenotyping and genomic selection: The frontiers of crop breeding converge. *Journal of integrative plant biology*. 00(0):1-9.
- Carey, G. (2000). *Quantitative Gnetics: II – Advanced Topics*. Available: <http://psych.colorado.edu/~carey/hgss/hgssadvanced/Chapter19Advanced.pdf>
- Castro, A.J., Gamba, F., German, S., Gonzales, S., Hayes, P.M., Pereyra, S. and Perez, C. (2012) Quantitative trait locus analysis of spot blotch and leaf rust resistance in the BCD47 × Baroness barley mapping population. *Plant Breeding*. 131(2):258-266.
- Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M.-C. and Dubcovsky, J. (2009). Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding*. 23(1):23–33.
- Chao, S., Dubcovsky, J., Dvorák, J., Luo, M.-C., Baenziger, S. P., Matnyazov, R., Clark, D. R., et al. (2010). Population- and genome-specific patterns of linkage disequilibrium and SNP variation in spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*. 11(1):727.

- Chen, X., Min, D., Yasir, T. A. and Hu, Y.-G. (2012). Genetic Diversity, Population Structure and Linkage Disequilibrium in Elite Chinese Winter Wheat Investigated with SSR Markers. *PloS one*. 7(9):e44510
- Chenu, K., Cooper, M., Hammer, G. L., Mathews, K. L., Dreccer, M. F. and Chapman, S. C. (2011). Environment characterization as an aid to wheat improvement: interpreting genotype-environment interactions by modelling water-deficit patterns in North-Eastern Australia. *Journal of experimental botany*. 62(6):1743–55.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. and Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142(1-2):169-196.
- Condón, F., Gustus, C., Rasmusson, D. C. and Smith, K. P. (2008). Effect of Advanced Cycle Breeding on Genetic Diversity in Barley Breeding Germplasm. *Crop Science*. 48(3):1027.
- Cornide, M. T. (2001). LA GENETICA VEGETAL, EL MEJORAMIENTO Y LA SOCIEDAD. *Cultivos Tropicales*. 22(3):73–82.
- Coster, A. (2011): Pedigree: Pedigree 2009. [R package version 1.2]
- Crossa, J., de los Campos, G. D. L., Pérez, P., Gianola, D., Burgueño, J., Araus, J. L., Makumbi, D., et al. (2010). Prediction of genetic values of quantitative traits in plant breeding using pedigree and molecular markers. *Genetics*. 186(2):713-24.
- Cuesta-Marcos, A., Casas, A. M., Hayes, P. M., Gracia, M. P., Lasa, J. M., Ciudad, F., Codesal, P., et al. (2009). Yield QTL affected by heading date in Mediterranean grown barley. *Plant Breeding*. 128(1):46–53.
- Cullis, B. R., Smith, a. B. and Coombes, N. E. (2006). On the design of early generation variety trials with correlated data. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*. 11(4):381–393.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. a, Banks, E., DePristo, M. a, Handsaker, R. E., et al. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 27(15):2156–8.

- Davey, J. W., Hohenlohe, P. a, Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M. and Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews. Genetics.* 12(7), 499-510.
- de los Campos, G., Naya, H., Gianola, D., Crossa, J., Legarra, A., Manfredi, E., Weigel, K., et al. (2009). Predicting quantitative traits with regression models for dense molecular markers and pedigree. *Genetics.* 182(1):375–85.
- DePristo, M. a, Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. a, et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics.* 43(5):491-8.
- DeWit, P., Pespeni, M. H., Ladner, J. T., Barshis, D. J., Seneca, F., Jaris, H., Therkildsen, N. O., et al. (2012). The simple fool’s guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Molecular ecology resources.* 12(6):1058–67.
- Deschamps, S., la Rota, M., Ratashak, J. P., Biddle, P., Thureen, D., Farmer, A., Luck, S., et al. (2010). Rapid Genome-wide Single Nucleotide Polymorphism Discovery in Soybean and Rice via Deep Resequencing of Reduced Representation Libraries with the Illumina Genome Analyzer. *The Plant Genome Journal.* 3(1):53.
- Diamond, J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature,* 418(6898):700–707
- DIEA-MGAP. (2011) Anuario 2011. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU> (verificado 21 Oct. 2012)
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T. and Himmelbauer, H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic acids research.* 36(16):e105.
- Dreisigacker, S., Zhang, P., Warburton, M. L., Skovmand, B., Hoisington, D. and Melchinger, A. E. (2005). Genetic Diversity among and within CIMMYT Wheat Landrace Accessions Investigated with SSRs and Implications for Plant Genetic Resources Management. *Crop Science.* 45(2):653.

- Dubcovsky, J., Luo, M.-C., Zhong, G.-Y., Bransteiter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A. and Dvorák, J. (1996). Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*. 143:983-999.
- Dvorák, J. and Zhang, H. B. (1990). Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(24):9640-4.
- Dvorák J, di Terlizzi P, Zhang HB, Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*. 36:21–31.
- Edmondson, R. N. (2005). Past developments and future opportunities in the design and analysis of crop experiments. *The Journal of Agricultural Science*. 143(1):27–33.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. a, Kawamoto, K., Buckler, E. S. and Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*. 6(5):e19379.
- Endelman, J. B. (2011). Ridge Regression and Other Kernels for Genomic Selection with R Package rrBLUP. *The Plant Genome Journal*. 4(3):250.
- Enjalbert, J. and David, J. L. (2000). Inferring recent outcrossing rates using multilocus individual heterozygosity: application to evolving wheat populations. *Genetics*. 156(4):1973–82.
- Erlich, Y., Mitra, P. P., McCombie, W. R. and Hannon, J. (2010). Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing. *Nature Methods*, 5(8), 679-682.
- FAO-STAT. (2010). Production. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (verificado el 21 Oct. 2012).
- Federer, W. T. (2003). Exploratory Model Selection for Spatially Designed Experiments – Some Examples. *Journal of Data Science*. 1:231–248.
- Flannery, K. V. (1982). *Guilá Naquitz: Archaic Foraging and Early agriculture in Oaxaca, Mexico*. Academic Press, New York.
- Flint-García, S. A., Thornsberry, J. M. and Buckler, E. S. (2003). Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual review of plant biology*, 54, 357–74.

- Flint-García, S. A., Thuillet, A.-C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S. M., Mitchell, S. E., Doebley, J., et al. (2005). Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 44(6):1054–64.
- Frankel, O.H. (1958) The dynamics of plant breeding. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*. 24:112-123.
- Fufa, H., Baenziger, P. S., Beecher, B. S., Dweikat, I., Graybosch, R. A. and Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*. 145:133–146.
- Gepts, P. and Papa, R. (2002) Evolution during domestication. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group.
- Gepts, P. (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev* 24 (Part 2): 1-44
- Gezan, S. A., White, T. L. and Huber, D. A. (2010). Accounting for Spatial Variability in Breeding Trials: A Simulation Study. *Agronomy Journal*. 102(6):1562.
- Gianola, D. and van Kaam, J. B. C. H. M. (2008). Reproducing kernel hilbert spaces regression methods for genomic assisted prediction of quantitative traits. *Genetics*. 178(4):2289–303.
- Goddard, M. E. and Hayes, B. J.(2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Review. Genetics*. 10:381–391. Abstact.
- Grabowski, P., Morris, G., Casler, M. and Borevitz, J.O. (2012) Range-wide Genomic Variation and Population Structure of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Measured Using Genotyping-By-Sequencing (GBS). *International Plant and Animal Genome Conference*. [En línea]. <https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper1297.html>
- Grattapaglia, D. (2012). Twenty Years of Eucalyptus Molecular Breeding: From RAPD and QTLs to Genotyping-By-Sequencing and Genomic Selection of Complex Traits. *International Plant and Animal Genome Conference*. [En línea]. <https://pag.confex.com/pag/xx/webprogram/Paper2695.html>

- Gu, Y.Q., Coleman-Derr, D., Kong, X.Y. and Anderson, O.D. (2004). Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol.* 135:459-470.
- Guo, X., Gao, A., Liu, W., Yang, X., Li, X. and Li, L. (2011). Evaluation of genetic diversity , population structure and linkage disequilibrium among elite Chinese wheat (*Triticum aestivum* L .) cultivars. *Australian Journal of Crop Science.* 5(10):1167–1172.
- Gupta, P. K., Rustgi, S. and Kulwal, P. L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant molecular biology.* 57(4):461–85.
- Gupta, P. K., Rustgi, S. and Mir, R. R. (2008). Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity.* 101(1):5–18.
- Gustafson, D. I., Horak, M. J., Rempel, C. B., Metz, S. G., Gigax, D. R. and Hucl, P. (2005). An Empirical Model for Pollen-Mediated Gene Flow in Wheat. *Crop Science.* 45(4): 1286.
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., Schork, N. J., et al. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome biology.* 10(3):R32.
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J. and Goddard, M.E. (2009) Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *Journal of Dairy Science.* 92:433–443
- Heisey, P.W., Lantican, M.A. and Dubin, H.J. (2002). Impacts of International Wheat Breeding Research in Developing
- Heffner, E. L., Sorrells, M. E. and Jannink, J.L. (2009). Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Science.* 49(1):1-12.
- Heffner, E. L., Lorenz, A. J., Jannink, J.-L. and Sorrells, M. E. (2010). Plant Breeding with Genomic Selection: Gain per Unit Time and Cost. *Crop Science.* 50(5):1681.

- Heffner, E. L., Jannink, J. and Sorrells, M. E. (2011). Genomic Selection Accuracy using Multifamily Prediction Models in a Wheat Breeding Program. *The Plant Genome*. 4:65–75.
- Helyar, S. J., Limborg, M. T., Bekkevold, D., Babbucci, M., van Houdt, J., Maes, G. E., Bargelloni, L., et al. (2012). SNP discovery using Next Generation Transcriptomic Sequencing in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *PloS one*. 7(8):e42089.
- Hendre, P. S., Kamalakannan, R. and Varghese, M. (2012). High-throughput and parallel SNP discovery in selected candidate genes in *Eucalyptus camaldulensis* using Illumina NGS platform. *Plant biotechnology journal*. 10(6):646–56
- Hillier, L. W., Marth, G. T., Quinlan, A. R., Dooling, D., Fewell, G., Barnett, D., Fox, P., et al. (2008). Whole-genome sequencing and variant discovery in *C. elegans*. *Nature Methods*. 5(2):183-188.
- Holland, J. B., Nyquist, W. E. and Cervantes-Martínez, C. T. (2003). Heritability for Plant Breeding: An Update. *Plant Breeding Reviews*. 22:9–112.
- Hori, K., Kobayashi, T., Shimizu, A., Sato, K., Takeda, K. and Kawasaki, S. (2003) Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theoretical and Applied Genetics*. 107:806–813
- Huang, X., Paulo, M., Boer, M., Effgen, S., Keizer, P. and Koornneef, M. (2011). Analysis of natural allelic variation in *Arabidopsis* using a multiparent recombinant inbred line population. *PNAS*. 108(11):4488–4493.
- Hyten, D. L., Choi, I.-Y., Song, Q., Specht, J. E., Carter, T. E., Shoemaker, R. C., Hwang, E.-Y., et al. (2010a). A High Density Integrated Genetic Linkage Map of Soybean and the Development of a 1536 Universal Soy Linkage Panel for Quantitative Trait Locus Mapping. *Crop Science*. 50(3):960-968.
- Hyten, D. L., Cannon, S. B., Song, Q., Weeks, N., Fickus, E. W., Shoemaker, R. C., Specht, J. E., et al. (2010b). High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence. *BMC genomics*. 11:38.

- Hyten, D. L., Song, Q., Fickus, E. W., Quigley, C. V., Lim, J.-S., Choi, I.-Y., Hwang, E.-Y., et al. (2010c). High-throughput SNP discovery and assay development in common bean. *BMC genomics*. 11:475.
- Ingvarsson, P. K. and Street, N. R. (2011). Association genetics of complex traits in plants. *The New phytologist*. 189(4):909–22.
- Iwata, H. and Jannink, J.-L. (2011). Accuracy of Genomic Selection Prediction in Barley Breeding Programs: A Simulation Study Based On the Real Single Nucleotide Polymorphism Data of Barley Breeding Lines. *Crop Science*. 51(5):1915.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D. and Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research*, 29(4), E25.
- Jannink, J. L. and Walsh, J. B. (2002) Association mapping in plant populations, pp. 59–68 in *Quantitative Genetics Genomics and Plant Breeding*, edited by M.S. Kang. CABI, Wallingford, UK
- Jorde, L.B. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Research*. 10: 1435-1444.
- Kang, H. M., Zaitlen, N. a, Wade, C. M., Kirby, A., Heckerman, D., Daly, M. J. and Eskin, E. (2008). Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics*. 178(3):1709–23.
- Kearsey, M.J. and Farquhar, A.G.L. (1998) QTL analysis; where are we now? *Heredity*. 80(2):137-142
- Khush, G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature reviews. Genetics*. 2(10):815–22.
- Kim, S. Y., Lohmueller, K. E., Albrechtsen, A., Li, Y., Korneliussen, T., Tian, G., Grarup, N., et al. (2011). Estimation of allele frequency and association mapping using next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics*. 12(1):231.
- Kirigwi, F. M., Ginkel, M., Brown-Guedira, G., Gill, B. S., Paulsen, G. M. and Fritz, a. K. (2007). Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Molecular Breeding*. 20(4):401–413.

- Knierim, E., Lucke, B., Schwarz, J. M., Schuelke, M. and Seelow, D. (2011). Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PloS one*. 6(11):e28240.
- Koboldt, D.C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D.E., McLellan, M.D., Mardis, E.R., Weinstock, G.M., Wilson, R.K. and Ding, L. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* (Oxford, England). 25 (17):2283-2285
- Koebner, R. M. D. and Summers, R. W. (2003). 21st Century Wheat Breeding: Plot Selection or Plate Detection? *Trends in biotechnology*. 21(2):59–63.
- Lafever, H.N. and Patterson, F.L. (1965) Tests for Association of Genetic Factors in a Nullisomic Line of *Avena sativa*. *Crop Science*. 5(6):509-510.
- Lande, R. and Thompson, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*. 124(3):743–56. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Verified: 5 Nov 2012].
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822):860-921.
- Legarra, A., Robert-Granié, C., Manfredi, E. and Elsen, J.M. (2008). Performance of genomic selection in mice. *Genetics*. 180(1):611–8.
- Leiser, W. L., Rattunde, H. F., Piepho, H.-P. and Parzies, H. K. (2012). Getting the Most Out of Sorghum Low-Input Field Trials in West Africa Using Spatial Adjustment. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 198(5):349–359.
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G. and Webb, W. W. (2003) Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations. *Science*. 299 (5607):682-686.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics*. 25:2078-2079.

- Li, H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 25:1754-60.
- Lu, X., Wei, S., Zhang, Y. and Lu, H. (2011). Epistatic Association Mapping in Homozygous Crop Cultivars. *PloS one*. 6(3):e17773.
- Mackay, T. F. C., Stone, E. a and Ayroles, J. F. (2009). The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature reviews. Genetics*. 10(8):565–77.
- Manifesto, M. M., Schlatter, A. R., Hopp, H. E., Sua, E. Y. and Dubcovsky, J. (2000). Quantitative Evaluation of Genetic Diversity in Wheat Germplasm. *Crop Science*. 4:682–690.
- Martin, T. J. (1990) Outcrossing in twelve hard red winter wheat cultivars. *Crop Science* 30(1):59–62
- McFadden, E. S. and Sears, E. R. (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity*. 37:81–89.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko., A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M. and DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*. 20:1297-303.
- McKernan, K. J., Peckham, H. E., Costa, G. L., McLaughlin, S. F., Fu, Y., Tsung, E. F., Clouser, C. R., et al. (2009). Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome research*. 19(9):1527–41.
- McNeish, R. S. (1992). *The Origins of Agriculture and Settle Life*. Univesity of Oklahoma. Press, Norman and London.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics*. 11(1):31-46.
- Meuwissen, T. H., Hayes, B. J. and Goddard, M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 157(4):1819-29.

- Müller, B. U., Schützenmeister, A. and Piepho, H.-P. (2010). Arrangement of check plots in augmented block designs when spatial analysis is used. *Plant Breeding*. 129(6):581–589.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E. and Buckler, E. S. (2009). Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant cell*. 21(8):2194–202.
- Nakaya, A. and Isobe, S. N. (2012). Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Annals of botany*. Disponible en www.aob.oxfordjournals.org (verificado en 22 Oct. 2012)
- Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P. and Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical chemistry*. 83(12):4327–4341.
- Nielsen, R., Paul, J. S., Albrechtsen, A. and Song, Y. S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature reviews. Genetics*. 12(6):443-51.
- Ordas, B., Malvar, R. a, Santiago, R. and Butron, A. (2010). QTL mapping for Mediterranean corn borer resistance in European flint germplasm using recombinant inbred lines. *BMC genomics*. 11:174.
- Prakash, C. S. (2001). The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution. *Plant physiology*. 126(1):8–15.
- Papadakis, J. S. (1937). Methode statistique pour des experiences sur champ. *Bulletin de l'Institut d'Amelioration des Plantes a' Salonique*. 23.
- Paradis, E., Claude, J. and Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20:289-290.
- Parisieux B. and Bernardo R. (2004) In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 109:508-514
- Paterson, A. H., Lander E. S., Hewitt J. D., Peterson S., Lincoln S. E. and Tanksley S. D., (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors, using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. 335:721-726.

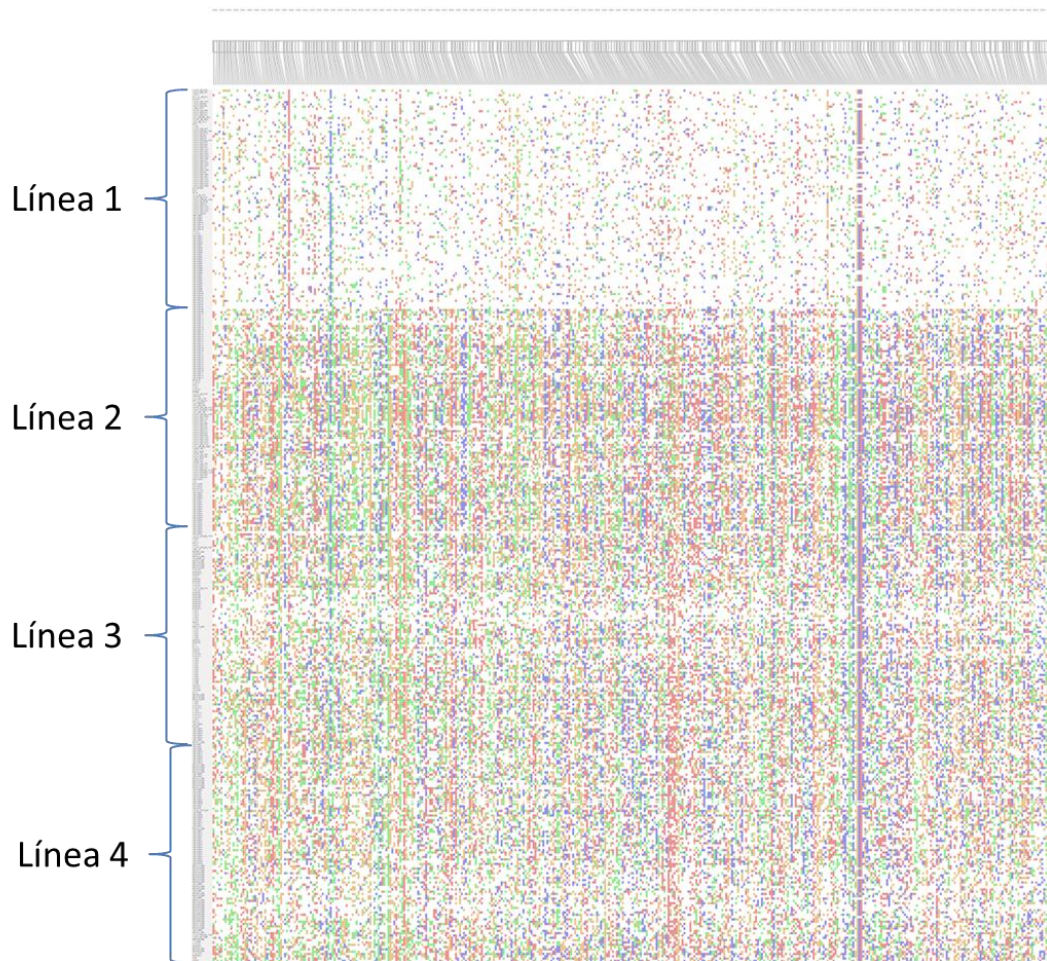
- Peiris, T. U. S., Samita, S. and Veronica, W. H. D. (2008). Accounting for Spatial Variability in Field Experiments on Tea. *Experimental Agriculture*. 44(04):547.
- Peterson, R.K.D. and Shama, L.M. (2005). A Comparative Risk Assessment of Genetically Engineered, Mutagenic and Conventional Wheat Production Systems. *Biomedical and Life Sciences*. 14(6):859-875.
- Piepho, H. P. and Williams, E. R. (2010). Linear variance models for plant breeding trials. *Plant Breeding*. 129(1):1–8.
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E. and Jannink, J.-L. (2012a). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PloS one*. 7(2):e32253.
- Poland, J.A. and Rife, T.W. (2012b). Genotyping by sequencing for plant breeding. *The Plant Genome*. Accepted
- Poland, J.A., Endelman, J., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S., Manes, Y., Dreisigacker, S., Crossa, J., Sanchez-Villeda, H., Sorrells, M. and Jannink, J.L. (2012c). Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. (In Press)
- Ratan, A., Zhang, Y., Hayes, V. M., Schuster, S. C. and Miller, W. (2010). Calling SNPs without a reference sequence. *BMC bioinformatics*. 11:130.
- Resende, M. F. R., Muñoz, P., Acosta, J. J., Peter, G. F., Davis, J. M., Grattapaglia, D., Resende, M. D. V., et al. (2012). Accelerating the domestication of trees using genomic selection: accuracy of prediction models across ages and environments. *The New phytologist*. 193(3):617–24.
- Rieseberg, L. H. and Carney, S. E. (1998). Plant hybridization. *New Phytology*, 140:599–624.
- Robertson, A. (1967). The nature of quantitative genetic variation. In *Heritage from Mendel* (ed. R. A. Brink), pp. 265-280. Madison: University of Wisconsin Press.
- Sarkar P and Stebbins GL (1956) Morphological evidence concerning the B genome in wheat. *Am J Bot* 43(4), 297–304.

- Sanger, F. and Nicklen, S. (1977). DNA sequencing with chain-terminating. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74(12), 5463-5467.
- Schnurbusch, T.H., Huang, C., Collins N.C., Sutton T., John U., Roy S., Paltridge N., Tester M., Paltridge P. and Fincher G.B. (2007) Prospects for developing GM varieties of wheat and barley with enhanced tolerance to abiotic stress. *Agricultural Science*. 21:4-10
- Schwender, H., Li, Q., Neumann C. and Ruczinski, I. (2012) trio: trio package without Fortran code. R package version 1.7.0. <http://CRAN.R-project.org/package=trio>
- Shin, J. H., Blay, S., McNeney, B. and Graham. (2006) LDheatmap: An R Function for Graphical Display of Pairwise Linkage Disequilibria Between Single Nucleotide Polymorphisms. *J Stat Soft*. 16:Code Snippet 36
- Smith, L.I. (2002) A tutorial on Principal Components Analysis. http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf
- Somers D.J., Kirkpatrick R., Moniwa M., Walsh A. (2003) Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*. 49: 431–437.
- Sommers D.J., Banks T., Depauw R, Fox S., Clarke J., Pozniak C. and McCartney C. (2007) Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome*. 50(6):557-567.
- Sorrells M.E. (1998). Marker Assisted Selection: Is it Practical ?. In: International Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. Eds: Dr. Mohan Kolhi and INIA La Estanzuela
- Stuber, C.W., Lincoln, S.E., Wolff, D.W., Helentjaris, T. and Lander, E. S. (1992). Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*. 132(3):823–39.
- Stuber, C.W., Polacco, M. and Senior M.L. (1999) Synergy of Empirical Breeding, Marker-Assisted Selection and Genomics to Increase Crop Yield Potential. *Crop Science*. 39(6):1571-1583.

- Tanksley, S.D. and J.C. Nelson (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 92:191-203.
- Technow, F., (2011) Rpackage mvngGrAd: moving grid adjustment in plant breeding field trials. R package version 0.1.2.
- Trebbi, D, Maccaferri, M., de Heer P., Sørensen A., Giuliani S., Salvi S., Sanguineti M. C., Massi A., et al. (2011) High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*. 123(4):555-569.
- VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of dairy science*. 91(11):4414–23.
- Varala, K., Swaminathan, K., Li, Y. and Hudson, M. E. (2011). Rapid genotyping of soybean cultivars using high throughput sequencing. *PloS one*, 6(9), e24811.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol*. 23(1):48–55
- Vaughan, D. a, Balázs, E. and Heslop-Harrison, J. S. (2007). From crop domestication to super-domestication. *Annals of botany*. 100(5):893–901.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304-51.
- Verhoeven, K. J. F., Casella, G. and McIntyre, L. M. (2010). Epistasis: obstacle or advantage for mapping complex traits? *PloS one*. 5(8):e12264.
- Von Zitzewitz, J., Cuesta-Marcos, A., Condon, F., Castro, A. J., Chao, S., Corey, A., Filichkin, T., et al. (2011). The Genetics of Winterhardiness in Barley: Perspectives from Genome-Wide Association Mapping. *The Plant Genome Journal*. 4(1):76.
- Wall, J. D. and Pritchard, J. K. (2003). Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews. Genetics*. 4(8):587–97.
- Wray, N. and Visscher, P. (2008) Estimating trait heritability. *Nature Education*. 1:1-16

- Wu, X., Ren, C., Joshi, T., Vuong, T., Xu, D. and Nguyen, H. T. (2010). SNP discovery by high-throughput sequencing in soybean. *BMC genomics*, 11:469.
- Wu, X., Chang, X. and Jing, R. (2012). Genetic insight into yield-associated traits of wheat grown in multiple rain-fed environments. *PloS one*. 7(2):e31249.
- Xie, C. X., Warburton, M., Li, M. S., Li, X. H., Xiao, M. J., Hao, Z. F., Zhao, Q. and Zhang, S. H. (2008). An analysis of population structure and linkage disequilibrium using multilocus data in 187 maize inbred lines. *Molecular Breeding*. 21: 407–418
- Yang, J., Benyamin, B., McEvoy B. P., Gordon, S., Henders, A.K., Nyholt, D. R., Madden, P. A., Heath, A. C., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Goddard, M. E. and Visscher, P. M. (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Gen*. 42: 565–569.
- You, F. M., Huo, N., Deal, K. R., Gu, Y. Q., Luo, M.-C., McGuire, P. E., Dvorák, J., et al. (2011). Annotation-based genome-wide SNP discovery in the large and complex *Aegilops tauschii* genome using next-generation sequencing without a reference genome sequence. *BMC genomics*. 12(1):59.
- Zamir, D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature reviews. Genetics*. 2(12):983–9.
- Zhang, L., Liu, D., Guo, X., Yang, W., Sun, J., Wang, D., Sourdille, P., et al. (2011). Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers. *BMC genetics*. 12(1):42.

7. ANEXOS



Anexo 1. Para cada muestra (filas) se indica el alelo presente en el SNP (columnas) con un código de colores para cada base nucleotídica. Las muestras se encuentran ordenadas según las líneas del secuenciador.

Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 4	Línea 1	Línea 2	Línea 3	Línea 4
2 :109985	2 :100702	2 :1038585	2 :1079689	26 : 22397	26 : 21004	26 : 21694	26 : 21843
3 : 351294	3 : 453369	3 : 442689	3 : 456116	27 : 20788	27 : 19632	27 : 20298	27 : 20438
4 : 184469	4 : 294158	4 : 288640	4 : 292512	28 : 19163	28 : 18718	28 : 19124	28 : 19397
5 : 124432	5 : 218001	5 : 217964	5 : 217847	29 : 17732	29 : 17671	29 : 18203	29 : 18232
6 : 95084	6 : 172267	6 : 172446	6 : 171944	30 : 16747	30 : 16775	30 : 17211	30 : 17240
7 : 78079	7 : 139382	7 : 140458	7 : 140488	31 : 15288	31 : 15948	31 : 16417	31 : 16399
8 : 66654	8 : 115244	8 : 116618	8 : 116415	32 : 14314	32 : 15137	32 : 15232	32 : 15606
9 : 60191	9 : 97530	9 : 99394	9 : 99032	33 : 13469	33 : 14460	33 : 14752	33 : 14675
10 : 54078	10 : 84341	10 : 84793	10 : 85641	34 : 12711	34 : 13932	34 : 14072	34 : 14007
11 : 49764	11 : 72861	11 : 74595	11 : 74674	35 : 11901	35 : 13009	35 : 13406	35 : 13181
12 : 46565	12 : 64342	12 : 66013	12 : 66644	36 : 11669	36 : 12566	36 : 13015	36 : 12776
13 : 44587	13 : 58084	13 : 58820	13 : 59949	37 : 11259	37 : 11949	37 : 12339	37 : 12245
14 : 41908	14 : 52316	14 : 53409	14 : 54085	38 : 10651	38 : 11366	38 : 11688	38 : 11679
15 : 39938	15 : 47713	15 : 48825	15 : 48713	39 : 10259	39 : 10966	39 : 11234	39 : 11017
16 : 38361	16 : 43515	16 : 44674	16 : 44676	40 : 9840	40 : 10761	40 : 10856	40 : 10537
17 : 37154	17 : 39788	17 : 40747	17 : 41119	41 : 9447	41 : 9975	41 : 10559	41 : 10117
18 : 35176	18 : 36656	18 : 37552	18 : 37733	42 : 9262	42 : 9628	42 : 10018	42 : 9807
19 : 33483	19 : 33668	19 : 34751	19 : 35057	43 : 8910	43 : 9310	43 : 9538	43 : 9257
20 : 32606	20 : 31225	20 : 32301	20 : 32696	44 : 8780	44 : 8876	44 : 9234	44 : 9053
21 : 31142	21 : 29197	21 : 30089	21 : 30510	45 : 8384	45 : 8648	45 : 9006	45 : 8657
22 : 29167	22 : 27373	22 : 28116	22 : 28028	46 : 8095	46 : 8142	46 : 8555	46 : 8417
23 : 27723	23 : 24966	23 : 26165	23 : 26236	47 : 7824	47 : 7993	47 : 8272	47 : 8108
24 : 25783	24 : 23642	24 : 24344	24 : 24375	48 : 7706	48 : 7768	48 : 7959	48 : 7782
25 : 24057	25 : 22479	25 : 23213	25 : 23168	49 : 7388	49 : 7427	49 : 7736	49 : 7514
				50 : 7209	50 : 7282	50 : 7399	50 : 7172
				(Other): 407559	(Other): 439272	(Other): 450504	(Other): 435423

Anexo 2. Se muestra la profundidad de la secuencias en cada una de la líneas del secuenciador. Se muestra hasta profundidades de 50, luego se juntan lo valores para profundidades más altas.

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL PROYECTO

**“Estudio de la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa*
y del gen *Dhn10* en dos variedades de papa (*Solanum
tuberosum L.*) sometidas a estrés hídrico”**

Previo a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ROSANA BELÉN VELASCO ENRÍQUEZ

SANGOLQUÍ, Noviembre del 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Srta. Rosana Belén Velasco Enríquez

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Grace Tatiana Páez Barrera

Lugar y fecha: Sangolquí, Noviembre 2012

CERTIFICACIÓN

Dra. Karina Proaño Tuma

Ing. Pedro Romero Saker

Certifican:

Que el trabajo titulado: “**Estudio de la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* y del gen *Dhn10* en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) sometidas a estrés hídrico**”, realizado por **Rosana Belén Velasco Enríquez**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que el presente trabajo es parte de las investigaciones realizadas por el Laboratorio de Mejoramiento Genético Hortícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Chile, se deja en libertad de la autora y del proyecto FONTAGRO AT/OC-11943-RG: Adaptación de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático (2010-2013) su publicación como tesis de pregrado. A sí mismo, la propiedad intelectual de los resultados es de INIA-La Platina y su publicación en otro medio necesita de permiso y coautoría de los investigadores involucrados con el proyecto.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a **Rosana Belén Velasco Enríquez** que lo entregue a la **Ing. Grace Tatiana Páez Barrera**, en su calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, de del 2012

Dra. Karina Proaño Tuma
DIRECTORA

Ing. Pedro Romero Saker
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Rosana Belén Velasco Enríquez.

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Estudio de la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* y del gen *Dhn10* en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum L.*) sometidas a estrés hídrico**” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

Srta. Rosana Belén Velasco Enríquez

DEDICATORIA

A mis padres *Rosana* y *Gonzalo*

Por su confianza, amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos *Pancho* y *Gaby*

Por ser mis compañeros de vida y porque más que hermanos han sido amigos.

A mis sobrinos *Emelie* y *Sebas*

Por darme la alegría de ser tía y dar alegría al hogar.

A las personas que de una u otra forma, supieron alentarme a cumplir con este objetivo.

No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños...

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, porque estando cerca o lejos me han apoyado, brindándome su confianza y amor.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA de Chile, FONTAGRO y a la Dra. María Teresa Pino Quezada, por confiar en mis capacidades, dándome la oportunidad de formar parte de su prestigioso grupo de investigación.

A *Betty, Eduardo, María Agustina* y a *Rodrigo* por acogerme en su hogar, haciéndome sentir querida y valorada. Gracias por sus consejos y apoyo durante mi estadía en Chile.

A mi querido equipo de trabajo en INIA, *Olga, Andrea, Paulina, Maritza, Carolina*, por sus enseñanzas, por las risas, las tardes de cine y galletas; son personas excepcionales.

A *Darío*, por ser mi gran amigo y estar siempre a mi lado.

A *Sebastián*, por la amistad y el cariño.

A mis compatriotas: *Jacque, Diego O* y *Diego A*, quienes supieron guiarme durante mi estadía en Chile.

Al grupo “Sábado Gigante Internacional”, por los viajes no planificados, los copetes y las risas. Gracias: *Jadyra* (Ecuador), *Marcelo* y *Wilma* (Bolivia), *Leonardo* (Colombia) y *José* (Chile).

A quienes han estado a mi lado durante toda mi carrera universitaria, dándome su cariño y apoyo. Gracias *Yrina, Carolina, Diana* y *Santiago*, ha sido un honor compartir con ustedes estos cinco años de carrera y se vienen más.

A mi directora *Karina Proaño* y mi codirector *Pedro Romero* por guiarme en este trabajo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pág
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	II
CERTIFICACIÓN	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XX
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Marco teórico	4
1.4.1 La papa	4
1.4.1.1 Taxonomía, morfología y distribución	4

1.4.1.2	Importancia de la papa.....	6
1.4.2	El déficit hídrico en plantas.....	7
1.4.2.1	Efectos del déficit hídrico sobre cultivos de papa.....	7
1.4.3	Respuesta fisiológica de las plantas frente al déficit hídrico.....	9
1.4.4	Respuesta molecular de las plantas frente al déficit hídrico.....	11
1.4.4.1	Biosíntesis del ABA: Papel del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i>	15
1.4.4.2	Las dehidrininas: Papel del gen <i>Dhn10</i>	19
1.5	Hipótesis	22
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		23
2.1	Participantes	23
2.2	Zona de estudio	23
2.2.1	Fase de campo.....	23
2.2.2	Fase de laboratorio.....	24
2.3	Tiempo de investigación	24
2.4	Diseño estadístico.....	24
2.5	Material vegetal.....	26
2.5.1	Variedades	26
2.5.2	Condiciones del experimento	28
2.5.3	Tratamientos hídricos	28
2.6	Aislamiento y análisis de las secuencias de los genes <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> y <i>Dhn10</i>	30
2.6.1	Extracción y cuantificación de ADN genómico	30

2.6.2	Diseño de primes para amplificación de ADN genómico.....	31
2.6.3	Amplificación de fragmentos a partir de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	32
2.6.4	Electroforesis en geles de agarosa	33
2.6.5	Purificación de bandas de ADN desde geles de agarosa.....	34
2.6.6	Ligación de fragmentos de ADN.....	35
2.6.7	Transformación de bacterias <i>Escherichia coli</i> (Top 10) quimiocompetentes	37
2.6.8	Evaluación de clones <i>E. coli</i> Top 10 transformados.....	38
2.6.8.1	PCR de colonias	38
2.6.8.2	Minipreparación para purificación de ADN plasmídico.....	38
2.6.9	Ensayo enzimático	39
2.6.10	Secuenciación de los genes.....	40
2.6.11	Análisis de secuencias	41
2.7	Análisis de la expresión génica.....	42
2.7.1	Extracción de ARN	42
2.7.2	Síntesis de cDNA	43
2.7.3	Análisis por RT-PCR	44
2.7.4	Estimación de expresión relativa a partir de análisis densitométrico de geles de agarosa	45
2.7.5	Análisis de datos	46
CAPITULO 3: RESULTADOS.....		47
3.1	Verificación de genes insertados: digestión enzimática parcial	47

3.2	Análisis filogenético de los genes <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> y <i>Dhn10</i>	50
3.2.1	Gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i>	50
3.2.2	Gen <i>Dhn10</i>	53
3.3	Análisis de la expresión de los genes <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> y <i>Dhn10</i>	56
3.3.1	Gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i>	56
3.3.2	Gen <i>Dhn10</i>	60
	CAPITULO 4: DISCUSIÓN.....	65
	CAPITULO 5: CONCLUSIONES.....	70
	CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	73
	ANEXOS	84
	RESULTADOS	84
	ESTADÍSTICA	103

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Contenido</u>	<u>Pág</u>
Figura 1. Estados fenológicos de la papa: I.	9
Figura 2. Esquema de la respuesta de las plantas frente al déficit hídrico..	12
Figura 3. Ruta de transducción de señal del estrés osmótico en células vegetales	13
Figura 4. Biosíntesis del ABA.....	17
Figura 5. Últimos pasos de la biosíntesis del ABA.	19
Figura 6. Disposición de las macetas en invernadero	24
Figura 7. Tubérculos de la variedad de papa Karú (INIA)	27
Figura 8. Tubérculos de la variedad de papa Yagana (INIA)	28
Figura 9. Distribución de los tratamientos en el invernadero.....	29
Figura 10. Mapa del Vector pGEM®-T Easy Vector System.....	36
Figura 11. Digestión enzimática parcial con enzima Eco RI.....	48
Figura 12. Productos de digestión parcial de la enzima Sal I.....	49
Figura 13. Relación filogenética de la proteína aldehído abscísico oxidasa	51
Figura 14. Alineamiento de secuencias obtenidas en las variedades Karú y Yagana	53
Figura 15. Relación filogenética de la proteína DHN1	54
Figura 16. Alineamiento de secuencias obtenidas tras secuenciación	55
Figura 17. Análisis de la expresión relativa del gen <i>St aldehído abscísico</i>	

	<i>oxidasa en Solanum tuberosum cv. Karú.....</i>	57
Figura 18.	Análisis de la expresión relativa del gen <i>St aldehído</i>	
	<i>abscísico oxidasa en Solanum tuberosum cv. Yagana.</i>	59
Figura 19.	Análisis de la expresión relativa del gen <i>Dhn10 en Solanum</i>	
	<i>tuberosum cv. Karú.....</i>	61
Figura 20.	Análisis de la expresión relativa del gen <i>Dhn10 en Solanum</i>	
	<i>tuberosum cv. Yagana.</i>	63

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pág
Tabla 1. Detalle de las variables propuestas en el diseño experimental.	26
Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizados para la amplificación de fragmentos, a partir de la PCR.....	33
Tabla 3. Protocolo para digestión enzimática de los productos de minipreparación para cada gen.....	39
Tabla 4. Muestras que se enviaron a secuenciar según los requerimientos de la empresa MacroGen Inc.	41
Tabla 5. Concentración y volumen de reactivos utilizados para tratamiento de RNA con DNAsa.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido	Pág
Anexo 1. Ubicación del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) .	84
Anexo 2 Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> en la variedad Karú.	85
Anexo 3 Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> en la variedad Yagana	85
Anexo 4 Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del gen <i>Dhn10</i> en la variedad Karú	86
Anexo 5 Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del gen <i>Dhn10</i> en la variedad Yagana	86
Anexo 6 Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas DHN10.	87
Anexo 7 Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas AAO (Aldehído abscísico oxidasa).	87
Anexo 8 Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> aislado de Karú	88
Anexo 9 Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> aislado de Yagana	89
Anexo 10 Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen <i>Dhn10</i> aislado de Karú	90
Anexo 11 Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen <i>Dhn10</i> aislado de Yagana	91

Anexo 12 Cromatograma de secuenciación del gen <i>St aldehído</i> <i>abscísico oxidasa</i> en la variedad Karú.....	92
Anexo 13 Cromatograma de secuenciación del gen <i>St aldehído</i> <i>abscísico oxidasa</i> en la variedad Yagana	94
Anexo 14 Cromatograma de secuenciación del gen <i>Dhn10</i> en Karú	96
Anexo 15 Cromatograma de secuenciación del gen <i>Dhn10</i> en Yagana	98
Anexo 16 Esquema de manejo del programa <i>Image J</i> versión 1.45 software para estandarización del número de ciclos.....	100
Anexo 17 Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i>	100
Anexo 18 Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen <i>Dhn10</i>	101
Anexo 19 Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen de control interno <i>60S</i>	101
Anexo 20 Análisis de la expresión génica <i>in silico</i>	102
Anexo 21 Análisis de Varianza (ANOVA).....	103
Anexo 22 ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> en la variedad Karú.....	106
Anexo 23 ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen <i>St aldehído abscísico oxidasa</i> en la variedad Yagana.	106
Anexo 24 ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen <i>Dhn10</i> en la variedad Karú.....	107

Anexo 25 ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen

Dhn10 en la variedad Yagana..... 107

ABREVIATURAS

AAO	aldehído abscísico oxidasa
ABA	Ácido abscísico
ABF/ AREB	factor de union a ABA/ Proteína de unión sensible a ABA
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
CRT/DRE	(C-repeat/elemento de respuesta a sequía) (siglas en inglés)
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio (sigla en inglés)
DEPC	dietilpirocarbonato
<i>Dhn10</i>	Dehidrina 10
dNTP's	desoxinucleótido trifosfato (sigla en inglés)
DREB/CBF	proteína de unión DREB/factor de unión C-repetido
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LEA	abundantes en embriogénesis tardía (sigla en inglés),
MgCl₂	cloruro de magnesio
MoCo	cofactor molibdeno (MoCo)
mRNA	ARN mensajero
MYB	myeloblastosis
MYC	myelocytomatosis
NaCl	cloruro de sodio
NCED	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
NXS	neoxantina sintasa
ROS	especies reactivas de oxígeno

RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (sigla en inglés)
SDR	dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (sigla en inglés)
Tris-HCl	tris (hidroximetil) aminometano en su forma ácida
ZEP	zeaxantina epoxidasa

RESUMEN

El déficit hídrico o sequía constituye un importante limitante ambiental sobre la producción de papa, afectando de manera directa la tuberización y calidad industrial de éste tubérculo. Ante la creciente influencia del cambio climático sobre los cultivos, es necesario identificar materiales genéticos que otorguen a las plantas tolerancia a la sequía. Con el objetivo de desarrollar a futuro material genético tolerante, se realizaron estudios de identificación, clonación y expresión semicuantitativa por RT-PCR del gen *St aldehído abscísico oxidasa*, involucrado en el paso final de la biosíntesis del ABA y del gen *Dhn10*, que codifica para la dehidrina DHN10. Tanto el ABA como las dehidrinas desempeñan papeles fundamentales en la protección de la planta frente al déficit hídrico. Luego de haber identificado dichos genes, fue posible analizar su expresión en hojas de plantas de *Solanum tuberosum* de las variedades cultivables de Karú (INIA) y Yagana (INIA), cuyo crecimiento se llevó a cabo en un invernadero del Centro Regional de Investigación (CRI) INIA- “La Platina”, bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. Mediante un diseño experimental de bloques completamente al azar (DBCA) se evaluó el efecto de los tratamientos sobre dichas plantas, con cuatro repeticiones por tratamiento de riego (100, 50 y 25 %). La evaluación de los tres tratamientos se realizó en los días 0, 1, 7 y 14. Se reconocieron diferencias significativas en los niveles de expresión génica relativa de ambos genes únicamente en la variedad Karú. Estos resultados sugieren mayor índice de tolerancia en la variedad Karú frente a la variedad Yagana.

ABSTRACT

Water stress or also known as drought is a major environmental constraint on potato production, affecting directly the tuberization and industrial quality of potatoes. With the growing influence of climate change on crops, it is necessary to identify genetic materials that give the plant drought tolerance. With the aim of developing future tolerant genetic material, studies of identification, cloning and expression by semiquantitative RT-PCR of the gene *St abscisic aldehyde oxidase* involved in the final step and ABA biosynthesis and the gene *Dhn10*, which encodes the dehydrin DHN10. Both ABA as dehydrins play key roles in plant's protection against water deficit. After identifying these genes, it was possible to analyze their expression in leaves of *Solanum tuberosum* arable varieties, Karu (INIA) and Yagana (INIA), whose growth was conducted in a greenhouse belonging to The Regional Research Center (CRI) INIA-"La Platina", under controlled temperature and humidity conditions. The effect of treatments on these plants was analyzed by using an experimental design of randomized complete block (DBCA), with four replicates per irrigation treatment (100, 50 and 25%). The evaluation of these treatments was performed on the days 0, 1, 7 and 14. Significant differences were recognized in the levels of relative gene expression in both genes only in the Karu variety. These results suggest greater tolerance in Karu variety against Yagana variety.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La papa (*Solanum tuberosum*) es el principal alimento no cereal en el mundo (Park *et al.*, 2009a) y es considerado el cuarto cultivo alimenticio, luego del trigo, el arroz y el maíz. Actualmente representa el 50% de toda la producción mundial de raíces y tubérculos (ODEPA, 2010).

La producción de la papa ha aumentado considerablemente en los últimos años; para el año 2007 se registró una producción mundial de 325 millones de toneladas (FAO, 2010). El principal productor es China, con 71 millones de toneladas, lo que representa más de un 20% de la producción mundial.

Chile es el sexto productor de papa de América Latina. En octubre del 2011 el INE (Instituto Nacional de Estadísticas), señaló que la superficie sembrada con papa fue de 41.534 hectáreas, lo que constituye una disminución de 22,6% respecto al 2010. Si bien la papa se puede cultivar en todo Chile, su producción se concentra en las provincias que están entre Coquimbo, al norte, y Chiloé (incluida la isla de Chiloé, donde ya se cultivaba en la época precolombina) (FAO, 2008).

Ecuador es el décimo productor de papa de América Latina. La región andina del Ecuador está en el territorio de la diversidad genética de la papa, y en el centro de Ecuador, en particular, se encuentra una gran diversidad de papas silvestres. En los últimos 10 años, el total de la producción ha caído de más de 450.000 toneladas a 350.000 toneladas, mientras que la superficie cultivada se ha reducido de 65.000 a unas 50.000 hectáreas (FAO, 2008).

A esta baja de producción en países como Chile y Ecuador, se suma una disminución en los rendimientos, causada por el déficit hídrico. Dicha condición de estrés puede llegar a disminuir el número y el tamaño de los tubérculos, lo cual conduce a pérdidas económicas importantes entre los agricultores, quienes tienden a alzar precios de su producción para compensar tales pérdidas, tornándose en un problema tanto para productores y consumidores.

El déficit hídrico y otro tipo de estreses abióticos, son consecuencia del cambio climático bajo el cual se encuentra el planeta, debido al calentamiento global que se da por el incremento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera según informes del Panel Gubernamental de Cambio Climático. Se proyecta que el calentamiento global tendrá impactos significativos que afectaran a la agricultura, la temperatura, dióxido de carbono, deshielos, precipitación y la interacción entre estos elementos (IPCC, 2007).

1.2 Justificación del problema

La papa cultivable es extremadamente sensible a bajas temperaturas, déficit hídrico, exceso de sales, entre otros; lo cual afecta negativamente su rendimiento. El estrés hídrico (sequía) afecta la tuberización o llenado de tubérculos y la calidad industrial (Hijmans, 2003). Teniendo en cuenta esto, uno de los nuevos desafíos que actualmente enfrenta la investigación agrícola, es crear variedades que logren altos rendimientos bajo circunstancias adversas de temperatura y baja disponibilidad de agua.

Es importante saber que no todas las variedades de papa presentan los mismos índices de tolerancia y que ésta se caracteriza por tener una alta variabilidad genética, presentando caracteres altamente deseables para su introgresión en cultivares comerciales (Mathias *et al.*, 2007).

El éxito en la obtención de variedades mejor adaptadas depende de la recolección, preservación y disseminación de material genético relevante (CGIAR, 2007). Las especies de papa silvestre desempeñan un papel importante en la obtención de variedades tolerantes al estrés abiótico. Su gran variabilidad genética hace de ellas importantes recursos para lograr las características deseadas.

Es por ello que el consorcio INIA Chile, INIA Uruguay y CIP de Perú busca aumentar la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo, a

través de la selección y desarrollo de genotipos con mayor tolerancia a la sequía y a altas temperaturas.

Fundamentalmente está orientado a determinar el potencial impacto del cambio climático en la región y en estos cultivos, así como, colocar a disposición tanto de programas de mejoramiento locales como de productores, genotipos y genes tolerantes a sequía y altas temperaturas que permitan obtener rendimientos competitivos frente al nuevo escenario climático. Particularmente, se busca crear una instancia regional de trabajo y discusión en este tema.

La presente investigación busca poder determinar la expresión de genes que confieren tolerancia al déficit hídrico en las variedades Karú (INIA) y Yagana (INIA), que son variedades comerciales; teniendo como precedente de que en estudios anteriores la variedad Karú es la menos afectada por sequía *in vitro*, lo cual sugiere que es una posible candidata para tolerancia a sequía. De igual manera se estaría aportando con información clave a los programas de mejoramiento genético.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Estudiar la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* y del *Dhn10* en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) sometidas a estrés hídrico.

1.3.2 Objetivos específicos

- a. Realizar un estudio *in silico* para identificar a los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*.
- b. Amplificar y clonar las secuencias de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10* en las variedades Karú y Yagana.

- c. Evaluar la expresión de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10* en hojas de papas, sometidas a tres diferentes niveles de estrés hídrico.

1.4 Marco teórico

1.4.1 La papa

La papa es uno de los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial, debido a su alta productividad y su alto nivel de almidón, vitaminas y proteínas. Ocupa el cuarto puesto luego del trigo, arroz y maíz y representa el 50% de toda la producción mundial de raíces y tubérculos (ODEPA, 2010). Su centro de origen está ubicado en las tierras altas de los Andes localizadas entre el centro del Perú y el centro de Bolivia. Con el tiempo, el área de cultivo se extendió a varios países en América Latina y al resto del mundo. Fue introducida a Europa después del descubrimiento de América (Huamán *et al.* 1997).

1.4.1.1 Taxonomía, morfología y distribución

La papa pertenece a la familia de las solanáceas y actualmente es conocida bajo el nombre de *Solanum tuberosum* (Spooner y Salas, 2006; Andre *et al.*, 2007). La papa tiene varios niveles de ploidía, la gran mayoría (70%) son diploides ($(2n = 2x = 24)$), el resto de ellas son tetraploides ($2n = 6x = 72$) y un pequeño porcentaje corresponden a los triploides y pentaploides (Spooner *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2008).

La clasificación taxonómica de la papa cultivada es un tema controversial, esto se debe a que gran parte de sus especies se relacionan entre sí, diferentes autores han reconocido desde 1 hasta 20 especies (Huamán y Spooner, 2002), pero todas forman un mismo pool genético (Spooner *et al.*, 2005). Spooner *et al.*, (2008) clasificaron las papas nativas en cuatro especies: *Solanum ajanhuiri* (diploide), *Solanum juzepczukii* (triploide), y *Solanum curtilobum* (pentaploide) y

Solanum tuberosum, con dos grupos cultivados: Andígena (*Andigenum*) y Chilotanum; en el primero se incluyen todas las papas andinas, tanto diploides como tetraploides, que crecen a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta Argentina, y el segundo está conformado por las papas adaptadas a día largo, que crecen en las tierras bajas del Centro y Sur de Chile, incluyendo las Islas del Archipiélago de los Chonos (Rodríguez, 2009). Es por ello que aún no se han logrado determinar un número real de especies (Spooner y Salas, 2006).

La papa es una planta dicotiledónea, herbácea, gracias a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos, puede ser considerada como perenne potencial. La planta puede medir de 0,40 a 1,4 m de altura, con tallos de 5 a 19 mm de diámetro en la base, erectos, pubescentes o glabros, de color verde a púrpura (Huamán y Spooner, 2002). Posee unos tallos laterales, llamados estolones, que crecen horizontalmente debajo del suelo y que pueden desarrollar tubérculos por una agrandamiento de su extremo distal, o crecer verticalmente desarrollando follaje normal (Puentes, 2004).

Las hojas son alternas, las primeras tienen aspecto simple, después vienen las hojas compuestas imparipinadas con tres pares de folíolos laterales y un folíolo terminal (Ríos, 2007).

La flor corresponde a una inflorescencia cimosa, cuyas flores son bisexuales. Poseen las cuatro partes esenciales de una flor: cáliz, corola, estambre y pistilo. Los estambres son el órgano masculino llamado *androceo*, y el pistilo es el órgano femenino llamado *gineceo* (Herrera, 2005).

La planta de papa puede desarrollarse a partir de una semilla o de un tubérculo, cuando crece a partir de una semilla, forma una delicada raíz axonoforma con ramificaciones laterales. Cuando crece de tubérculos, forma raíces adventicias que se desarrollan en la base del tubérculo y las yemas horizontales se alargan dando origen a tallos en forma de estolones. El crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso y muy ramificado. El tubérculo, es un tallo subterráneo modificado, acortado, engrosado y provisto de yemas u ojos en las axilas de sus hojas escamosas los

ojos del tubérculo corresponden morfológicamente a los nudos de los tallos. En cada ojo existen normalmente tres yemas, aunque en ocasiones puede presentar más (Herrera, 2005).

El cultivo de papa se encuentra distribuido por toda América, desde sureste de Norteamérica, por toda Centroamérica y Sudamérica. Crece desde el nivel del mar hasta la cordillera, a 4500 m de altitud. La mayor variabilidad genética de las especies de papas, se concentra en el área de la meseta peruano-boliviana, y de las 183 especies de este género el 74,3% es diploide, el 3,8% es triploide, el 14,8% es tetraploide, el 1,6% es pentaploide y el 5,5% es hexaploide (Contreras, 2008).

1.4.1.2 Importancia de la papa

La papa ha sido utilizada como fuente de alimentación primaria o secundaria en países con malnutrición (Lutaladio y Castaldi, 2009). Una papa mediana contiene aproximadamente la mitad de los requerimientos de vitamina C de un adulto, contiene apenas un 5% de materia grasa del trigo y un cuarto de calorías del pan. Cocida tiene el doble de proteínas del maíz y cerca del doble de calcio, es una buena fuente de vitaminas B1, B3 y B6 y de minerales como potasio, fósforo y magnesio, además de folato, ácido pantoténico, rivo flavina y antioxidantes necesarios para la dieta (Burlingame *et al.*, 2009; CIP, 2010).

Para el año 2007 se registró una producción mundial de 325 millones de toneladas (FAO, 2010). En Chile, en el año 2010, fueron producidas cerca de 920.000 toneladas de papas (ODEPA, 2010). En Chile la producción de papa se realiza en todo el país y durante todo el año, debido a sus excelentes condiciones para el cultivo y diversidad climática (Fundación Chile, 2001). La mayor producción de papa se concentra entre las áreas de Coquimbo y Los Lagos y existen 156 variedades de papas registradas en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), de las cuales 31 de ellas se encuentran inscritas en el registro de variedades protegidas con derecho de propiedad intelectual

(Kalazich *et al.*, 2006). Las variedades de tubérculos más vendidas en Chile son Asterix (31,1%), seguida por la Desireé (27,3%) y la Karú (16,2%), además de las variedades Cardinal, Pukará, Rosara y Yagana (ODEPA, 2010).

Se cree que para el 2020, el cultivo de papa tendrá una tasa de crecimiento anual mayor que los principales cultivos alimenticios, en países desarrollados, convirtiéndolo en un cultivo clave para alimentar a un mundo en expansión y con gran necesidad de alimentos (Scott *et al.*, 2000).

1.4.2 El déficit hídrico en plantas

El déficit hídrico al igual que el exceso de agua, luz, salinidad, altas o bajas temperaturas, contaminación por metales pesados, entre otros; son factores abióticos que producen condiciones desfavorables para el desempeño de una función vital en las plantas, haciendo que estas se estresen (Gaspar *et al.*, 2002).

Debido al déficit hídrico, la demanda de la planta supera a la capacidad de suministro por las raíces. La falta de agua hace que las plantas presenten una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que le ayudan a tolerar en mayor o menor grado los trastornos que produce éste déficit (Moreno, 2009), pero se debe tomar en cuenta que si se exceden los límites de tolerancia pueden haber daños permanentes o incluso la muerte de la planta. El déficit hídrico es uno de los principales estreses abióticos que afectan el rendimiento de especies cultivadas (Acevedo *et al.*, 1998) y es el factor ambiental que más limita la producción agrícola a escala mundial (Corell, 2009).

1.4.2.1 Efectos del déficit hídrico sobre cultivos de papa

La papa cultivable (*S. tuberosum*) es un cultivo sensible a la sequía (Van Loon, 1981), el cual puede presentar rendimientos bajos y defectos fisiológicos en el

tubérculo cuando se encuentra en lugares donde existen bajos niveles de disponibilidad hídrica (Ekanayake, 1994). En relación a la etapa de crecimiento vegetativo, el estrés hídrico afecta directamente en número y tamaño de la hoja, la longitud de las raíces y la altura de la planta (Alsharari *et al.*, 2007; Hinojosa, 2009). En esta misma etapa, al presentarse un estrés de éste tipo, las plantas de papa tienden a producir tubérculos de menor tamaño, como consecuencia de la reducción del follaje, disminución de la tasa fotosintética por unidad foliar y acortamiento del periodo vegetativo (Van Loon, 1981).

Un sistema radicular poco profundo que no permite una extracción eficiente de agua, hace de la papa un cultivo altamente vulnerable a déficit; sus raíces pueden oscilar entre 50 y 80 cm (Ekanayake, 1994; Weisz *et al.*, 1994). Frente a la falta de agua, los estomas de las hojas de la papa se cierran rápidamente reduciendo la transpiración y la tasa fotosintética, aumenta la temperatura foliar, y se afecta el rendimiento (Ekanayake, 1994).

Los cultivos de papa responden de manera diferenciada a la sequía, dependiendo del estado fenológico en que se encuentre el cultivo. Los periodos de estolonización y, formación y desarrollo de tubérculos, son los más sensibles al déficit hídrico. Mientras que la fase inicial de desarrollo y la de maduración son menos sensibles a sequía (Peralta, 2006).

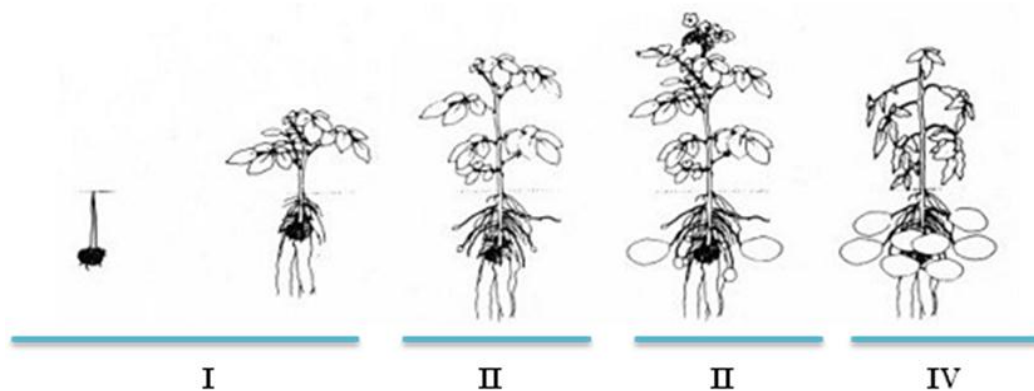


Figura 1. Estados fenológicos de la papa: I. Estado vegetativo: desde emergencia de brotes hasta la formación de las primeras 8 – 12 hojas; II. Iniciación de tuberización: comienzan a formarse los tubérculos en los extremos de los estolones, el follaje sigue desarrollándose; III. Crecimiento del tubérculo: gran parte de la energía de la planta suple el crecimiento del tubérculo; IV. Maduración: senectud del follaje, engrosamiento de la piel y el tubérculo alcanza su mayor contenido de materia seca.

1.4.3 Respuesta fisiológica de las plantas frente al déficit hídrico

Una de las primeras respuestas fisiológicas a la falta de agua es la reducción del crecimiento generalizado de la planta, debido a la inhibición de la expansión celular (Acevedo *et al.*, 1998). Esta disminución se debe a la disminución de presión de turgencia celular, que es la fuerza necesaria para la expansión celular (Hsiao *et al.*, 1976). La suspensión de riego reduce la expansión foliar, el crecimiento del tallo y de las raíces. Cuando el déficit es severo se acelera la senescencia de hojas maduras (Acevedo *et al.*, 1998; Munné-Bosch y Alegre, 2004).

Luego de la expansión celular hay una reducción de la síntesis de pared celular. La síntesis proteica también es sensible a niveles de estrés hídrico, es por ello que se ve afectada la actividad enzimática. La fotosíntesis es inhibida debido a que los estomas en su gran rol del balance hídrico, disminuyen su apertura para impedir pérdidas importantes de agua por transpiración. Disminuye la división celular (Acevedo *et al.*, 1998; Yordanov *et al.*, 2003).

El cierre de estomas está asociado a la síntesis de ácido abscísico (ABA), que altera rápidamente el flujo de iones en las células oclusivas (células epidérmicas especializadas que rodean el estoma) (Leung y Giraudat, 1998). El ABA juega un papel importante en la maduración y germinación de semillas, así como la adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés abiótico, como es el caso del déficit hídrico, alta salinidad y bajas temperaturas (Leung y Giraudat, 1998). Se ha podido observar que muchos genes inducibles por sequía y bajas temperaturas también son inducidos por aplicaciones exógenas de ABA, lo que indica que el ácido abscísico cumple un importante rol en la regulación de la expresión genética en respuesta al estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Un cultivar que presente sólo una pequeña reducción de su rendimiento bajo condiciones de sequía, puede ser definido como tolerante al déficit hídrico (Valladares *et al.*, 2004). Al hacerse tolerante, se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento. Uno de principal importancia es la limitación específica de la expansión foliar. Aunque el área foliar es importante, pues de ella depende la fotosíntesis, una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua. Una menor área foliar transpira menos agua, por lo que es un efectivo método de conservación de un suministro limitado de agua durante un periodo más largo (Taiz y Zeiger, 2002).

Una baja disponibilidad de agua, provoca que la parte aérea de la planta deje de crecer por causa del estrés, mientras que la raíz continúa su desarrollo y busca abastecerse de agua en zonas más profundas del suelo, ya que las capas superiores normalmente son las primeras en secarse (Moreno, 2009). Los genotipos tolerantes a sequía presentan un mayor desarrollo radicular (Acevedo *et al.* 1998).

El ajuste osmótico es un proceso que también se da como respuesta de tolerancia a la sequía a nivel celular, éste consiste en la acumulación de solutos en respuesta al déficit hídrico y la disminución del potencial hídrico total

de hojas, tallos y raíces (Silva *et al.*, 2007). Como resultado, las plantas pueden absorber agua a bajos potenciales hídricos del suelo y mantener el turgor en sus tejidos (Acevedo *et al.*, 1998). La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en la planta, cuando ésta crece en condiciones óptimas, pero en condiciones de estrés, el contenido de prolina aumenta considerablemente, actuando como agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación (Chaman, 2007).

Otro mecanismo adaptativo de las plantas sometidas a estrés abiótico, incluida la sequía, es la acumulación de pigmentos como los flavonoides. Estos tienen múltiples funciones en las plantas, como la protección contra la exposición excesiva a la radiación ultravioleta, pigmentación floral y actividad microbiana (Chutipaijit *et al.*, 2008). Las antocianinas son un tipo de flavonoides que se han visto involucrados en funciones protectoras contra la fotoinhibición (Prado, 1999) y como mecanismo no enzimático eficaz contra la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler, 2002). Las ROS son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno (Apel y Hirt, 2004).

Estreses abióticos y bióticos pueden aumentar la concentración de ROS, originando daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN (Bhattacharjee, 2005).

1.4.4 Respuesta molecular de las plantas frente al déficit hídrico

La expresión de genes asociados a estreses medioambientales como sequía, alta salinidad y bajas temperaturas, desencadenan una serie de respuestas bioquímicas y luego fisiológicas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). La existencia de múltiples genes inducibles por estrés sugiere la compleja respuesta de las plantas ante estreses abióticos (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Los productos de estos genes pueden ser clasificados en dos grupos: los que protegen directamente de estreses abióticos a las células y los

que regulan la expresión génica y la transducción de señales de respuesta al estrés (figura 2) (Thomashow, 1999; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

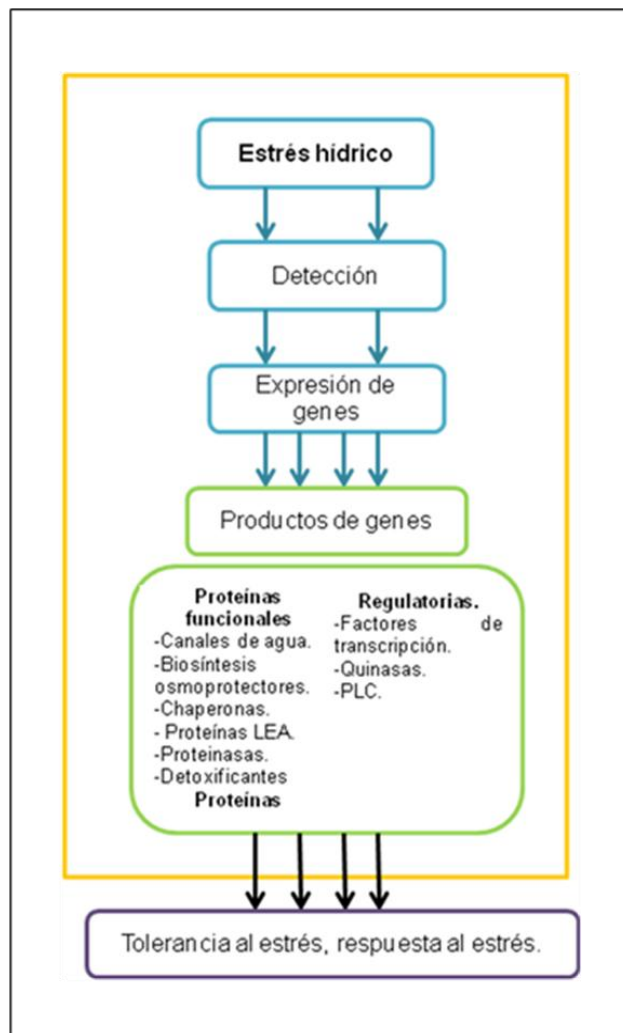


Figura 2. Esquema de la respuesta de las plantas frente al déficit hídrico (Modificado de Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Dentro del primer grupo están enzimas claves para la síntesis de osmoprotectores como prolina, proteínas LEA (*Late embryogenesis abundant*), proteínas anticongelantes, chaperonas y enzimas detoxificantes (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

El segundo grupo de productos genéticos, incluye a los factores de transcripción, proteínas kinasas, enzimas que intervienen en el metabolismo de los fosfolípidos y otras moléculas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

Los estudios de la respuesta molecular ante el déficit hídrico sugieren cuatro vías de señalización independientes, que activan genes inducibles por el estrés por sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996), dos son dependientes de ABA y dos no son dependientes de ABA (figura 3).

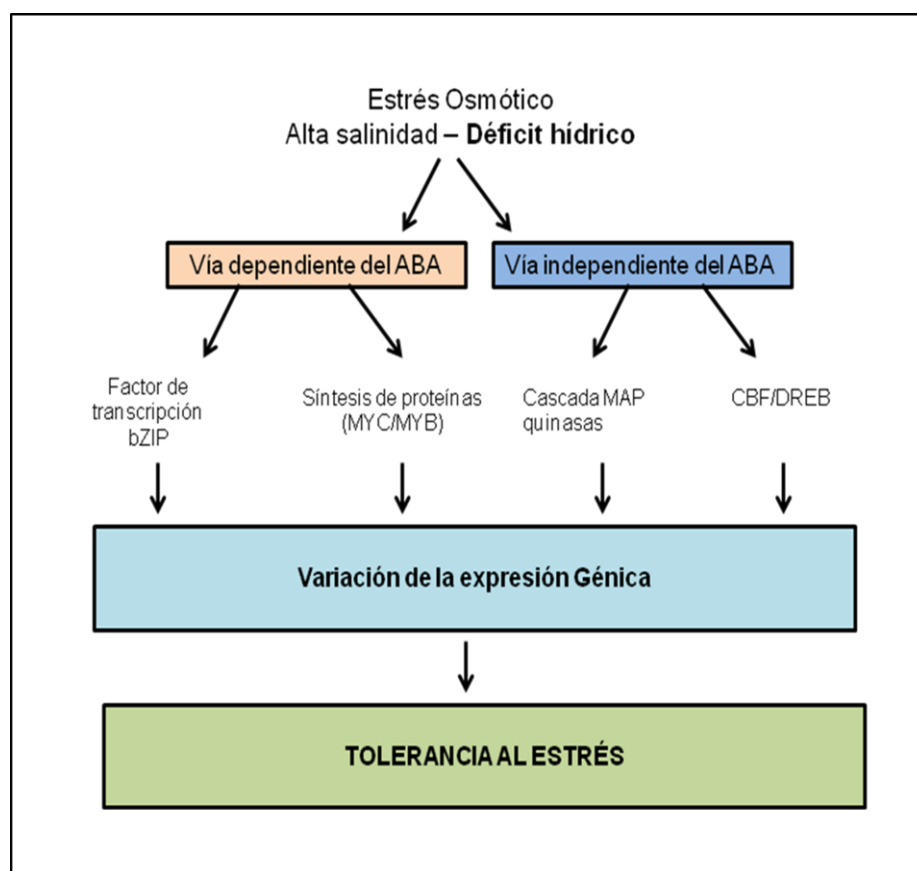


Figura 3. Ruta de transducción de señal del estrés osmótico en células vegetales. (Modificado de: Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000).

Una de las vías dependientes de ABA no requiere la biosíntesis de proteínas para su expresión (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Estos genes inducibles por sequía tienen elementos cis conservados llamados “elementos

de respuesta a ABA” (ABRE- C/TATCGTGGC) en la región del promotor (Leung y Giraudat, 1998).

Los factores de unión a ABRE (AREB/ABF; *ABA responsive binding protein/ABA binding factor*) han demostrado tener un motivo bZIP (*Basic Leucine Zipper*; cierre de leucina básico) el cual se une a una secuencia central (ACGT) llamada *G-box* (Caja G) (Uno *et al.*, 2000). La secuencia ABRE se identificó por primera vez en el gen Em de trigo y rab16 de arroz (Guiltinan *et al.*, 1990; Mundy *et al.*, 1990) y se considera como un elemento en cis fundamental en la expresión de genes que responden a ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

La otra vía dependiente de ABA requiere la biosíntesis de factores proteicos necesarios para la expresión de genes inducibles por sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Se ha encontrado que una región específica del promotor del gen RD22 en *Arabidopsis thaliana* contiene elementos *cis*-activos que son homólogos a las secuencias de reconocimiento MYB (*myeloblastosis*) y MYC (*myelocytomatosis*), pero no secuencias ABRE, como otra vía para la transducción de genes dependientes de ABA (Abe *et al.*, 1997). Las proteínas MYC y MYB son sintetizadas después de la acumulación de ABA endógeno, lo cual indica su rol más bien en una etapa posterior de respuesta al estrés.

Los genes que se expresan independiente de la presencia de ABA incluyen en su promotor secuencias de 9pb conservadas (TACCGACAT) llamadas CRT/DRE (*C-repeat/Drought responsive element*) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1994). Stockinger *et al.* (1997) aislaron una proteína de unión a la secuencia CRT/DRE llamado CBF/DREB (*CRT binding factor/DREB binding protein*), esta secuencia conservada juega un papel importante en la regulación de la expresión génica en respuesta a bajas temperaturas, déficit hídrico y alta salinidad (Baker *et al.*, 1994). Sin embargo, hay una vía de transducción en respuesta a sequía independiente de ABA que es activada por CBF/DREB cuyos componentes aún son desconocidos (Nakashima *et al.*, 1997).

En condiciones de sequía se ha determinado que se activan unos 200 genes, con mayor o menor expresión (Pino *et al.*, 2011). En el presente estudio se

analizó el papel de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*, por medio de su expresión.

1.4.4.1 Biosíntesis del ABA: Papel del gen *St aldehído abscísico oxidasa*

El ácido abscísico (ABA), es una fitohormona que pertenece a los sesquiterpenoides de 15 carbonos, sintetizado por dos vías, una directa que parte del ácido mevalónico, la cual implica la ciclación y oxidación de un precursor C15 para formar al ABA (Davies *et al.*, 1995). En la mayoría de las plantas superiores, la biosíntesis del ABA se realiza por vía indirecta, es decir, por degradación de algunos carotenoides (C40) presentes en plastidios. En la parte aérea, los cloroplastos contienen los carotenoides de los cuales se forma el ABA, mientras que en raíces, frutos, embriones de semilla y otras partes del vegetal, los precursores del ABA se encuentran en otros plastidios (Azcon-Bieto y Talon, 1993).

Cuando una planta es sometida a estrés hídrico, esta acumula ABA, lo cual provoca la activación de numerosos genes y el cierre estomatal para restringir la transpiración (Schroeder *et al.*, 2001).

El nivel de ácido Abscísico (ABA) en cualquier tejido de la planta (hojas, frutos, semillas y raíces), está determinado por la tasa de biosíntesis y catabolismo de la hormona. Por lo tanto, la identificación de todos los genes implicados en el metabolismo es esencial para una comprensión completa de cómo esta hormona dirige el crecimiento y desarrollo de plantas. Desde el descubrimiento del ABA a comienzos de los años 60, se ha dedicado mucho esfuerzo en comprender cómo éste es sintetizado. A través de estudios genéticos y bioquímicos, la biosíntesis del ABA en plantas superiores es ahora comprendido en gran detalle. Recientemente han sido identificadas la mayoría de genes que codifican para las enzimas en la vía de biosíntesis del ABA (Schwartz *et al.*, 2003). La biosíntesis del ABA está sujeta a una regulación

compleja durante el desarrollo de la planta y a respuestas hacia estreses ambientales.

El ABA en plantas superiores, es sintetizado por una vía "indirecta" a través de la escisión del precursor de carotenoides C₄₀, seguido por dos pasos de conversión del intermediario Xantonina a ABA vía ABA-aldehído (figura 4).

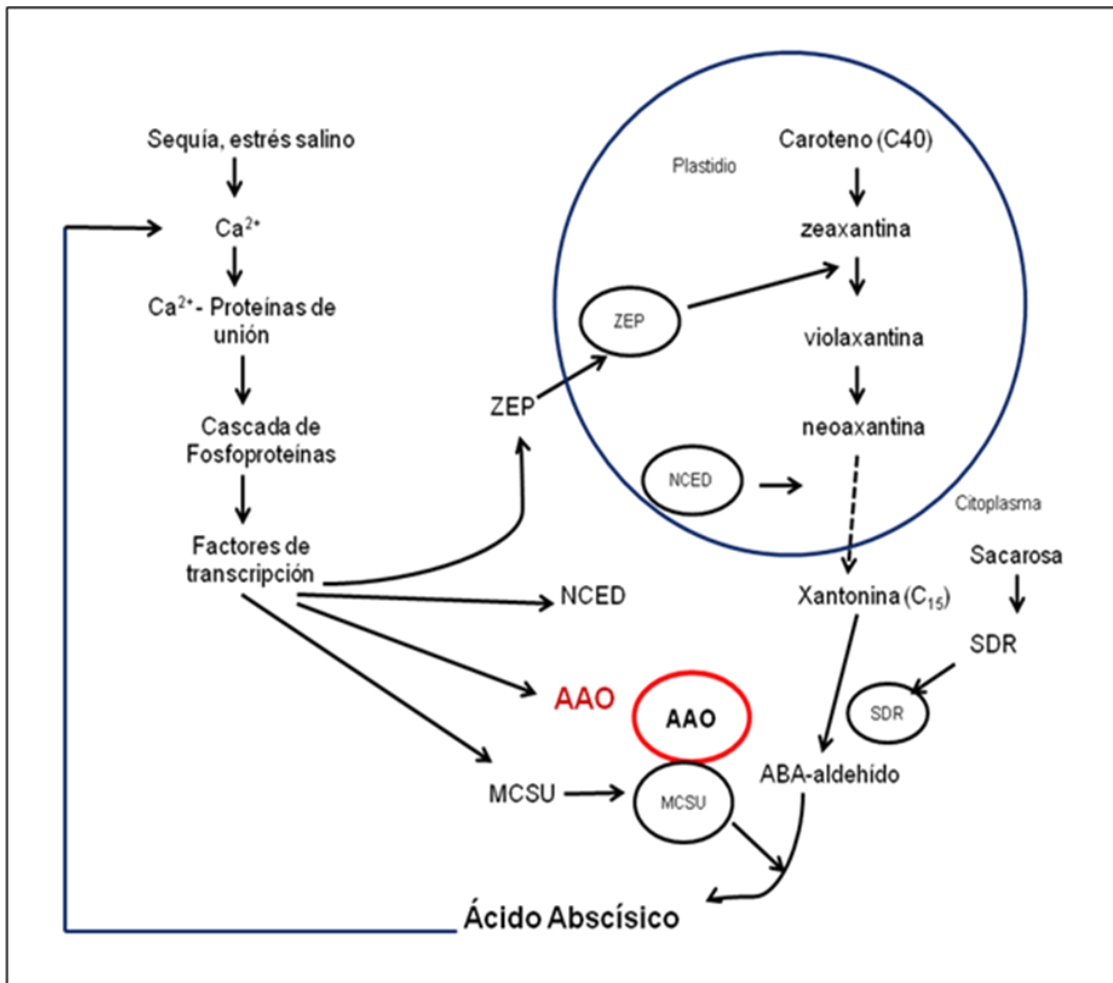


Figura 4. Biosíntesis del ABA. La regulación de la biosíntesis del ABA es derivada de los precursores de C₄₀ epoxicarotenoides a través de una reacción de escisión oxidativa en los plastidios. El intermediario Xantonina (C₁₅) es convertida a ABA mediante una reacción de dos pasos vía ABA-aldehído en el citoplasma. Los estreses abióticos como el hídrico activa genes, probablemente a través de una cascada de fosfoproteínas dependientes de Ca²⁺, que se indica en la izquierda de la figura. La retroalimentación de ABA estimula la biosíntesis de genes, a través de la cascada de fosfoproteínas. *NCED* es fuertemente regulada por una condición de estrés, sin embargo *SDR* es regulado por la sacarosa. Las enzimas que participan en la biosíntesis del ABA se indican en los pequeños óvalos, el óvalo rojo corresponde a la enzima que es codificada por el gen de interés en el presente estudio (aldehído abscísico oxidasa). El paso en el cual interviene *NCED* probablemente limita la biosíntesis de ABA en hojas. ZEP, zeaxantin epoxidasa; *NCED*, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; AAO, ABA-aldehído oxidasa; MCSU, MoCo sulfurasa. Modificado de Taylor *et al.*, 2000; Finkelstein and Rock, 2002; Seo y Koshiba, 2002; Schwartz *et al.*, 2003).

El primer paso para la biosíntesis del ABA viene dado por una epoxidación de la zeaxantina a violaxantina, dentro de los plástidos, este paso es catalizado por la zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego de una serie de modificaciones estructurales, la violaxantina es convertida en 9-cis-epoxicarotenoide el cual es transformado en xantonina, luego de una escisión oxidativa mediada por la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Schwartz *et al.*, 1997). Este paso fue considerado como el primer paso comprometido en la ruta de biosíntesis de ABA. Se ha propuesto que la NCED es la principal enzima regulatoria debido a que su expresión está correlacionada con los niveles endógenos de ABA (Schwartz *et al.*, 2003). La inducción de la expresión del gen *nced*, en condiciones de estrés hídrico, se ha observado en raíces y hojas en varias especies incluyendo *P. vulgaris* y *Arabidopsis*. Adicionalmente, la sobreexpresión del gen *Atnced3* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* aumentan los niveles de ABA y la tolerancia a la deshidratación (Melhorn *et al.*, 2008).

Luego la xantonina (producto de 15 carbonos), se transporta al citoplasma por un mecanismo desconocido (Qin *et al.*, 2002), en donde es convertida en ABA mediante tres posibles vías: la del ácido xantóxico, la del alcohol-abscísico y la del ABA-aldehído (ABAld); ésta última es la más importante, en la que la xantonina es oxidada en el citoplasma a ABAld (Abscísico aldehído) mediante una enzima simple SDR1 (Deshidrogenasa/Reductasa de Cadena Corta), que actúa como xantonina oxidasa y transforman la xantonina en ABAld (Cheng *et al.*, 2002). Finalmente, el ABAld es convertido a ABA por la enzima aldehído abscísico oxidasa, la cual requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica (Nambara y Marion-Poll, 2005).

Papel del gen *St aldehído abscísico oxidasa*

El gen *St aldehído abscísico oxidasa* codifica para la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del ABA, en donde el aldehído abscísico (ABAld) es convertido a ABA. Esta enzima requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica (Nambara y Marion-Poll, 2005).

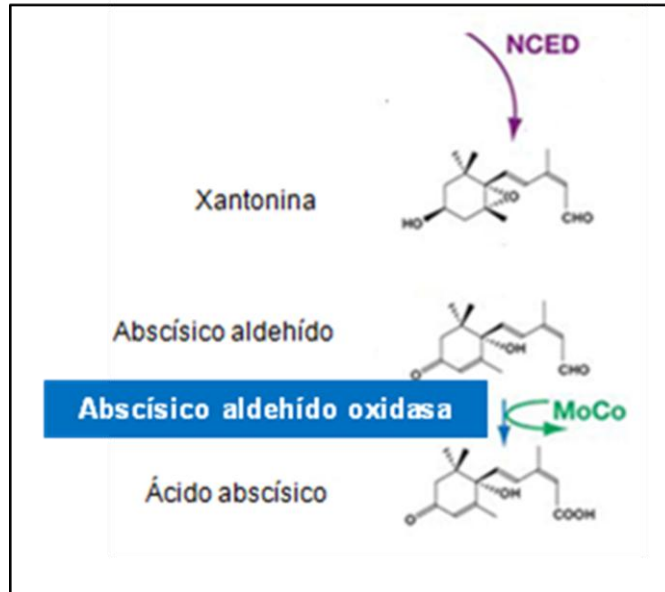


Figura 5. Últimos pasos de la biosíntesis del ABA. La xantonina es oxidada en el citoplasma a ABAld (Abcísico aldehído) mediante una enzima simple SDR1 (Deshidrogenasa/Reductasa de Cadena Corta). Finalmente, el ABAld es convertido a ABA por la enzima aldehído abscísico oxidasa, la cual requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica. Modificado de Nambara y Marion-Poll, 2005.

1.4.4.2 Las dehidrinas: Papel del gen *Dhn10*

Bajo condiciones de sequía las plantas producen ciertas proteínas como parte de una respuesta global frente al estrés, lo cual precede una protección del metabolismo celular (Ingram y Bartels 1996). Gran parte de investigaciones se enfocan en las proteínas que aumentan durante una condición de estrés, ya que puede que éstas tengan una función adaptativa o de protección a dicha condición. La síntesis de proteínas hidrofílicas como son las dehidrinas es un componente común de esta respuesta. Las dehidrinas son proteínas que originalmente fueron identificadas como grupo II de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales se acumulan durante los estados tardíos de la embriogénesis en semillas, en respuesta a la aplicación de la hormona ácido abscísico (ABA). Estas proteínas no sólo se acumulan durante la última etapa en la formación de la semilla, sino que también se encuentran en tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación (Galau *et al.*, 1986).

Las dehidrinas están distribuidas en un amplio rango de organismos, incluyendo plantas superiores, algas, levaduras y cianobacterias (*Mitwisha et al.*, 1998). Son sintetizadas en diferentes órganos de las plantas, incluyendo raíces, hojas, coleóptilos, semillas y coronas y están localizadas en diferentes compartimentos de las células, como el citoplasma, núcleo, mitocondria o vacuola, o en las proximidades de las membranas plasmáticas (*Heyen et al.*, 2002).

El aislamiento y purificación de dehidrinas a partir de semillas de maíz y de ejemplares de género *Vigna*, de plántulas de cebada y maíz (*Close et al.*, 1997), y de los tejidos de corteza del durazno; han permitido obtener información de sus propiedades bioquímicas *in vitro*. Estas proteínas han sido caracterizadas en un amplio rango de masas moleculares, desde 9 a 200 kD (*Soulages et al.*, 2003). Son ricas en residuos de glicina y lisina, pero carecen de cisteína y triptófano. Contienen una gran proporción de aminoácidos polares cargados y presentan motivos de secuencia repetidos. El dominio altamente conservado y siempre presente en todas las dehidrinas es el dominio rico en Lisina (*Lys*), también llamado segmento-K, consta de 15 residuos de aminoácidos (EKKGIMDKIKEKLPG). Sin embargo, pueden ocurrir ciertas sustituciones de un aminoácido y cambios en la estructura dentro de cada segmento (*Allagulova et al.*, 2003).

La mayoría de las dehidrinas contienen dominios que tienen residuos de Serina (*Ser*) (segmento-S) y el motivo consenso (T/VDE/QYGNP), denominado el segmento-Y, localizado cerca del extremo N-terminal (*Close*, 1997). Los distintos segmentos se ensamblan y se dispersan por dominios menos conservados generalmente ricos en aminoácidos polares (segmentos- Φ) que podrían interactuar con superficies de las macromoléculas citoplasmáticas o nucleares, para prevenir su coagulación (*Campbell y Close*, 1997).

Se han estudiado las propiedades fisicoquímicas y estructurales de una dehidrina presente en la soja (GmDHN1, tipo Y₂K), su hidrofiliidad y habilidad de adoptar una conformación helicoidal a bajas temperaturas, constituyen la

base de la función de las dehidrinas de prevenir daños en estructuras macromoleculares, inducidos por estrés osmótico (Soulages *et al.*, 2003)

La función de las dehidrinas sigue siendo poco clara, pero debido a las características de sus secuencias, estas han sido postuladas a ser estabilizadoras de las estructuras celulares frente a la deshidratación (Close, 1997).

Se han determinado varias subclases de dehidrinas, en base a número y orden de sus dominios conservados. Según Close (1997), la clasificación de las dehidrinas está basada en la presencia de segmentos altamente conservados. De acuerdo a su combinación, las dehidrinas han sido subdivididas en cinco clases: Y_nSK_2 , K_n , K_nS , SK_n , y Y_2K_n .

Las dehidrinas Y_nSK_2 son las más abundantes, contienen de uno a tres segmentos-Y, un segmento-S y dos segmentos-K; son inducidas por ABA o por sequía. Las dehidrinas K_n , contienen de dos a nueve segmentos-K, son inducidas por bajas temperaturas, deshidratación y ABA. Las dehidrinas SK_n contienen un segmento-S y dos o tres segmentos-K, son de naturaleza ácida y son inducidas por bajas temperaturas. Las dehidrinas K_nS en contraste con el resto dehidrinas, su segmento-K inicia con el motivo (H/Q) KEG, son inducidas por deshidratación y temperaturas frías. Finalmente, las dehidrinas Y_2K_n , son de naturaleza ácida, contienen dos segmentos-Y y uno o dos segmentos-K.

Papel del gen *Dhn10*

El gen designado como *Dhn10* codifica para la proteína DHN10, la cual es una dehidrina de 10 kDa, presenta algunas secuencias de consenso de aminoácidos de las dehidrinas, denominadas segmentos-K y segmentos-S. A diferencia de la mayoría de dehidrinas, ambos segmentos se presentan en copias únicas en la secuencia de la DHN10 y el segmento-S se encuentra en la posición C-terminal. Búsquedas en bases de datos revelan que las dehidrinas del tipo K-S constituyen una subclase específica distribuida en dicotiledóneas y

monocotiledoneas (Rorat *et al.*, 2003). Las dehidrinas podrían ayudar a estabilizar a las membranas contra la deshidratación a través de α -hélices anfipáticas (Close, 1997).

Datos obtenidos tras un análisis de la expresión del gen *Dhn10*, indican que la proteína está presente en un alto nivel en ausencia de estrés durante el crecimiento vegetativo, y que su expresión está regulada principalmente por factores relacionados con el tipo de órgano y la etapa de desarrollo de las hojas (Rorat *et al.*, 2004). Bajo condiciones de estrés, se pudo observar un nivel mucho más elevado de la proteína DHN10 en hojas maduras. Lo que es más, los datos obtenidos por Rorat *et al.*, también revelaron que en contraste con la mayoría de dehidrinas, la DHN10 es más necesaria para una planta durante el crecimiento y desarrollo normal que bajo condiciones de estrés.

1.5 Hipótesis

Existen diferencias estadísticas significativas en la expresión de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*, que explican tolerancia y susceptibilidad a estrés hídrico entre las variedades Karú y Yagana.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Mejoramiento Molecular Hortícola, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación “La Platina”, Santiago, Chile. Esta investigación en particular fue financiada por el Proyecto FONTAGRO AT/OC-11943-RG: Adaptación de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático (2010-2013), bajo guía y supervisión de la Dra. María Teresa Pino Quezada, líder del proyecto y la asesoría técnica y científica del Lic. Darío Estay Ubilla.

Los colaboradores científicos del proyecto en la Escuela Politécnica del Ejército (Ecuador) fueron la Dra. Karina Proaño Tuma y el Ing. Pedro Romero Saker, quienes desempeñaron las funciones de directora y codirector respectivamente.

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Fase de campo

El experimento se realizó en el Centro Regional de Investigación (CRI) INIA-“La Platina”, 33°34' lat. Sur altura s.n.m. 625 m (*anexo 1*). En invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad



Figura 6. Disposición de las macetas con las papas de interés del estudio en el invernadero #3 del INIA-La Platina, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

2.2.2 Fase de laboratorio

La investigación se desarrolló en el área de molecular del Laboratorio de Mejoramiento Molecular Hortícola del INIA, La Platina.

2.3 Tiempo de investigación

La investigación inició en el abril del 2011 y finalizó en mayo del 2012, comprendiendo un período de 13 meses.

2.4 Diseño estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar (DBCA), en donde se emplearon dos variedades de papa con cuatro repeticiones por tratamiento de riego (100, 50 y 25 %); el efecto de los tres tratamientos fue analizado en cuatro tiempos, días (0, 1, 7 y 14).

El modelo estadístico para este diseño fue dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}; \begin{cases} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, b \end{cases}$$

Donde Y_{ij} es la medición que corresponde al tratamiento i y al bloque j , μ es la media poblacional, τ_i es el efecto debido al tratamiento i , γ_j es el efecto debido al bloque j , y ε_{ij} es el error atribuible a la medición Y_{ij} se supone que los errores se distribuyen de manera normal con media cero y varianza constante $[N(0, \sigma^2)]$, y que son independientes entre sí (Gutiérrez y De La Vara, 2008).

El efecto de los distintos tratamientos en la expresión de los genes en cada variedad, fue analizado mediante la técnica de análisis de varianza, ANOVA. La diferencia de las medias fue comparada por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan ($\alpha=0.05$), utilizando el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.1.2 (S.A.S 2003®).

Operatividad de las variables

Tabla 1. Detalle de las variables propuestas en el diseño experimental.

Variable	Tipo	Definición	Factor a determinar
Expresión génica	Dependiente (De respuesta)	cDNA transcrito detectable sintetizado a partir de una hebra simple de mRNA maduro	Cantidad de cDNA de los genes <i>St absícisco aldehído oxidasa</i> y <i>Dhn10</i> expresados respecto a la cantidad de cDNA de un gen housekeeping 60S (control interno)
Genotipo	Independiente	Entrada de una misma especie	En función al patrón de expresión de cada gen, se estableció si las variedades son resistentes o susceptibles a estrés hídrico

2.5 Material vegetal

2.5.1 Variedades

Para este estudio se usaron plantas de papa de *Solanum tuberosum* cv. Karú (INIA) y cv. Yagana (INIA).

Karú-INIA: Es un nuevo cultivar de papa creado a partir del cruzamiento Yagana-INIA x Fanfare, por el Programa de Mejoramiento Genético de la Papa del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), en el Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, el año 1989. Es una planta semi erecta, de

buen vigor, con tubérculos de tamaño medio a grande, uniformes, de forma oval alargada, piel roja y pulpa amarilla clara. Posee altos rendimientos y se adapta bien a la mayoría de las zonas y épocas de cultivo de la papa en Chile. Su uso preferente es para consumo fresco, aunque produce una fritura de calidad altamente aceptable, similar a Yagana-INIA. Su lanzamiento oficial al mercado fue en el año 2003.



Figura 7. Tubérculos de la variedad de papa Karú (INIA). Tomado de la página web del INIA: <http://www.inia.cl/link.cgi/Remehue/Servicios/InsumosTecnologicos/semillaPapa/6622>

Yagana (INIA): Es la primera variedad de papa chilena que se dio a conocer en el año de 1983. Es el resultado del cruzamiento de las variedades INIA Hydra y 904/61. Se caracteriza por tener tubérculos ovalados de color amarillo intenso y su pulpa amarilla. La planta tiene un buen desarrollo de follaje. Tiene una muy buena calidad para su consumo, es resistente a la cocción, de muy buen sabor, color y textura suave. Excelente para todo tipo de preparación culinaria.



Figura 8. Tubérculos de la variedad de papa Yagana (INIA). Tomado de la página web del INIA: <http://www.inia.cl/link.cgi/Remehue/Servicios/InsumosTecnologicos/semillaPapa/6623>

2.5.2 Condiciones del experimento

El experimento se realizó en el Centro Regional de Investigación (CRI) INIA La Platina (33°34' lat. Sur altura s.n.m. 625 m), en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Las papas fueron establecidas en maceteros de 7 L de capacidad, utilizando como sustrato la mezcla de turba-perlita en proporción 1:1. Dicha turba está bajo el nombre comercial de Sunshine N°6 (Sun Gro, Canadá). Cada planta fue regada según los tratamientos descritos a continuación.

2.5.3 Tratamientos hídricos

Fueron evaluadas tres condiciones hídricas: 100% (sin restricciones de riego), 50% (con la mitad de restricciones de riego) y 25% (con restricciones de riego).

A partir de la tuberización (Día 0) se comenzó a aplicar los distintos niveles de riego a las variedades de papa. El diseño del ensayo fue uno de bloques completos al azar, con 18 tratamientos: 6 variedades/línea de papa y 3 niveles

de riego. Se establecieron 4 bloques, constituyendo cada uno una repetición. Para este estudio se tomaron únicamente muestras de hojas de dos variedades de papa (Karú y Yagana), de las cuales se tomó muestras de hoja los días: 0, 1, 7 y 14; mientras que las demás variedades fueron utilizadas para otros estudios. Se tomaron un total de 96 muestras de hojas, correspondientes a las dos variedades por cada tratamiento y día de muestreo. La distribución de las macetas se muestra en la figura 9.

Los riegos se efectuaron tres veces por semana. Para determinar el volumen a aplicar por día, se pesó una maceta por variedad antes y después de regar a capacidad de campo. El volumen de agua a aplicar quedó determinado como la diferencia entre ambos pesos. Los volúmenes determinados para aplicar fueron constantes a lo largo del ensayo, fueron: Para el tratamiento del 100%, 1000 ml, para el 50%, 500 ml y para el 25%, 250 ml.



Figura 9. Distribución de los tratamientos en el invernadero (variedades, riego, repetición). (a) Distribución de macetas en invernadero. (b) Los colores representan los 3 niveles de riego (Verde: 100% de la Capacidad de Campo (CC), amarillo: 50% de la CC, rojo: 25% de la CC)

2.6 Aislamiento y análisis de las secuencias de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*

2.6.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico de hojas de las variedades de papa, Karú y Yagana, acorde a lo expuesto en el protocolo modificado de Doyle (1991). Para ello, se tomaron hojas frescas y se molieron en un mortero con Nitrógeno Líquido hasta lograr un polvo homogéneo, luego se agregó Buffer de extracción CTAB (1ml de buffer por cada 100 mg de muestra de hoja / 100µl de β-mercapto etanol por cada 50ml de buffer), el buffer fue llevado previamente a una temperatura entre de 45 y 60°C. La solución obtenida se traspasó a tubos eppendorf con aproximadamente 1000 µl. Se dejó incubar a 60° C durante una hora y se enfrió a temperatura ambiente. Luego se agregaron 500 µl de fenol-cloroformo, se mezcló por inversión 30 veces y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 13.500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante al cual se le agregaron 500 µl de cloroformo y nuevamente se mezcló por inversión 30 veces, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.500 rpm durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante al cual se le adicionó isopropanol con una relación de 1:1 en volumen, y acetato de sodio con una relación de 1:10 en volumen y se dejó precipitar toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante, quedando únicamente el pellet dentro del eppendorf, a éste se le agregaron 500 µl de etanol 80%; se agitó en el vórtex y se centrifugó por 5 minutos a 8000 rpm; se eliminó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar a 60°C y se re suspendió el pellet en 30 µl de buffer TE con RNAsas.

Para la cuantificación y verificación de la calidad del ADN, se tomaron 2 µl de ADN en solución y se llevaron a 500 µl en Buffer TE (Volumen final). Se midió la absorbancia en celdas de cuarzo a 260 y 280 nm con ayuda del espectrofotómetro (SpectroQuest™ 2800 UV/VIS, UNICO, USA) para así

obtener la razón 260/280 y se calculó la concentración de las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (50^* \times A_{260} \times \text{factor de dilución}) / 1000$$

*La concentración de DNA a $A_{260} = 1.0$ en una cubeta de 1 cm, esto equivale a 50 μg de DNA por ml de agua.

Una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ADN de doble hebra y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ADN de hebra simple y RNA, según Sambrook *et al.*, 1989.

2.6.2 Diseño de primers para amplificación de ADN genómico

Por medio de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), se realizó un análisis de secuencias de ARNm y ADN de los genes *St absícisco aldehído oxidasa*) y *Dhn10*, que son genes involucrados en la respuesta al déficit hídrico.

Se procedió a diseñar primers con ayuda del programa *Primer Premier* tomando bien en cuenta las condiciones a las que deben ser diseñados. Para el gen de la dehidrina se utilizó una secuencia de *Solanum commersonii* (GenBank: EU849680.1), descrita como *Dhn10* y para el gen de síntesis de ABA (*St absícisco aldehído oxidasa*) se utilizó una secuencia descrita para *Solanum tuberosum* (GenBank: DQ206635.1). Los primers se mandaron a sintetizar a la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, Iowa, USA). Para la secuencia descrita del gen *St aldehído abscísico oxidasa*, el primer fue: Forward: 5'- ATGGTCTCAAATAGCACTTGG-3' y Reverse: 5'- CAAGTATTCAGTATCTATGTTGCTCT-3', con un amplicón de 663pb. Para la secuencia descrita para el gen *Dhn10*, Forward: 5'- GCTAAACCCCAAAAAAAAAACTCATT-3' y Reverse: 5'- GTCCAAAAGACGAGTACATTAC-3', con un amplicón de 496pb.

2.6.3 Amplificación de fragmentos a partir de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR que se utilizó para cada primer se detalla en la tabla 2. Se utilizó el termociclador en gradiente XP Thermal cycler (Bioer Co, Japan) con un programa de 35 ciclos a 94°C por 40s, 60°C por 40s y 72°C por 1 minuto. El mismo programa funcionó tanto para el primer diseñado para el gen *Dhn10* como para el gen *St absícisco aldehído oxidasa*, incluido la temperatura de alineamiento.

Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizados para la amplificación de fragmentos, a partir de la PCR

	Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1x (µl)
Máster Mix	H₂O			9
	Buffer	10x	1x	2
	MgCl₂	25 mM	2,5 mM	2
	dNTP mix	10 mM	0,4 mM	0,8
	Taq polimerasa	5 u/ µl	1 u	0,2
	Forward + Reverse	5 µM	10 µmoles	2 (c/u)
	DNA	100 ng/ µl	200 ng	2
			Volumen final	20

2.6.4 Electroforesis en geles de agarosa

Se visualizó el DNA amplificado a partir de PCR, en geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM, EDTA 1 mM) utilizando GelRed™ (Biotium Inc, USA) como agente de tinción fluorescente de ácidos nucleicos. Se utilizó el peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix™

de 10000 pb (Fermentas, USA) y se cargaron las muestras previamente mezcladas con el buffer de carga DNA Loading Dye 6X (Fermentas, USA). Los geles de agarosa migraron en una diferencia de potencial eléctrico de 80V durante una hora en la cámara de electroforesis (CONSORT NV, HV13, BELGIUM). Las bandas de ADN fueron identificadas en el transiluminador (ULTRA LUM INCV, EACS-20, USA).

2.6.5 Purificación de bandas de ADN desde geles de agarosa

La purificación de ADN se realizó según el protocolo, modificado QIAEX II (Qiagen, Alemania). Una vez amplificadas las secuencias de interés se procedió a cortarlas con ayuda de un bisturí sobre el transiluminador UV (ULTRA LUM INCV, EACS-20, USA). Se eliminó el exceso de agarosa. Se pesó la agarosa (~ 0.1 g de agarosa) y se colocó cada pedazo de gel cortado en un eppendorf de 1.5 ml. Para esta cantidad de agarosa se adicionaron 300 µl de NAI (6M). Se incubó a 55 °C durante 10 a 20 minutos, en el baño termo regulado (WISE THERM™, HB-48P, KOREA), y se agitó la muestra cada cierto tiempo para así diluir completamente la agarosa. A continuación, se añadieron 15 µl de sílica, luego se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación continua, para luego centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos. Con ayuda de una jeringa se descartó el sobrenadante, el pellet fue re suspendido en 750 µl de New Wash Solution (NaCl 50mM, tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 2.5mM, etanol 50%), se agitó en vórtex para ayudar a disolver completamente la mezcla y luego se centrifugó a 10.000 rpm por 2 minutos; éste proceso se repitió dos veces. Una vez terminado el proceso de limpieza del pellet se lo dejó secar en una estufa a 63 °C durante una hora, para eliminar todo el etanol. Para recuperar el ADN se agregaron 15 µl de Tris HCl (10 mM - pH 7.5), se lo colocó en baño a 55°C por aproximadamente 10 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos. Finalmente se recuperó el DNA presente en el sobrenadante (10 µl), con ayuda de una micropipeta, teniendo mucho cuidado de no tomar la sílica.

2.6.6 Ligación de fragmentos de ADN

La concentración de DNA purificado se cuantificó desde el gel de agarosa, comparando la intensidad de la banda frente al estándar de peso molecular cuantificable GeneRuler DNA Ladder Mix™ de 10000 pb (Fermentas, 2010 USA). El análisis densitométrico de cada banda se realizó a partir del programa Image J versión 1.45 software (2011) (National Institutes of Health, USA). El ADN purificado fue ligado con el vector de clonamiento pGEM®-T easy vector (Promega, Madison, WI. USA) (figura 10). Para determinar la cantidad de inserto se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ng Inserto} = \frac{\text{vector (ng)} * \text{tamaño del Inserto (Kb)}}{\text{tamaño del Vector (Kb)}} * \text{Razon Molar (Inserto : vector)}$$

Una vez calculada la cantidad el inserto se determinó el volumen del mismo que se debe ocupar, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de inserto} = \text{ng inserto} / \text{concentración de DNA purificado}$$

Finalmente, se utilizaron 5 µL de Buffer T4 DNA Ligasa 2X, 50 ng del Vector pGEM®-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA, 2010) (1 µL), 40 ng de producto de PCR (3 µL) y 1 µL de DNA Ligasa T4 (3U/µl) para completar un volumen final de 10 µL. Esta mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 horas.

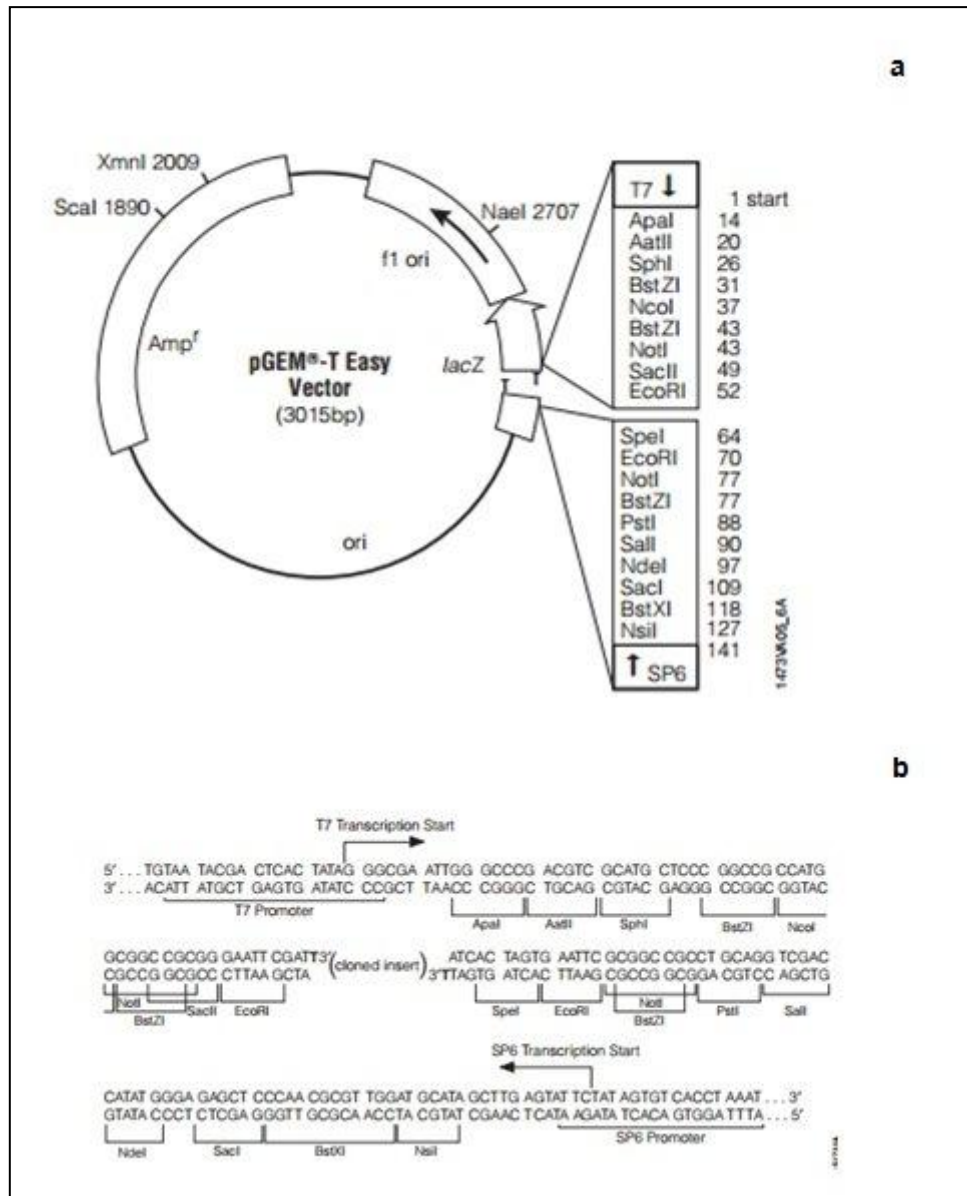


Figura 10. Mapa del Vector pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corporation, Madison, USA, 2010). (a) Puntos de referencia de la secuencia: Sitio de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa T7 (1). Región de clonación múltiple (10-128). Promotor de la ARN polimerasa SP6 (-17 a +3), (139-158). Inicio de la transcripción de la ARN polimerasa SP6 (141). Sitio de unión del primer reverse de secuenciación pUC/M13 (176-197). Codón de inicio lacZ (180). Operador lac (200-216). Región de codificación de β-lactamasa (1337-2197). Región del fago f1 (2380-2835). Secuencias del operón lac (2836-2996, 166-395). Sitio de unión del primer forward se secuenciación pUC/M13 (2949-2972). Promotor de la T7 ARN polimerasa (-17 a +3) (2999-3). (b) Promotor y secuencia de clonación múltiple del vector. La hebra superior corresponde al ARN sintetizado por la RNA polimerasa T7. La hebra inferior corresponde al ARN sintetizado por la ARN polimerasa SP6.

2.6.7 Transformación de bacterias *Escherichia coli* (Top 10) quimiocompetentes

Con el producto de la ligación se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli*. Dichas células corresponden a un stock de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, USA), preparadas previamente.

La transformación se realizó según el protocolo de Li *et al.*, 2010, con ciertas modificaciones, donde se descongeló en hielo una alícuota de células competentes, luego éstas fueron colocadas en un tubo eppendorf de 1 ml, al cual se adicionó 50 ng de vector o (2-6 μ L aprox.) de producto de ligación más 100 μ L de células competentes (considerando que el plásmido no sea > 10% v/v). Dicha mezcla se mantuvo en hielo por 30 min, para luego pasar a un Shock térmico a 42°C por 45 segundos e inmediatamente se colocó a 4°C por 2 minutos. A continuación se agregó 900 μ l de medio LB (triptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v) sin antibiótico y se incubó en un agitador a 37°C por 45 min (aproximadamente 200 rpm). Posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se re suspendió en 100 μ L de LB y se sembró en placas de LB-Agar (Tryptona 2% p/v, NaCl 0,8% p/v, agar-agar 1,6% p/v) con antibiótico Ampicilina 1X (100 mg/l) IPTG y *Xgal*. Las placas se colocaron invertidas en una estufa a 37°C por 12 horas. Al día siguiente se pudo observar varias colonias blancas y azules en todas las placas.

Para la selección, en el agar con X-gal más el inductor de la enzima como es el IPTG en conjunto con ampicilina, las colonias recombinantes serán azul oscuro, mientras las que tienen el gen Lac Z' recombinante son incapaces de sintetizar la enzima y por lo tanto serán blancas (Brown, 1990).

2.6.8 Evaluación de clones *E. coli* Top 10 transformados

2.6.8.1 PCR de colonias

Se realizó un PCR de colonias con el fin de detectar la presencia del vector conteniendo el inserto de interés en la colonia de bacteria seleccionada. Para ello se suspendió las colonias de color blanco; como potenciales clones con plásmido recombinante en 20 μL de agua ultra pura. De ésta se tomó 1 μL para la reacción de PCR y se continuó según lo descrito en el apartado 2.6.3. Los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 2.6.4. Se seleccionaron los clones que presentaron las bandas del tamaño correspondiente a los fragmentos amplificados. Para ello se utilizó los 19 μL restantes de la suspensión de la colonia aislada y se inoculó en 5 ml de medio LB con ampicilina. Estas se dejaron crecer toda la noche con agitación a 37°C.

2.6.8.2 Minipreparación para purificación de ADN plasmídico

De los cultivos almacenados en medio LB líquido con ampicilina se realizó una minipreparación destinada a purificar el DNA correspondiente al vector unido al inserto contenido en las bacterias transformantes, mientras una alícuota de 750 μL de cada cultivo fue almacenada a -80°C agregando 250 μL de glicerol 60% estéril para su conservación en tales condiciones.

El protocolo empleado es una modificación de los métodos de Birnboim y Doly (1979) y Horowicz y Burke (1981) de acuerdo a Sambrook (1991). Donde, se tomó un cultivo de 3ml que se dejó en crecimiento durante una noche (apartado y se dividió en 1.5 ml en dos tubos Eppendorf, se centrifugó a 11.000 rpm durante 3 minutos y se eliminó completamente el sobrenadante. Luego el pellet (Bacterias + Plásmido Integrado) de un tubo se re suspendió en 150 μl Buffer TE y RNAsa (a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ (1,5 μl desde stock 10 mg/ml) usando la micropipeta hasta lograr una solución homogénea y

trasvasarlas al siguiente tubo, luego se colocó en hielo durante 10 minutos. A continuación se agregaron 150 µl de solución de lisis (NaOH 0,2M; SDS 1%) y se mezcló por inversión, se puso en hielo durante 10 min. Se añadieron 150 µl de Acetato de Sodio 3M pH: 5,2 y se mezcló por inversión, después se colocó en hielo durante 10 minutos posterior a ello se centrifugó el lisado por 10 minutos a 11000 rpm a 4 °C.

Luego se precipitó el ADN, de acuerdo al protocolo de Doyle (1991), se recuperó el sobrenadante sin tomar el pellet, a este se agregó un volumen (1:1) de Isopropanol y (1:10) de Acetato de Sodio 3M pH: 5,2. Y se colocó a -20° por 2 horas. Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 700 µl de etanol al 70%, dando un vórtex suave (este paso se hizo dos veces). Terminado el lavado se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se dejó en baño seco a 65°C durante 15 minutos para evaporar completamente el etanol, finalmente se re suspendió el pellet en 40 µl de agua libre de Nucleasas.

2.6.9 Ensayo enzimático

El ensayo de restricción se realizó utilizando la enzima Eco RI (cuyo sitio de corte flanquea el sitio de inserción del fragmento a clonar) y la enzima de restricción Sal I (la cual corta al vector pGEM-T Easy en un solo sitio, dejándolo linealizado y unido al fragmento ligado a él), ambas enzimas de Promega, Madison, WI. USA. El resultado de este ensayo fue observado en un gel de agarosa 1% en buffer TAE (80V por 1h 20min), siguiendo el protocolo que se describe en la tabla 3. La concentración de ADN fue calculada con ayuda del software *ImageJ* versión 1.4 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), el cual es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público.

Tabla 3. Protocolo para digestión enzimática de los productos de minipreparación para cada gen.

Componente de reacción	Reacción estándar
10X Buffer (Eco RI / Sal I)	1 μ l
Agua Libre de Nucleasas	7,5 μ l
Sustrato de DNA	1 μ l
Enzima (Eco RI / Sal I)	0,5 μ l
<i>Volumen total</i>	10 μ l

2.6.10 Secuenciación de los genes

El ensayo enzimático ayudó a determinar la cantidad de ADN que se mandó a secuenciar a la empresa Macrogen (Geumchun-gu, Seoul, Korea: http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp). Para la secuenciación se utilizaron los primers universales pUC/M13F y pUC/M13R, directos y reversos respectivamente. Las secuencias se muestran en los *Anexos 2, 3, 4 y 5*; y los sitios de hibridación al vector pGEM®-T Easy se indica la (Figura 2.5).

En la tabla 4, se detallan las muestras que se enviaron a secuenciar, junto con el volumen y concentración de las mismas.

Tabla 4. Muestras que se enviaron a secuenciar según los requerimientos de la empresa Macrogen Inc.

Clon	Variedad	Volumen (μ l)	Concentración (ng/ μ l)
<i>Dhn10</i>	Karú	23	80,5
	Yagana	25	88,3
<i>St aldehído abscísico oxidasa</i>	Karú	22	113
	Yagana	23	97

2.6.11 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas según el servicio de Macrogen fueron analizadas con ayuda del Software GeneTool Versión 4.03 y fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante BLAST para encontrar la similitud con otras especies vegetales. Las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta CLUSTALW2 disponible en el sitio del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y el análisis filogenético fue construido con ayuda del programa MEGA (Versión 5.01, 2011), mediante un análisis de tipo UPGMA (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011).

2.7 Análisis de la expresión génica

2.7.1 Extracción de ARN

El ARN total se aisló de tejido de hoja correspondiente a las cuatro repeticiones de los tres tratamientos hídricos que se aplicaron a las dos variedades de interés del estudio (Karú y Yagana), usando el protocolo descrito en el manual de los fabricantes de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU), con ciertas modificaciones. Donde, se tomaron aproximadamente 100 mg de hoja de papa y se homogenizó con ayuda con nitrógeno líquido, en un mortero frío. Luego se agregó 1 ml de Trizol y se siguió moliendo la muestra, para luego traspasar a un eppendorf de 1,5 ml. Se agitó con ayuda de un vórtex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió cloroformo (0,2 ml por ml de Trizol utilizado). Se agitó con la mano volteando suavemente durante 15 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron dos fases, una inferior, de fenolcloroformo y otra acuosa, superior, donde está en RNA. Se recuperó la fase acuosa (superior) en un eppendorf de 1,5 ml (aproximadamente tres pipeteos de 200 µl) y se añadió isopropanol puro (0,5 ml por cada ml de Trizol). Se volteó con la mano y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y al precipitado fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, se agitó en vórtex por un segundo y se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se secó el precipitado durante un corto tiempo a temperatura ambiente, para acelerar el proceso se colocó en el baño seco a 60°C durante 15 minutos hasta que se evaporó todo el metanol. Se colocaron los tubos en hielo y se re suspendió el precipitado con 40 µl de agua DEPC (tratada con dietilpirocarbonato al 0,1 % (v/v)). Se colocaron los tubos a 65°C durante 10 minutos y se re suspendió con la pipeta suavemente.

Debido a que ningún método de extracción de ARN produce ARN que esté libre de ADN contaminante, se hace necesario tratar las muestras con DNasa I para eliminar el ADN contaminante, especialmente en experimentos de RT-PCR, ya

que pueden obtenerse falsos positivos debido a la presencia de ADN. Se siguió el protocolo que se indica en la tabla 5, con reactivos de Fermentas.

Tabla 5. Concentración y volumen de reactivos utilizados para tratamiento de RNA con DNAsa

Componente de reacción	Reacción estándar (µl)
RNA	5
Buffer	1
H ₂ O DEPC	2
DNAsa	2
Volumen total	10
+ DNAsa Stop	1
Volumen total	11

2.7.2 Síntesis de cDNA

A partir de mRNA se sintetizó cDNA por transcripción inversa, empleando la retrotranscriptasa M-MLV (Promega, USA). Se utilizaron 100 ng de RNA que fueron mezclados con 1 µl de primer Oligo dT18 (5µM), 1 µl de dNTP mix (10mM) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 14 µl. El mix fue colocado en un termociclador Xp Cyclor (Bioer) por 5 minutos a 65°C. Luego se agregó 4µl de buffer 5X el cual ya tiene DTT y 1µl RNAsa Out (40U/ µL), se mezcló y se llevó nuevamente al termociclador por 2 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó 1µl de *M-MLV Transcriptasa Reversa* (200U/ µL), se mezcló y se colocó en el termociclador a 37°C por 50 minutos y luego a 70°C por 15 minutos.

2.7.3 Análisis por RT-PCR

Para poder realizar el análisis de expresión por RT-PCR, primero se diseñaron primers de expresión con ayuda del Software Gene Tool versión 1.0 (<http://www.gene-tools.com>) y se los mandó a sintetizar en la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, Iowa, USA. Luego se realizaron pruebas de estandarización de cada primer, para poder establecer la temperatura de alineamiento y el número de ciclos óptimos (*Anexo 16*) para el análisis de expresión mediante RT-PCR de los genes de interés.

Para el Gen *St aldehído absícisco oxidasa* se usó una mezcla de reacción compuesta por 2,0 µl de Buffer PCR (10x), 1,6 µl de MgCl₂ (25mM), 10,4 µl de agua libre de nucleasas, 2,0 µl de cDNA (10ng/µl), 0,8 µl de dNTP's (10 mM), 1,5 µl de cada primer (5 µM) y 0,2 µl de Taq polimerasa (5U/µl) para completar un volumen final de 20 µl. Las secuencias de los primers utilizados fueron: Forward: 5'-TATTTGGAAAGTTTGCTGG-3' y Reverse: 5'-AAGTGTTTGTCTGGGTCATC-3'. Las muestras se amplificaron en un Termociclador Xp Cyler (Bioer; Japón) con un programa de 33 ciclos (*Anexo 17*) a 94°C por 40s, 50°C por 40s y 72°C por 1 minuto.

Para el gen *Dhn10* se usó una mezcla de reacción compuesta por 2,0 µl de Buffer PCR (10x), 1,6 µl de MgCl₂ (25mM), 12,4 µl de agua libre de nucleasas, 1,0 µl de cDNA (10ng/µl), 0,8 µl de dNTP's (10 mM), 1,0 µl de cada primer (5 µM) y 0,2 µl de Taq polimerasa (5U/µl) para completar un volumen final de 20 µl. Las secuencias de los primers utilizados fueron: Forward: 5'-ATCACAAGATGGAAAAG-3' y Reverse: 5'-TCTAATCACTGTCTGCTGC-3'. Las muestras se amplificaron en un Termociclador Xp Cyler (Bioer, Japón) con un programa de 34 ciclos (*Anexo 18*) a 94°C por 40s, 48°C por 40s y 72°C por 1 minuto.

Como control interno se utilizó la proteína ribosómica 60S (Carvallo *et al.*, 2011). La mezcla de reacción fue: 2,0 µl de Buffer PCR (10x), 1,6 µl de MgCl₂ (25mM), 9,4 µl de agua libre de nucleasas, 2,0 µl de cDNA (10ng/µl), 0,8 µl de dNTP's (10 mM), 2,0 µl de cada primer (5 µM) y 0,2 µl de Taq polimerasa (5U/µl) para completar un volumen final de 20 µl. Las secuencias de los primers

utilizados fueron: Forward: 5'-AACAAAT GGCGGCTAAGAAGA-3' y Reverse: 5'-TGCCCATAAACCCTTTTTG-3'. Las muestras se amplificaron en un Termociclador Xp Cycler (Bioer, Japón) con un programa de 24 ciclos (*Anexo 19*) a 94°C por 40s, 55°C por 40s y 72°C por 1 minuto. El control positivo fue una dilución 10^{-3} del producto de la minipreparación (apartado 2.6.8.2) y el control negativo, agua ultra pura.

Las reacciones de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y tinción con GelRed™ (Biotium, USA), evaluando la presencia de una banda de amplificación de 105 pb para el gen *DHN10*, 159 pb para el gen *St Abscisic aldehyde oxidase* y 100 pb para el gen de control interno (60S). La corrida electroforética se la realiza a 80V durante una hora y media. Como marcador molecular se utilizó el Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, ready to use #SM0333 (Fermentas, USA).

2.7.4 Estimación de expresión relativa a partir de análisis densitométrico de geles de agarosa

Los datos densitométricos de las intensidades de las bandas obtenidas de cada gen en el experimento, fueron generados por el análisis de imágenes que ofrece el programa *Image J* versión 1.45 software (2011), el cual es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health.

Este programa es ideal para comparar bandas de la misma calidad digital. Está basado en el hecho de que la densidad óptica (OD) es una función logarítmica del brillo. Se analizó la densidad de cada banda, tomando como referencia una de las bandas del peso molecular. Una vez obtenidos todos los valores de las bandas de los genes de interés del estudio, se procedió a normalizarlos con respecto a los valores de 60S y se graficó la expresión relativa de dichos genes, con respecto a cada tratamiento y periodos de tiempo (días).

2.7.5 Análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por genotipo; los análisis de varianza (ANOVA) y el test de significancia de Duncan ($p=0.05$) se realizaron con ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.2 para Windows, Software (2002-2008) por el SAS Instituto Inc., Cary, NC, USA (Manejado bajo licencia de INIA-La Platina-Chile).

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1 Verificación de genes insertados: digestión enzimática parcial

Una vez identificados los genes de interés de este estudio, se amplificaron y clonaron sus secuencias. A través de una digestión enzimática parcial con las enzimas Eco RI y Sal I se pudo confirmar que los fragmentos purificados de los dos genes de interés del estudio se insertaron en el plásmido recombinante. El resultado de la digestión se observó en geles de agarosa al 1%. La enzima Eco RI flanqueó el sitio de multiclonamiento (polylinker) del vector pGEM[®]-T Easy, por lo tanto, al digerirlo fue posible liberar el inserto. En el caso del gen *Dhn10*, se observaron dos bandas, la una correspondiente al vector de 3015 pb y la otra propia del gen de 496 pb. Para el gen *St aldehído abscísico oxidasa*, se observó de igual manera dos bandas, la del vector y la del fragmento del gen de 663 pb (figura 11).

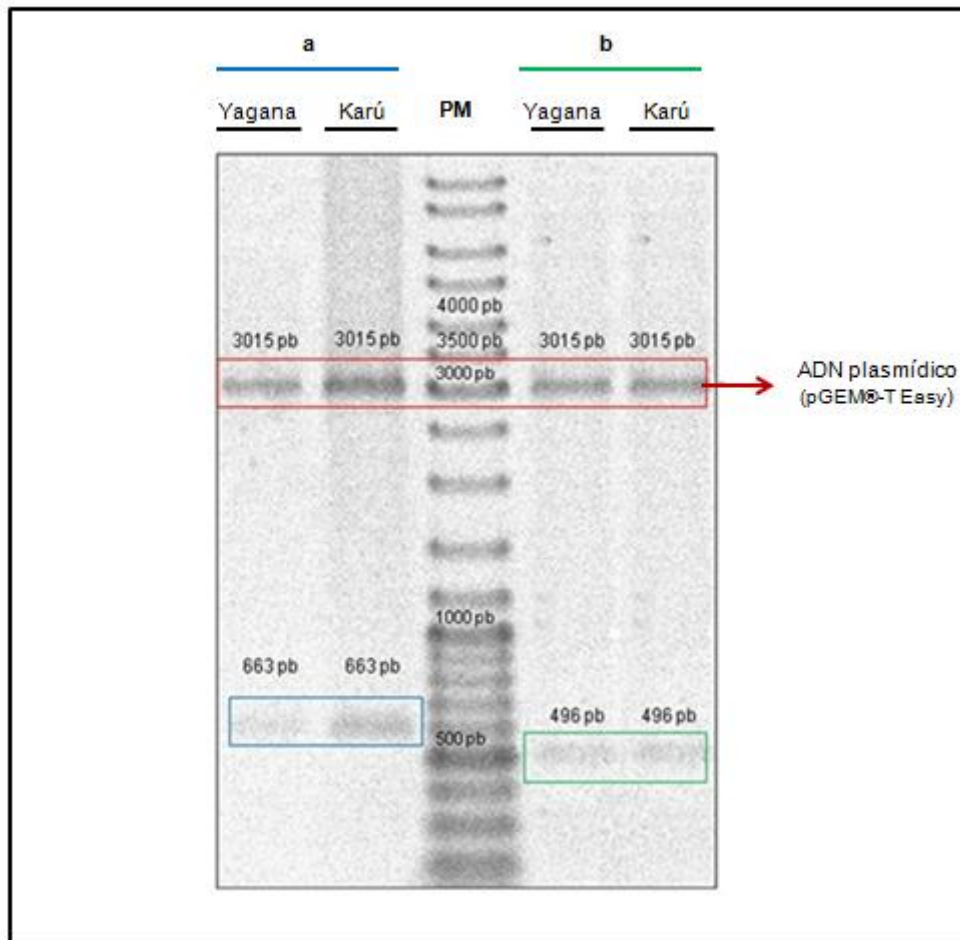


Figura 11. Digestión enzimática parcial con enzima Eco RI. (a) Productos de digestión enzimática: ADN plasmídico (3015pb) e inserto del gen *St aldehído abscísico oxidasa* (663pb) en las variedades Karú y Yagana. (b) Productos de digestión enzimática: ADN plasmídico (3015pb) e inserto del gen *Dhn10* (496pb) en las variedades Karú y Yagana. PM: marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1%, 80V.

La enzima Sal I generó un único sitio de corte en una región del vector pGEM-T Easy distinta al sitio de clonamiento múltiple, por lo que se observó una banda de 3511pb para el gen *Dhn10* y una banda de 3678 pb para el gen *St aldehído abscísico oxidasa*. Los productos de la digestión correspondieron al tamaño del vector + inserto de cada gen (figura 12).

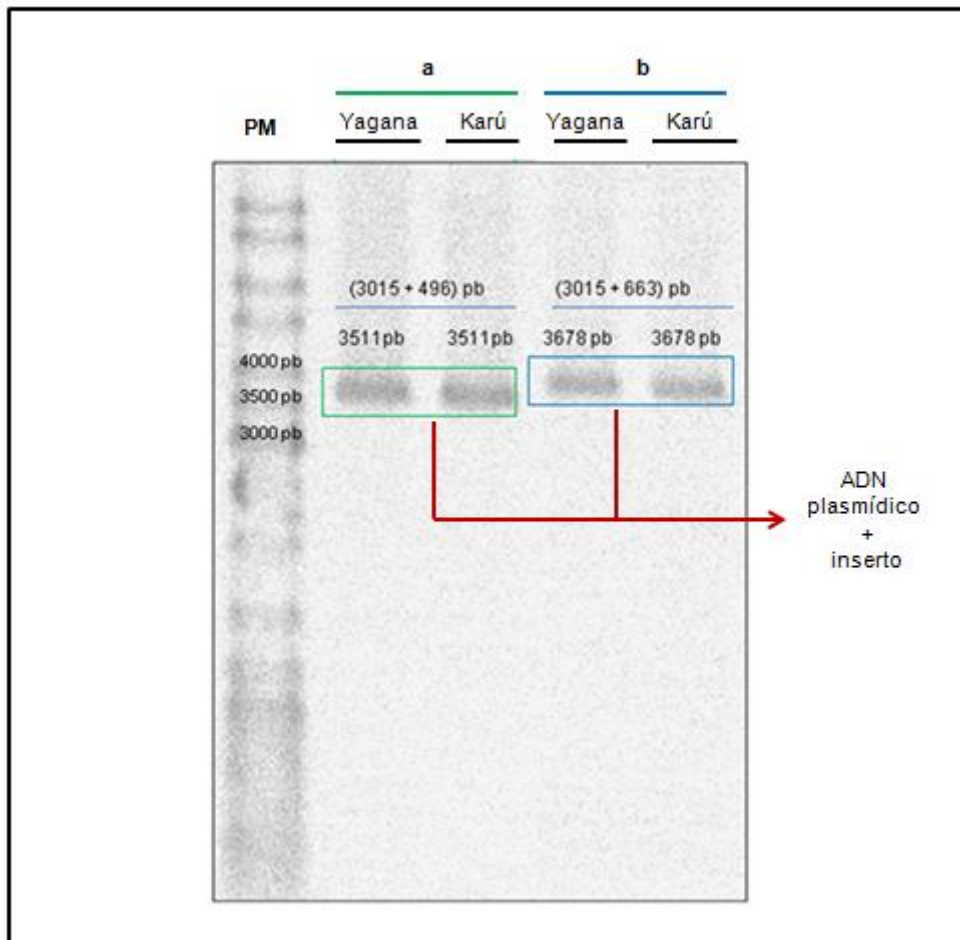


Figura 12. Digestión enzimática parcial con enzima Sal I. (a) Productos de digestión enzimática: ADN plasmídico + inserto del gen *Dhn10* (3511pb) en las variedades Karú y Yagana. (b) Productos de digestión enzimática: ADN plasmídico + inserto del gen *St aldehído abscísico oxidasa* (3678pb) en las variedades Karú y Yagana. PM: marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1%, 80V.

Estos resultados confirmaron la presencia de insertos en el plásmido recombinante (vector pGEM-T Easy). Para tener la certeza de que dichos insertos corresponden a las secuencias de los genes de interés, se envió a secuenciar a Macrogen, para luego realizar un análisis filogenético.

3.2 Análisis filogenético de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*

3.2.1 Gen *St aldehído abscísico oxidasa*

Al analizar la secuencia correspondiente al gen *St aldehído abscísico oxidasa* en la variedad Karú (INIA CRI-La Platina) se obtuvo un amplicón de 663p (*anexo 2*), el cual coincide con la secuencia disponible en la base de datos (NCBI, Acceso: DQ206635) de *Solanum tuberosum*. En la variedad Yagana (INIA CRI-La Platina) la secuencia del amplicón fue de 735pb (*anexo 3*), esta difiere en 72 pb a partir de la base 180 (5'-3') de la secuencia de la variedad Karú, presentando 23 aminoácidos extras.

Posteriormente, estas secuencias fueron ordenadas mediante alineamientos para el diseño de los árboles filogenéticos (figura 13), a partir de las secuencias de aminoácidos obtenidas para el gen *St aldehído abscísico oxidasa* en las variedades Karú y Yagana y las secuencias de enzimas ortólogas en otras especies.

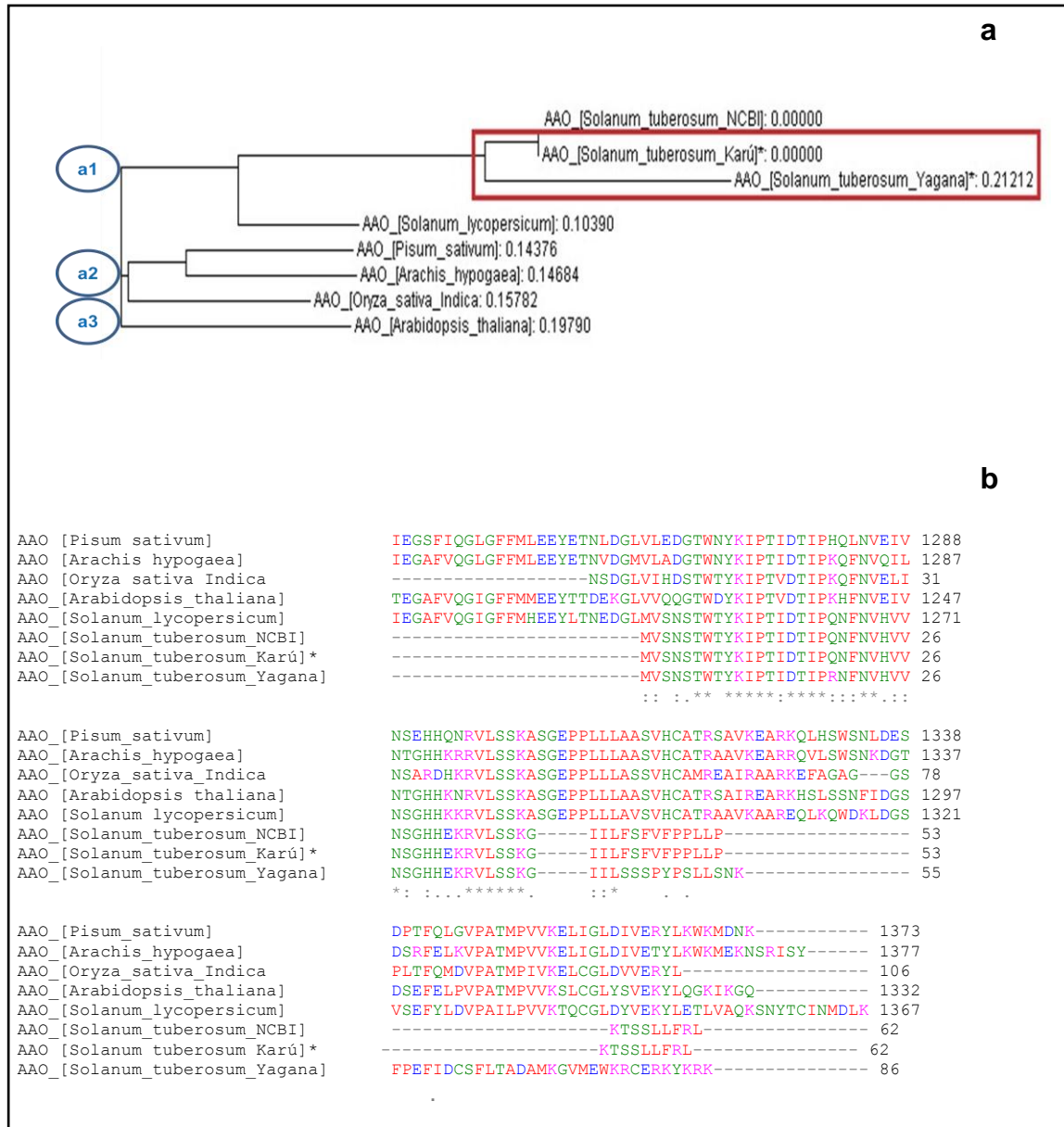


Figura 13. Relación filogenética de la proteína aldehído abscísico oxidasa (AAO). (a) Dendrograma construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas: NP_001234456.1 (aldehyde oxidase, *Solanum lycopersicum*), BAA82672.1 (aldehyde oxidase, *Arabidopsis thaliana*), ABR25866.1 (aldehyde oxidase 1, *Oryza sativa Indica* Group), ABS32108.1 (aldehyde oxidase 1, *Pisum sativum*), ABY52975.1 (Aldehyde oxidase, *Arachis hypogaea*), DQ206635 (St abscisic aldehyde oxidase, *Solanum tuberosum*) y las secuencias obtenidas para Karú y Yagana (encerradas en el recuadro rojo); con ayuda del programa MEGA (Versión 5.01, 2011), mediante un análisis de tipo UPGMA (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011). (b) Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de proteínas del tipo AAO con la herramienta CLUSTALW2 disponible en el sitio del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

En el dendograma se puede observar la conformación de 3 grupos (figura 13a1, 13a2 y 13a3). En el primero se ubican las secuencias del gen *St aldehído abscísico oxidasa* de las especies de la familia Solanácea, el cual presenta dos subgrupos adicionales. En el primer subgrupo se aprecian las secuencias obtenidas en el presente estudio con las variedades de papa Karú y Yagana junto con la secuencia de la base de datos, en el segundo se observa otra especie de la misma familia, el tomate riñón (*Solanum lycopersicum*).

El segundo grupo del dendograma también presentó dos subgrupos más, en el primero se ubicaron dos especies de la familia de las Fabáceas y en el segundo una especie de la familia de las Poáceas.

Dentro del tercer grupo se ubicó *Arabidopsis thaliana* de la familia de las Brassicáceas.

Al comparar las distancias obtenidas entre estas especies, se determinó que son mínimas, ya que tras el alineamiento de sus secuencias estas alcanzaron porcentajes de identidad superiores al 90%.

En la figura 13b se puede visualizar un bajo porcentaje de alineamiento de las secuencias de las variedades Karú y Yagana, con respecto a las secuencias de otras especies, debido a la poca información de este gen en *Solanum tuberosum*.

En la figura 14 se puede observar la diferencia de las secuencias aminoacídicas de Karú y Yagana, diferencia que puede influir en su comportamiento frente al déficit hídrico.

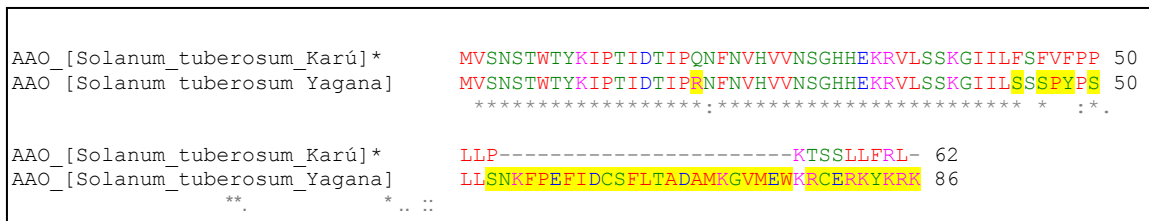


Figura 14. Alineamiento de secuencias obtenidas en las variedades Karú y Yagana de *Solanum tuberosum*. Los aminoácidos en los cuales difieren ambas secuencias se encuentran resaltados (23 aminoácidos).

3.2.2 Gen *Dhn10*

La secuencia con el amplicón correspondiente al gen *Dhn10* en la variedad Karú (INIA CRI-La Platina) fue de 504pb (*anexo 4*), la cual difiere en 8pb más de la secuencia disponible en la base de datos del gen de la *Dhn10* en *Solanum commersonii* (NCBI, acceso: EU849680). Mientras que el tamaño de la secuencia en la variedad Yagana (INIA CRI-La Platina) fue de 499pb (*anexo 5*), con apenas 3pb más que la secuencia de la base de datos (NCBI, acceso: EU849680).

En la figura 15 se observa el árbol filogenético diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida para el gen *Dhn10* en las variedades Karú y Yagana; así como otras secuencias aminoacídicas de enzimas ortólogas en otras especies.

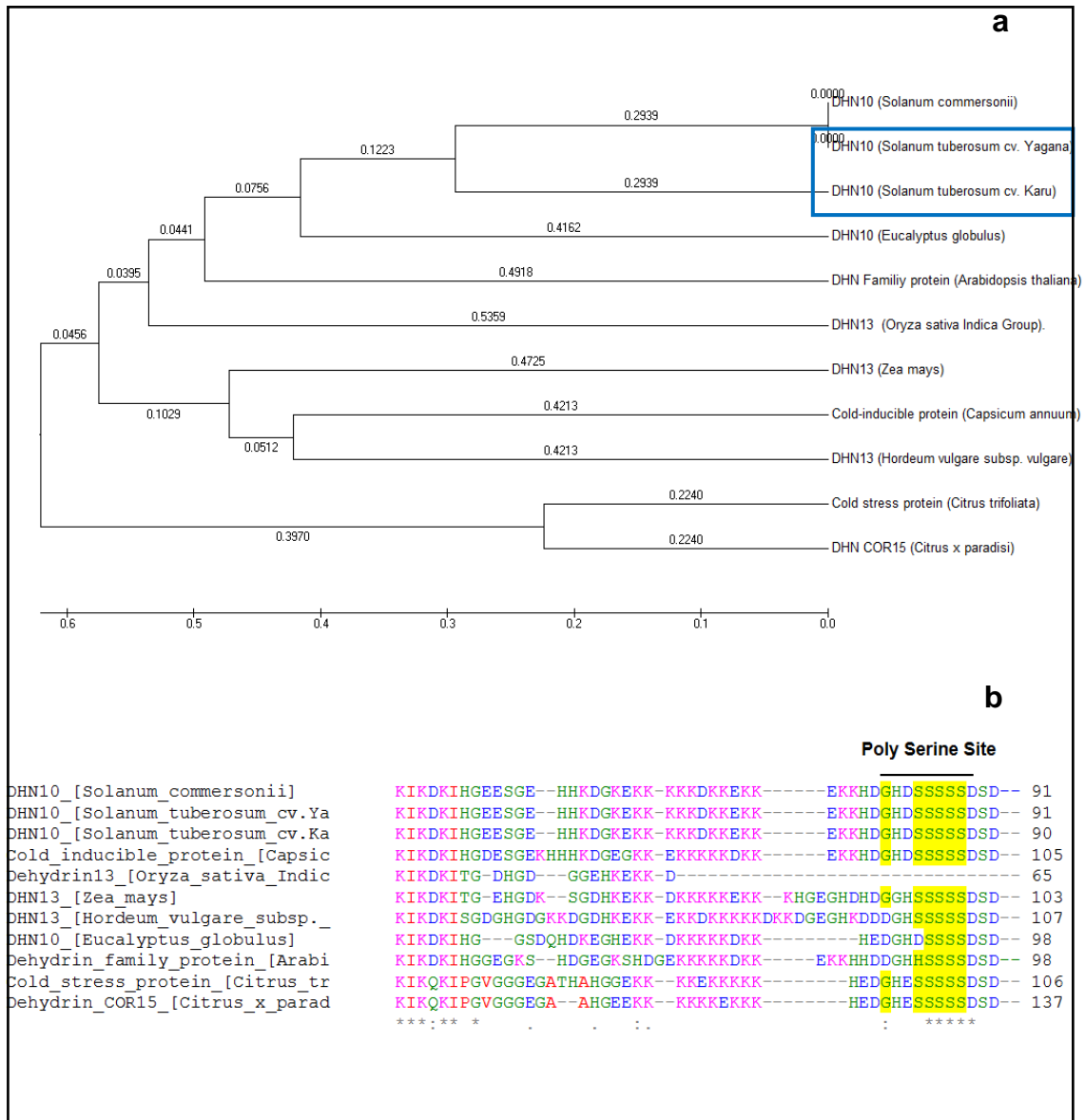


Figura 15. Relación filogenética de la proteína DHN10. (a) Dendrograma construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas: ACJ26759.1 (DHN10, *Solanum commersonii*). AER27689.1 (Dehydrin 10, *Eucalyptus globulus*). ABR25707.1 (dehydrin 13, *Oryza sativa* Indica Group). AAX20043.1 (cold-inducible protein, *Capsicum annum*). AAT81473.1 (dehydrin 13, *Hordeum vulgare* subsp. Vulgare). NP_175843.1 (dehydrin family protein, *Arabidopsis thaliana*). AAA99963.1 (cold stress protein, *Citrus trifoliata*). AAK52077.1 (dehydrin COR15, *Citrus x paradisi*). ACG34745.1 (dehydrin 13, *Zea mays*) y las secuencias obtenidas para Karú y Yagana (encerradas en el recuadro azul); con ayuda del programa MEGA (Versión 5.01, 2011), mediante un análisis de tipo UPGMA (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011). (b) Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de proteínas del tipo DHN con la herramienta CLUSTALW2 disponible en el sitio del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Las secuencias aminoacídicas idénticas fueron resaltadas con amarillo (Segmento S: Poli Ser).

En el dendograma de la figura 15a se puede observar la conformación de varios grupos y subgrupos que comprenden especies de las familias Solanácea, Poácea, Rutácea, Mirtácea y Brassicácea. Es importante destacar es que las secuencias correspondientes a la enzima codificada por el gen *Dhn10*, obtenidas en las variedades Karú y Yagana en *Solanum tuberosum* y la secuencia de la base de datos del gen *Dhn10* en *Solanum commersonii*, fueron ubicadas dentro de un mismo grupo. El alineamiento realizado con estas secuencias permitió determinar que todas estas especies alcanzaron porcentajes de identidad superiores al 50%.

En los alineamientos de las secuencias aminoacídicas en especies ortólogas (figura 15b) se pudo identificar secuencias aminoacídicas idénticas que presentan un motivo conservado llamado Segmento S: Poli Ser, característico de todas las dehidrasas, también fue posible identificar el segmento K, propio de las dehidrasas del tipo K-S, como lo es la dehidrasa 10.

La secuencia identificada en la variedad Karú presentó la ausencia de un aminoácido con respecto a Yagana y a la secuencia de la base de datos (figura. 16). Esta diferencia puede influir en su comportamiento frente al déficit hídrico.

```

AAO [Solanum tuberosum Karú]*      MAGIIHKIEEKLHIGGGHKEEEHKEEHKEGEHK-EEHKEGFVEKIKDKI 49
AAO [Solanum tuberosum Yagana]     MAGIIHKIEEKLHIGGGHKEEEHKEEHKEGEHKKEEHKEGFVEKIKDKI 50
                                     *****

AAO [Solanum tuberosum Karú]*      HGEESGEHHKDGKEKKKKKDKKEKKEKKHDGHDSSSSSDSD 90
AAO [Solanum tuberosum Yagana]     HGEESGEHHKDGKEKKKKKDKKEKKEKKHDGHDSSSSSDSD 91
                                     *****

```

Figura 16. Alineamiento de secuencias obtenidas tras secuenciación en MacroGen de las variedades Karú y Yagana de *Solanum tuberosum*. El aminoácido en el que difieren ambas variedades se indica resaltado (K).

3.3 Análisis de la expresión de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*

La expresión de estos dos genes fue evaluada a partir de cDNA de hojas de plantas de papa de las variedades Karú y Yagana, sometidas a tres tratamientos de riego: 100% (sin restricciones de riego), 50% (con la mitad de restricciones de riego) y 25% (con restricciones de riego); correspondientes a los días 0,1, 7 y 14, a partir de la tuberización.

3.3.1 Gen *St aldehído abscísico oxidasa*

La figura 17, muestra la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en la variedad Karú.

En el gel se puede observar claramente un incremento en la intensidad de las bandas con respecto a los días en que se analizó dicha expresión y a los tratamientos de riego (figura 17a), lo que sugiere que esta variedad presente una respuesta frente al déficit hídrico. Se destacan las bandas obtenidas el día 14 en cada uno de los tratamientos.

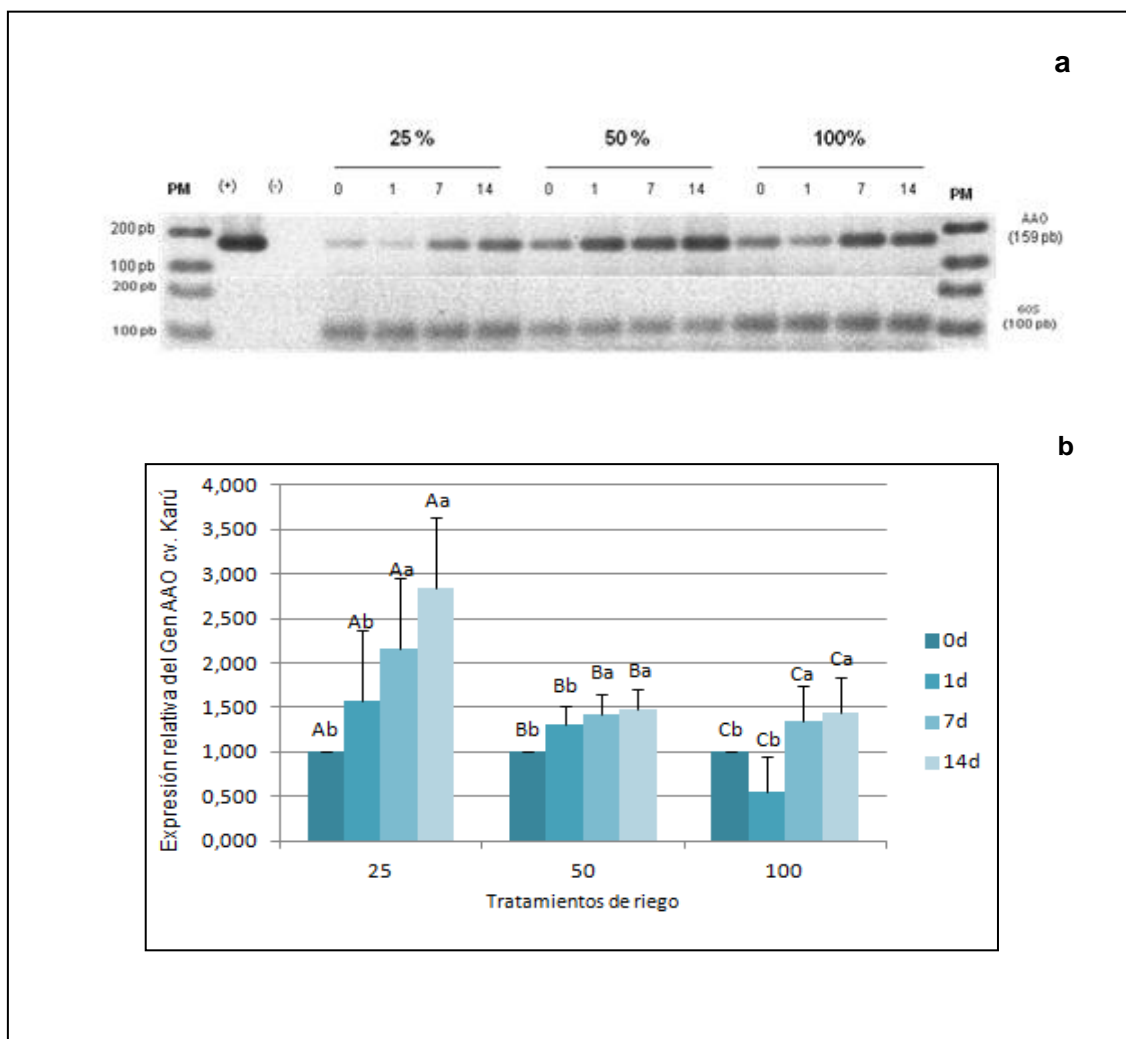


Figura 17. Análisis de la expresión relativa del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en *Solanum tuberosum* cv. Karú. a) Expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en *Solanum tuberosum* cv. Karú y del gen 60S Control Interno. RT-PCR establecida para 100 ng de cDNA. Tratamientos de riego (25, 50 y 100 %). Días 0, 1, 7 y 14. (+) Control positivo. (-) Control negativo. (PM) Peso molecular. Geles de agarosa 2,5%. b) Niveles de expresión génica relativa. El análisis densitométrico de la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), se realizó con ayuda del programa *Image J* versión 1.45 (2011). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados usando el gen de control interno de papa 60S. Para cada tratamiento el día 0 fue fijado en 1 y los otros valores se ajustan a éste. Valores de \pm SD para $n=4$. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos de riego, según prueba de Duncan ($p < 0.0001$); letras minúsculas indican diferencias entre los días, según prueba de Duncan ($p=0.0001$).

El análisis estadístico (ANOVA, *anexo 22*) mostró diferencias significativas tanto en la expresión del gen frente a los tratamientos de riego ($p < 0,001$), a los días en que se analizó la expresión del gen ($p < 0,001$) y a la interacción de ambos ($p = 0,002$). Con estos datos se confirmó lo observado en geles de agarosa (figura 17a), en los cuales se observa un incremento en la expresión relativa del gen en cada tratamiento en el transcurso de los días con respecto al día 0. El tratamiento en el cual se observó mayor expresión fue el del 25%, seguido del 50% y el 100%, lo cual claramente indica una respuesta de esta variedad frente al déficit hídrico. Se destacó la muestra del día 14 con el tratamiento al 25%, la cual estuvo con la mayor restricción hídrica. La prueba de Duncan generó tres subconjuntos de confianza (A, B y C) para cada tratamiento hídrico, indicando que los tratamientos son completamente diferentes. Adicionalmente, generó dos subconjuntos de confianza para los períodos de tiempo, los días 0 y 1 se ubicaron dentro del mismo subconjunto (b), y los días 7 y 14 dentro del mismo subconjunto (a) (figura 17b).

La figura 18 muestra la expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en la variedad Yagana.

Se puede observar claramente en el gel que no hubo un incremento en la intensidad de las bandas con respecto al tiempo y a los diferentes tratamientos de riego, es decir la expresión se mantuvo uniforme (figura 18a). Esto sugiere que esta variedad no está presentando una respuesta frente al estrés hídrico.

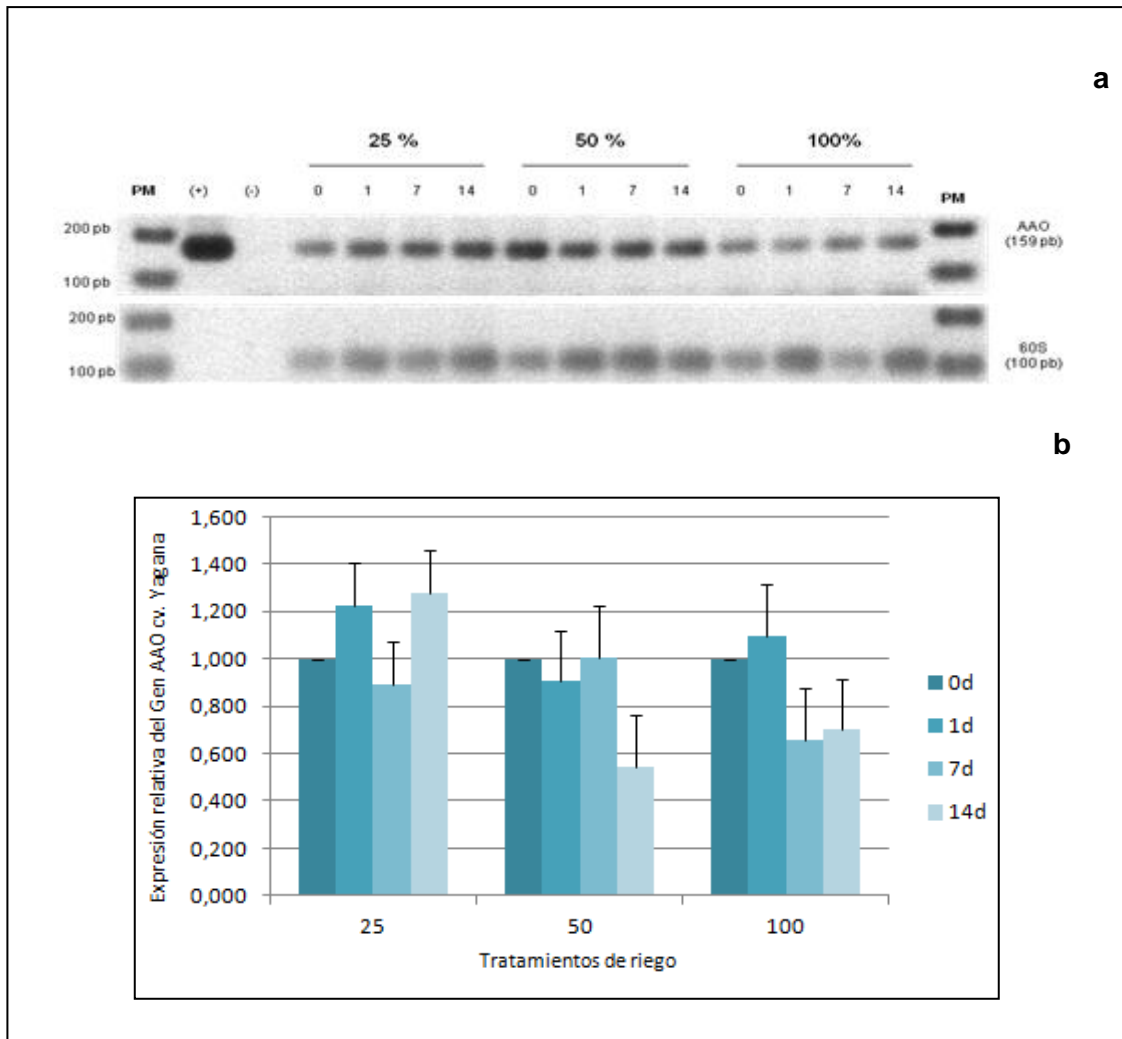


Figura 18. Análisis de la expresión relativa del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en *Solanum tuberosum* cv. Yagana. (a) Expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en *Solanum tuberosum* cv. Yagana y del gen 60S Control Interno. RT-PCR establecida para 100 ng de cDNA. Tratamientos de riego (25, 50 y 100 %). Días 0, 1, 7 y 14. (+) Control positivo. (-) Control negativo. (PM) Peso molecular. Geles de agarosa 2,5%. (b) Niveles de expresión génica relativa. El análisis densitométrico de la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó con ayuda del programa *Image J* versión 1.45 (2011). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados usando el gen de control interno de papa 60S. Para cada tratamiento el día 0 fue fijado en 1 y los otros valores se ajustan a éste. Valores de \pm SD para $n=4$. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de riego y días.

El análisis estadístico (ANOVA, *anexo 23*) no mostró diferencias significativas debido al tratamiento de déficit hídrico ($p=0,0996$)^{n.s}, ni a los períodos de tiempo en que se analizó la expresión del gen ($p=0,2101$)^{n.s} (*figura 18b*).

La expresión del gen fue similar en todos los tratamientos y días, lo cual confirma lo observado en el gel de agarosa.

3.3.2 Gen *Dhn10*

La *figura 19*, muestra la expresión del gen *Dhn10* en la variedad Karú.

En el gel se puede apreciar que todos los tratamientos presentan un comportamiento similar, es decir un incremento en la intensidad de las bandas con respecto al tiempo (*figura 19a*). Esto indica que la expresión del gen *Dhn10* en Karú incrementa con el paso del tiempo, independientemente de los tratamientos de riego.

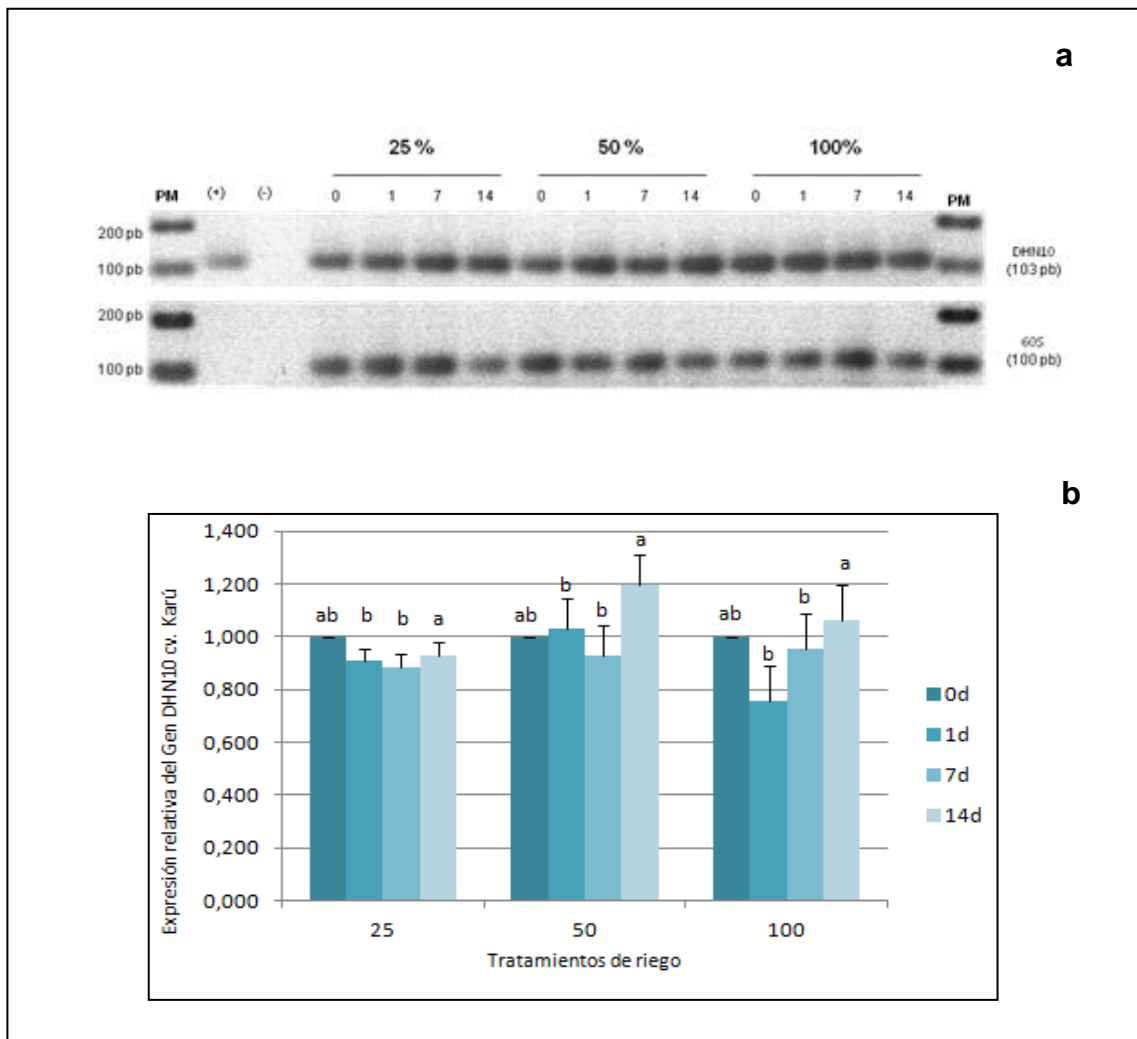


Figura 19. Análisis de la expresión relativa del gen *Dhn10* en *Solanum tuberosum* cv. Karú. (a) Expresión del gen *Dhn10* en *Solanum tuberosum* cv. Karú y del gen 60S Control Interno. RT-PCR establecida para 100 ng de cDNA. Tratamientos de riego (25, 50 y 100 %). Días 0, 1, 7 y 14. (+) Control positivo. (-) Control negativo. (PM) Peso molecular. Geles de agarosa 2,5%. (b) Niveles de expresión génica relativa. El análisis densitométrico de la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó con ayuda del programa *Image J* versión 1.45 (2011). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados usando el gen de control interno de papa 60S. Para cada tratamiento el día 0 fue fijado en 1 y los otros valores se ajustan a éste. Valores de \pm SD para $n=4$. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre los días, según prueba de Duncan ($p=0.0374$).

El análisis estadístico (ANOVA, *anexo 24*) mostró diferencias significativas únicamente en los días en que fue analizada la expresión relativa del gen ($p=0,0374$). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de riego ($p=0,2941$) ^{n.s.}. La prueba de Duncan generó tres subconjuntos de confianza (a, b y ab) para los períodos de tiempo, los días 1 y 7 se ubicaron dentro del mismo subconjunto (b), el día 0 en el subconjunto ab y el día 14 en el subconjunto (a) (figura 19b).

Estos datos confirmaron lo observado en el gel de agarosa, únicamente el tiempo influye en el incremento de la expresión de este gen en Karú.

La figura 20, muestra la expresión del gen *Dhn10* en Yagana. Se puede observar claramente en el gel que no hubo ningún cambio en la intensidad de las bandas, es decir fue uniforme (figura 20a). Esto sugiere que ni los tratamientos, ni el paso del tiempo influyen en la expresión de este gen en esta variedad.

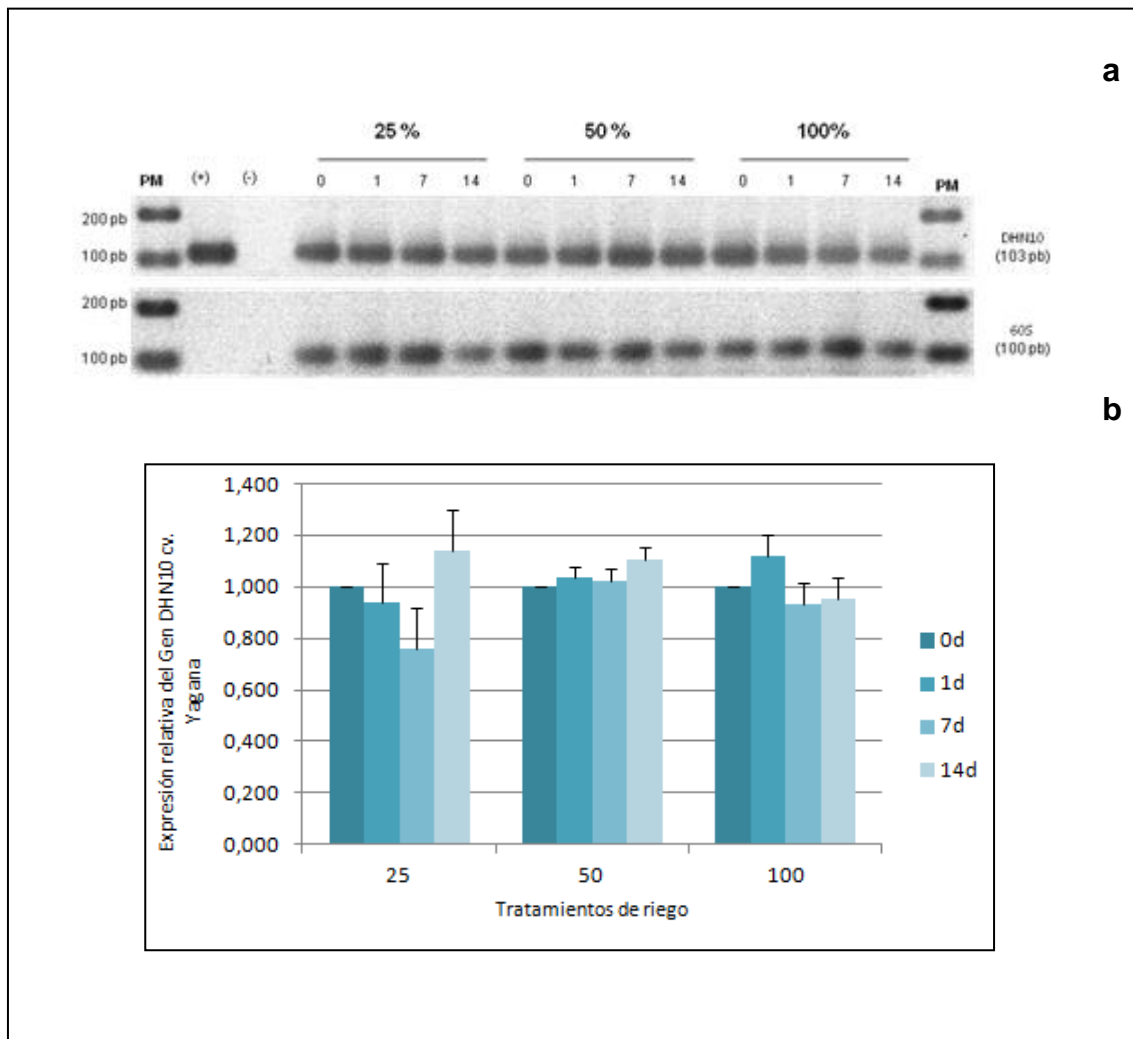


Figura 20. Análisis de la expresión relativa del gen *Dhn10* en *Solanum tuberosum* cv. Yagana. a) Expresión del gen *Dhn10* en *Solanum tuberosum* cv. Yagana y del gen 60S Control Interno. RT-PCR establecida para 100 ng de cDNA. Tratamientos de riego (25, 50 y 100 %). Días 0, 1, 7 y 14. (+) Control positivo. (-) Control negativo. (PM) Peso molecular. Geles de agarosa 2,5%. (b) Niveles de expresión génica relativa. El análisis densitométrico de la Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó con ayuda del programa *Image J* versión 1.45 (2011). Los niveles de expresión relativa fueron normalizados usando el gen de control interno de papa 60S. Para cada tratamiento el día 0 fue fijado en 1 y los otros valores se ajustan a éste. Valores de \pm SD para n=4. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de riego y días.

El análisis estadístico (ANOVA, *anexo 25*) no mostró diferencias significativas debido al tratamiento de déficit hídrico ($p=0,7148$), tampoco a los días en que se analizó la expresión ($p=0,2210$) (*figura 20b*). Dicha expresión fue similar en todos los tratamientos y días, confirmando lo observado en el gel de agarosa.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

Se ha determinado que en condiciones de sequía se activan unos 200 genes (con mayor o menor expresión) (Pino *et al.*, 2011), información valiosa para desarrollar variedades tolerantes al estrés hídrico que pueden mitigar daños que reducen la cosecha en los distintos cultivos a mediano y largo plazo. Es por esta razón que este estudio pretende determinar la presencia de dos genes asociados a tolerancia a déficit hídrico en las variedades INIA, Karú y Yagana; además de conocer cómo dichos genes se expresan en cada variedad, para obtener información necesaria para estos planes de mejoramiento.

Las variedades Karú y Yagana fueron escogidas debido a que son ampliamente plantadas en Chile y debido al impacto que éstas han tenido en el Mercado Nacional, generando importantes ingresos al sector agrícola.

A nivel experimental, se ha confirmado que los fragmentos purificados de los dos genes de interés de este estudio se insertaron en el plásmido recombinante, por ello fue posible mandarlos a secuenciar y posteriormente realizar un análisis filogenético.

Al comparar el fragmento del gen *St aldehído abscísico oxidasa*, aislado de las variedades Karú y Yagana de *Solanum tuberosum* (Familia Solanácea), con base en los resultados del análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) de la base de datos de GenBank, se corroboró que el fragmento secuenciado, efectivamente, corresponde al gen *St aldehído abscísico oxidasa*.

Este trabajo permitió asociar los resultados de secuenciación obtenidos, con proteínas funcionalmente similares, descritas en plantas superiores, como: el tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), perteneciente a la misma familia de la papa (Solanáceas), la arveja (*Pisum sativum*) y el maní (*Arachis hypogaea*) de la familia de las Fabáceas, el arroz (*Oryza sativa*) de la familia de las Poaceas,

Arabidopsis thaliana de las Brassicáceas, alcanzando porcentajes de identidad superiores al 90%.

Hay que mencionar que en papa sólo está descrita una secuencia parcial del gen *St aldehído abscísico oxidasa*, pero por homología de secuencias fue posible inferir que ésta corresponde al gen de interés, haciéndolo válido para el estudio de expresión.

Gracias al análisis comparativo del gen *Dhn10*, se confirmó la similitud de las secuencias de Karú y Yagana, con respecto a la secuencia del gen *Dhn10* descrita para *Solanum commersonii*, tomada de la base de datos GenBank. También fue posible asociar dichas secuencias con genes que codifican para proteínas funcionalmente similares, descritas en plantas superiores, como: el pimiento (*Capsicum annum*) perteneciente a la misma familia de la papa (Solanáceas), el arroz (*Oryza sativa*), el maíz (*Zea mays*) y la cebada de la familia de las Poáceas; el naranjo espinoso (*Citrus trifoliata*) y el pomelo (*Citrus x paradisi*) de la familia de las Rutáceas, el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) de la familia de las Mirtáceas y finalmente *Arabidopsis thaliana* de las Brassicáceas, alcanzando porcentajes de identidad superiores al 50%.

En condiciones de estrés, como el hídrico, la biosíntesis del ABA se ve favorecida. La aldehído oxidasa, cataliza el paso de oxidación del aldehído abscísico a ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). Esto sugiere que al encontrar expresión del gen que codifica para dicha enzima, se podría saber si la planta está o no respondiendo al estrés. En estudios anteriores se ha descrito que el transcrito del gen de la aldehído abscísico oxidasa se acumula ante la falta de agua (Seo *et al.*, 2000).

La figura 17 de la sección Resultados, muestra cómo en la variedad Karú, el nivel de expresión relativa es mayor en las plantas que estuvieron sometidas a un régimen de riego más restrictivo. Independientemente del tratamiento aplicado, la expresión relativa tuvo un aumento, a medida de que pasaba el

tiempo. Este incremento en la expresión, se encuentra respaldada por las evidencias reportadas previamente en la literatura (Schroeder *et al.*, 2001).

Mientras que en la variedad Yagana, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa, con respecto al tratamiento hídrico, ni a los días en que se realizó el análisis, como lo indica la figura 18 de la sección Resultados. Se ha propuesto que los niveles de ácido abscísico en una planta serían determinantes en su comportamiento frente a una condición de estrés. Esto sugiere que esta variedad es más sensible al estrés hídrico y que le cuesta iniciar una respuesta rápida frente al mismo, a diferencia de la variedad Karú; corroborando los datos obtenidos en estudios anteriores, en donde ha presentado tolerancia a sequía inducida con polietilenglicol (PEG) a nivel *in vitro* (Kalazich y Pino, 2011). Es debido a este precedente, que Karú fue escogida como una buena candidata para éste estudio.

Incluso luego de haber hecho un estudio de las secuencias obtenidas tanto para Karú como para Yagana, se logró evidenciar diferencias. Yagana posee 23 aminoácidos más que Karú; lo cual podría estarle dando una configuración y comportamiento distintos a la enzima (figura 14, Sección Resultados).

También se podría aludir este tipo de comportamiento en la variedad Yagana, a los altos niveles de carotenoides que suelen estar presentes en las hojas; los cuales no son susceptibles de contribuir positivamente a la síntesis de ABA, incluso bajo condiciones de estrés (Audran *et al.*, 1998). Es decir, quizás la variedad Yagana presente mayor contenido de carotenoides en sus hojas que la variedad Karú, lo cual podría determinarse en futuros estudios.

En esta investigación también se presentan las características de la secuencia y el patrón de expresión de una dehidrina *Solanum*, denominada DHN10 en las variedades antes mencionadas. A diferencia de la mayoría de dehidrinas, los segmentos K y S se encuentran sólo en copias únicas en la secuencia DHN10 y el segmento- S está en la posición C-terminal. La búsqueda en las bases de

datos revela que las dehidrinas del tipo KS constituyen una subclase específica del grupo II de las proteínas LEA (Galau *et al.*, 1986).

La variedad Karú presentó una respuesta frente al déficit hídrico, incrementando la expresión del gen *Dhn10*, asociado a protección frente a dicho déficit con el paso del tiempo. Los tratamientos de déficit hídrico no fueron significantes para dicha respuesta, como lo indica la figura 19 de la sección Resultados, esto se debe a que la presencia de las dehidrinas del tipo KS en hojas varía de acuerdo a la edad de la planta. Bajo condiciones de control se han encontrado grandes cantidades de la dehidrina DHN10, sobre todo en las flores, tallos, tubérculos y hojas jóvenes en desarrollo. En otras solanáceas y en cebada (*Hordeum vulgare L.*), la cantidad de DHN10 es mucho más elevada en hojas jóvenes que en las hojas viejas (Rorat *et al.*, 2003 y Pawlowicz *et al.*, 2004). Mientras que en condiciones de estrés, existen mayores niveles de proteína sólo en hojas maduras. Es decir, la expresión del gen *Dhn10* en hojas bajo estrés, depende del estado de desarrollo de la planta (Broin *et al.*, 2003).

En la variedad Yagana, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión relativa del gen (figura 20, sección Resultados). Es decir la expresión fue muy parecida en todos los tratamientos y con el paso del tiempo tampoco se logró observar diferencias. Estos resultados indican claramente que las dehidrinas del tipo KS están presentes en un alto nivel en ausencia de estrés durante el crecimiento vegetativo y que su expresión está regulada principalmente por factores relacionados con el tipo de órgano y a la etapa de desarrollo de las hojas.

Las características específicas de las secuencias conservadas de la DHN10 pueden ser las que le otorguen el papel potencial de protección a la planta. Las dehidrinas tipo KS podrían ayudar a estabilizar las membranas frente a la deshidratación a través de sus α -hélices anfipáticas (Close, 1997). En la figura 16 de la sección Resultados, se puede apreciar la pequeña diferencia que existe entre la secuencia del gen *Dhn10* en la variedad Karú y Yagana. Esta

diferencia es de apenas un aminoácido, pero este pequeño cambio podría estar alterando su conformación y por ende su actividad catalítica, haciéndola en este caso más tolerante que Yagana.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que las herramientas moleculares como el aislamiento de genes y el análisis de sus niveles de expresión, son muy útiles dentro del proceso de selección de variedades para el mejoramiento agrícola. La presencia de genes que respondan a diferentes tipos de estrés abiótico, como lo es el déficit hídrico, dan una pauta a los investigadores para desarrollar variedades que sean capaces de resistir a las consecuencias del cambio climático bajo el cual se encuentra el planeta, debido al calentamiento global.

CAPITULO 5: CONCLUSIONES.

- Las secuencias que se amplificaron y clonaron de los genes *Dhn10* y el *St aldehído abscísico oxidasa* en las variedades Karú y Yagana, presentan altos porcentajes de identidad con genes de otras especies, validándolas para el estudio de expresión.
- Los primers diseñados para la amplificación de los genes *Dhn10* y el *St aldehído abscísico oxidasa*, son eficaces para identificar las secuencias en las variedades analizadas (Karú y Yagana), puesto que los resultados observados se ajustan a lo previsto en el estudio *in sílico*.
- Las diferencias estadísticas significativas, encontradas en la expresión de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10* en la variedad Karú, indican que la acumulación de las enzimas relacionadas a cada uno de estos genes puede estar asociada con la mayor tolerancia de esta variedad a condiciones de restricción hídrica.
- Las diferencias en las secuencias de las enzimas que son codificadas por los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10* en las variedades Karú y Yagana, pueden cambiar su conformación y actividad catalítica, dando mayor o menor tolerancia a condiciones de restricción hídrica.
- El gen *Dhn10* puede ser considerado, como un gen de carácter constitutivo y necesario para el mantenimiento de la función celular basal de la planta, ya que se expresa en condiciones normales en hojas jóvenes, mientras que en condiciones de estrés, existen mayores niveles de expresión sólo en hojas maduras.
- La dehidrina DHN10 presenta un rol potencial durante el desarrollo de la planta y frente a la tolerancia a estreses abióticos.

- La técnica de RT-PCR convencional es una buena opción para este tipo de estudio, ya que con esta, se puede observar directamente la banda del tamaño esperado del gen (en el gel) y se puede realizar una cuantificación densitométrica de la misma, independiente de cualquier posible banda inespecífica que pueda aparecer o cualquier otro factor que produzca amplicones alternativos aparte del de interés.
- La comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia que exhiben muchas plantas a las condiciones de estrés hídrico plantea un desafío futuro de gran trascendencia ya que cada vez se observa con mayor frecuencia la pérdida de tierras de cultivo a causa de la desertización en todo el mundo.
- El mejoramiento genético con el objeto de mejorar la tolerancia a estrés abiótico es una forma de optimizar los rendimientos en un cultivar.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Es importante realizar mediciones fisiológicas como la conductancia estomática, eficiencia de la fotosíntesis, intercambio gaseoso, transpiración y producción por planta en papa, para fortalecer los resultados obtenidos en la parte molecular.
- Es importante determinar la cantidad de la dehidrina DHN10 y de ABA en hojas de papa bajo las mismas condiciones de déficit hídrico, para respaldar los datos de expresión obtenidos en el análisis molecular, mediante Western Blot y ELISA, respectivamente.
- Se recomienda aislar, secuenciar y analizar la expresión de otros genes presentes en la ruta de biosíntesis del ABA y otras rutas asociadas a tolerancia al estrés en papa, permitiendo así construir una genoteca que proporcione información genética de forma más eficiente al Programa de Mejoramiento del INIA.
- Para estudios de expresión en los cuales se deba analizar una gran cantidad de muestras, se recomienda realizar primero un análisis por RT-PCR convencional para preseleccionar las muestras ideales para realizar una qRT-PCR, evitando así la presencia de falsos positivos y dando mayor consistencia a los resultados.
- Para evaluar la expresión génica relativa a través de densitometría, es necesario estandarizar las condiciones de corrida del gel, como el tipo agarosa, el buffer, la concentración del gel, el agente intercalante usado como marcador de ácidos nucleicos y con ello determinar la capacidad lineal de este sistema con respecto a la cantidad de cDNA presentado por un marcador de peso molecular cuantificable.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hikosawa, D., Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid regulated gene expression. *Plant Cell*. Vol. 10, Págs. 1859-1868.
- Acevedo, E., Silva, H. y Silva, P. (1998). Tendencias actuales de la investigación en la tolerancia al estrés hídrico de las plantas cultivadas. Universidad de Chile. *Boletín técnico de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Forestales, Chile*. Vol. 49, Págs.1-28.
- Alsharari, S., Alsadon, A.A., y Alharbi, A.R. (2007). Evaluation of drought tolerance of potato cultivars under greenhouse conditions. *Acta Horticulturae*. Vol. 747, Págs. 67-74.
- Andre, C.M., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., Herrera, M.R., Hoffmann, L., Hausman, J.F., Larondelle, Y., y Evers, D. (2007). Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant y mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55, Págs. 366-378.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Bio*. Vol.55, Págs. 373-99.
- Audran C, Borel C, Frey A, Sotta B, Meyer C, et al. (1998). Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol*. Vol. 118, Págs.1021–28.
- Azcon Bieto, J., y Talon, M. (1993). Fisiología y bioquímica vegetal. Interamericana McGraw-Hill, Madrid. Pág. 581.

- Baker, S., Wilhelm, K., y Thomashow, M. (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold, drought and ABA regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.* Vol.24, Págs. 701-713.

- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science.* Vol.89, Págs. 1113-1121.

- Broin, M., Besse, I., Rey, P. (2003). Evidence for post-translational control in the expression of a gene encoding a plastidic thioredoxin during leaf development in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiol Biochem.* Vol.41, Págs. 303–308.

- Brown, T. A. 1990. Gene Cloning. Segunda edición. *Chapman and May.* Pág. 286.

- Burlingame, B., Mouille, B., Charrondie'e, U. R. (2009). Review: Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis.* Vol. 22, Págs. 494-502.

- CGIAR. (2007). Global Climate Change: Can Agriculture Cope. Consulta en línea: 2012-06-10, <http://www.cgiar.org/impact/global/climate.html>

- Campbell, S.A., y Close, T.J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* Vol. 137, Págs. 61–74.

- Chaman, B. (2007). Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. inducido por NaCl. *Arnaldoa.* Vol. 14. Págs. 251- 258.

- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M. (2002). A unique short-chain

dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*. Vol.14, Págs. 2733–2740.

- Chutipaijit, S.; Cha-um, S. y Sompornpailin, K. (2008). Influence of drought stress on proline and anthocyanin accumulations in *indica* rice cultivars. *KMITL Sci.* Vol.8, Págs. 41-47.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*. Vol. 100, Págs. 291–296.
- Contreras, A. M. (2008). Uso de especies silvestre y cultivada en el mejoramiento de la papa. *Agro sur*. Vol.36, Págs.115-129.
- Corell, M. (2009). Efecto del estrés hídrico en la fisiología, producción y calidad de los aceites esenciales en *Salvia officinalis* y *S. lavandulifolia subsp. Vellerea*, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Departamento de Ciencias Agroforestales, Sevilla, España.
- Davies, W.J., Kudoyarova, G., y Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plants response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol.24. Págs. 285–295.
- Doyle, J.J. (1991). DNA protocols for plants. Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series H. *Cell Biology*. Vol. 57. Págs. 283-293.
- Ekanayake, I. (1994). Estudios sobre estrés por sequía y necesidades de riego en la papa. Guía de Investigación CIP N° 19. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Vol. 40.
- FAO. (2010). FAO statistics database on the World Wide Web. Consulta en línea: 2012-06-06 <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>.

- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*. Vol.14, Págs. S15–S45.

- Fundación Chile. (2001). Cadenas Agroalimentarias, Papas, Consulta en línea: 2012-06-12
http://www.fundacionchile.cl/portal/c/document_library/get_file?p_l_id=10504&folderId=12883&name=DLFE-918.pdf

- Galau, G.A., Hughes, D.W., y Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* Vol. 7, Págs. 155-170.

- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kever, C., Jouve, L., Hausman, J.F. y Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology, Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. Vol. 37, Págs. 263-285.

- Gultinan, M.J., Marcotte, W.R. y Quatrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*. Vol. 250, Págs. 267-270.

- Gutiérrez, H., y De La Vara, R. (2008). Análisis y Diseño de experimentos. Segunda edición. McGraw – Hill Interamericana, México.

- Herrera, G. (2005). Evaluación de Chlorpropham como inhibidor de brotes en las variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Desirée, Yagana-INIA y Asterix. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. Pág. 96.

- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randal, S.K. (2002). The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* Vol. 130. Págs. 675–687

- Hijmans, R. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*. Vol. 80, Págs. 271-280.
- Hsiao, T.; Acevedo, E., Fereres, E. y Henderson, D. (1976). Water stress, growth, and osmotic adjustment, *Phil. Trans. R. Soc.* Vol. 273, Págs. 490-500.
- Huamán, Z. y D. Spooner. (2002). Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum sect. Petota*). *American Journal of Botany*. Vol. 89, Págs. 947–965.
- Huamán, Z., Golmirzaie, A. y Amoros, W. (1997). Biodiversity in Trust: Conservation and Use of Plant Genetic Resources in CGIAR. *Cambridge University Press*. Cambridge, UK. Vol. 2, Págs. 21-28.
- Ingram, J., y Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 47, Págs. 277–403.
- IPCC. (2007). Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza. Consulta en línea: 2012-04-24 http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_sp.pdf
- Kalazich, J., López, H. y Sagredo, H. (2006). Manual de producción de papa para la agricultura familiar campesina (A.F.C). Instituto de Investigaciones Agropecuaria, Centro Regional de Investigación La Platina, Chile. Boletín INIA N° 147, Pág. 172.
- Leung, J., y Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol.49. Págs. 199–222.

- Li, J.-F., Li, L., & Sheen, J. (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods*. Vol.6, Págs. 2-8.
- Litaladio, N. B. y Castaldi, L. (2009). Potato: The hidden treasure. *JFCA IYP Special Issue*. Vol.22. Págs. 491 – 493.
- Mathias, M., Sagredo, B. y Kalazich, J. (2007). Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. *Agricultura Técnica, Chile*. Vol. 67, Págs. 3-15.
- Melhorn, V., Matsumi, K., Koiwai, H., Ikegami, K., Okamoto, M., Nambara, E., Bittner, F., y Koshiwa, T. (2008). Transient expression of atNCED3 and AAO 3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *J. Plant Res*. Vol. 121. Págs. 125-131.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend. Plant Sci*. Vol. 7. Págs. 405-410.
- Mitwisha, L., Brandt, W., McCread, L., Lindsey, G. (1998). HSP12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Mol Biol*. Vol. 37, Págs. 513–521.
- Moreno, L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico, Una revisión. *Agronomía Colombiana*. Vol.27, Págs. 179-191.
- Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Chua, N.-H. (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proc. Natl. Acad Sci, USA*. Vol. 87, Págs. 1406-1410.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*. Vol. 31, Págs. 203-216.

- Nakashima, K., Ito, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. *Plant Physiology*. Vol. 149, Págs. 88-95.
- Nambara, E., Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism, *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 56, Págs. 165-185.
- ODEPA. (2009). El mercado de la papa 2008 – 2009. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Chile. Consulta en línea: 2012-06-06, <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2237.pdf>
- ODEPA. (2010). El mercado de la papa 2009 – 2010. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura. Chile. Consulta en línea: 2012-06-06, <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2385.pdf>
- Park, T.-H., Vleeshouwers, V.G.A.A., Jacobsen, E., van der Vossen, E. y Visser, R.G.F. (2009). Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breed.* Vol. 128, Págs. 109-117.
- Pawlowicz, I., Grygorowicz, W., y Rorat, T. (2004). DHN10 dehydrin is not expressed in transgenic *Solanum* species plants when the dhn10 gene is fused to a glucosyl transferase promoter. *Cell & Mol Biol letters*. Vol. 9, Págs. 947 – 961.
- Peralta, J. (2006). Estrategias de riego en papa para la zona sur de Chile, En: Santos, J. y Orena, S. *Manual de producción de papa para la agricultura familiar campesina (AFC)*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Osorno, Chile. Págs. 101-114.
- Pino, M.T., Inostroza, L., y Kalazich, J. (2011). El mejoramiento genético y la biotecnología como herramientas para la adaptación de la agricultura al cambio climático. *Revista Tierra Adentro*. Vol. 93, Págs. 50-53.

- Prado, F. (1999). Fisiología y bioquímica del estrés: respuesta de las plantas al ambiente, En: Jacobsen, S. y Mujica, A. Fisiología de la tolerancia a sequía en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Centro internacional de la papa (CIP), Lima, Perú. Consulta en línea: 2012-06-20, <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro05/home5.htm>

- Puentes, A. (2004). Efecto de diferentes niveles de agua aplicada a través de riego por goteo, durante la etapa de llenado de tubérculos, sobre el rendimiento y distribución de calibres de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Temporada 2000/2001. 62 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile.

- Qin, X., Zeevaart, J.A.D. (2002). Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and jasmonic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol.* Vol. 128, Págs. 549–551.

- Ríos, B. (2007). Distribución y variabilidad de *Ralstonia solanacearum* E.F.Smith, agente causal de marchitez bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), en tres departamentos del norte de Nicaragua (Estelí, Matagalpa y Jinotega). 44 p. Trabajo de Diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, Nicaragua.

- Rodríguez, L. E. (2009). Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). *Agronomía Colombiana*. Vol. 27. Págs. 305-312.

- Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W., Rey, P. (2004). Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*. Vol. 218, Págs. 878–885.

- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*. Vol. 410, Págs. 327-330.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D., McCarty, D.R., 1997, Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science*. Vol. 276, Págs. 1872–1874.
- Schwartz, SH., Qin, X., Zeevaart, J.A.D. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol*. Vol.131, Págs. 1591–1601.
- Scott, G., Rosegrant, M., y Ringler, C. (2000). Global projections for root and tuber crops to the year 2020. *Food Policy*. Vol. 5, Págs. 561-597.
- Seo, M. y Koshiha, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*. Vol. 7, Págs. 41–48.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*. Vol. 115, Págs. 327–34.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Bio*. Vol. 3, Págs. 217–23.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Global analysis of gene networks to solve complex abiotic stress responses. En: Chen, T.H.H. and Uemura, M., Eds, *Cold Hardiness in Plants: Molecular Genetics. Cell biology and Physiology*, CABI Publisher UK. Págs.1-10.

- Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol.* Vol. 7, Págs. 161-167.
- Silva, H.; Ortiz, M. y Acevedo, E. (2007). Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia.* Vol.41, Págs. 23-34.
- Soulages, J., Kinr, K., Arrese, E., Walters, C., y Cushman, J. (2003). Conformation of a Group 2 Late Embryogenesis Abundant Protein from Soybean. Evidence of Poly (L-Proline)-type II Structure. *Plant Physiology.* Vol.131, Págs. 963-975.
- Spooner, D.M. y Hetterscheid, W.L.A. (2005). Origins, eution, and group classification of cultivated potatoes. *Columbia University Press, NY.* Págs. 285-307.
- Spooner, D.M. y Salas, A. (2006). Structure, biosystematics, and genetic resources, In Gopal, J., and S.M.P. Khurana (Eds.). Handbook of potato production, improvement, and postharvest management. *Haworth's Press, Inc., Binghampton, NY.* Págs. 1-39.
- Spooner, D., Rodríguez, F., Polgár, Z., Ballard, H.E. y Jansky, S.H. (2008). Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *The plant genome, Crop Science.* Vol. 48, Págs. 27-36.
- Stockinger, E., Gilmour, S., y Thomashow, M. (1997). *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* Vol. 94, Págs. 1035–1040.
- Tabaeizadeh, Z. (1998). Drought-induced responses in plant cells, *Intl. Rev. Cyt.* Vol. 182, Págs. 193-245.

- Taiz, L. y Zeiger, L. (2002). *Plant Physiology*, 3ed, Sunderland, USA, Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Taylor, I.B., Burbidge, A., Thompson, A.J. (2000). Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot.* Vol.51, Págs. 1563–1574.
- Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* Vol. 50, Págs. 571-599.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high Salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* Vol. 97, Págs. 11632–11637.
- Valladares, F.; Vilagrosa, A.; Peñuelas, J.; Ogaya, R.; Camarero, J.; Corcuera, L.; Sisó, S. y Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía, En: Valladares, F. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. *Ministerio de medio ambiente organismo autónomo parques nacionales, Madrid, España.* Págs.163-190.
- Van Loon, C.D. (1981). The effect of water stress on potato growth, development, and yield. *American Potato Journal.* Vol. 58, Págs. 51-69.
- Weisz, R.; Kaminski, K. y Smilowitz, Z. (1994). Water deficit effects on potato leaf growth and transpiration: utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops. *American Journal of Potato Research.* Vol. 7, Págs. 829-840.
- Yordanov, I.; Velikova, V. y Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant physiol.* Págs, 187–206.

ANEXOS

RESULTADOS

Anexo 1. Ubicación del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación “La Platina”, Avda Sta Rosa 11610, La Pintana, Región Metropolitana, Chile. Datos de mapa ©2012 Google, Mapcity Imágenes ©2012 Cnes/Spot Image, DigitalGlobe, GeoEye Disponible en: <http://www.inia.cl/link.cgi/Platina/8000>



Anexo 2. Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del *St aldehydo abscisico oxidasa* en la variedad Karú de 663 pb, destacando en colores azul y rojo las regiones correspondientes a los primers forward y reverse respectivamente.

```
ATGGTCTCAAATAGCACTTGGACATACAAGATCCCGACTATTGACACTATACC
TCAGAATTTCAATGTTTCATGTGGTAAACAGTGGACATCATGAAAAACGCGTTCT
CTCATCTAAAGGTATTATTCTGTTTTCAATTTGTTTTCCACCCCTTCTGCCAAA
ACAAGTTCTTTGCTTTTTTCGCTTATAACTGTGAATTACATCATCAAATTCTGAAT
TTGCCTTTATTCATACAAACCGTTGAATCTTAACTTGATAACTCTTTTTGCAGCA
TCTGGTGAACCGCCGTTGCTTCTGGCAGCTTCAGTCCACTGTGCAGCAAGAGC
AGCCGTTAAAGCAGCACGTGAACAGCTCAAACATATGGGGCAAGCTTGACGGG
TCTGTTTCAGAATTCTATCTGGACGTCCCAGCCATATTACCCGTTGTGAAGACA
CAGTGTGGCCTGGATTATGTGGAGAAATATTTGGAAAGTTTGCTGGCTCAGAA
ATCTAACTAAACGTGCTTCAACATGCATCTCAGAATGATACTGAACTATGTTTCT
CAAACCTCAAAAATGTTGCCTATGCCGTGTTGGTTCCCAAAAATACACTAT
TTTTGGATGACCCGACAAACACTTGGGGACATTTTTGAAAAGTCAGAGCAACA
TAGATACTGAATACTTG
```

Anexo 3. Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del *St aldehydo abscisico oxidasa* en la variedad Yagana de 735 pb, destacando en colores azul y rojo las regiones correspondientes a los primers forward y reverse respectivamente.

```
ATGGTCTCAAATAGCACTTGGACATACAAGATCCCGACTATAGACACCATACC
TCGAAATTTCAATGTTTCATGTGGTAAACAGTGGACACCACGAAAAACGTGTTCT
CTCCTCTAAAGGTATAATTCTTTCTTCATCTCCTTACCCGTCCCTGCTGTCAAAC
AAGTTTCCCGAGTTCATTGATTGTTTCGTTTTAACTGCGGATGCCATGAAAGGT
GTTATGGAATGGAAGAGATGTGAGAGAAAATATAAAAAGAAAATAAACAACAACTC
ATTGTATTGATCATTTAACTTCAAATCCTGGATCCGTCTTTGTATGTACAAAACC
GTTGAATCTTCTTAATATGAATACTTTTTTCGAGCATCTGGTGAAGCCACCGTTG
CTTCTGGCAGCCAGCGTCCATTGTGCAGCACGAGCAGCGGTTAAAGCAGCAC
GTGAACAGCTCAAACAATGGGACAAGCTTGACGGGTCTGTTTCAGAATTCTAT
CTGGACGTCCCCGCCATATTACCCGTTGTGAAGACACAGTGTGGCCTGGATTA
TGTGGAGAAATACTTGGAACTTTGCTGGCTCAGAAATCTAACTGAAGGTGCAT
CCACATGTCTCAAATGATACTGAACTATGTTGTTTGGACTCTCCAAAATGTCTT
CACACCCTTGTGCGTTCTTTCAAAAATACACTACTTTTGAACGATCCAACATGC
ATTAATATCCAGAGCAACATAGATACTGAATACTTG
```

Anexo 4. Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del gen *Dhn10* en la variedad Karú de 504 pb, destacando en colores azul y rojo las regiones correspondientes a los primers forward y reverse respectivamente.

```
GCTAAACCCCAAAAAAAAAACTCATTTCATCTGATCAAATATGGCAGGAA
TCATCCACAAAATTGAGGAGAACTCCACATCGGAGGAGGCCACAAGGAAG
AAGAACACAAAAGGAGGAACACAAGGGAGAAGGACACAAGGAGGAGCACA
AGGAAGGATTTGTTGAGAAGATAAAAGATAAGATCCATGGAGAAGAAAGTGG
AGAGCATCACAAGGATGGAAAGGAGAAGAAGAAGAAGAAAGACAAGAAGGA
GAAGAAGGAGAAAAAGCATGATGGACATGATAGTAGCAGCAGCAGCGACAG
TGATTAGATCTGATCTCATCGCATCTGAACTTGATTGATCTCCTATTTACCTAA
CAACATTTATCTATAGTATTTTTCTGCTATAGATCTATCTATCTATGTGAGAA
AAAGAAAAAAAAAACAGAAAAATGGAAAAGAAGATCTCGTGTTTATCTGCTT
TTGTTGTGATTTGTGAATGTA
```

Anexo 5. Resultados de secuenciación obtenidos para el inserto del gen *Dhn10* en la variedad Yagana de 499 pb, destacando en colores azul y rojo las regiones correspondientes a los primers forward y reverse respectivamente.

```
GCTAAACCCCAAAAAAAAAACTCATTTCATCTGATCAAATATGGCAGGAA
TCATCCACAAAATTGAGGAGAACTCCACATCGGAGGAGGCCACAAGGAAGA
AGAACACAAAAGGAGGAACACAAGGGAGAAGGACACAAGAAGGAGGAGCAC
AAGGAAGGATTTGTTGAGAAGATAAAAGATAAGATCCATGGAGAAGAAAGTGG
AGAGCATCACAAGGATGGAAAGGAGAAGAAGAAGAAGAAAGACAAAAAGGAG
AAGAAGGAGAAAAAGCATGATGGACATGATAGTAGCAGCAGCAGCGACAGTG
ATTAGATCTGATCTGAGCGCATCTGAACTGATTGATTTTCTATTTACCTAACAA
CATTTCAACTATAGTATTTTTCTGCTATGGATCTATCTATCTATGTGAGAAAAAC
AGAAAAATGAAGAAAAAAAAAAAAATCTCGTGTTAACTGCTTTTGTGATTTGT
GAATGTA
```

Anexo 6. Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas DHN10 obtenidas en este estudio en las variedades Karú y Yagana y la secuencia aminoacídica descrita en la base de datos de NCBI (EU849680).

```

DHN10_NCBI      MAGIIHKIEEKLHIGGGHKEEEHKKEEHKGEHGK-EEHKEGFVEKIKDKIHGEESGEHHK 60
DHN10_Yagana    MAGIIHKIEEKLHIGGGHKEEEHKKEEHKGEHGK-EEHKEGFVEKIKDKIHGEESGEHHK 60
DHN10_Karú      MAGIIHKIEEKLHIGGGHKEEEHKKEEHKGEHGK-EEHKEGFVEKIKDKIHGEESGEHHK 59
                *****
                *****

DHN10_NCBI      DGKEKKKKDKKEKKEKHDGHDSSSSSDSD 91
DHN10_Yagana    DGKEKKKKDKKEKKEKHDGHDSSSSSDSD 91
DHN10_Karú      DGKEKKKKDKKEKKEKHDGHDSSSSSDSD 90
                *****
                *****

```

Anexo 7. Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de las enzimas AAO (Aldehído abscísico oxidasa) obtenidas en este estudio en las variedades Karú y Yagana y la secuencia aminoacídica descrita en la base de datos de NCBI (Q42435).

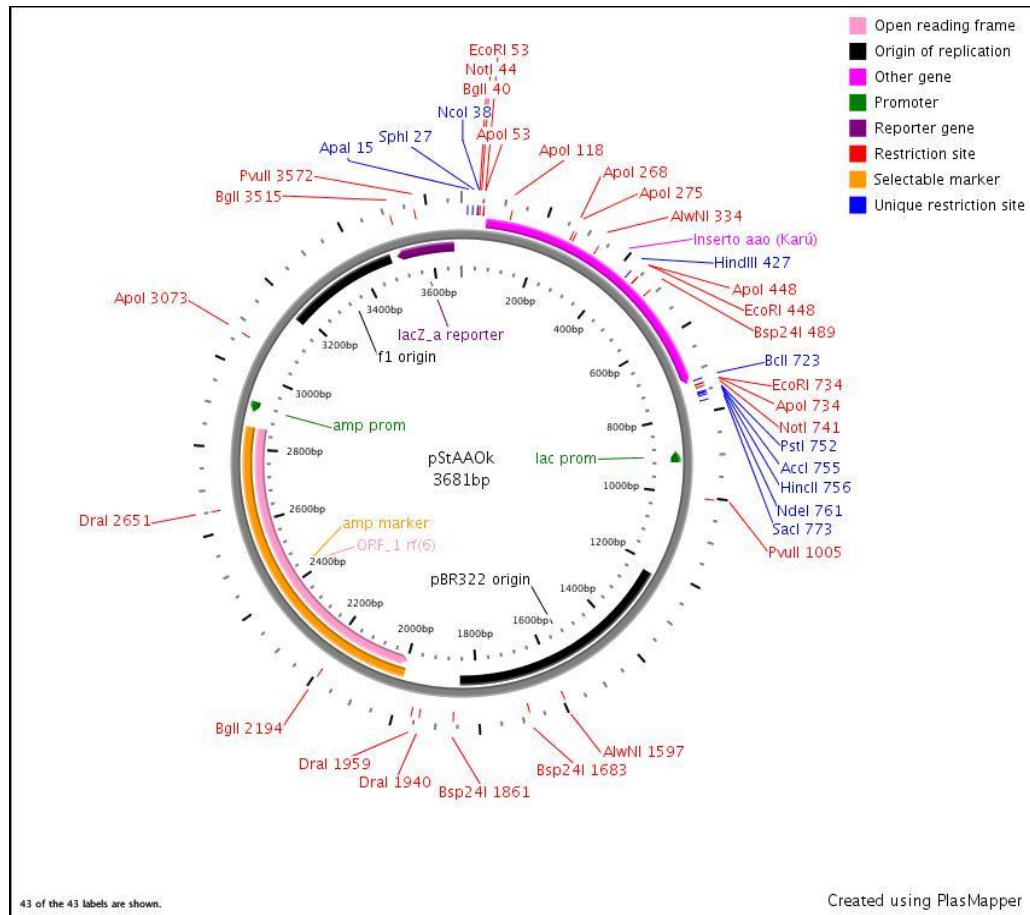
```

AAO_Karú        MVSNSTWYKIPTIDTIPQNFNVHVVNSGHHEKRVLSSKG----IILFSFVFPPLLP-- 53
AAO_Yagana      MVSNSTWYKIPTIDTIPRNFNVHVVNSGHHEKRVLSSKG----IILSSSPYPSLLSN- 54
AAO_NCBI        MVSNSTWYKIPTIDTIPQNFNVHVVNSGHHEKRVLSSKASGEPPLLLAASVHCAARAAV 60
                *****:*****.
                ::* : . . .

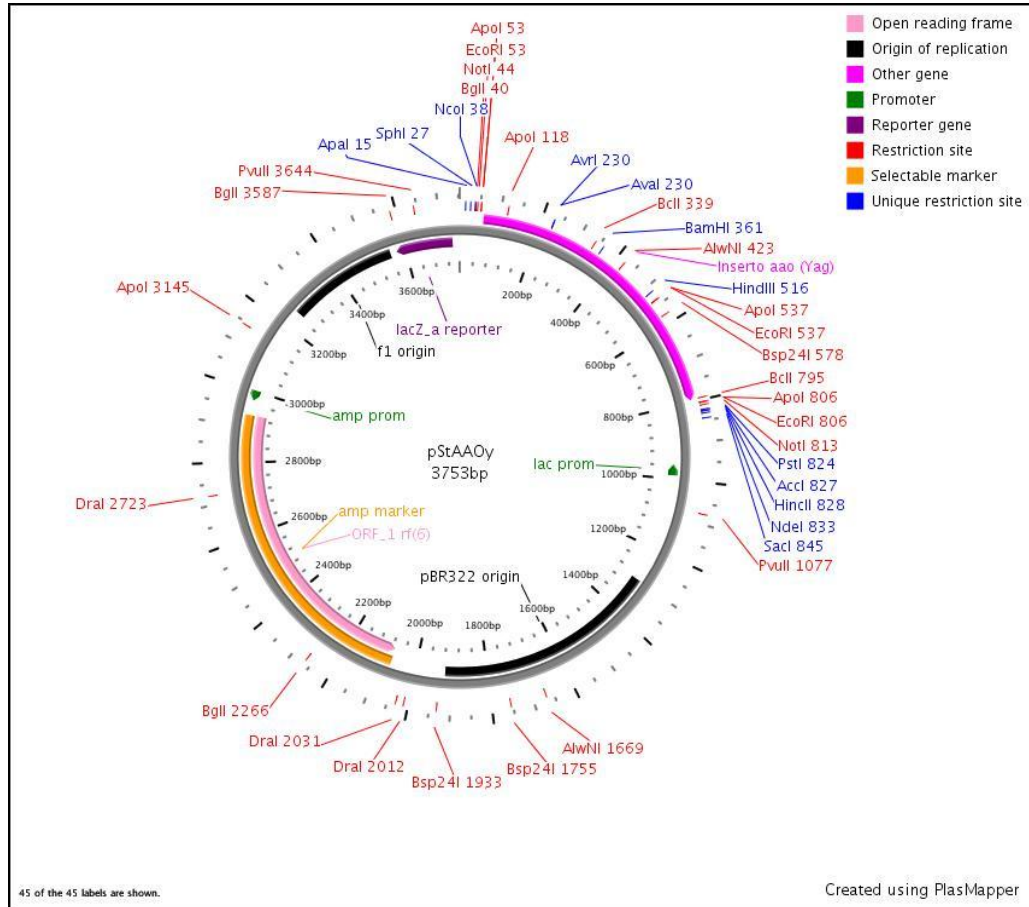
AAO_Karú        -----KTSSLLFRL----- 62
AAO_Yagana      -----KFPEFIDCSFLTADAMKGVMEWKR CERKYKRK----- 86
AAO_NCBI        KAARERLKLWGKLDGSVSEFYLDVPAILPVVK-TQCGLDYVEKYLESLLAQKSN 113
                . . .
                :

```

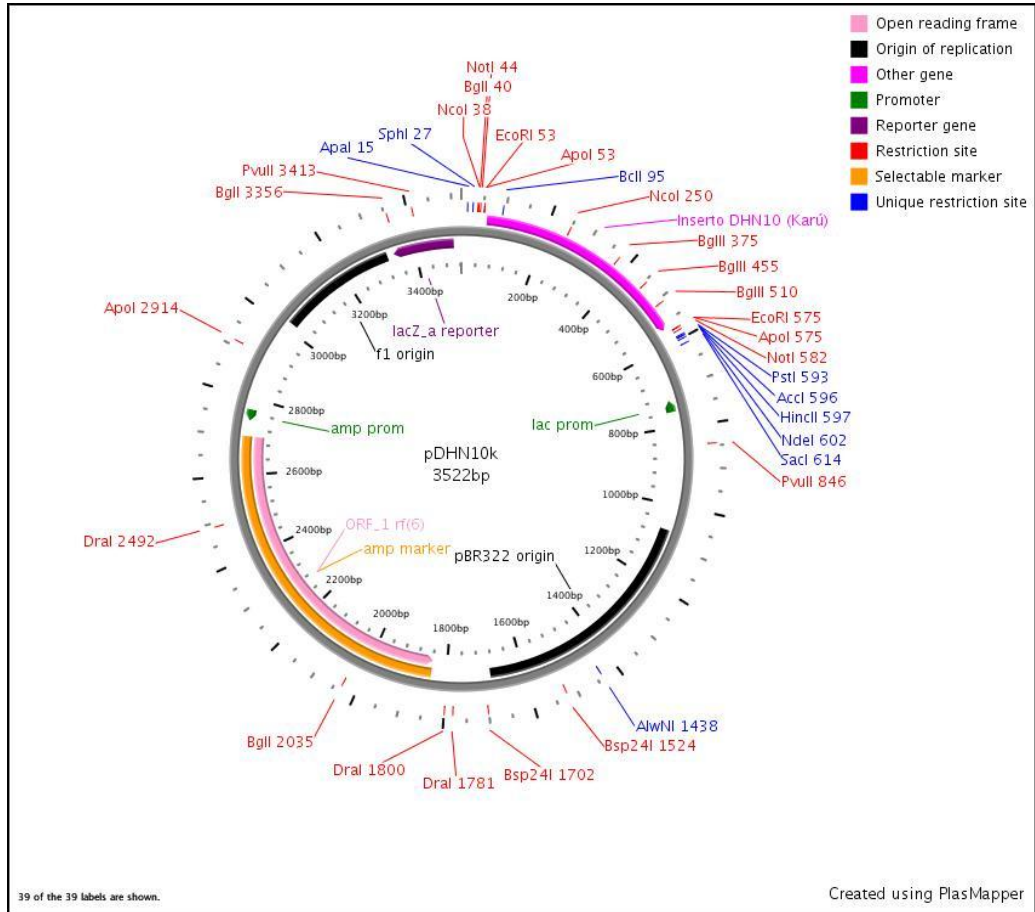
Anexo 8. Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen *St aldehído abscísico oxidasa* aislado de la variedad Karú INIA-La Platina en el vector comercial pGEM[®]-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA, 2010).



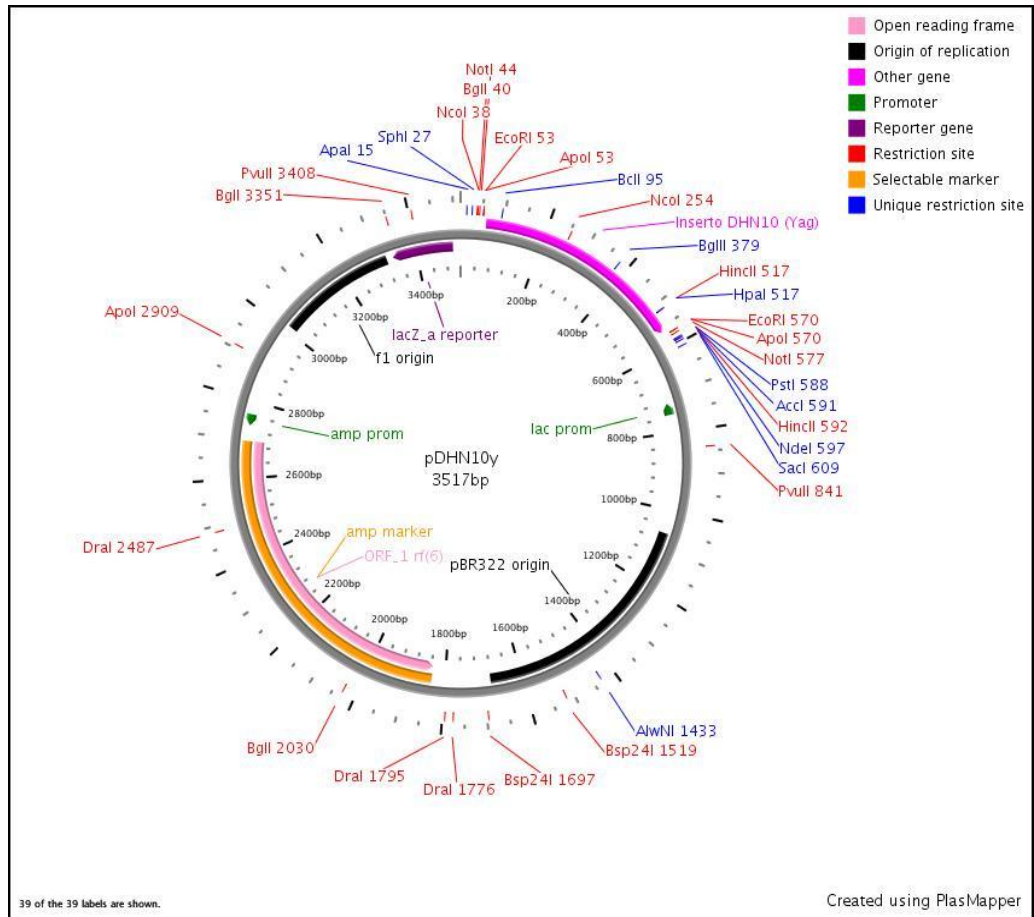
Anexo 9. Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen *St aldehído abscísico oxidasa* aislado de la variedad Yagana INIA-La Platina en el vector comercial pGEM[®]-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA, 2010).



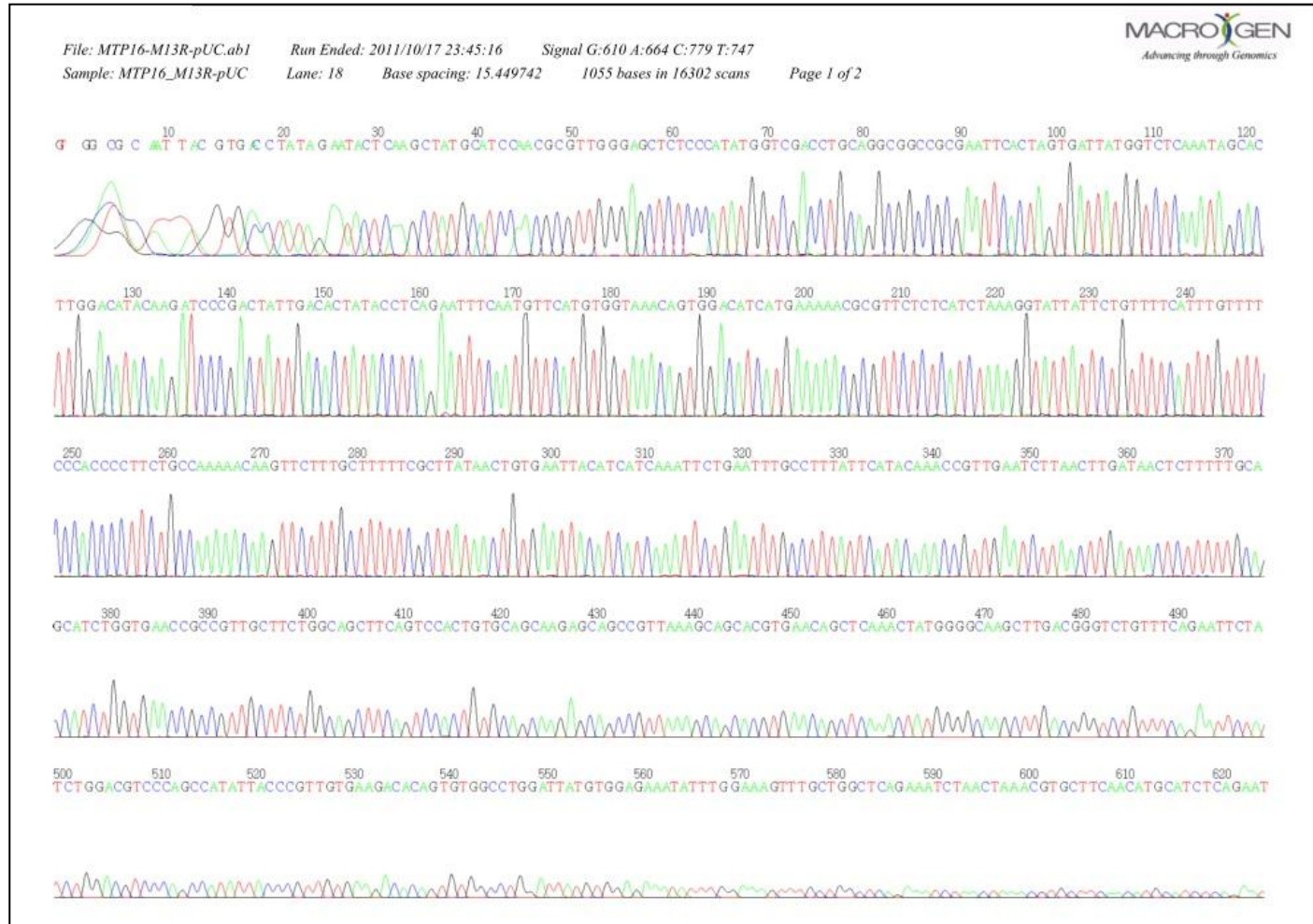
Anexo 10. Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen *Dhn10* aislado de la variedad Karú INIA-La Platina en el vector comercial pGEM[®]-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA, 2010).



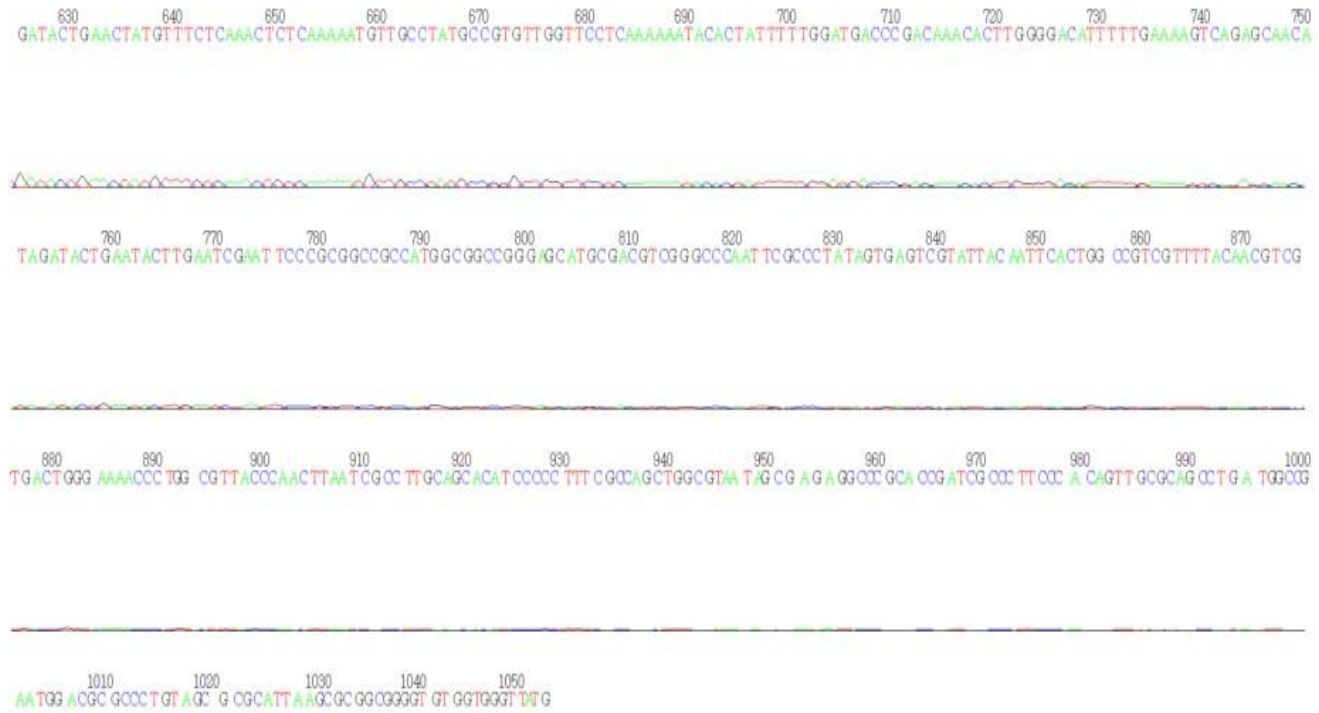
Anexo 11. Plásmido recombinante obtenido tras la inserción del gen *Dhn10* aislado de la variedad Yagana INIA-La Platina en el vector comercial pGEM[®]-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA, 2010).



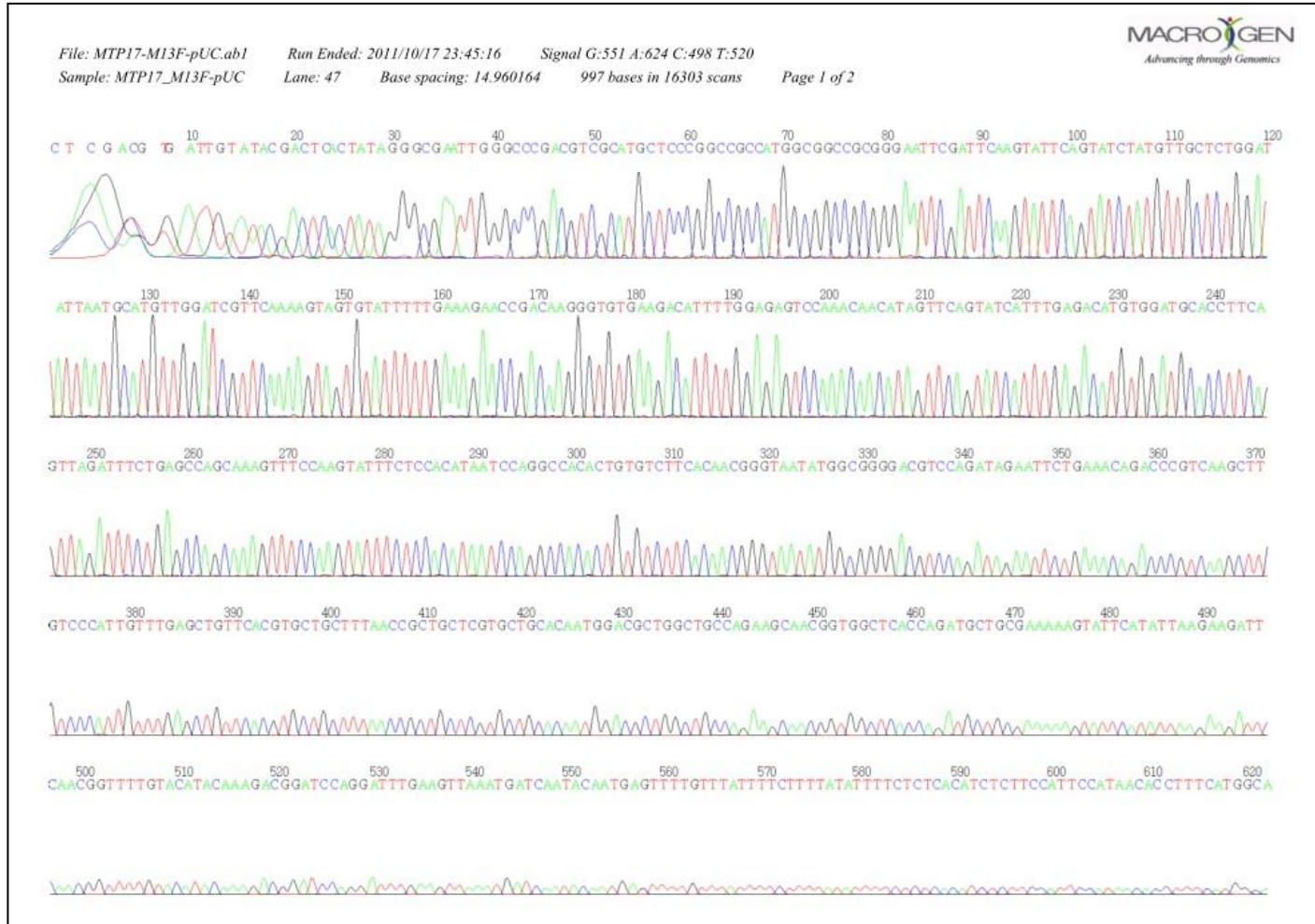
Anexo 12. Cromatograma de secuenciación del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en la variedad Karú obtenido a partir de Macrogen Inc. Korea 2011. Código de gen MTP16.



File: MTP16-M13R-pUC.ab1 Run Ended: 2011/10/17 23:45:16 Signal G:610 A:664 C:779 T:747
Sample: MTP16_M13R-pUC Lane: 18 Base spacing: 15.449742 1055 bases in 16302 scans Page 2 of 2



Anexo 13. Cromatograma de secuenciación del gen *St aldehído abscísico oxidasa* en la variedad Yagana obtenido a partir de Macrogen Inc. Korea 2011. Código de gen MTP17.



File: MTP17-M13F-pUC.ab1 Run Ended: 2011/10/17 23:45:16 Signal G:551 A:624 C:498 T:520
Sample: MTP17_M13F-pUC Lane: 47 Base spacing: 14.960164 997 bases in 16303 scans Page 2 of 2

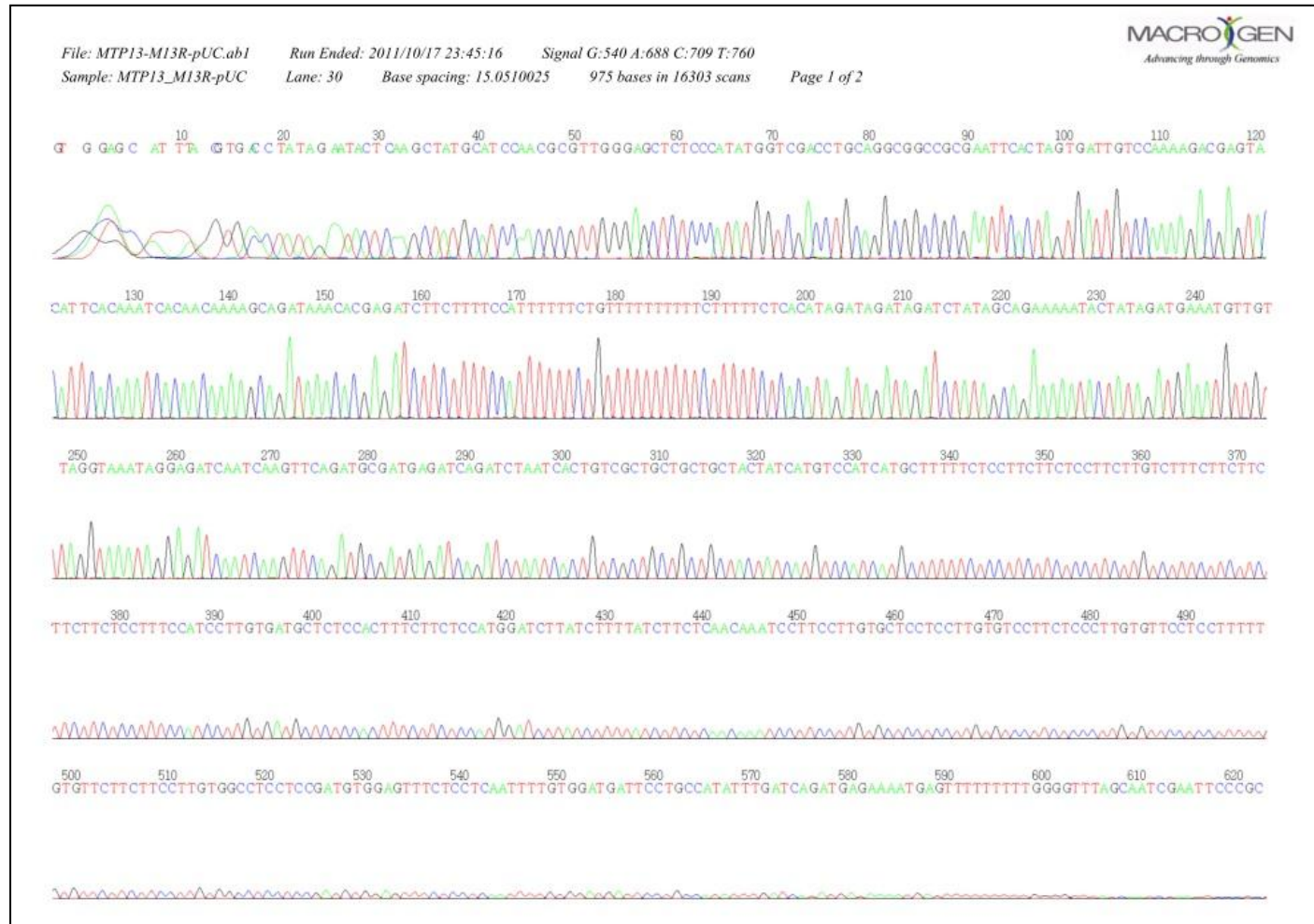
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
TCCGCAGTTAAAAACGAACAATCAATGAACTCGGGAAACTTGTTTGACAGCAGGGACGGGTAGGAGATGAAGAAAGAAATTATACCTTTAGAGGAGAGAACACGTTTTTCGTGGTGTCCACTGT

750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
TTACCACATGAACATGAAATTCGAGGTATGGTGTCTATAGTCGGGATCTTGTATGTCCAGTGCTATTTGAGACCATAAACAC TAGTGAAATTCGGGCGCCGCTGCAAGTCGACCATATGGGAG

880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
AGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCCACTAATAGCTTGGCGTAAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATTTGATCCGCTCACAAATCCACAACAATACG

g

Anexo 14. Cromatograma de secuenciación del gen *Dhn10* en la variedad Karú obtenido a partir de MacroGen Inc. Korea 2011. Código de gen MTP13.



File: MTP13-M13R-pUC.ab1 Run Ended: 2011/10/17 23:45:16 Signal G:540 A:688 C:709 T:760

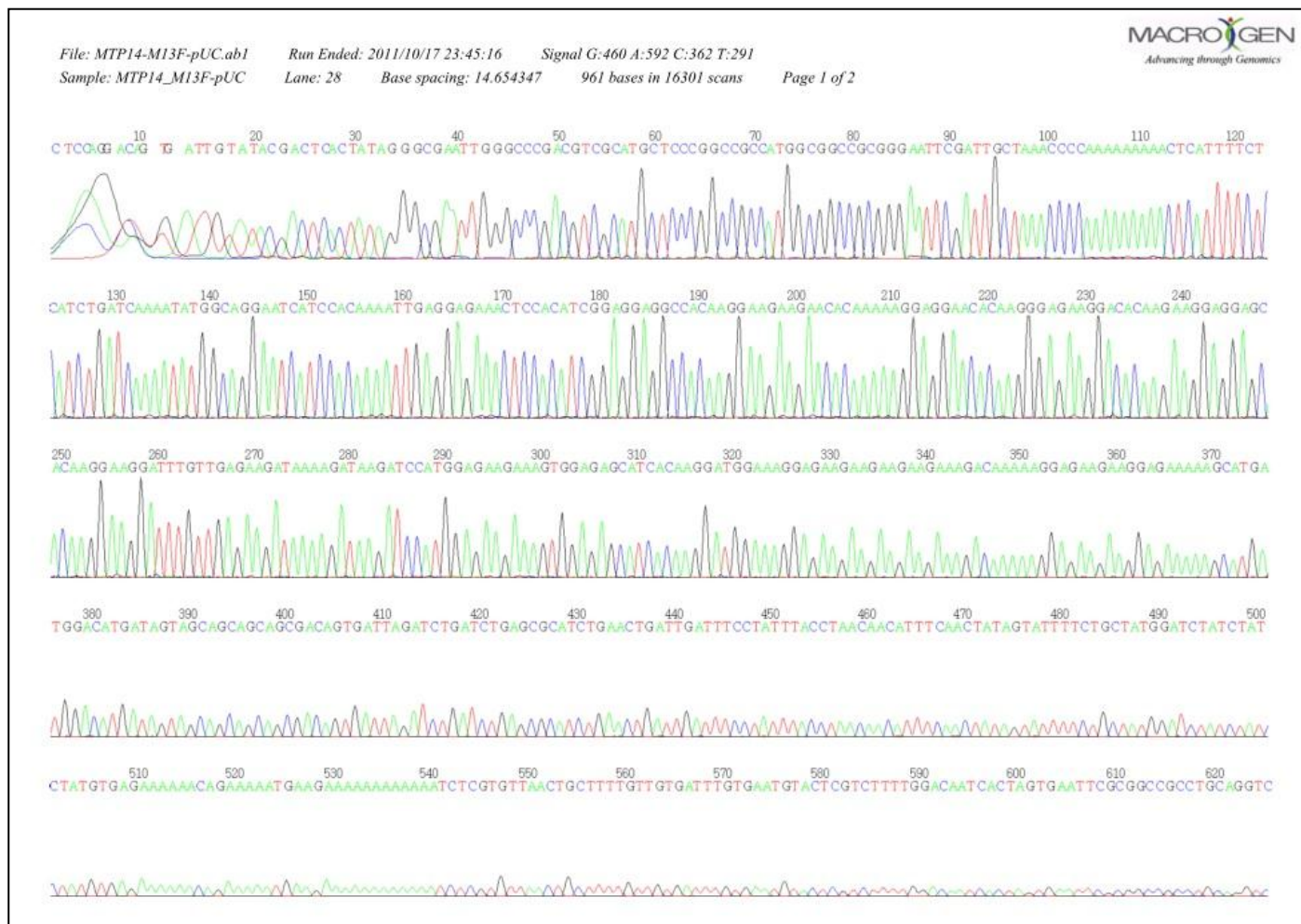
Sample: MTP13_M13R-pUC Lane: 30 Base spacing: 15.0510025 975 bases in 16303 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
GGCCGC CATGGCGGCCGGAGCATGCGACGTGGGCCCCAATTCGCCCTATAGTGAATCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAAT

760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880
CGCCTTGCAGCAGATCCCCCTTTCCGCCAGCTGGCGTAATAAGCAGAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCACAGCCGTAATGGCGAATGGACGCCCTGTAGCGGCGCA TTAA GCGCGGC

890 900 910 920 930 940 950 960 970
GGGTGTGGTGGTTACGCGCAAGGTGACCGTTACACTTGCCAGCGCTTAGGCGCCGC TCCGTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCAAGCCAGTTCCGC

Anexo 15. Cromatograma de secuenciación del gen *Dhn10* en la variedad Yagana obtenido a partir de Macrogen Inc. Korea 2011. Código de gen MTP14.



File: MTP14-M13F-pUC.ab1 Run Ended: 2011/10/17 23:45:16 Signal G:460 A:592 C:362 T:291
Sample: MTP14_M13F-pUC Lane: 28 Base spacing: 14.654347 961 bases in 16301 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
GACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAATTTCTATAGTGCCTAAATAGCTTGGCGTAAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAAAAT



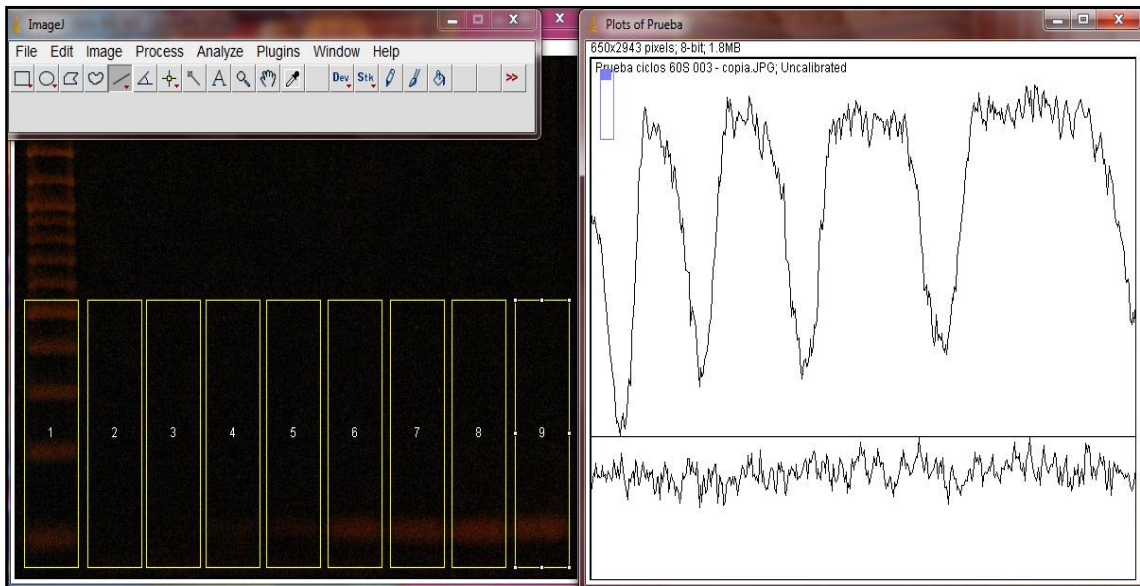
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
TCCACACAAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTCGTGCCAGC



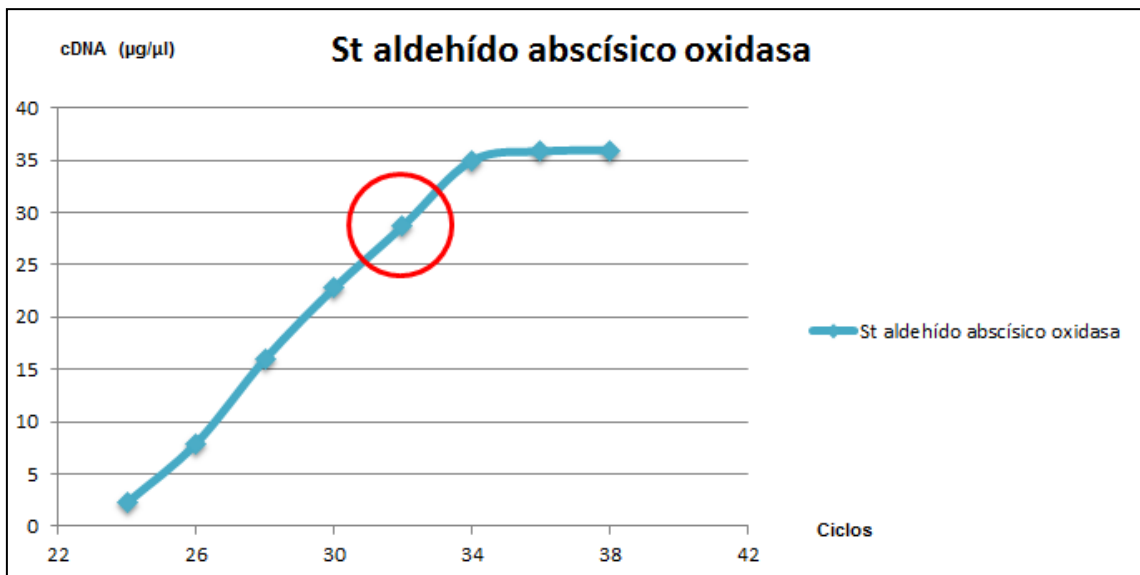
880 890 900 910 920 930 940 950 960
TGCATTAAATGAAATCGGOCACGCGCGGGGAGAGG:GGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTTCGCTGCCTGACTCGCTGCG



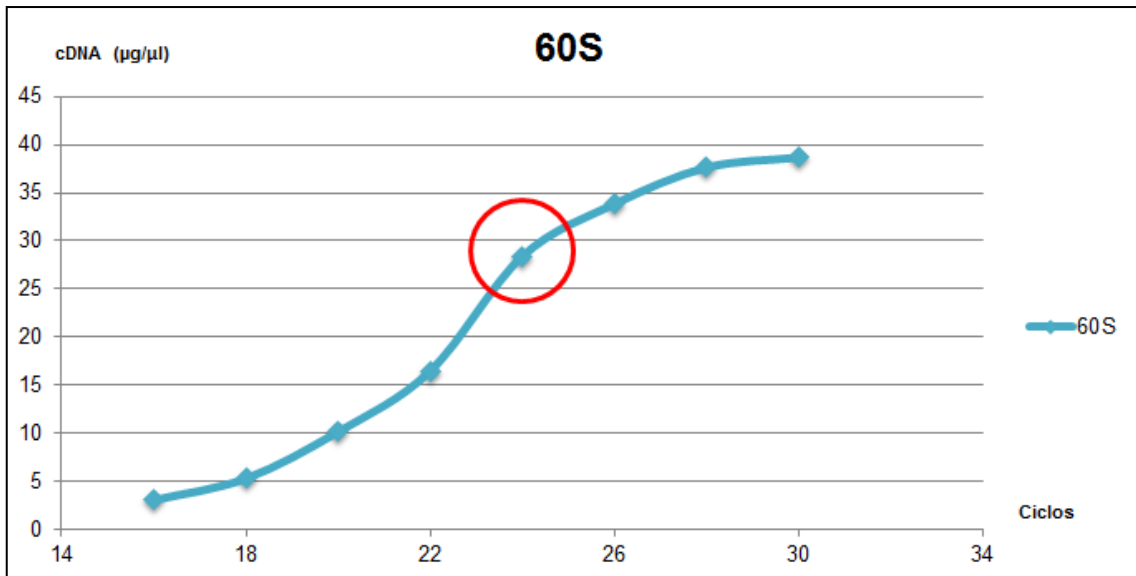
Anexo 16. Esquema de manejo del programa *Image J* versión 1.45 software, para estandarización del número de ciclos empleados para el análisis de expresión de los genes: *St aldehído abscísico oxidasa*, *Dhn10* y el gen de control interno 60S.



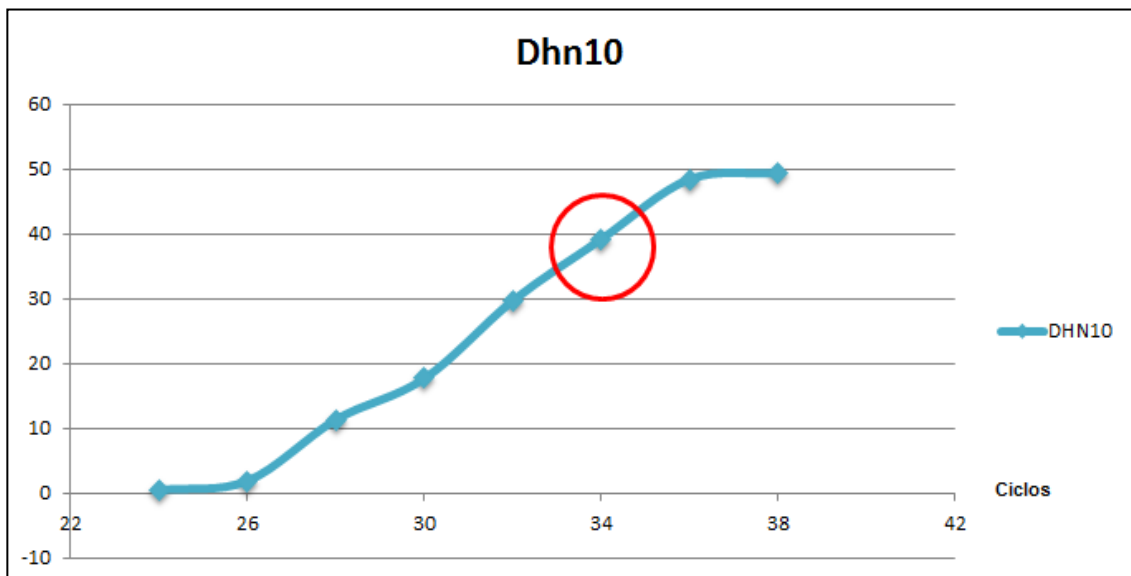
Anexo 17. Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen *St aldehído abscísico oxidasa*, a partir de los valores obtenidos en el programa Image J.



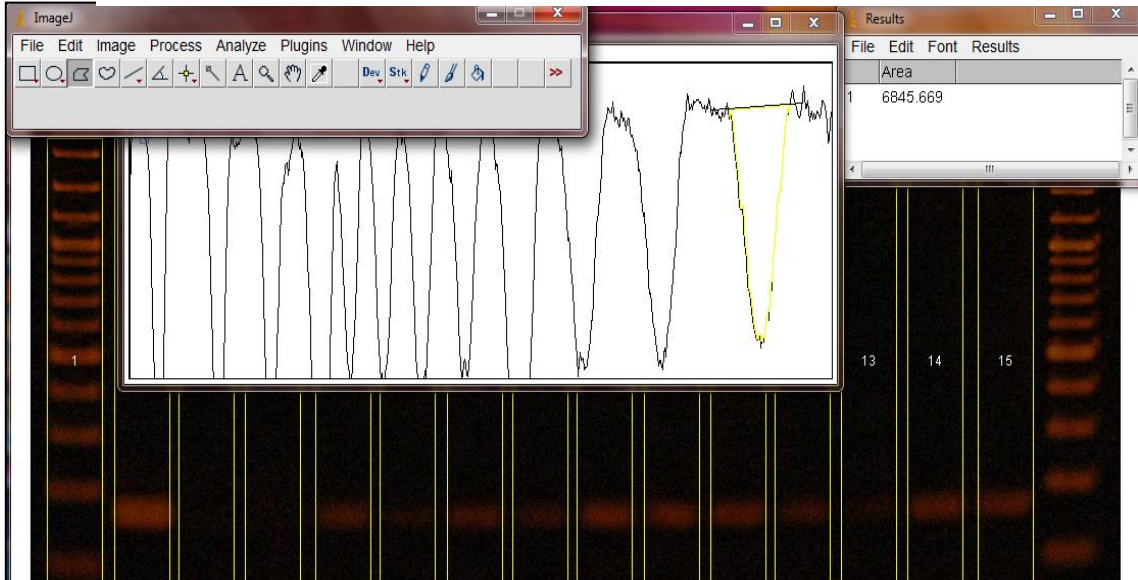
Anexo 19. Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen de control interno 60S, a partir de los valores obtenidos en el programa Image J.



Anexo 18. Gráfica de estandarización del número ciclos para el análisis de expresión del gen *Dhn10*, a partir de los valores obtenidos en el programa Image J.



Anexo 20. Análisis de la expresión génica *in silico* a partir de Image J versión 1.45 software. Obtención de valores para el análisis.



ESTADÍSTICA

Anexo 21. Análisis de Varianza (ANOVA)

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

El análisis de varianza es una técnica estadística de interdependencia que busca la explicación de una variable cuantitativa mediante una o un grupo de variables cualitativas, las cuales se denominan factores, y cada una de estas contienen un número determinado de niveles.

Si se desea comparar a tratamientos o niveles de un factor único. Los resultados que se observan en cada uno de los a tratamientos es una variable aleatoria, que se puede describir mediante el modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} = \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

donde Y_{ij} , es la j -ésima observación sometida al i -ésimo tratamiento, μ es un parámetro común a todos los tratamientos denominado media global, τ_i , es un parámetro único para el i -ésimo tratamiento llamado efecto del i -ésimo tratamiento, y ϵ_{ij} es el componente aleatorio del error. El principal objeto es tratar de probar hipótesis apropiadas con respecto a los efectos del tratamiento y hacer una estimación de ellos.

Los errores del modelo son variables aleatorias independientes con distribución normal, con media cero y varianza σ^2

Modelo de Efectos fijos.

En este modelo los efectos de tratamiento τ se definen usualmente como desviaciones con respecto a la media general, por esa razón.

$$\sum_{i=1}^a \tau_i = 0$$

Donde y_i es el total de las observaciones bajo el i -ésimo tratamiento, \bar{y}_i es el promedio de las observaciones bajo el i -ésimo tratamiento, así mismo $y_{..}$ es la suma de todas las observaciones y $\bar{y}_{..}$ es la media general de las observaciones, las cuales expresadas matemáticamente son:

$$y_{i.} = \sum_{j=1}^n y_{ij} \qquad y_{i.} = \frac{y_{i.}}{n} \qquad i = 1, 2, \dots, a$$

$$y_{..} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij} \qquad y_{..} = \frac{y_{..}}{N}$$

N= representa el número total de observaciones

La media de la j-ésima observación sometida al i-ésimo tratamiento es $E(y_{ij}) = \mu_i = \mu + \tau_i$, $i = 1, 2, \dots, a$; por lo tanto el valor medio del i-ésimo tratamiento consta de la suma de la media general y el efecto del i-ésimo tratamiento, donde el objetivo es probar la igualdad de las medias de los a tratamientos, por lo que se tiene:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_a$$

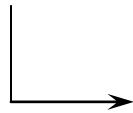
$$H_1 : \mu_i \neq \mu_j \quad \text{para } i \neq j$$

El contraste de hipótesis es equivalente a:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_a = 0$$

$$H_1 : \tau_i \neq 0 \quad \text{para al menos un } \tau_i$$

Tabla ANOVA para un factor con a niveles

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F ₀
Tratamientos	$SS_{\text{Trat}} = SC_T = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{Y}_{i\cdot} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$	k-1	$S_B^2 = MST = CM_T = \frac{SS_{\text{Trat}}}{a-1}$	$FC = \frac{S_B^2}{S_W^2}$
Error	$SS_E = SC_E = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot})^2$	n-k	$S_p^2 = MSE = CM_E = \frac{SS_E}{N-a}$	
Total	$SS_T = SS_{\text{Trat}} + SS_E$ o bien $SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{\cdot\cdot})^2$	n-1		$S_W^2 = MSE$ y es un buen estimador de σ^2

Con $(1 - \alpha)100\%$ de confianza, se rechaza la hipótesis nula a favor de H_1 , sí:

$$F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$$

i. En este caso se plantea la siguiente hipótesis:

$$H_0 : \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$$

vs

$$H_1 : \text{no se cumple } H_0$$

H_0 propone que no existe diferencia entre los tratamientos del factor y por eso se iguala a cero, mientras que H_1 indica la negación de H_0 es decir que al menos uno de los tratamientos del factor es diferente.

Anexo 22. ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen *St aldehído absclísico oxidasa* en la variedad Karú.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	20	17.79013715	0.88950686	7.85	<.0001
Error	27	2.60492598	0.11325765		
Total corregido	47	20.39506313			

Anexo 23. ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen *St aldehído absclísico oxidasa* en la variedad Yagana.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	20	2.75661091	0.13783055	2.13	0.0416
Error	27	1.48887407	0.06473366		
Total corregido	47	4.24548497			

Anexo 24. ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen *Dhn10* en la variedad Karú.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	20	0.86637202	0.04331860	2.11	0.0355
Error	27	0.55402042	0.02051927		
Total corregido	47	1.42039244			

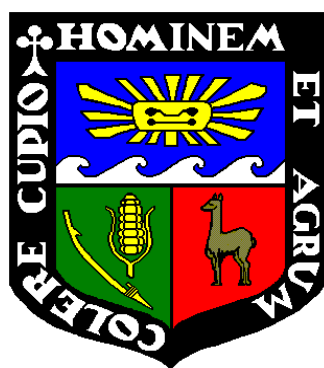
Anexo 25. ANOVA para variable dependiente expresión génica del gen *Dhn10* en la variedad Yagana.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Modelo	20	1.32753616	0.06637681	1.70	0.1009
Error	27	1.01392955	0.03899729		
Total corregido	47	2.34146570			

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“VALIDACION DE UN PROTOCOLO PARA LA
CUANTIFICACION DE ACIDO ABSCISICO EN
PAPA (*Solanum tuberosum* L. spp) MEDIANTE LA
TECNICA ELISA COMPETITIVO”**

Tesis para optar el título de

BIOLOGO

LUCIA NOHELY HUANUCO AZABACHE

Lima-Perú

2013

A Dios y a mi familia por su
constante apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al Centro Internacional de la Papa - CIP, por brindarme todas las facilidades y todo lo necesario para realizar esta investigación.

Al Ing. Raymundo Gutiérrez Rosales, por ayudarme, guiarme y compartir sus conocimientos tanto del cultivo como del trabajo en equipo durante todo este proceso.

A la Blga. Giovanna Muller, por su apoyo en todo lo relacionado a la técnica ELISA y por las correcciones y sugerencias brindadas.

Al Dr. Folkard Asch, por sus valiosas correcciones que ayudaron a agilizar las pruebas.

A la Dra. Elva Ríos, por su apoyo, preocupación y empuje durante todo este tiempo y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A todos mis amigos del área de Virología y Serología: Susan, Ana, Betty, Heidy, Joao, Marco, Sr. Marco y Sr. Jaime; por todos los momentos compartidos y por su invaluable apoyo a lo largo de la ejecución de este trabajo.

Un agradecimiento especial a la Sra. Catalina Milicich, por enseñarme todos los detalles de la prueba ELISA y por su compañía diaria en el Laboratorio de Serología.

A todos y cada uno de mis amigos en el CIP, porque de una u otra manera contribuyeron a realizar esta investigación de la mejor manera.

Al fondo FONTAGRO por el financiamiento del proyecto: “Aumento de la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo en Sudamérica ante el cambio climático” y al fondo GIZ-BMZ del gobierno Alemán por el financiamiento del proyecto: “Improved potato varieties and water management technologies to enhance water use efficiency, resilience, costeffectiveness, and productivity of smallholder farms in stress-prone Central Asian environments”

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
3.1. CULTIVO DE PAPA, <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.	6
3.2. ESTRÉS HIDRICO.....	7
3.2.1. SEQUIA	8
3.2.2. RESPUESTA A LA SEQUIA.....	9
3.3. REGULADORES HORMONALES EN PLANTAS	9
3.3.1. ACIDO ABCISICO “ABA”	10
3.4. TECNICAS INMUNOLOGICAS.....	12
3.4.1. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA LIGADO A ENZIMA “ELISA”	13
3.4.2. ELISA COMPETITIVO-INDIRECTO	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. PLAN GENERAL DEL EXPERIMENTO	17
4.2. BIOENSAYOS EN LABORATORIO	17
4.2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	17
4.2.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	17
4.2.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	19
4.3. BIOENSAYO EN CAMARA DE CRECIMIENTO	21
4.3.1. CONDICIONES CONTROLADAS EN LA CÁMARA DE CRECIMIENTO	21
4.3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	22
4.3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	22
4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
4.4.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ACIDO ABCÍSIICO.....	26
4.4.2. CÁMARA DE CRECIMIENTO.....	27
4.4.3. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA.....	28
4.5. ANÁLISIS DE DATOS	28
4.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ACIDO ABCÍSIICO.....	28
4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA TRANSPIRACION NORMALIZADA	30
4.5.3. CUANTIFICACION DE ABA EN MUESTRAS	31
4.5.4. ABA DE ACUERDO AL TIPO Y FUENTE DE MUESTRA	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
5.1. CURVA DE CALIBRACION	32
5.2. APLICACIÓN DEL ENSAYO EN MUESTRAS.....	45
5.2.1. DILUCION DE LAS MUESTRA	45
5.2.2. CONCENTRACION DEL ABA CUANTIFICADO	49
5.2.3. RELACION TRANSPIRACION NORMALIZADA-ABA.....	52
5.2.4. RELACION ABA-RENDIMIENTO	57
V. CONCLUSIONES	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	61
VIII. ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: DILUCIONES EN NG/ML (1:10) A PARTIR DE UNA CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE ABA.	20
CUADRO 2: ASIGNACIÓN DE CADA POCILLO EN UNA MICROPLACA ELISA	26
CUADRO 3: DISTRIBUCIÓN DE LOS TRES CLONES DENTRO DE LA CÁMARA DE CRECIMIENTO.....	27
CUADRO 4: DISTRIBUCIÓN DE ESTÁNDARES DE ABA Y MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	28
CUADRO 5: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, BLOQUEO 1% LECHE, MAC252 A 1:30 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 2MG/ML.	33
CUADRO 6: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:30 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 2MG/ML.....	33
CUADRO 7: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:40 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 2MG/ML.....	34
CUADRO 8: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:60 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 2MG/ML.....	35
CUADRO 9: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	36
CUADRO 10: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, BLOQUEO 1% LECHE, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 1MG/ML.	37
CUADRO 11: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, BLOQUEO 1% LECHE, MAC252 A 1:100 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 1MG/ML.	37
CUADRO 12: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	38
CUADRO 13: CONDICIONES: ABA-BSA 500NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:3000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	40
CUADRO 14: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:1000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	41
CUADRO 15: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:2000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	41
CUADRO 16: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:2000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	42
CUADRO 17: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:2000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	44
CUADRO 18: CONDICIONES: ABA-BSA 300NG/ML, SIN BLOQUEO, MAC252 A 1:80 000 Y ANTIRAT IGG A 1:2000. SUSTRATO EN 1MG/ML.....	46
CUADRO 19. ABSORBANCIAS EN DOS MUESTRAS DE FOLIOLO BAJO SEQUIA REGULADA Y DOS MUESTRAS EN RIEGO NORMAL.	48
CUADRO 20. ABSORBANCIAS EN DOS MUESTRAS DE JUGO DE XILEMA BAJO SEQUIA REGULADA Y DOS MUESTRAS EN RIEGO NORMAL.	48
CUADRO 21. CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ABCSÍICO CUANDO LA FUENTE DE MUESTRA ES DE TIPO “USO”..	50
CUADRO 22. CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ABCSÍICO CUANDO LA FUENTE DE MUESTRA HA SIDO ALMACENA A -70°C.	51
CUADRO 23. RESULTADOS DE PROBABILIDAD EN PRUEBA T ENTRE MUESTRAS EN USO Y EN -70°C.....	52
CUADRO 24. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN (ENTRE ABA Y TN) Y P VALUE.	56
CUADRO 25. VALORES DE RENDIMIENTO Y DE ABA CUANTIFICADA.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SUPERFICIE MUNDIAL DE COSECHA DE PAPA Y RENDIMIENTO PROMEDIO DURANTE EL PERIODO 1961-2011.	6
FIGURA 2. SUPERFICIE COSECHA DE PAPA (GAEZ, 2011).	7
FIGURA 3. ESQUEMA ELISA COMPETITIVO INDIRECTO (ASCH, 2000).	15
FIGURA 4. INSTALACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO EN LA CÁMARA DE CRECIMIENTO.	23
FIGURA 5. EXTRACCIÓN DEL JUGO DE XILEMA CON LA BOMBA SCHOLANDER.	26
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN HOMOGÉNEA DEL CRECIMIENTO DE LOS TRES CLONES EN ESTUDIO.	27
FIGURA 7. CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA DEL CUADRO 9. LA ECUACIÓN RESULTANTE ES:	36
FIGURA 8. CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA DEL CUADRO 12. LA ECUACIÓN RESULTANTE ES:	39
FIGURA 9. CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA DEL CUADRO 15. LA ECUACIÓN RESULTANTE ES:	42
FIGURA 10. GRAFICA LINEARIZADA OBTENIDA DEL CUADRO 16. LA ECUACIÓN RESULTANTE ES:	43
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN CUALITATIVA DE LA CURVA ESTÁNDAR.	45
FIGURA 12. CURVA ESTÁNDAR OBTENIDA EN BASE AL CUADRO 19. LA ECUACIÓN RESULTANTE ES:	46
FIGURA 13. REGRESIONES LINEALES EN LAS MUESTRAS “USO” DEL PRIMER MUESTREO.	53
FIGURA 14. REGRESIONES LINEALES EN LAS MUESTRAS “-70°C” DEL PRIMER MUESTREO.	54
FIGURA 15. REGRESIONES LINEALES EN LAS MUESTRAS “USO” DEL SEGUNDO MUESTREO.	55
FIGURA 16. REGRESIONES LINEALES EN LAS MUESTRAS “-70°C” DEL SEGUNDO MUESTREO.	56

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 GRÁFICA DE LOS VALORES DE LA TRANSPIRACIÓN NORMALIZADA EN LOS TRES CLONES DE PAPA....	66
ANEXO 2. ESTÁNDARES DE ÁCIDO ABCÍSICO. A PARTIR DE S5 DE PREPARAN LAS DILUCIONES PARA ARMAR LA CURVA ESTÁNDAR.	67
ANEXO 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO SAS, EN LA COMPARACIÓN DE ESTÁNDARES, CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS.	67
ANEXO 4. ABSORBANCIAS-CLON A-1MUESTREO-FOLIOLO (USO)	69
ANEXO 5. ABSORBANCIAS-CLON A-1MUESTREO-FOLIOLO (-70).....	70
ANEXO 6. ABSORBANCIAS-CLON B-1MUESTREO -FOLIOLO (USO)	71
ANEXO 7. ABSORBANCIAS-CLON B-1MUESTREO-FOLIOLO (-70)	72
ANEXO 8. ABSORBANCIAS-CLON C-1MUESTREO -FOLIOLO (USO).....	73
ANEXO 9. ABSORBANCIAS-CLON C-1MUESTREO-FOLIOLO (-70)	74
ANEXO 10. ABSORBANCIAS-CLON A-2MUESTREO-FOLIOLO (USO)	75
ANEXO 11. ABSORBANCIAS-CLON A-2MUESTREO-FOLIOLO (-70).....	76
ANEXO 12. ABSORBANCIAS-CLON B-2MUESTREO-FOLIOLO (USO)	77
ANEXO 13. ABSORBANCIAS-CLON B-2MUESTREO -FOLIOLO (-70)	78
ANEXO 14. ABSORBANCIAS-CLON C-2MUESTREO-FOLIOLO (USO)	79
ANEXO 15. ABSORBANCIAS-CLON C-2MUESTREO-FOLIOLO (-70)	80
ANEXO 16. ABSORBANCIAS-CLON A-1MUESTREO-XILEMA (USO)	81
ANEXO 17. ABSORBANCIAS-CLON A 1MUESTREO-XILEMA (-70).....	82
ANEXO 18. ABSORBANCIAS-CLON B 1MUESTREO-XILEMA (USO)	83
ANEXO 19. ABSORBANCIAS-CLON B-1MUESTREO-XILEMA (-70).....	84
ANEXO 20. ABSORBANCIAS-CLON C-1MUESTREO-XILEMA (USO).....	85
ANEXO 21. ABSORBANCIAS-CLON C-1MUESTREO-XILEMA (-70).....	86
ANEXO 22. ABSORBANCIAS-CLON A-2MUESTREO-XILEMA (USO) Y (-70) (1POCILLO SEQUÍA Y 4 RIEGO)	87
ANEXO 23. ABSORBANCIAS-CLON B-2MUESTREO-XILEMA (USO).....	88
ANEXO 24. ABSORBANCIAS-CLON B-2MUESTREO-XILEMA (-70).....	89
ANEXO 25. ABSORBANCIAS CLON C 2MUESTREO-XILEMA (USO).....	90
ANEXO 26. ABSORBANCIAS-CLON C-2MUESTREO-XILEMA (-70).....	91

I. RESUMEN

La papa, *Solanum tuberosum* L, es un cultivo primordial en la alimentación mundial; sin embargo presenta una característica interesante para su cultivo, y es la sensibilidad que muestra frente a la deficiencia de agua. Una respuesta frente a dicha condición es la síntesis de la fitohormona Acido abscisico, cuya concentración depende tanto de las características del cultivo (genotipo o etapa fonológica) como del estrés impuesto (intensidad y duración). Debido a que la metodología más específica y confiable para su cuantificación es el Ensayo de Inmuno-absorbancia Ligado a Enzimas; esta investigación utilizó el ELISA de tipo competitivo indirecto para establecer un protocolo que determine una curva estándar de concentraciones conocidas de ABA. Se hicieron variaciones principalmente en las concentraciones de los anticuerpos y antígeno, así como del sustrato; siendo las condiciones óptimas que permitieron obtener una buena sensibilidad y reproducibilidad del protocolo las especificadas a continuación: ABA-BSA 300ng/ml, MAC252 a 1:80 000, Antirat IgG a 1:2 000 y sustrato en 1mg/ml. Obteniéndose al final ecuaciones linearizadas cuyos valores de R^2 estaban en un rango de 0.94-0.98 y diferencias significativas entre los controles positivos y negativos.

Con el fin de validar el protocolo establecido, se condujo un experimento en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas para tres clones de Papa (Clon A: *CIP number* 501061.1, Clon B: *CIP number* 394881.8 y Clon C: *CIP number* 397077.16). Los tratamientos aplicados fueron de riego normal y sequía regulada, este último establecido de acuerdo a la transpiración normalizada (TN) en cada maceta. Los muestreos se hicieron en foliolos y en jugo de xilema, realizándose el primer muestreo cuando la TN llego a un valor promedio de 50-70% mientras que el segundo muestreo cuando la TN alcanzó un valor promedio de 20%. A partir de las concentraciones de ABA cuantificadas, se pudo determinar que no existen diferencias significativas entre el tipo de muestra (analizada luego del muestreo o almacenada a -70°C) ni con la fuente de la misma (foliolo o xilema).

Además, la relación de esta hormona con el rendimiento podría ayudar a determinar el comportamiento de cada clon frente al estrés impuesto.

Palabras clave (*key words*): *Solanum tuberosum* L., Sequía, Acido abscísico (ABA), Ensayo de Inmuno absorbancia Ligado a Enzimas (ELISA), transpiración normalizada (TN).

II. INTRODUCCIÓN

La papa, es un cultivo originario de los andes sudamericanos y ha sido utilizado como fuente de alimento por muchos pueblos antiguos y civilizaciones recientes. Entre los cultivos alimenticios a nivel mundial, la papa es el tercer cultivo más grande del mundo; después del arroz y el trigo. Una característica interesante respecto a este cultivo, es la sensibilidad que muestra frente a la deficiencia de agua debido a que tiene un sistema radicular escaso y superficial; motivo por el cual, se reduce considerablemente el rendimiento, número, tamaño y calidad del tubérculo.

Una de las causas principales por la cual se incrementa la síntesis de hormonas en las plantas es el estrés abiótico, el cual es un efecto por los cambios en las condiciones ambientales. Las estrategias para hacer frente a la sequía implican normalmente una mezcla de tolerancia y evitamiento del estrés. Es así que el aumento en la síntesis de la fitohormona Acido Abscísico durante el estrés hídrico, específicamente la sequía, hace que se le considere como “la hormona del estrés”. Investigaciones previas muestran una relación directa entre el ABA y el cierre de los estomas, previniendo así la pérdida de agua por transpiración a través de las hojas y disminuyendo así los requerimientos hídricos de la planta. Por otro lado, la tolerancia a condiciones de sequía está directamente relacionada con la capacidad para producir ABA, sin embargo, esta relación también depende del genotipo o cultivar, intensidad y duración del estrés así como también de la etapa fenológica del cultivo y su variedad.

Las técnicas inmunológicas han tenido grandes avances durante los últimos 30 años y son consideradas cada vez más como una tecnología de detección para el análisis de muestras. Básicamente; son más rápidas, rentables, de alto rendimiento y mayor sensibilidad de muestreo que las técnicas cromatográficas. Todo esto conllevó a la aplicación de ensayos de inmuno-absorbancia ligados a enzimas (ELISA), los cuales se complementan con el uso de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales. La

variante ELISA competitivo indirecto, es la más usada para la cuantificación de sustancias muy pequeñas, como es el caso de las hormonas.

La determinación de esta fitohormona ha pasado por varias técnicas. Desde sus inicios se utilizaron las técnicas cromatográficas, que al resultar muy complicadas y necesarias de equipos especiales, se cambiaron por el uso de los Radio-inmunoensayos (RIA). Con el avance en los procesos y el uso de enzimas, se empezó a usar el Ensayo de Inmuno-absorbancia ligado a Enzimas (ELISA). Luego y gracias a investigaciones se desarrolló un anticuerpo monoclonal, el cual permitía una determinación más precisa del ABA; y para hacer la prueba aún más sensible, se hicieron avances con la variante del ELISA competitivo indirecto. Cabe mencionar que actualmente existen kits para la cuantificación de esta hormona, pero al tener un costo muy elevado por muestra y carecer de reproducibilidad, se requiere determinar un protocolo más preciso.

Debido a que la limitación del agua puede llegar a ser un obstáculo fundamental para la productividad primaria bajo escenarios futuros de climas más áridos por causa del cambio ambiental global, y a que un tercio de la tierra destinada al cultivo se encuentra en regiones áridas y semi-áridas, el ABA puede tener una importancia enorme en el futuro de la agricultura. Precisamente la predicción en la magnitud de la señalización de ABA es crucial para la optimización de las técnicas de riego, con el fin de lograr un mejor uso eficiente de agua. En base a esto, se espera utilizar este procedimiento como un método de tamizado en clones de papa usando el contenido de ABA como indicador de su respuesta frente a la sequía.

Por lo expuesto, los objetivos de esta investigación son los siguientes:

OBJETIVO PRINCIPAL

- Establecer y validar un protocolo para cuantificar la fitohormona ácido abscísico mediante la aplicación de la técnica ELISA-competitivo-indirecto.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Optimizar las combinaciones entre concentración de anticuerpo-antígeno, concentración de sustrato y tiempo de desarrollo.
- Determinar si la hoja o el extracto de xilema provee de mayor cantidad de ácido abscísico.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. CULTIVO DE PAPA, *Solanum Tuberosum* L.

Solanum tuberosum es un cultivo tuberoso originario de los Andes (Horton, 1992) y aunque se desconoce exactamente cuando se inició su uso, se estima que fue hace 7 a 10.000 años en el Lago Titicaca, región de Perú y Bolivia (Loebenstein, 2001).

Es considerado como el tercer cultivo alimentario más grande del mundo, después del arroz y el trigo, con una producción de 329 millones de toneladas en 18,6 millones de hectáreas (FAO, 2011) (Figura 1). Los continentes más grandes de producción de papa son Asia y Europa con 44% y 37% de la producción mundial, respectivamente. El general, el cultivo de desarrolla a gran escala en cerca de 130 países (Loebenstein, 2001), siendo esencial en los países desarrollados, donde la producción per cápita sigue siendo la más alta del mundo (Figura 2).

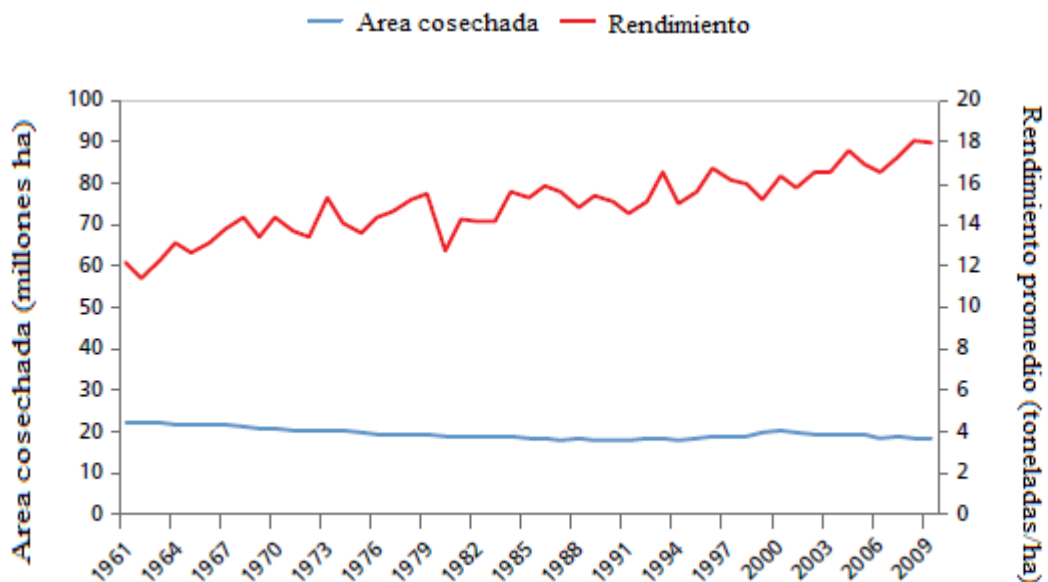


Figura 1. Superficie mundial de cosecha de papa y rendimiento promedio durante el periodo 1961-2011.

La papa se cultiva en países con diferentes zonas climáticas, incluyendo las regiones templadas, los trópicos y sub-trópicos, bajo diferentes condiciones agroecológicas, tierras bajas y tierras altas (Loebenstein, 2001). A pesar de que se puede plantar a partir de semilla botánica, en casi todos los casos se planta como tubérculos. La semilla tubérculo debe tener dos o tres ojos, de los cuales brotan los nuevos brotes y tallos; la profundidad de siembra es generalmente de 5 a 10cm y la densidad de plantas se encuentra en un rango de 30 000 a 60 000 plantas/ha aunque varía dependiendo del tamaño de las semillas, el cultivar y el uso. La duración del ciclo de crecimiento y la producción total de tubérculos depende del cultivar, temperatura y duración del día (Quiroz, 2012).

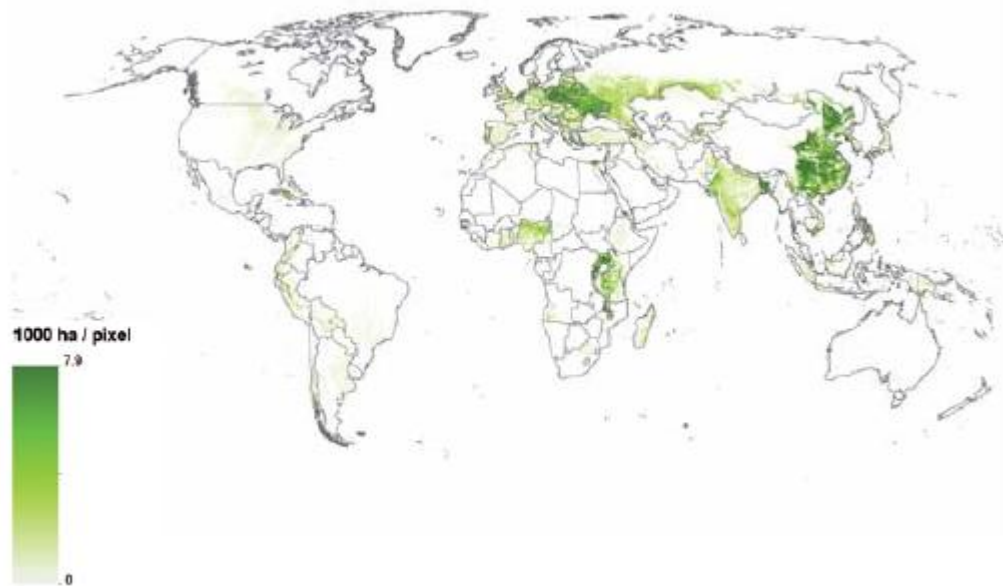


Figura 2. Superficie cosecha de papa (Gaez, 2011).

3.2. ESTRÉS HIDRICO

El estrés hídrico es definido como la respuesta a la falta o exceso de agua en las plantas (González, 1999). El déficit hídrico es uno de los factores limitantes en la producción global de cultivos, es por este motivo que varias investigaciones se han enfocado en la caracterización de plantas tolerantes a la sequía (Kholova, 2010).

Las respuestas de las plantas frente a la escasez de agua son complejas, incluyendo cambios en adaptación y/o efectos perjudiciales (Chaves, 2002). Bajo condiciones de estrés hídrico las plantas detienen su crecimiento completamente y acumulan solutos en las células para mantener el volumen y turgencia celular contra la deshidratación, el cual es llamado ajuste osmótico (Heidari, 2009).

En el caso de las plantas vasculares, las estrategias para minimizar los efectos negativos inducidos por la deficiencia de agua, pueden ser las modificaciones morfológicas como el incremento del tamaño de raíces y la reducción del área foliar. Así también, durante la deficiencia de agua existen mecanismos fisiológicos como el cierre estomático y la disminución en la transpiración y en la tasa fotosintética, y finalmente procesos bioquímicos como el ajuste osmótico caracterizado por la acumulación de solutos orgánicos que mantienen la turgencia celular (Lobo da Costa, 2009).

3.2.1. SEQUIA

La sequía es el tipo de estrés que afecta muy directamente a la producción de cultivos debido a que afecta en casi todas las funciones de la planta (Heidari, 2009); es además, una de las fuentes claves del estrés abiótico debido a que induce un menor crecimiento y tasas de desarrollo, aborto de la floración y disminución del rendimiento del cultivo durante la etapa vegetativa, reproductiva y de maduración. Usualmente, las consecuencias por sequía en plantas son estudiadas en situaciones controladas y artificiales en las que se aplica la restricción de agua (Lobo da Costa, 2009).

La sequía puede ser clasificada de acuerdo al motivo que la causa. La sequía meteorológica ocurre cuando la precipitación es significativamente menor a la esperada de acuerdo a la locación y época del año; la sequía agrícola ocurre cuando las fuentes de agua usadas directamente para el cultivo, son escasas y resultan en un alto déficit de humedad del suelo. El umbral para la sequía agrícola puede estar influenciado por el cambio a un nuevo cultivo, debido a que diferentes cultivos tienen diferentes requerimientos de agua (Ashley, 1993).

Las estrategias de las plantas para hacer frente a la sequía normalmente envuelve una mezcla de escape al estrés y de tolerancia que varían de acuerdo al genotipo (Chaves, 2002), siendo la inducción del cierre estomático parcial y la reducción del área foliar las principales causas fisiológicas para que las plantas ahorren agua (Heidari, 2009). Por otro lado, el efecto de la sequía depende de la intensidad y la duración de esta, así como la etapa fenológica en la que se encuentre el cultivo (Barrios, 1998) y la variedad de la misma (Ortiz, 2008).

Finalmente, debido a que la sequía es una de las limitaciones más importantes en la producción de los cultivos en regiones desérticas, es de mucha importancia estudiar variedades con alta eficiencia bajo condiciones de estrés (Heidari, 2009).

3.2.2. RESPUESTA A LA SEQUIA

El cultivo de papa es sensible a la deficiencia de agua debido a que su sistema radicular es superficial y escaso por lo que el rendimiento (Liu, 2004-2006), número, tamaño y calidad del tubérculo se puede reducir considerablemente.

La deficiencia de agua en etapas tempranas, durante la formación del estolón, la iniciación del tubérculo y después del mismo, tiene grandes efectos adversos en el rendimiento final. En general, la deficiencia en la mitad o parte final del periodo de crecimiento tiende a reducir el rendimiento menos que en el periodo temprano; aunque esto puede variar con el tipo de cultivar (Quiroz, 2012).

3.3. REGULADORES HORMONALES EN PLANTAS

Las fitohormonas son moléculas muy pequeñas sintetizadas a partir de precursores ubicuos, muchas de ellas a través de múltiples vías escalonadas y en una amplia gama de tejidos o células dentro de los tejidos. Actúan en la misma célula o en el tejido donde fue sintetizado, incluso pueden ser transportadas a larga distancia para dar una respuesta fisiológica específica (Davies, 1995). Son activas en cantidades mínimas y algunas de ellas

tienen influencias tanto promotoras como inhibitorias. Es decir, no son solo estimuladores, sino que también son reguladores químicos que llevan información sobre el estado de las células y tejidos, o las condiciones alrededor del ambiente en el que se desarrolla la planta (Turner, 1997).

Cada fase del crecimiento de las plantas desde la germinación, a través de la diferenciación durante el crecimiento y la senescencia, es controlada por hormonas endógenas. Estas tienen un rol importante en el desarrollo embrionario, la germinación de la semilla y la síntesis de sustancias de almacén. (Chudasama, 2007).

Los niveles de ABA en tejidos vegetativos pueden ser elevados en respuesta a varios estreses ambientales; es decir, se vuelve activa en la adaptación frente a varias formas de estrés ambiental (Hartung 1999, Sarmad 2007), particularmente bajo el estrés hídrico. Por tal, se refiere a la fitohormona ABA como la hormona del estrés (Taylor 2000, Heidari 2009).

3.3.1. ACIDO ABSCISICO “ABA”

Esta fitohormona es considerada como un regulador endógeno del crecimiento de las plantas, ya que está involucrado en la regulación de varios procesos del desarrollo tales como la inhibición del crecimiento, la abscisión de hojas y frutos, y la dormancia de semillas o aceleración de la senescencia (Mertens, 1983). Además, durante el proceso de tuberización de la papa, participa en la latencia de yemas o inhibe la formación de estolones (Ortiz, 2008).

El ABA regula muchos aspectos agronómicos importantes del desarrollo de las plantas incluyendo un rol principal en la maduración de semillas y desarrollo del fruto. De varios reportes se conoce que el ABA es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Sharp 2002, Chudasama 2007). Si bien las células de la raíz sintetizan constitutivamente una pequeña concentración basal de ABA cuando la planta está en riego (Wilkinson, 2002); actúa principalmente como un factor central de defensa frente al estrés hídrico en plantas, durante el cual desencadena el cierre estomático (Mertens, 1983)

aunque algunas investigaciones sugieren que la sensibilidad del estoma al ABA es muy variable (Zhang 1997).

Cuando las plantas están sujetas a estrés por salinidad o sequía o a la combinación de ambas, el ácido abscísico suele ser producido en las raíces y actuar como una señal hormonal siendo transportadas al tallo vía el xilema, donde reducen el crecimiento foliar y la conductancia estomática, resultando de este modo en el retraso del déficit hídrico de la planta (Jacobsen, 2009); tal como se reportó en cebada y trigo (Razzaghi, 2011). Las raíces contienen todos los precursores necesarios para la biosíntesis de ABA a través de la ruta indirecta de violaxantina. El ABA en las raíces aumenta cuando el suelo pierde humedad y es derivado en gran medida hacia la síntesis en tejidos de las raíces, siendo mayor la acumulación en sus puntas; lo que puede ser el resultado de la baja vacuolización de sus células con un alto porcentaje de citosol, compartimento donde el ABA es formado (Hartung, 1999). Otros estudios más detallados muestran que bajo un continuo suelo seco, la segunda fuente de ABA en el xilema es originado en las hojas marchitas (Razzaghi, 2011). La síntesis de ABA en las hojas puede ser cargado al floema y ser transportado hacia las raíces, en donde una parte puede ser depositada en los tejidos y otra parte recirculada al xilema (Hartung, 2002).

Bajo condiciones de estrés hídrico la disminución del potencial hídrico celular y la acumulación de ABA dan lugar a una regularización de los metabolitos celulares y la acumulación de osmolitos como prolina, glicina y betaina (Heidari, 2009). La concentración del ABA en tejidos se mantiene dinámico por las fuerzas de síntesis, transporte y catabolismo de productos inactivos (Chudasama, 2007). Varios conjugados de ABA y sus metabolitos han sido reportados, de los cuales el ABA glucosa ester (ABA-GE) parece ser el más extendido. Este tiene poca o ninguna actividad biológica y no es considerada una reserva de ABA. En algunos tejidos, la formación de ABA-GE u otros conjugados parecen ser una vía importante en la inactivación del ABA (Cutler, 1999). Sauter *et al.* han señalado que el ABA-GE solo puede tener rol hormonal cuando el ABA es liberado de su forma conjugada hidrófila y fisiológicamente inactiva (Sauter *et al*, 2002)

La concentración de esta hormona en estructuras reproductivas de un cultivo, aumenta significativamente cuando la planta se encuentra bajo el estrés por sequía durante

la floración. Este aumento de la concentración sugiere tener un rol en la determinación del grano en maíz y trigo. Los niveles de ABA también aumentan en las etapas iniciales del desarrollo de la semilla y disminuye durante la maduración del embrión (Chudasama, 2007). En trigo y en algunas plantas leñosas, una mayor cantidad de ABA fue correlacionado con la tolerancia al estrés, aunque en maíz y en girasol dicha relación no ha podido ser probada. Por lo que la relación ABA-tolerancia se encuentra relacionada al cultivo y a las condiciones específicas en las que se desarrolle (Kholova, 2010).

3.4. TECNICAS INMUNOLOGICAS

Las conocidas técnicas cromatográficas generalmente requieren personal muy específico, tratamiento laborioso de las muestras y elevados costos de equipos. Por consiguiente, estas técnicas no son prácticas para el tamizado de un elevado número de muestras. En cambio, Las técnicas inmunológicas son consideradas cada vez más como una alternativa y/o método complementario para el análisis, debido a que son rápidas, rentables y de alto rendimiento del muestreo (Zhang, 2011).

Los inmuno ensayos están siendo usados cada vez más para determinar la concentración de fitohormonas en plantas (Ross, 1987). La gran ventaja de los inmunoensayos sobre los bioensayos convencionales y métodos físico-químicos tales como HPLC y GC-MS es la posibilidad de analizar varias muestras rápidamente y sin tanta pérdida de material biológico durante el proceso de extracción. Además, debido a la sensibilidad de los ensayos (a nivel de picomoles) sólo pequeñas cantidades de tejido vegetal son necesarias para el análisis (Cahill, 1989).

Por un lado, los Radioinmuno ensayos (RIA) permiten una cuantificación precisa y sensible de una hormona pero requiere de una antígeno con alta radioactividad específica y equipos costosos. Por otro lado, las técnicas inmuno-enzimáticas, especialmente el ensayo de inmuno-absorbancia ligado a enzimas (ELISA), son más sensibles y utilizan compuestos y equipos relativamente más económicos (Leroux, 1985).

Estos tipos de tecnologías por detección han sido objeto de grandes avances en los últimos 30 años. Es así que se empieza con la detección mediante el uso de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales en ensayos de inmunoabsorbancia ligados a enzimas (ELISA), el cual aumenta drásticamente la velocidad con la que los antígenos serán detectados *in vivo* (Komy, 2010).

3.4.1. ENSAYO DE INMUNOABSORBANCIA LIGADO A ENZIMA “ELISA”

Las técnicas ELISA están basadas en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al mantener ambas moléculas sus propiedades individuales y estar uno de los componentes marcado con un enzima e insolubilizado sobre un soporte, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color detectable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro (Takahashi, 1987). La técnica puede diferenciar materiales sanos de enfermos -virus-(cualitativamente) o determina la concentración del antígeno o anticuerpo (cuantitativamente) (Clark, 1981).

Los primeros anticuerpos utilizados para la determinación intracelular del ABA, fueron de tipo policlonal. Al resultar éstos con alta reactividad cruzada, limitaban su uso para el análisis cuantitativo del ABA en presencia de niveles altos de precursores, catabolitos o conjugados del ABA (Mertens, 1983). Es así que Leroux (1985) determinó que sólo los anticuerpos monoclonales o una amidación del ABA, permitirían la medición de pequeñas cantidades de esta hormona. La habilidad de los anticuerpos monoclonales (McAbs) de reconocer estructuras moleculares específicas pueden hacer que los ensayos con este tipo de anticuerpos estén menos influenciados por la interferencia de uniones no específicas con impurezas en los extractos crudos de plantas (Ross 1987, Quarrie 1988).

3.4.2. ELISA COMPETITIVO-INDIRECTO

El ensayo ELISA competitivo es el menos común debido a que el desarrollo de su procedimiento conlleva más etapas y requiere de más conocimientos. Sin embargo, esta técnica es la más usada para detectar antígenos muy pequeños, tales como las hormonas (Jordan, 2005a).

Existen muchas variaciones y adaptaciones del ELISA-competitivo aunque el principio general en todos es el mismo (Figura 3). La etapa inicial de la técnica es la sensibilización o cobertura de la microplaca ELISA con un antígeno que resulte ser específico a su respectivo anticuerpo monoclonal, el cual será cuantificado y cuyas concentraciones son importantes de determinar al aumentar la sensibilidad del ensayo (Zhang, 2011). La base de la técnica recae en la competencia entre la forma conjugada del antígeno con la muestras por los sitios de unión al anticuerpo, la unión de éstos a un segundo anticuerpo enzimático puede ser detectada usando un sustrato adecuado que produzca color. La competencia entre el antígeno conjugado y la muestra interfiere con la habilidad del anticuerpo enzimático de unirse al anticuerpo monoclonal capturado. Por eso, y a diferencia del ELISA estándar sándwich (DAS-ELISA) la lectura es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Jordan, 2005b). Las lecturas pueden ser realizadas con un espectrofotómetro.

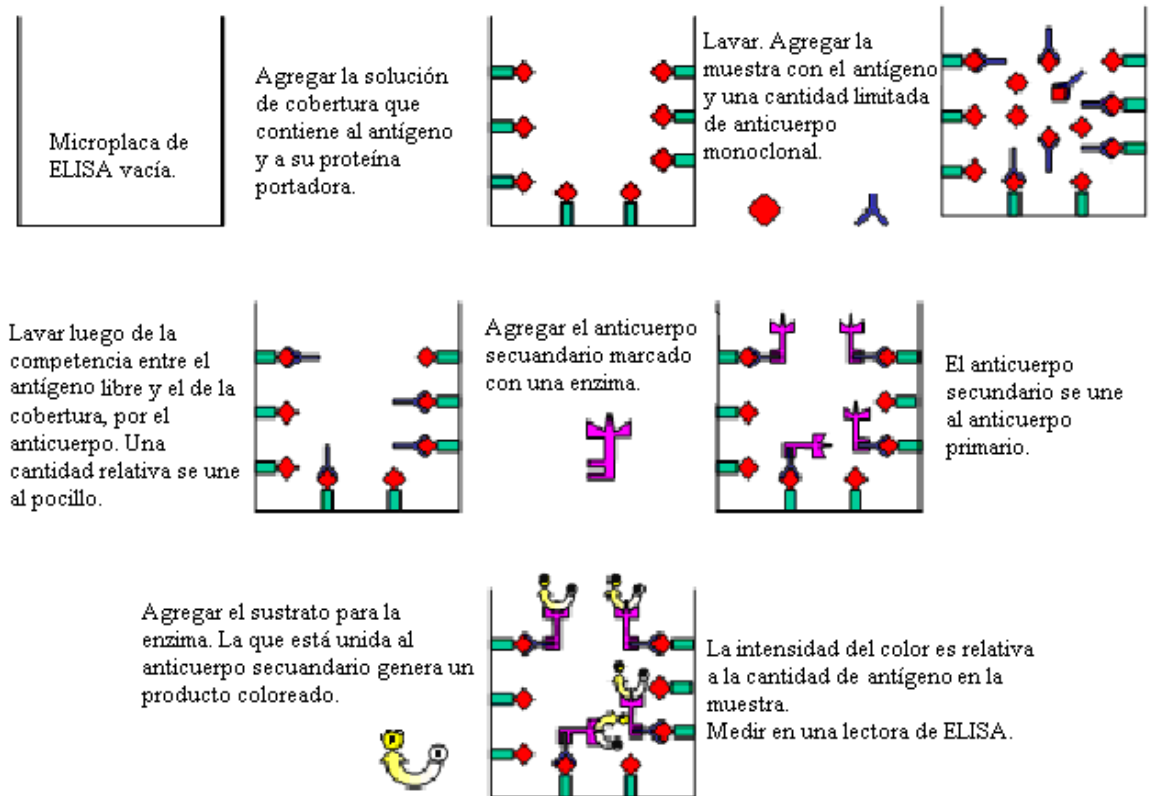


Figura 3. Esquema ELISA competitivo indirecto (Asch, 2000).

Las primeras aplicaciones de esta técnica para la cuantificación del ABA se dieron con Quarrie (1988), quien determinó que el anticuerpo monoclonal MAC62 (MAC 252) resulta ser más específico que los policlonales. Cahill, en 1989, calificó a este método como específico y confiable para la detección de ABA en extractos de tejido crudo de soya. Con la técnica definida, las posteriores investigaciones se aplicaron para determinar la relación entre el ABA y fisiología de la planta; es así que en 1997, Quarrie y su equipo no encontraron suficiente evidencia para determinar una relación entre el tamaño de la hoja y la capacidad para acumular ABA en muestras de arroz. Del mismo modo, Olivella (2001) aplicó el procedimiento en *Gerbera jamesonii* cv. Bolus, en la cual no encontró cambios significativos en los niveles de ABA en hojas de diferente edad.

Luego, las investigaciones se enfocaron en hallar una relación de esta hormona con la deficiencia de agua del suelo. Por consiguiente, Jiang, (2004) determinó mediante el uso de hojas y tallos en *Rhinanthus minor*, que la deficiencia de agua causa un claro aumento de 2 a 3 veces en los niveles de ABA. Así también, Heidari (2009) prueba que durante la sequía aumenta el ABA en *Zea mais*, incluso señala el uso de su estudio para la selección

de genotipos en mejoramiento; lo mismo ocurre en *Vigna unguiculata* en donde el déficit hídrico induce un aumento significativo de la concentración de ABA, medido en ng/kg (Lobo da Costa 2011). Sin embargo, Kholova (2010), en un estudio de *Pearl millet*, no encontró diferencias en los niveles de ABA entre los tratamientos de estrés (sequía regulada) y control.

Aunque los primeros ensayos fueron realizados a partir de hojas o tallos, con el avance en el conocimiento del transporte de ABA y la búsqueda de nuevas alternativas de muestreo, las investigaciones optaron por el uso del jugo de xilema. Por ejemplo, Liu en condiciones controladas de invernadero (2004), bajo riego parcial de raíces (2006) y con sequía total (2007) de papa, demostró que los niveles de ABA en el xilema aumentan exponencialmente en combinación con la disminución del potencial hídrico. Además, Jacobsen (2009) demostró que en el cultivo de quinua, la sequía aumenta la cantidad de ABA en el xilema desde el segundo día luego de imponer el estrés y este incremento se hace más notorio a partir del día 11.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. PLAN GENERAL DEL EXPERIMENTO

La presente investigación consta de dos etapas; en la primera, mediante la prueba ELISA-competitivo-indirecto se determinan las mejores condiciones para establecer un protocolo que cuantifique la fitohormona ácido abscísico en base al desarrollo de una curva de calibración. En la segunda parte, se aplica el protocolo previamente establecido en muestras de papa, las cuales se desarrollaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, con el fin de estimar las diferencias de su concentración bajo dos tratamientos de riego y en dos tipos de muestras.

4.2. BIOENSAYOS EN LABORATORIO

4.2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El desarrollo de cada una de las fases de la técnica ELISA-competitivo-indirecto fue realizado en el Laboratorio de Serología del Centro Internacional de la Papa.

4.2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

a) Tampones y reactivos

a.1 Tampón carbonato 50mM (pH 9.6) - Tampón de cobertura

- Na_2CO_3 -----0.159g

- NaHCO_3 -----0.293g
- Agua mQ-----100ml

a.2 Tampón fosfato salino 10mM - PBS (pH 7.4)

- NaCl (137mM)-----8g/l
- KH_2PO_4 -----0.2g/l
- Na_2HPO_4 -----1.15g/l
- KCl (2.7mM)-----0.2g/l

a.3 Tampón de lavado – PBS Tween (pH 7.4)

- PBS -----1000ml
- 0.05% Tween-20-----0.5ml

a.4 Tampon Salino Trisma - TBS (pH 7.8)

- Trisma Base-----6g/l
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -----0.428g/l
- NaCl -----8.85g/l

a.5 Tampón de sustrato (pH 9.8)

- Dietanolamina-----582ml
- HCl -----338ml
- Agua destilada-----80ml

a.6 Diluciones Stock de Ácido abscísico

- 2-cis, 4-trans-Abscísico acid, 98%, synthetic (Sigma-Aldrich)
- Metanol

b) Equipos y otros

- Lectora SUNRISE-BASIC TECAN
- Nanodrop
- Incubador de baño maría a 37°C
- Microplacas ELISA de poliestireno 12x8
- Dispensador de lavado

4.2.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

El establecimiento del siguiente protocolo se realizó en base a la técnica ELISA competitivo-indirecto, teniendo como referencias los protocolos previamente descritos por Asch (2000) y Kholova, (2010). Las concentraciones de ABA fueron determinadas usando el anticuerpo monoclonal MAC252 de acuerdo al protocolo descrito por Quarrie *et al.* (1988).

a) Conjugado ABA-BSA

Debido a que las hormonas son moléculas muy pequeñas, es necesario que estén conjugadas a una proteína. La proteína portadora más utilizada y que brinda resultados satisfactorios es la Albúmina Sérica Bovina-BSA (Jinqing, 2011).

El procedimiento se realizó en base al protocolo descrito por Jana Kholova.

Se diluyeron 15.3mg de ABA sintético con 0.4ml de Dimetilformamide (DMF) mientras que 50mg de albúmina sérica bovina se diluyeron con 1.5ml de agua destilada pH 8. Ambas soluciones se mezclaron y se les agregó 40mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) diluido en 0.5ml de agua destilada pH 8. Se dejó reposar la mezcla por 2h en oscuridad y posteriormente se incubó a 4°C durante toda la noche y en constante agitación. Al día siguiente, la mezcla se dializó contra 4 cambios de 1L de agua destilada durante 2 días a 4°C y en oscuridad. Finalmente, las concentraciones

del conjugado se determinaron en alícuotas de 0.1ml en un Nanodrop y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

b) Cobertura

Cada pocillo de una microplaca ELISA fue cubierta con 0.15ml de la mezcla entre el tampón cobertura pH 9.6 y el conjugado ABA-BSA en un rango de concentraciones entre 90ng/ml y 500ng/ml. Posteriormente, las placas fueron selladas usando manking-tape y envueltas con papel aluminio para mantenerse a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados, de 3 minutos cada uno, con tampón fosfato salino tween 20 (pH 7.4). Las placas sensibilizadas se almacenaron selladas y recubiertas a -20°C hasta su uso.

c) Preparación de diluciones

A partir de la menor dilución stock conocida de 2-cis, 4-trans-Acido Abscísico (5000ng/ml) se preparó una batería de diluciones 1:10 en un rango de 1000ng/ml hasta 1×10^{-4} ng/ml en tampón TBS pH 7.8. Para obtener la curva estándar, en los pocillos de 3 o 4 filas se agregaron 0.075ml de cada dilución.

Cuadro 1: Diluciones en ng/ml (1:10) a partir de una concentración conocida de ABA.

CODIGO	CONCENTRACION (ng/ml)	ABA (ul)	TBS (ul)	TOTAL (ml)
St. 1	1000	200 STOCK 5	800	1
St. 2	100	100 St.1	900	1
St. 3	10	100 St.2	900	1
St. 4	1	100 St.3	900	1
St. 5	0.1	100 St.4	900	1
St. 6	0.01	100 St.5	900	1
St. 7	0.001	100 St.6	900	1
St. 8	0.0001	100 St.7	900	1

d) Primer anticuerpo

Se preparó el anticuerpo monoclonal MAC 252 en las proporciones 1:40 000 1:60 000 1:80 000 y 1:100 000 en tampón PBS pH 7.4. A cada pocillo de los estándares y controles positivos, se les agregó la mitad del volumen usado en un pocillo; mientras que los controles negativos no contienen este anticuerpo. Para el paso de competencia las placas selladas y envueltas se incubaron a 4°C durante 3horas. Luego se realizaron 3 lavados con tampón PBS-tween pH 7.4.

e) Segundo anticuerpo

El Segundo anticuerpo, Antirat IgG-peroxidasa, fue preparado en tampón TBS pH 7.8 hasta obtener las concentraciones de 1:1000 1:2000 y 1:3000. A cada pocillo se le agregó 0.15ml y se volvió a sellar y cubrir. Luego, se dejó incubar durante 1hora a 37-38°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados con tampón PBS-tween pH 7.4.

f) Revelado

Al tampón sustrato se le agregaron pastillas de paranitrofenil fosfato-PNPP hasta obtener una concentración de 1mg/ml o 2mg/ml. En cada pocillo se agregó 0.15ml y se dejó reaccionar a 37°C en baño maría durante 30minutos y luego a 30min en el laboratorio. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 405nm.

4.3. BIOENSAYO EN CAMARA DE CRECIMIENTO

4.3.1. CONDICIONES CONTROLADAS EN LA CÁMARA DE CRECIMIENTO

Las condiciones climáticas establecidas para el desarrollo de las plantas de Papa en la cámara de crecimiento fueron las siguientes: La temperatura se mantuvo a 22°C ± 2°C durante el día y 12°C ± 2°C por la noche y 12h de fotoperiodo.

4.3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

a) Material vegetal

Se utilizaron tubérculos de tres clones de papa (*Solanum tuberosum* L), Clon A: 501061.1 - Clon B: 394881.8 y Clon C: 397977.16; de característica susceptible, intermedia y tolerante frente a la sequía respectivamente. Fueron sembrados en macetas que contenían 950g de sustrato en base a: arena, musgo y humus en la proporción 1:2:3.

b) Equipos y otros

- HOBO-U23
- Balanza
- Macetas #8 (19cm de diámetro y 15cm hondo)
- Probetas de 50, 250 y 500ml
- Bomba Scholander

4.3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

a) Instalación y conducción del ensayo

a.1 Siembra

Una vez que la cámara de crecimiento presentara las condiciones programadas, se continuó con la siembra de los tubérculos “madre” (Figura4). En cada maceta se colocó un tubérculo con una profundidad de 5cm.



Figura 4. Instalación del material biológico en la cámara de crecimiento.

a.2 Imposición del estrés hídrico (sequía regulada)

Este procedimiento se realizó de acuerdo al descrito por Saji (2010).

Todas las macetas crecieron bajo condiciones de riego durante las primeras semanas y hasta el momento de imponer el tratamiento (20 días después de la siembra). Cuatro macetas, escogidas al azar, de cada clon fueron cosechadas al momento de iniciar el tratamiento para determinar su biomasa (biomasa pre-sequía). Las veinte macetas restantes de cada genotipo fueron saturadas con agua y drenaron durante la noche. Las plantas sometidas bajo el tratamiento riego normal, recibieron diariamente la misma cantidad de agua transpirada y hasta un 80% de la capacidad de campo del suelo en las macetas; esto con el fin de no saturar el suelo dado que la papa es ligeramente sensible a la falta de aire en el suelo. El tratamiento de sequía regulada estuvo sometido a pérdidas sucesivas por transpiración diaria, hasta de 150 ml en los 4 primeros días, posteriormente se redujo hasta 70ml durante 6 días y al final llegamos hasta valores de pérdidas sucesivas de 30ml de transpiración como máximo para cada maceta. Los valores de transpiración que excedían los límites antes descritos, fueron repuestos cada día por la aplicación del riego diario según cada registro de pesos. Esta labor fue realizada con agua medida a través de probetas y aplicada directamente en cada maceta.

El experimento terminó cuando para un genotipo o clon, la transpiración normalizada de las plantas bajo estrés hídrico estaba alrededor del 20%. La duración del experimento fue de 25-30 días, periodo durante el cual se puede ignorar el aumento del peso de cada maceta por el peso fresco.

a.3 Muestreo

De las veinte macetas restantes por cada clon, se escogieron al azar diez (cinco bajo riego normal o control y cinco en estrés hídrico o sequía regulada) y a partir de ellas se realizaron los muestreos en dos fechas.

El primer muestreo, tanto en las plantas control como en las que estaban bajo estrés, se realizó al inicio del tratamiento de sequía regulada cuando la transpiración normalizada en los tres clones presentaba un valor aproximado de 70-50% (Clon A: 52%, Clon B: 68% y Clon C: 72%). La segunda toma de muestras se llevó a cabo cuando la transpiración promedio presentó un valor de 20%. Cada muestreo se realizó por duplicado para obtener dos tipos de muestra, siendo el primero el que se analizó luego de la cosecha; mientras que el segundo grupo se analizó luego de conservar las muestras durante 30 días a -70°C .

En cada una de las dos fechas, el muestreo consideró dos fuentes de material: folíolos y jugo de xilema. Los folíolos seleccionados pertenecieron a la última hoja expandida en el tercio superior de cada planta, así también las hojas que se utilizaron para extraer el jugo de xilema.

a.4 Cosecha

Luego del segundo muestreo, se realizó la cosecha de hojas, tallos, raíces y tubérculos de todas las macetas. Se anotaron los Pesos frescos y los Pesos secos luego de estar dos días en una estufa a 80°C .

b) Estimación del ácido abscísico

La obtención del ácido abscísico en cada uno de los muestreos se realizó de la siguiente manera:

b.1 Extracción del ácido abscísico en folíolos

Se siguió la metodología previamente establecida por Heidari, 2009.

Se pesaron 200mg de tejido molido con nitrógeno líquido y se colocaron en viales Eppendorf ámbar, luego fueron macerados con 1.2ml de solución acuosa de metanol al 80% conteniendo hidroxitolueno butilado (10mg/l). Después de 1 hora en la oscuridad y a 4°C, se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 5min (4°C) y filtrar en un Sep-Pak C-18 a 5000rpm por 5 segundos para remover pigmentos y lípidos. El volumen restante se llevó a un evaporador rotativo al vacío para remover el metanol (60 min aprox). El residuo se disolvió en 1 ml de agua destilada y se particionó tres veces con igual volumen de etil acetato para separar el ABA libre del ABA-conjugado. La fase acuosa fue eliminada y la fase orgánica se incubó en oscuridad y a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la fracción pura de etil acetato se llevó a un evaporador rotativo al vacío durante 30min. Finalmente, el residuo se disolvió con 500ul de buffer TBS pH 7.8.

b.2 Extracción del ácido abscísico en xilema

Para la extracción del ácido abscísico a partir del jugo de xilema se utilizó la metodología descrita por Liu (2006) y repetida por Jacobsen (2009).

El jugo de xilema fue colectado mediante la presurización de una hoja en una cámara de presión tipo Scholander. La hoja completa fue introducida en la cámara mientras que parte del tallo sobresalía de la misma y se aplicaba una presión de 0.3MPa. La superficie del tallo fue cortado, limpiado con agua destilada y secado con papel toalla. Se colectaron de 0.5 a 1.0ml de jugo usando una pipeta y colocándolo en un vial Eppendorf ámbar (Figura 5). La determinación de concentración del ABA en el xilema siguió el procedimiento de Heidari (2009) pero sin el uso del sep Pak C-18.



Figura 5. Extracción del jugo de xilema con la Bomba Scholander.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.4.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ACIDO ABSCÍSICO

La curva de calibración en cada microplaca ELISA se construyó en base a 8 puntos de diluciones conocidas o estándares (St.) de ABA. Cada estándar contó con 3-4 repeticiones mientras que los controles positivos (B+) y negativos (B-) con un promedio de 10 repeticiones.

Cuadro 2: Asignación de cada pocillo en una microplaca ELISA

St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8		
R	R	R	R	R	R	R	R	B+	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B+	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B+	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B+	B+
B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B+	B+
B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B-	B+	B+

4.4.2. CÁMARA DE CRECIMIENTO

La cámara de crecimiento almacenó al inicio del experimento, 72 macetas distribuidas en la misma cantidad entre los 3 clones en estudio. La aplicación del tratamiento se inició cuando todas las macetas presentaron un desarrollo homogéneo con un tamaño promedio de tallo de 10cm. El tipo de tratamiento aplicado en cada maceta fue elegido al azar.

Cada clon contó con 24 unidades experimentales, de las cuales 12 crecieron bajo el tratamiento de riego normal y las restantes 12 macetas bajo sequía regulada. La distribución del material biológico dentro de la cámara de crecimiento fue la presentada a continuación:

Cuadro 3: Distribución de los tres clones dentro de la cámara de crecimiento.

CLON A CIP 501061.1 Sequía regulada/Riego normal	CLON B CIP 394881.8 Sequía regulada/Riego normal
CLON C CIP 397077.16 Sequía regulada/Riego normal HOBO	



Figura 6. Distribución homogénea del crecimiento de los tres clones en estudio.

4.4.3. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

En cada placa ELISA se colocaron 10 muestras (con 3 repeticiones cada una), más tres repeticiones de los estándares, los controles positivos y negativos; siendo la distribución elegida la presentada a continuación:

Cuadro 4: Distribución de estándares de ABA y muestras biológicas.

St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	B-	B-	B+
R	R	R	R	R	R	R	B-	B-	B+
R	R	R	R	R	R	R	B-	B-	B+
R	R	R	R	R	R	R	B-	B-	B+
r1	r1	r1	r1	r1	r1	r1	r1	r1	r1
r2	r2	r2	r2	r2	r2	r2	r2	r2	r2
r3	r3	r3	r3	r3	r3	r3	r3	r3	r3
Sequía regulada					Riego normal				

4.5. ANÁLISIS DE DATOS

4.5.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ACIDO ABSCÍSICO

Para construir la curva de calibración se utilizaron los valores de absorbancia medidos luego de 30min (37°C en baño maría) y de 60min de reacción total, a 405nm mediante el uso de una lectora SUNRISE-BASIC TECAN y en conjunto con el software Magellan 7.0. Los valores de absorbancia fijados para cada estándar se obtuvieron en base al promedio de tres repeticiones.

Método logit-log

Este método se encarga de linearizar las curvas de calibración obtenidas en ensayos inmuno-métricos y competitivos. La aplicación de esta conversión matemática de tipo Logit vs. Log genera una relación lineal a partir de la transformación de datos. La función logit transforma una curva de forma S con un solo punto de inflexión, en una línea recta; es así que en ensayos competitivos, el logaritmo de la concentración (eje x) es plotado vs el logit del porcentaje de unión o señal corregida (eje y) (Wild, 2006).

El porcentaje de unión (%Binding) para cada estándar se obtiene de acuerdo a la siguiente formula (Asch, 2000):

$$\% \text{ Binding (\%B)} = \frac{\text{standard O.D} - \text{NSB O.D} * 100}{B_0 \text{ O.D} - \text{NSB O.D}}$$

En donde:

- NSB O.D. representa el nivel de unión no específica y debe ser restado a todas las lecturas.
- B_0 O.D. representa al valor de absorbancia máxima en la cual ocurre el 100% de unión.
- % Binding es el porcentaje total de unión posible observado para una determinada concentración de ABA después de ser corregido con la unión no específica.

Finalmente, el logit del porcentaje de unión es (Quarrie, 1988):

$$\text{Logit \% Binding} = \ln [\%B / 100 - \%B]$$

Además, para demostrar si existen diferencias significativas entre los controles positivos y negativos, los resultados fueron procesados y analizados utilizando un paquete estadístico "SAS" de la Unidad de Investigación Informática (RIU, por sus siglas en inglés *Research Informatic Unit*), del Centro Internacional de la Papa.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA TRANSPIRACION NORMALIZADA

El tratamiento de sequía regulada se mantuvo de acuerdo a los cálculos obtenidos en la transpiración normalizada de cada maceta, de acuerdo a lo descrito por Saji *et al.* (2010).

Para minimizar la influencia en la transpiración en el período de la prueba, debido a los factores ambientales, la tasa de transpiración fue normalizada a partir del promedio de las plantas sometidas bajo el tratamiento de riego normal o control.

$$TT = \frac{\text{transpiración_de_planta_en_sequía_regulada}}{\text{transpiración_promedio_de_plantas_control}}$$

Donde TT es la transpiración relativa. Una segunda normalización es realizada para remover la variación en TT debida al tamaño de planta. TT diaria de cada maceta en el tratamiento de sequía regulada es dividida entre el promedio de los tres primeros días, en cada una de las macetas.

$$TN = \frac{TT_de_la_planta}{TT_promedio_de_tres_primeros_días_de_la_planta}$$

Donde TN es la transpiración normalizada y sirve para eliminar variaciones, y partir de condiciones iniciales estables como las adecuadas condiciones de agua disponible en el suelo. Después de esta normalización, los valores iniciales de la TN en el tratamiento de sequía regulada fueron cercanos a 1.0 (100%), para luego ir descendiendo. Todo este procedimiento fue realizado en una hoja de cálculo (MS Excel 2007).

La tasa de transpiración normalizada (TTN) es el promedio de las TN para cada día en cada maceta, el fin de la prueba termina cuando la TTN es cercana al 20%. Este término de la prueba indica el momento de la cosecha.

4.5.3. CUANTIFICACION DE ABA EN MUESTRAS

En primer lugar, se probaron diferentes diluciones de muestra de acuerdo a la fuente (xilema o foliolo) para determinar por comparación cuál de estas diluciones se ajusta mejor al procedimiento planteado. Este paso se aplicó en dos muestras de cada fuente elegidas al azar. A partir de esto, la concentración de la fitohormona en las muestras de foliolos y jugo de xilema, fue calculada usando el modelo linearizado por interpolación (Quarrie, 1988) a partir del promedio de 3 lecturas de absorbancias registradas en cada muestra.

4.5.4. ABA DE ACUERDO AL TIPO Y FUENTE DE MUESTRA

Se aplicó la comparación de medias o prueba estadística T-Test para determinar si existían o no diferencias significativas entre la concentración de la hormona cuantificada en los dos tipos de muestra (“uso” y “-70°C”). Por otro lado, ésta prueba también fue aplicada en los valores obtenidos del Coeficiente de Correlación de Pearson (r) entre la relación ABA cuantificada y Transpiración Normalizada al momento del muestreo, para determinar si existían diferencias entre las dos fuentes de muestreo (foliolo y jugo de xilema).

Finalmente, con el fin de tener una asociación más con la concentración de ABA, se estudiaron diferentes variables de interés teniendo en cuenta dos factores importantes. El primero es la disponibilidad de material para el muestreo, mientras que el segundo es la capacidad que presente la fuente de muestra de manera que permita hallar relaciones entre la cantidad de ABA y una variable de interés. Se realizaron comparaciones entre la relación rendimiento (cuyo valor estuvo determinado por el Peso Fresco del tubérculo obtenido durante la cosecha) y concentración de ABA; para lo cual se generaron gráficos lineales XY, teniendo como variable independiente la concentración de la hormona mientras que el Rendimiento actuó como variable dependiente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 CURVA DE CALIBRACION

Para empezar la optimización de las concentraciones que fijarán la curva de calibración del ácido abscísico se tomaron como base, de acuerdo a las referencias encontradas, las siguientes condiciones para diluciones 1:4 (a partir de 1000ng/ml hasta 3.9ng/ml):

- ABA-BSA 90ng/ml
- Bloqueo con tampón TBS y 1% de leche en polvo. Incubar durante 45min a 37°C
- MAC 252 1:30 000. Incubar durante 3horas a 4°C.
- Antirat IgG 1:3000. Incubar durante 60min a 37°C.
- Sustrato 2mg/ml. Revelado de 1a 3 horas a temperatura ambiente.

Según el protocolo establecido por Kholova (2010), luego de sensibilizar las microplacas existe un paso extra de bloqueo, el cual sirve para evitar el *background* o falsos positivos en las placas. Este paso se estuvo realizando hasta que las absorbancias entre repeticiones de un mismo estándar presentaron menor desviación estándar. Finalmente, luego de probar varias veces y de comparar absorbancias, se optó por continuar el procedimiento sin el uso del tampón de bloqueo ya que no era demasiada la diferencia en los resultados obtenidos.

Cuadro 5: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, bloqueo 1% leche, MAC252 a 1:30 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 2mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE
1000	1.009	0.909	0.959	0.071
250	0.831	0.873	0.852	0.030
62.5	0.547	0.677	0.612	0.092
15.6	0.519	0.544	0.532	0.018
3.9	0.524	0.516	0.520	0.006
0.97	0.371	0.351	0.361	0.014
0.2	0.566	0.529	0.548	0.026
0.06	0.497	0.469	0.483	0.020
B+			0.549	0.055
B-			0.301	0.007
B+ corregido			0.248	

Cuadro 6: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:30 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 2mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE
1000	0.582	0.699	0.641	0.083
250	0.625	0.550	0.588	0.053
62.5	0.579	0.495	0.537	0.059
15.6	0.460	0.474	0.467	0.010
3.9	0.453	0.512	0.483	0.042
0.97	0.431	0.455	0.443	0.017
0.20	0.483	0.462	0.473	0.015
0.06	0.401	0.405	0.403	0.003
B+			0.672	0.071
B-			0.302	0.014
B+ corregido			0.370	

Como se puede observar en la comparación de los Cuadros 5 y 6, el uso del tampón bloqueo retarda la reacción. En este punto se analizaron principalmente los valores obtenidos en los controles positivos y negativos, obteniéndose un valor más alto de B+ corregido en las repeticiones del ensayo sin el uso del bloqueo. Este paso del protocolo también es obviado por Asch (2000).

Un paso muy importante en todo ELISA competitivo, es la reacción de competencia, en este caso entre el ABA y el anticuerpo MAC 252. Por tal motivo, es muy importante relacionar de manera adecuada sus concentraciones. Una concentración muy alta de MAC 252 permitirá que tanto el conjugado inmobilizado (ABA-BSA) como el estándar agregado se unan al anticuerpo; lo que se visualizará en absorbancias muy parecidas entre los diferentes estándares. En un inicio se probaron concentraciones más diluidas del MAC 252 empezando por 1:40 000 hasta 1:100 000.

Cuadro 7: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:40 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 2mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.942	0.529	0.736	0.292	83.107	1.593	3.000
250	0.811	0.512	0.662	0.211	66.872	0.702	2.398
62.5	0.96	0.535	0.748	0.301	85.740	1.794	1.796
15.6	0.879	0.548	0.714	0.234	78.281	1.282	1.193
3.9	1	0.727	0.864	0.193	111.189	—	0.591
0.97	0.655	0.764	0.710	0.077	77.403	1.231	-0.013
0.2	0.678	0.69	0.684	0.008	71.809	0.935	-0.699
0.06	0.986	0.873	0.930	0.080	125.668	—	-1.222
B+			0.813	0.098			
B-			0.357	0.088			
B+ corregido			0.456				

Cuadro 8: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:60 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 2mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.409	0.305	0.357	0.074	19.767	-1.401	3.000
250	0.435	0.391	0.413	0.031	28.725	-0.909	2.398
62.5	0.642	0.451	0.547	0.135	50.080	0.003	1.796
15.6	0.462	0.456	0.459	0.004	36.083	-0.572	1.193
3.9	0.384	0.373	0.379	0.008	23.206	-1.197	0.591
0.97	0.466	0.352	0.409	0.081	28.085	-0.940	-0.013
0.2	0.389	0.409	0.399	0.014	26.485	-1.021	-0.699
0.06	0.438	0.387	0.413	0.036	28.645	-0.913	-1.222
B+			0.859	0.159			
B-			0.233	0.006			
B+ corregido			0.625				

Como se observa en los cuadros 7 y 8, las absorbancias promedio entre los estándares son muy parecidas, indicando que la dilución 1:40 000 y 1:60 000 del MAC 252 aun no es la adecuada y aún debe disminuir.

En el Cuadro 9, se puede notar que las absorbancias promedio de los estándares presentan una diferenciación más notoria entre ellas. Asch (2012) indica que valores óptimos en una curva se obtienen cuando el negativo se mantiene en un valor cercano a 0.2, y es lo que ocurre al realizar este cambio. Además, los valores de los controles positivos resultaron con un valor cercano a 1, lo que se demuestra en un valor más alto de B+ corregido. Por estos motivos, la dilución de 1:80 000 es considerada óptima con las condiciones ya establecidas del protocolo y se mantendrá constante.

Cuadro 9: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	Mean	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.318	0.377	0.348	0.042	14.361	-1.786	3.000
250	0.395	0.379	0.387	0.011	0.193	-6.247	2.398
62.5	0.695x	0.685x					
15.6	0.338	0.444	0.391	0.075	0.198	-6.221	1.193
3.9	0.434	0.356	0.395	0.055	0.203	-6.196	0.591
0.97	0.469	0.490	0.480	0.015	0.310	-5.774	-0.013
0.2	0.526	0.423	0.475	0.073	0.303	-5.795	-0.699
0.06	0.491	0.530	0.511	0.028	0.349	-5.655	-1.222
B+			1.028	0.140			
B-			0.233	0.006			
B+ corregido			0.794				

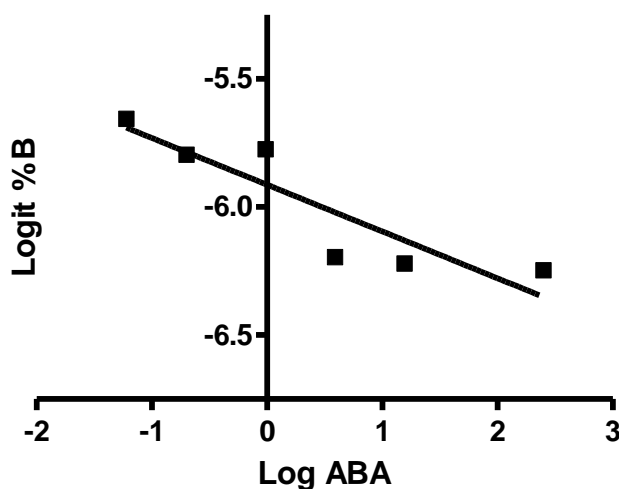


Figura 7. Curva estándar obtenida del Cuadro 9. La ecuación resultante es:
 $\hat{y} = -0.1825x - 5.9127$; $R^2 = 0.806$.

Si bien el uso del tampón bloqueo disminuye la desviación estándar (SE) de las absorbancias, no mejora la reacción de la placa ya que para un mismo tiempo transcurrido (1hora), la lectura total registrada es menor. Es así que por los resultados obtenidos en el Cuadro 10 y 11, se concluyó que no es necesario el uso del tampón bloqueo para continuar con el buen desarrollo del protocolo.

Cuadro 10: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, bloqueo 1% leche, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.277	0.322	0.300	0.032	29.248	-0.883	3.000
250	0.300	0.335	0.318	0.025	39.276	-0.436	2.398
62.5	0.277	0.287	0.282	0.007	19.499	-1.418	1.796
15.6	0.306	0.290	0.298	0.011	28.412	-0.924	1.193
3.9	0.312	0.270	0.291	0.030	24.513	-1.125	0.591
0.97	0.303	0.300	0.302	0.002	30.362	-0.830	-0.013
0.2	0.339	0.325	0.332	0.010	47.354	-0.106	-0.699
0.06	0.372	0.347	0.360	0.018	62.674	0.518	-1.222
B+			0.427	0.037			
B-			0.247	0.010			
B corregido			0.180				

Cuadro 11: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, bloqueo 1% leche, MAC252 a 1:100 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.337	0.286	0.312	0.036	27.484	-0.970	3.000
250	0.391	0.317	0.354	0.052	46.928	-0.123	2.398
62.5	0.329	0.307	0.318	0.016	30.458	-0.826	1.796
15.6	0.403	0.366	0.385	0.026	60.882	0.442	1.193
3.9	0.305	0.302	0.304	0.002	23.824	-1.162	0.591
0.97	0.294	0.303	0.299	0.006	21.536	-1.293	-0.013
0.2	0.288	0.340	0.314	0.037	28.627	-0.914	-0.699
0.06	0.317	0.353	0.335	0.025	38.235	-0.480	-1.222
B+			0.470	0.057			
B-			0.251	0.010			
B corregido			0.219				

Zhang (2011) demostró experimentalmente que las concentraciones de anticuerpo y antígeno inmovilizado son muy importantes al incrementar la sensibilidad del inmunoensayo. Es por eso que se realizaron pruebas variando la concentración del conjugado ABA-BSA. Se probaron concentraciones de 90ng/ml, 300mg/ml (Kholova, 2010), 400 y 500ng/ml de ABA-BSA adherido a la microplaca. De acuerdo a las absorbancias de los resultados obtenidos, se descarta la concentración menor a 300ng/ml debido a que aumenta la desviación estándar tanto de los controles como de los estándares de ABA; y también, la concentración de 500ng/ml ya que aunque aumenta los valores de lectura, influye de la misma manera en las absorbancias obtenidas en los controles negativos.

El aumento en la concentración del ABA-BSA incrementa la señal de la prueba pero disminuye la sensibilidad del ensayo (Zhang, 2011). Es por eso que la concentración óptima de ABA-BSA y la dilución de MAC 252 quedaron determinadas en 300ng/ml y 1:80 000 respectivamente, por ser la combinación que presento menor desviación estándar en cada punto de la curva estándar y un valor más alto del control positivo; tal y como se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
1000	0.352	0.308	0.330	0.031	0.022	-8.421	3.000
250	0.334	0.276	0.305	0.041	0.018	-8.600	2.398
62.5	0.278	0.302	0.290	0.017	0.016	-8.725	1.796
15.6	0.336	0.314	0.325	0.016	0.021	-8.454	1.193
3.9	0.324	0.326	0.325	0.001	0.021	-8.454	0.591
0.97	0.413	0.37	0.392	0.030	0.031	-8.083	-0.013
0.2	0.611	0.535	0.573	0.054	0.057	-7.469	-0.699
0.06	0.388	0.357	0.373	0.022	0.028	-8.176	-1.222
B+			694.0	0.035			
B-			0.2	0.016			
B+ corregido			693.8				

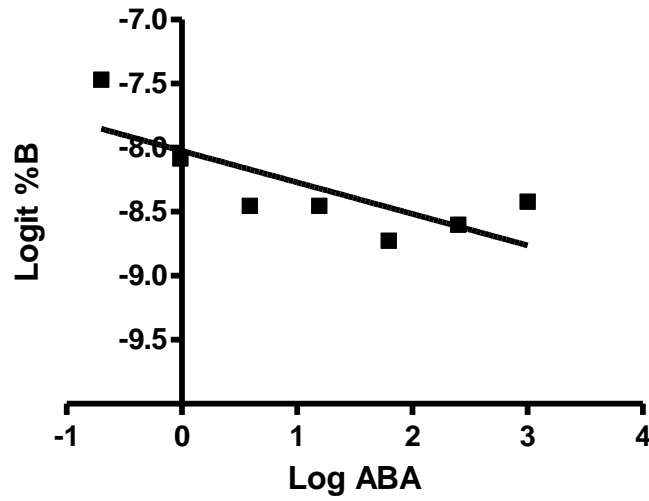


Figura 8. Curva estándar obtenida del Cuadro 12. La ecuación resultante es:
 $\hat{y} = -0.2463x - 8.0244$; $R^2 = 0.5939$.

Para determinar una buena relación entre el MAC252, fijado en la placa por el ABA-BSA, y el Antirat IgG que se le unirá, se probaron las concentraciones de este segundo anticuerpo principalmente entre tres valores: 1:1000 (Cuadro 14), 1:2000 (Cuadro 15) y 1:3000 (Cuadro 13). Con las mismas condiciones ya establecidas, se obtuvieron absorbancias más altas con el uso del Antirat IgG en una concentración de 1:1000 como otros autores también lo recomiendan (Cahill, 1989); pero al mismo tiempo las absorbancias de los negativos aumentan hasta valores cercanos a 0.3.

Cuadro 13: Condiciones: ABA-BSA 500ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:3000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.308	0.419	0.364	0.078	95.745	3.114	3.000
250	0.284	0.422	0.353	0.098	90.688	2.276	2.398
62.5	0.339	0.277	0.308	0.044	69.014	0.801	1.796
15.6	0.31	0.308	0.309	0.001	69.495	0.823	1.193
3.9	0.28	0.273	0.277	0.005	53.842	0.154	0.591
0.97	0.305	0.297	0.301	0.006	65.642	0.647	-0.013
0.2	0.383	0.281	0.332	0.072	80.573	1.423	-0.699
0.06	1.143	0.326	0.735	0.578	274.438	—	-1.222
B+			0.372	0.032			
B-			0.165	0.006			
B+ corregido			0.208				

Después de las pruebas realizadas, se determinó que con el uso de la dilución 1:2000 se registraron mejores valores en los controles positivos y factibilidad al armar la curva estándar. Además que mantuvo al control negativo menos reactivo (Abs. aproximada de 0.2) y la desviación estándar en la mayoría de los estándares en un valor menos a 0.03, lo que también puede estar influenciado por el cambio a diluciones 1:10.

Cuadro 14: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:1000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.673	0.614	0.644	0.042	80.703	1.431	3.000
250	0.693	0.700	0.697	0.005	92.325	2.487	2.398
62.5	0.941	0.596	0.769	0.244	108.113	—	1.796
15.6	0.557	0.580	0.569	0.016	64.257	0.587	1.193
3.9	0.713	0.729	0.721	0.011	97.698	3.748	0.591
0.97	0.732	0.631	0.682	0.071	89.036	2.094	-0.013
0.24	0.644	0.658	0.651	0.010	82.348	1.540	-0.620
0.06	0.695	0.561	0.628	0.095	77.305	1.226	-1.222
B+			0.732	0.136			
B-			0.275	0.032			
B+ corregido			0.456				

Cuadro 15: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:2000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	mean	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
1000	0.453	0.501	0.477	0.034	43.335	-0.268	3.000
100	0.416	0.386	0.401	0.021	30.073	-0.844	2.000
10	0.473	0.474	0.474	0.001	42.724	-0.293	1.000
1	0.492	0.550	0.521	0.041	51.013	0.041	0.000
0.1	0.624	0.648	0.636	0.017	71.081	0.899	-1.000
0.01	0.665	0.669	0.667	0.003	76.491	1.180	-2.000
0.001	0.700	0.598	0.649	0.072	73.349	1.012	-3.000
0.0001	0.726	0.714	0.720	0.008	85.739	1.794	-4.000
B+			0.802	0.090			
B-			0.219	0.007			
B+ corregido			0.573				

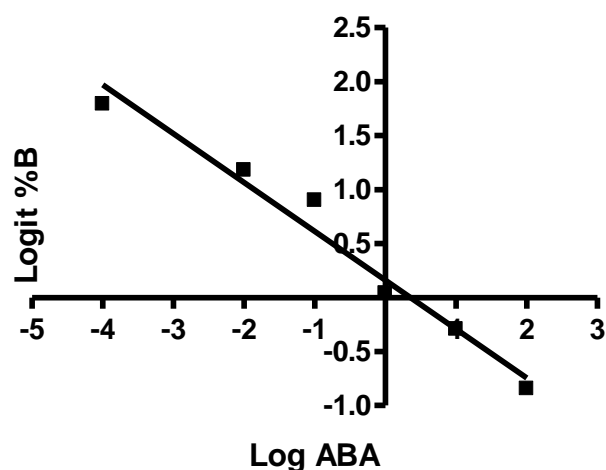


Figura 9. Curva estándar obtenida del Cuadro 15. La ecuación resultante es:
 $\hat{y} = -0.4527x + 0.1609$; $R^2 = 0.9695$.

Determinado el protocolo hasta aquí, se decidió continuar con la mejora de las diferencias entre absorbancias de los estándares manteniendo el uso de las diluciones 1:10. Por otro lado, la concentración del sustrato también fue determinada; aunque desde un inicio se usó a 2mg/ml, se observó que al probar con 1mg/ml (Asch, 2000) se obtenía una buena reacción con menos reacción inespecífica y menor uso de material pero igual resultado en las concentraciones calculadas.

Cuadro 16: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:2000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
1000	0.358	0.422	0.390	0.045	26.088	-1.041	3.000
100	0.420	0.395	0.408	0.018	28.728	-0.909	2.000
10	0.475	0.486	0.481	0.008	39.742	-0.416	1.000
1	0.625	0.548	0.587	0.054	55.735	0.230	0.000
0.1	0.655	0.638	0.647	0.012	64.787	0.610	-1.000
0.01	0.770	0.631	0.701	0.098	72.935	0.991	-2.000
0.001	0.755	0.700	0.728	0.039	77.008	1.209	-3.000
0.0001	0.877	0.860	0.869	0.012	98.282	4.046	-4.000
B+			0.880	0.065			
B-			0.217	0.007			
B+ corregido			0.663				

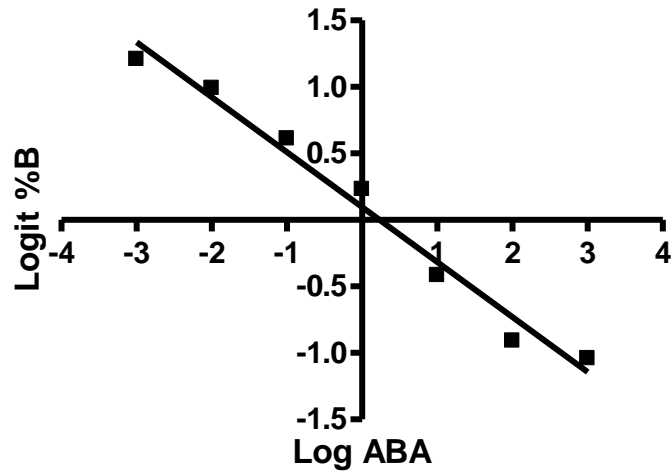


Figura 10. Grafica linealizada obtenida del Cuadro 16. La ecuación resultante es:
 $\hat{y} = -0.434x + 0.0689$; $R^2 = 0.9793$.

En todas las pruebas se observó que la desviación estándar en las absorbancias de los pocillos al borde de cada microplaca ELISA, mostraban valores altos e inconsistentes igual que en las investigaciones de Ross (1987) y Cahill (1989). Es por este motivo que para los análisis de muestras se decidió utilizar solo los 60 pocillos internos en cada placa, mientras que los pocillos externos se llenaron solo con tampón TBS.

Al mismo tiempo, en los procedimientos se probaron los tiempos y temperaturas de revelado. Tal es el caso que la reacción de la placa se acelera cuando está a 37°C en Baño María; sin embargo, a la misma temperatura pero en estufa oscuras, los valores de las absorbancias registradas son menores para una lectura con el mismo tiempo de reacción (Cuadro 18).

Cuadro 17: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:2000. Sustrato en 1mg/ml.

St[ng/ml]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
1000	0.359	0.430	0.395	0.050	72.820	0.985	3.000
100	0.312	0.328	0.320	0.011	48.585	-0.057	2.000
10	0.274	0.306	0.290	0.023	38.826	-0.455	1.000
1	0.317	0.340	0.329	0.016	51.350	0.054	0.000
0.1	0.316	0.317	0.317	0.001	47.447	-0.102	-1.000
0.01	0.332	0.345	0.339	0.009	54.603	0.185	-2.000
0.001	0.350	0.361	0.356	0.008	60.133	0.411	-3.000
0.0001	0.438	0.436	0.437	0.001	86.645	1.870	-4.000
B+			0.478	0.037			
B-			0.171	0.007			
B+ corregido			0.307				

Finalmente y de acuerdo a las alternativas probadas, las condiciones para obtener el protocolo más adecuado en la cuantificación del Ácido abscísico mediante el ensayo ELISA competitivo indirecto, quedan establecidas de la siguiente manera:

- i. Sensibilizar las microplacas ELISA con 150ul/pocillo del conjugado ABA-BSA a 300ng/ml. Sellar, envolver e incubar toda la noche a 4°C.
- ii. Al día siguiente, realizar 3 lavados de 3min cada uno con el tampón PBS-tween 20 pH 7.4. Sacudir sobre papel toalla para quitar restos de tampón en los pocillos. Sellar, envolver y almacenar hasta su uso a -20°C.
- iii. Agregar 75ul/pocillo de los estándares y de los controles positivos y negativos.
- iv. Adicionar 75ul/pocillo del primer anticuerpo, MAC 252 diluido en tampón PBS, a una concentración de 1:80 000. Incubar durante 3 horas a 4°C.
- v. Realizar 3 lavados de 3min cada uno con el tampón PBS-tween 20 pH 7.4. Sacudir sobre papel toalla.
- vi. Agregar 150ul/pocillo el segundo anticuerpo Antirat-IgG diluido en tampón TBS pH 7.8, en la concentración de 1:2 000. Incubar la placa sellada y cubierta en estufa a 37°C durante 60min.

- vii. Realizar 3 lavados de 3min cada uno con el tampón PBS-tween 20 pH 7.4. Sacudir sobre papel toalla.
- viii. Finalmente, agregar lo más rápido posible el tampón sustrato a una concentración de 1mg/ml de PNPP y revelar en Baño María a 37°C durante 30min y luego 30min más a temperatura ambiente.

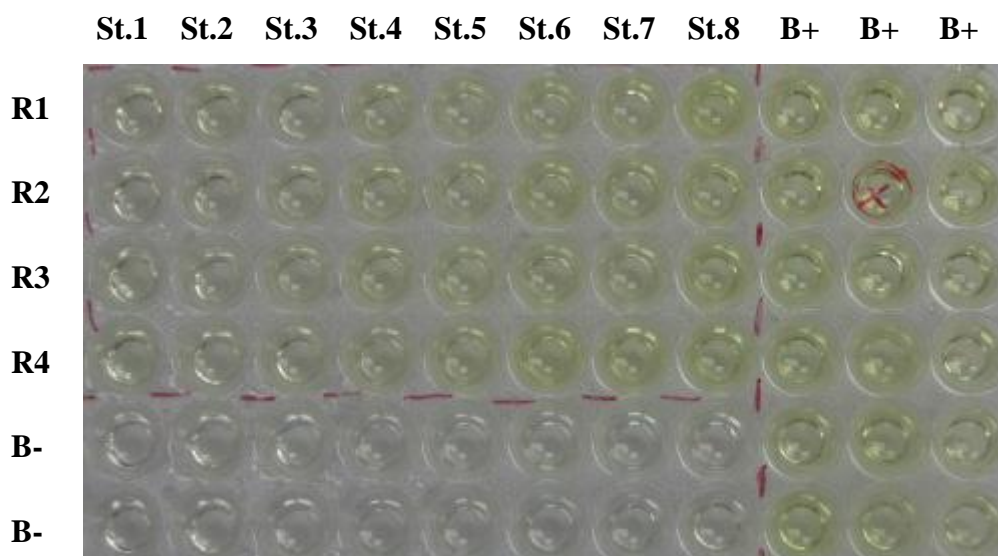


Figura 11. Representación cualitativa de la curva estándar.

5.2. APLICACIÓN DEL ENSAYO EN MUESTRAS

5.2.1 DILUCION DE LAS MUESTRA

Antes de aplicar el ensayo, se probaron diluciones de muestras en tampón TBS pH 7.8 (Jiang, 2004) para determinar cuál se ajusta mejor a las absorbancias obtenidas en el protocolo. Las diluciones probadas en muestras de xilema fueron 1:2 y 1:100, mientras que para las muestras provenientes de los folíolos las diluciones fueron 1:2 y 1:10.

En una misma placa se colocaron las diluciones para folíolos y xilema, además de las repeticiones de ABA estándar para armar su propia curva estándar. En el cuadro 19 se muestran las absorbancias obtenidas y la curva estándar resultante.

Cuadro 18: Condiciones: ABA-BSA 300ng/ml, sin bloqueo, MAC252 a 1:80 000 y Antirat IgG a 1:2000. Sustrato en 1mg/ml.

St[NG/ML]	R1	R2	promedio	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.479	0.525	0.502	0.033	38.964	-0.449	2.000
10	0.420	0.389	0.405	0.022	26.478	-1.021	1.000
1	0.439	0.480	0.460	0.029	33.521	-0.685	0.000
0.1	0.516	0.513	0.515	0.002	40.565	-0.382	-1.000
0.01	0.592	0.561	0.577	0.022	48.505	-0.060	-2.000
0.001	0.483	0.457	0.470	0.018	34.866	-0.625	-3.000
0.0001	0.799	0.825	0.812	0.018	78.664	1.305	-4.000
B+			0.979	0.060			
B-			0.198	0.012			
B+ corregido			0.781				

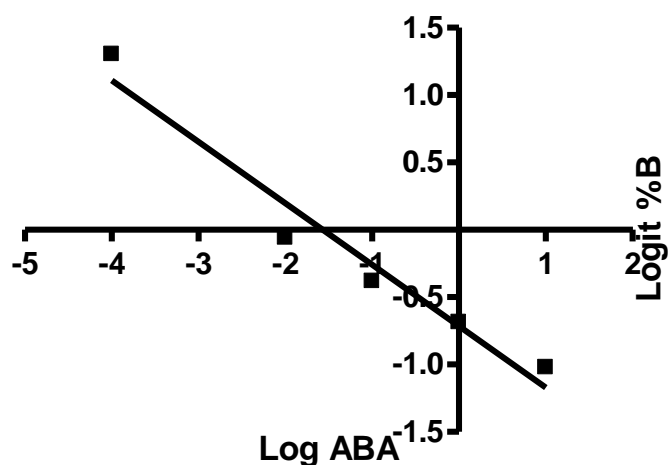


Figura 12. Curva estándar obtenida en base al Cuadro 19. La ecuación resultante es:
 $\hat{y} = -0.4561x - 0.7159$; $R^2 = 0.9557$.

Como se observa en el Cuadro 20, para las muestras provenientes de folíolos la dilución que mejor se ajustó a los parámetros del ensayo fue de 1:10, es decir que los valores de las absorbancias registradas pertenecían al rango de absorbancias obtenidas cuando se estandarizó el protocolo. Además, en las pruebas de DAS-ELISA que también usan folíolos se recomienda la dilución de 1:10 (Salazar, 1997). Por otro lado, para el caso

de las muestras a partir de jugo de xilema, se utilizaron las diluciones 1:100 (Cuadro 21) por los mismos criterios de las diluciones en foliolo.

Aunque las muestras estén diluidas no se afecta la concentración final calculada de ABA (ng/g) y ABA (ng/ul) ya que al comparar los valores obtenidos en ambas diluciones, resultan ser muy parecidos (Cuadro 20 y 21). Por otro lado, las muestras (elegidas al azar) analizadas permiten mostrar diferencias de concentración de la hormona y comparar el valor de esta en ambos tratamientos. Más concentración de ABA cuando la muestra ha sido obtenida de una planta bajo sequia regulada y menos cuando ha estado en riego normal (Liu, 2004).

Cuadro 19. Absorbancias en dos muestras de foliolo bajo sequia regulada y dos muestras en riego normal.

Muestra	Dil.	xil R1	xil R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	valor	ABA ng/ml	Dil.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
Sequía	1:100	0.494	0.481	0.488	0.009	0.371	-0.528	-0.413	0.387	100	38.656	0.387
	1:2	0.373	0.363	0.368	0.007	0.218	-1.277	1.231	17.006	2	34.011	0.340
Riego	1:100	0.595	0.567	0.581	0.020	0.491	-0.037	-1.489	0.032	100	3.243	0.032
	1:2	0.478	0.449	0.464	0.021	0.340	-0.662	-0.119	0.761	2	1.522	0.015

Cuadro 20. Absorbancias en dos muestras de jugo de xilema bajo sequia regulada y dos muestras en riego normal.

Muestra	Dil.	hoja R1	hoja R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	valor	ABA ng/ml	Dil.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
Sequía	1:10	0.455	0.448	0.452	0.005	0.325	-0.731	0.033	1.079	10	10.794	53.972
	1:2	0.394	0.401	0.398	0.005	0.256	-1.068	0.772	5.911	2	11.822	59.111
Riego	1:10	0.508	0.556	0.532	0.034	0.428	-0.290	-0.934	0.116	10	1.163	5.817
	1:2	0.469	0.499	0.484	0.021	0.367	-0.547	-0.371	0.426	2	0.852	4.260

5.2.2 CONCENTRACION DEL ABA CUANTIFICADO

Por los resultados obtenidos y al ser la cuantificación del ABA una medida instantánea y fisiológicamente dependiente de cada individuo, no se trabajaron con promedios para el análisis de datos, sino que se trabajaron de acuerdo a la respuesta presentada en cada planta analizada. Es así, que solo en algunos casos se puede observar la relación de más ABA cuando la planta está bajo estrés.

Como se observa en los Cuadro 21 y Cuadro 22, en el primer muestreo (1m) se pudieron obtener tanto las muestras de foliolo como las de jugo de xilema, sin embargo en el caso del segundo muestreo (2m) son pocas las muestras de xilema obtenidas ya que el efecto del estrés impide realizar un buen uso de la bomba Scholander y por tal la calidad, cantidad y disponibilidad de jugo extraído se ve afectado negativamente.

Cuadro 21. Concentraciones de Ácido abscísico cuando la fuente de muestra es de tipo “uso”.

CLON A	FOLIOLO		XILEMA		CLON B	FOLIOLO		XILEMA		CLON C	FOLIOLO		XILEMA	
	1m	2m	1m	2m		1m	2m	1m	2m		1m	2m	1m	2m
	ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)		ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)		ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)
Sequía	118.4	3.4	83.0	0.1	Sequía	0.1	0.7	23.2	0.2	Sequía	11.9	1569.3	6.1	1.1
	274.2	728.0	19.2	—		o	0.0	24.2	0.2		42.3	1405.3	—	—
	20.4	3302.5	2.8	—		4.2	5.5	49.3	0.2		38.9	2861.7	0.0	0.0
	244.7	0.0	4.8	—		0.8	843.2	37.3	—		37.6	1043.4	0.0	0.0
	0.1	0.0	4.8	—		8.9	35.6	36.3	—		9.0	2401.1	0.0	—
Riego	1191.0	0.0	16.9	0.0	Riego	181.4	1414.2	56.8	0.0	Riego	0.3	73.0	0.0	—
	30.1	57.3	11.1	0.2		325.3	7026.3	93.1	0.0		0.4	3422.1	0.5	—
	329.8	2059.6	3.0	0.3		24.1	344.9	20.7	0.3		0.0	22.0	0.0	0.0
	134.7	2575.1	1.6	0.6		99.2	1414.2	0.0	0.1		3.8	52.6	0.0	0.0
	0.2	18.4	0.7	—		9.1	17.8	0.0	—		6.4	227.3	1.3	—

Cuadro 22. Concentraciones de Ácido abséscico cuando la fuente de muestra ha sido almacena a -70°C.

CLON A	FOLIOLO		XILEMA		CLON B	FOLIOLO		XILEMA		CLON C	FOLIOLO		XILEMA	
	1m	2m	1m	2m		1m	2m	1m	2m		1m	2m	1m	2m
	ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)		ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)		ABA (ng/g)	ABA (ng/g)	ABA (ng/ul)	ABA (ng/ul)
Sequía	19.2	0.0	0.0	5.2	Sequía	10.2	23.0	15.6	—	Sequía	0.2	95.8	0.7	2.5
	0.0	0.0	43.0	—		0.0	89.2	0.6	—		85.2	127.6	0.0	1.7
	14.3	14.0	43.8	—		4.9	12.8	0.6	—		16.8	117.5	0.3	1.2
	31.7	9.7	0.0	—		0.1	0.0	0.3	—		9.8	395.5	0.3	—
	0.1	1.3	24.9	—		0.0	0.0	0.1	—		1.6	1218.7	2.9	—
Riego	0.2	0.6	0.0	8.4	Riego	0.9	14.9	3.0	—	Riego	0.1	1678.9	0.5	0.0
	13.4	47.3	0.0	30.5		0.0	1.3	0.1	—		0.6	1251.1	4.0	0.0
	8.4	11.8	19.4	3.8		0.2	12.7	0.7	—		0.2	810.2	2.3	0.0
	0.1	25.2	2.2	15.4		4.8	61.7	9.5	—		8.8	4.6	16.5	0.0
	6.7	90.9	11.7	—		1.4	39.0	886.1	—		0.0	81.6	12.4	0.0

Por otro lado, el análisis estadístico (Prueba t) aplicado en las mediciones de ABA obtenidas entre los dos tipos de muestra, indica que no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellos y además, se cumple en los tres clones. Como se observa en el Cuadro 23, de los 21 valores de probabilidad obtenidos sólo dos resultan ser menores a 0.05, lo cual puede estar influenciado por la variabilidad de los datos o el error experimental.

En este sentido, podemos concluir que el análisis puede ser realizado ya sea a partir de muestras recién recolectadas (“uso”) o de muestras almacenadas a -70°C . Sin embargo, podemos sugerir que por facilidades de trabajo y organización del material, el análisis para la cuantificación de la hormona se realice a partir de muestras almacenadas; así también evitamos el efecto de la diferencia de tiempo transcurrido durante el proceso de las mismas.

Cuadro 23. Resultados de probabilidad en prueba t entre muestras en uso y en -70°C .

Clon	Trat.	FOLIOLO		XILEMA	
		1muestreo	2muestreo	1muestreo	2muestreo
A (501061.1)	Sequía	0.069	0.365	0.975	—
	Riego	0.172	0.149	0.998	0.051
B (394881.8)	Sequía	0.881	0.391	0.001	—
	Riego	0.061	0.153	0.105	—
C (397077.16)	Sequía	0.774	0.006	0.660	0.147
	Riego	0.910	0.994	0.062	0.433

5.2.3 RELACION TRANSPIRACION NORMALIZADA-ABA

Con el fin de responder al segundo objetivo, se realizó un análisis de correlación ente la transpiración normalizada (TN) de cada planta al momento del muestreo, con la cuantificación de la hormona como se muestra en las Figuras 13, 14, 15 y 16.

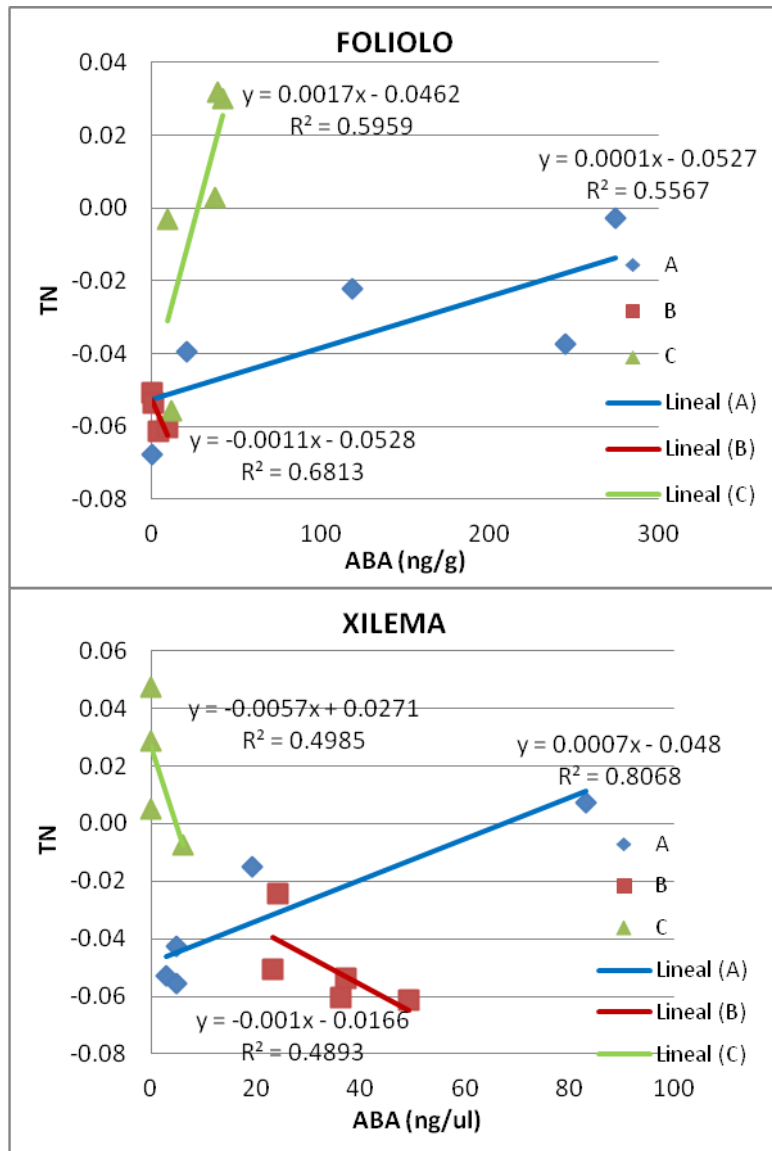


Figura 13. Regresiones lineales en las muestras “uso” del primer muestreo.

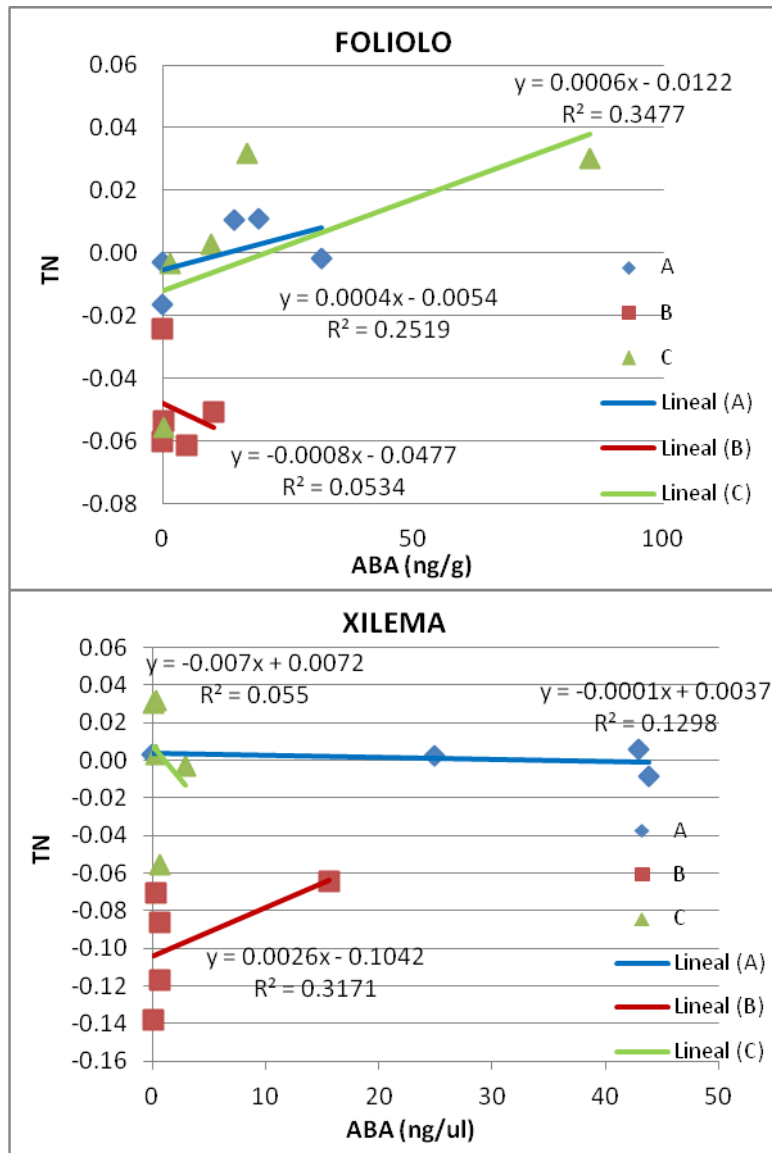


Figura 14. Regresiones lineales en las muestras “-70°C” del primer muestreo.

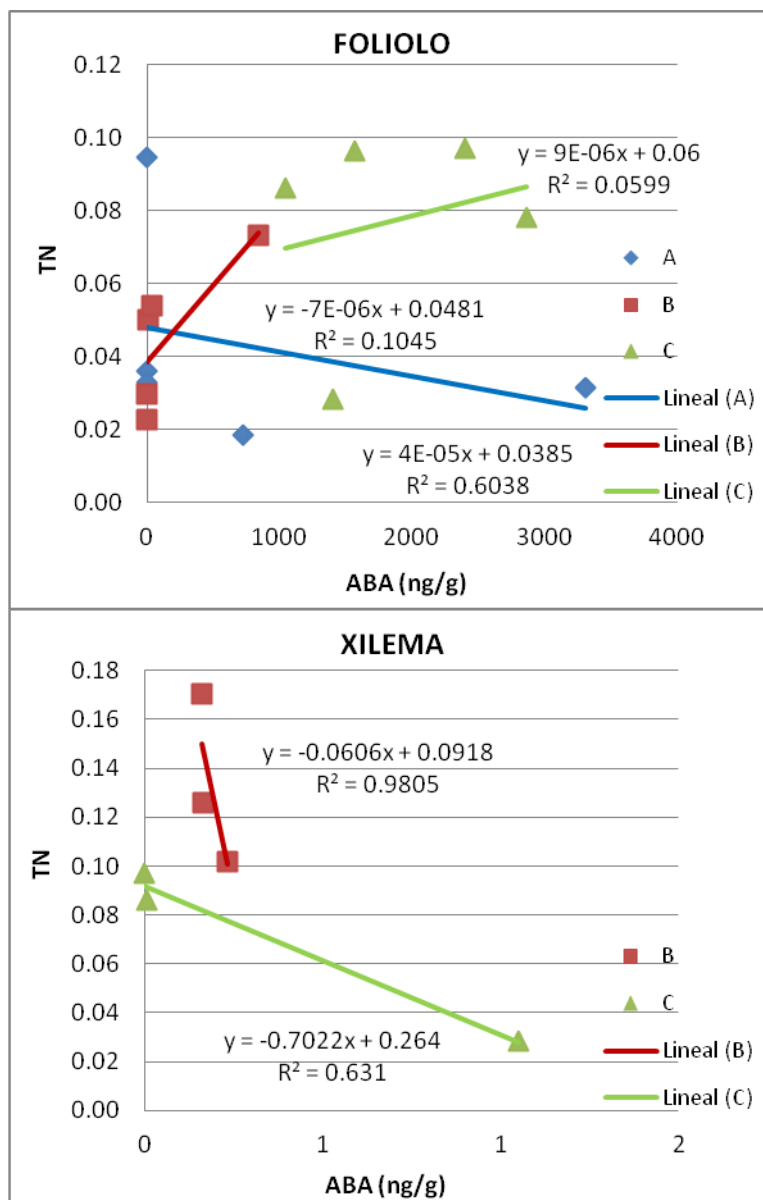


Figura 15. Regresiones lineales en las muestras “uso” del segundo muestreo.

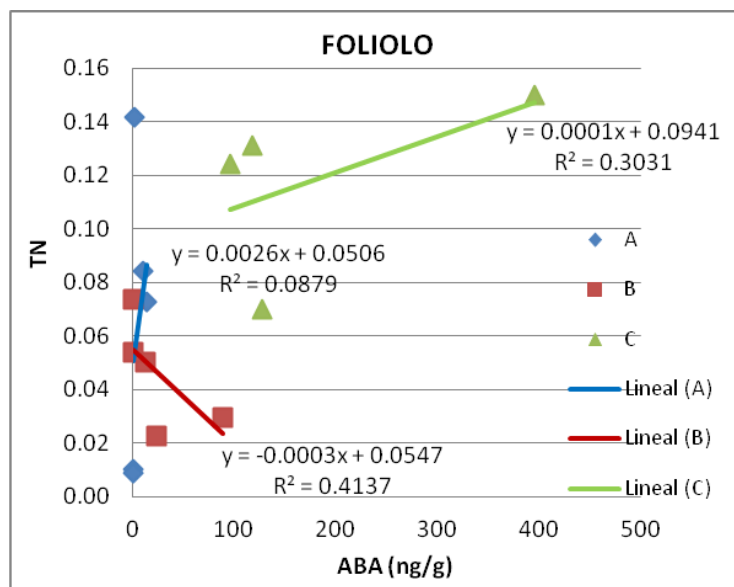


Figura 16. Regresiones lineales en las muestras “-70°C” del segundo muestreo.

Luego de obtener los coeficientes de correlación “r” (**Cuadro 24**) entre la transpiración normalizada y el ABA extraído de foliolo y de jugo de xilema, se aplicó la Prueba t entre dichos coeficientes y se demostró que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las dos fuentes de muestra analizadas. De éste modo podemos indicar que tanto los foliolo como el jugo de xilema son capaces de presentar una buena correlación del ABA con la reacción de la planta. La diferencia entre ellas, sería la disponibilidad de material biológico en clones intermedios y susceptibles cuando el estrés impuesto es más avanzado; notándose que el muestreo de foliolo tanto en el primer como en el segundo muestreo se ve menos afectado que el jugo de xilema por la cantidad de muestras obtenidas (Cuadro 21 y Cuadro 22).

Cuadro 24. Coeficientes de Correlación (entre ABA y TN) y P value.

Clon	muestras "uso"				muestras "-70°C"			
	1muestreo		2muestreo		1muestreo		2muestreo	
	fol	xil	fol	xil	fol	xil	fol	xil
A (501061.1)	0.746	0.898	0.323	—	0.502	0.639	0.296	—
B (394881.8)	0.825	0.700	0.777	0.794	0.231	0.563	0.643	—
C (397077.16)	0.772	0.706	0.245	0.990	0.590	0.235	0.264	0.384
P value	0.858		0.145		0.829		—	

5.2.4 RELACION ABA-RENDIMIENTO

En un primer momento se intentó hallar alguna relación entre la Biomasa Total o la Transpiración Total frente al ABA cuantificado pero no se obtuvieron resultados concluyentes. Esto puede estar afectado por el hecho de que las variables Biomasa y Transpiración son mediciones totales del comportamiento de la planta, mientras que la medición del ABA está más afectada por el momento en el cual se realizó el muestreo. Es así que se decidió hallar una relación del ABA con una variante que determine el resultado de todo el proceso; por tal, la comparación entre el ABA cuantificado y el Rendimiento (Rend.) (**Cuadro 25**) si ayudó a obtener asociaciones y por consiguiente un mejor análisis del comportamiento de cada clon frente a la sequía.

El análisis se basó en la relación del rendimiento y el ABA cuantificado a partir de folíolos del segundo muestreo que fueron almacenados a -70°C , ya que de este modo aseguramos un análisis menos influenciado por algún error durante el muestreo o proceso de extracción. Sin embargo, no siempre se pudieron determinar conclusiones determinantes debido a que sólo 5 muestras de sequía por clon, no fueron suficientes para construir relaciones lineales significativas.

Cuadro 25. Valores de rendimiento y de ABA cuantificada.

Núm. Maceta	Clon	Trat.	Rend.(g)	Muestras a (-70)			
				ABA (1m)		ABA (2m)	
				foliolo	xilema	foliolo	xilema
101	501061.1	Sequía	5.76	19.24	0.00	0.00	—
104	501061.1	Sequía	0	0.00	42.96	0.01	—
116	501061.1	Sequía	0	14.31	43.82	13.98	—
120	501061.1	Sequía	0	31.67	0.00	9.74	5.17
121	501061.1	Sequía	0	0.07	24.89	1.27	—
108	501061.1	Riego	64.37	0.18	0.00	0.61	—
110	501061.1	Riego	15.87	13.40	0.00	47.27	8.42
111	501061.1	Riego	89.33	8.42	19.38	11.78	30.54
112	501061.1	Riego	28.51	0.08	2.16	25.19	3.80
119	501061.1	Riego	0	6.68	11.74	90.90	15.35
126	394881.8	Sequía	50.25	10.15	15.64	23.043	—
138	394881.8	Sequía	76.68	0.00	0.61	89.167	—
139	394881.8	Sequía	56.19	4.93	0.63	12.797	—
140	394881.8	Sequía	46.63	0.14	0.34	0.014	—
148	394881.8	Sequía	34.47	0.01	0.07	0.005	—
134	394881.8	Riego	29.84	0.92	3.01	14.883	—
137	394881.8	Riego	75.88	0.00	0.07	1.294	—
142	394881.8	Riego	89.15	0.16	0.69	12.654	—
144	394881.8	Riego	118.59	4.77	9.52	61.723	—
147	394881.8	Riego	46.32	1.39	886.14	39.022	—
155	397077.16	Sequía	56.24	0.24	0.66	95.79	2.52
156	397077.16	Sequía	72.94	85.22	0.03	127.60	1.68
157	397077.16	Sequía	82.6	16.77	0.32	117.46	1.15
158	397077.16	Sequía	93.24	9.79	0.35	395.47	—
170	397077.16	Sequía	55.74	1.56	2.93	1218.73	—
153	397077.16	Riego	140.38	0.06	0.48	1678.94	0.01
159	397077.16	Riego	159.21	0.60	4.05	1251.09	0.00
160	397077.16	Riego	139.9	0.17	2.25	810.20	0.03
163	397077.16	Riego	91.78	8.80	16.46	4.58	0.00
171	397077.16	Riego	33.01	0.03	12.41	81.56	0.00

V. CONCLUSIONES

- Después de una serie de pruebas, podemos establecer que el presente protocolo desarrollado está validado para cuantificar la fitohormona ácido abscísico mediante la aplicación de la técnica ELISA-competitivo-indirecto. La sensibilidad del ensayo está determinada por las curvas estándares obtenidas, ya que presentan valores R^2 en un rango de 0.95-0.99 y una diferencia significativa entre los controles positivos y negativos.
- Se lograron optimizar las concentraciones del primer y segundo anticuerpo (MAC252 y Antirat-IgG respectivamente) con el antígeno conjugado (ABA-BSA) de manera tal que permitió obtener un ensayo reproducible.
- Los folíolos fueron obtenidos sin dificultad tanto en el primer como en el segundo muestreo de los tres clones; sin embargo, el número de extracciones de jugo de xilema durante el segundo muestreo si fue afectado por el estrés impuesto.
- La cuantificación de la hormona no se vio afectada por el tipo de muestreo, pues no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre la muestra tomada, procesada y analizada inmediatamente (“en uso”) con respecto de la muestra tomada, almacenada a -70°C durante un mes, y posteriormente analizada.
- Las fuentes de muestras analizadas, folíolos de plantas de papa o jugo del xilema del tallo, no resultó ser afectada debido a que las respuestas en la cuantificación realizada con relación a la transpiración normalizada son similares.
- Por los resultados obtenidos podemos concluir que la cuantificación de la fitohormona Ácido abscísico puede ser utilizado como un indicador de la respuesta del cultivo de papa frente al estrés hídrico por sequía.

VI. RECOMENDACIONES

- Es necesario contar con instrumentos calibrados y material que no retenga líquidos (tips de baja retención), pues se trabaja con concentraciones tan pequeñas de la hormona ácido abscísico, que se requiere reducir el riesgo de errores al momento de construir la curva estándar.
- En el caso de muestreos más numerosos, se recomienda usar muestras almacenadas a -70°C durante un mes, para organizar mejor el material y así evitar alterar los resultados durante el proceso de extracción.
- En la aplicación del procedimiento de cuantificación en clones intermedios y susceptibles al estrés, se recomienda utilizar los folíolos como fuente de muestra debido a la disponibilidad de material biológico.
- Para confirmar la relación entre el ABA disponible y el rendimiento, sería necesario contar con un mayor número de muestras cuantificadas.
- Con el fin de evaluar este procedimiento de cuantificación de Ácido abscísico, se recomienda realizarlo en otras especies de interés.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Asch, F. 2000. Determination of abscisic acid by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Technical Report. Taastrup, Denmark: Laboratory for Agrohydrology and Bioclimatology. Department of Agricultural Sciences. The Royal Veterinary and Agricultural University.

Asch, F. 2012. Desarrollo de un protocolo para ABA (entrevista). Alemania, University of Hohenheim.

Ashley, J. 1993. Drought and crop adaptation. En: Drylan farming in Africa. Ed. Rowland JTRJ. McMillan Education LTD. London. p: 46-67.

Barrios, A. ; Ritchie, J. and Smucker, A. 1998. El efecto de sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*. 9(2): 01-08.

Cahill, D. M. and Ward, E. W. An indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assay for measurement of Abscisic Acid in Soybean inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology*. 79: 1238-1242.

Clark, M. F. 1981. Immunosorbent Assays in Plant Pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 83-106.

Chaves, M.M ; et al. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89 : 907-916.

Chudasama, R and Thaker, V. S. 2007. Relationship between endogenous Abscisic acid and dry matter accumulation in developing seed and pod of Pigeon Pea (*Cajanus Cajan*). *World Journal of Agricultural Sciences* 3(6) : 833-842.

Cramer, J.S. 2003. The origins and development of the logit model. Cambridge University Press.

Cutler, A. J. and Krochko, J. E. 1999. Formation and breakdown of ABA. Trends Plant Sci. 4(12) : 472-478.

Gaez. 2011. Global Agro-Ecological Zones. ver. 3.0, FAO, IIASA

González, J.A. 1999. Eco-fisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Fisiología de la resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinua* Willd.). En: Jacobsen, S.E.; Mujica, A. I Curso Internacional. Proyecto Quinua. Lima, Peru. p: 3-20.

Hartung, W.; Peuke, A. and Davies, W. J. 1999. Abscisic Acid—A Hormonal Long-Distance Stress Signal in Plants Under Drought and Salt Stress. Handbook of Plant and Crop Stress, 2 Ed. p: 731–747.

Hartung, W.; Sauer, A. and Hose, E. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?. Journal of Experimental Botany 53 (366): 27-32.

Heidari, Y. and Moaveni, P. 2009. Study of drought stress on ABA accumulation and Proline among in different genotypes forage corn. Research Journal of Biological Sciences 4(10):1121-1124.

Horton, D. 1992. La Papa. Produccion, comercializacion y programas. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 260p.

Jacobsen, SE.; Liu, F. and Jensen, CR. 2009. Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Scientia Horticulturae (122): 281-287.

Jiang, F. *et al.* 2004. Abscisic acid (ABA) flows from *Hordeum vulgare* to the hemiparasite *Rhinanthus minor* and the influence of infection on host and parasite abscisic acid relations. Journal of Experimental Botany 55(406): 2323-2329.

- Jinqing, J. *et al.* 2011. Development and Optimization of an Indirect Competitive ELISA for detection of Norfloxacin Residue in Chicken liver. International Conference on Environmental Science and Technology 6: 460-463.
- Jordan, W. 2005a. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Medical Biomethods Handbook. p: 419-427.
- Jordan, W. 2005b. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Methods in Molecular Biology, Immunochemical Protocols. Third edition. p: 215-225.
- Kholova, J. *et al.* 2010. Terminal drought-tolerant pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) have high leaf ABA and limit transpiration at high vapour pressure deficit. Journal of Experimental Botany. 61 (5): 1431-1440.
- Komy, M.; Abou-Talbeb, E.; Aboshosha, S and El-Sherif, E.M. 2010. Serological and molecular detection of late blight pathogen and disease development in potato. Inc. J. Agric. Biol. 12: 161-170.
- Leroux, B.; Maldiney, R.; Miginiac, E.; Sossountzov, L. and Sotta, B. 1985. Comparative quantification of abscisic acid in plant extracts by gas-liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay using the avidin-biotin system. Planta. 166: 524-529.
- Liu, F.; Rensen, C. R.; Shahanzari, A. and Andersen, M. N. 2004. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. Plant Science. 168: 831-836.
- Liu, F. *et al.* 2006. Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signaling, leaf gas exchange, and water use efficiency. Journal of Experimental Botany. 57 (14): 3727-3735.
- Lobo Da Costa, R. & Lobato, A. 2011. ABA-mediated proline synthesis in cowpea leaves exposed to water deficiency and rehydration. Turk J. Agric. For. 35: 309-317.
- Loebenstein, G. *et al.* 2001. Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers. p: 1-18.

Mertens, R.; Deus-Neumann, B & Weiler, E.W. 1983. Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. FEBS. 160:1-2.

Olivella, C.; Vendrell, M. y Savé, R. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16(3).

Ortiz, L. y Florez, V.J. 2008. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la tuberización de *Solanum tuberosum* L. *Solanum phureja* Juz et Buk. Agronomía Colombiana 26(1): 32-39.

Quiarrie, SA. *et al.* 1988. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscísico acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. Planta (173): 330-339.

Quarrie, SA.; Laurie, DA.; Zhu, J.; Lebreton, C.; Semikhodskii, A.; Witsenboer, H. and Calestani, C. 1997. QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves and comparisons across cereals. Plant Molecular Biology. 35: 155-165.

Quiroz, R. 2012. Crop yield response to water. FAO Irrigation and Drainage Paper- Potato. 66: 184-191.

Razzaghi, F. *et al.* 2011. Water relations and transpiration of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salinity and soil drying. J. Agronomy & Crop Science. 197: 348-360.

Ross, G. S.; Elder, P. McWha, J.; Pearce, D. and Pharis, R. 1987. The development of an Indirect Enzyme Linked Immunoassay for Abscisic acid. Plant Physiol. 85: 46-50.

Saji S. 2010. Eficiencia de transpiración en 10 variedades de papas nativas en la comunidad de Palccoyo – Che'qakupe –Canchis. Tesis de Ing. Agr. Cusco, Peru. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 202 p.

Salazar, L.F and Jayasinghe, U. 1997. Protocolos de Purificación de Virus de Plantas. En: Técnicas en Virología de Plantas. Manual de Capacitación. Fascículo 3.2.1. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Peru.

Sarmard, J.; Shariati, M. and Madadkar, M. 2007. Relationship between endogenous Abscisic Acid and B-carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella*. American-Eurasian J.Agric. & Environ. Sci., 2(5): 559-564.

Sauter, A. and Hartung, W. 2002. The contribution of internode and mesocotyl tissues to root to shoot signaling of abscisic acid. Journal of Experimental Botany 51: 929-935.

Sharp, R.E. and Lenoble M.E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. Journal of Experimental Botany 53 (366): 33-37.

Takahashi, J. 1987. Evaluación de los métodos serológicos de látex y ELISA para la detección del virus Y de la papa (PVY) y del virus del enrollamiento de la papa (PLRV). Tesis Mag. Sc. Lima, Peru. Universidad Nacional Agraria La Molina . 141 p.

Wild, D. 2006. The immunosorbant assay handbook. Calibration curve-fitting. 3 ed. p: 233-239.

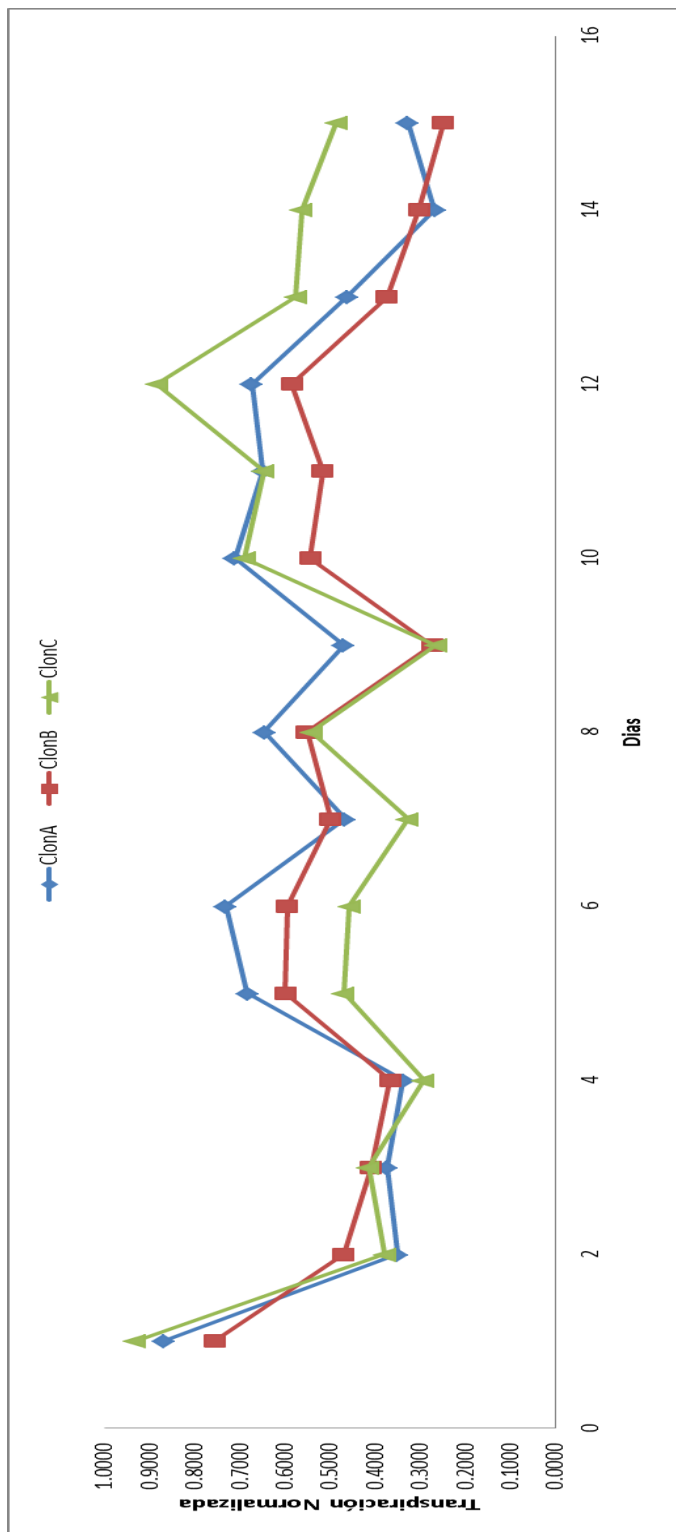
Wilkinson, S & Davies, W. J. 2002. ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant, Cell and Environment 25: 195-210.

Zhang, J.; Jia, W. & Zhang, Da-Peng. 1997. Effect of leaf water status and xylem pH metabolism of xylem-transported abscisic acid. Plant Growth Regulation 21: 51-58.

Zhang, H. T. *et al.* 2011. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. J. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 12 (11): 884-891.

VIII. ANEXOS

Anexo 1 Gráfica de los valores de la transpiración normalizada en los tres clones de papa.



Anexo 2. Estándares de Ácido abscísico. A partir de S5 se preparan las diluciones para armar la curva estándar.

STOCK	ABA (ul)	Metanol (ul)	Concentración (ug/ml)
S1	50 mg	1000	50000
S2	100 S1	900	500
S3	100 S2	900	500
S4	100 S3	900	50
S5	100 S4	900	5 = 5000ng/ml

Anexo 3. Análisis estadístico SAS, en la comparación de estándares, controles positivos y negativos.

Class Level Information

Class	Levels	Values
trt	10	0.05 0.2 0.97 15.6 250 3.9 500 62.5 negativo positivo

Number of Observations Read	41
Number of Observations Used	41

Dependent Variable: Absorbancia

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
trt	9	0.09007148	0.01000794	10.81	<.0001
Error	31	0.02870076	0.00092583		
Corrected Total	40	0.11877224			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Absorbancia Mean
----------	-----------	----------	------------------

0.758355 8.558770 0.030427 0.355512

Level of trt	N	-----Absorbancia-----	
		Mean	Std Dev
0.05	3	0.38700000	0.02406242
0.2	3	0.41400000	0.00655744
0.97	3	0.37333333	0.05701169
15.6	3	0.37733333	0.01159023
250	3	0.33433333	0.02335237
3.9	3	0.39266667	0.01159023
500	3	0.33366667	0.04852147
62.5	3	0.36166667	0.00680686
negativo	8	0.27037500	0.02631641
positivo	9	0.38788889	0.03478306

Dunnett's t Tests for Absorbancia

Alpha 0.05
 Critical Value of Dunnett's t 2.92613

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

trt	Comparison	Difference		
		Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
0.2	- positivo	0.02611	-0.03325	0.08547
3.9	- positivo	0.00478	-0.05458	0.06413
0.05	- positivo	-0.00089	-0.06025	0.05847
15.6	- positivo	-0.01056	-0.06991	0.04880
0.97	- positivo	-0.01456	-0.07391	0.04480
62.5	- positivo	-0.02622	-0.08558	0.03313
250	- positivo	-0.05356	-0.11291	0.00580
500	- positivo	-0.05422	-0.11358	0.00513
	negativo - positivo	-0.11751	-0.16078	-0.07425 ***
0.2	- negativo	0.14362	0.08348	0.20377 ***
3.9	- negativo	0.12229	0.06215	0.18244 ***
	positivo - negativo	0.11751	0.07435	0.16068 ***
0.05	- negativo	0.11663	0.05648	0.17677 ***
15.6	- negativo	0.10696	0.04681	0.16710 ***
0.97	- negativo	0.10296	0.04281	0.16310 ***
62.5	- negativo	0.09129	0.03115	0.15144 ***
250	- negativo	0.06396	0.00381	0.12410 ***
500	- negativo	0.06329	0.00315	0.12344 ***

Anexo 4. Absorbancias-Clon A-1muestreo-foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.459	0.439	0.449	0.014	40.496	-0.385	2.000
10	0.359	0.370	0.365	0.008	26.283	-1.031	1.000
1	0.398	0.430	0.414	0.023	34.609	-0.636	0.000
0.1	0.481	0.453	0.467	0.020	43.524	-0.261	-1.000
0.01	0.517	0.492	0.505	0.018	49.832	-0.007	-2.000
0.001	0.597	0.547	0.572	0.035	61.186	0.455	-3.000
0.0001	0.667	0.678	0.673	0.008	78.091	1.271	-4.000
B+			0.803	0.093			
B-			0.208	0.009			
B+ corregido			0.595				

$$y = -0.4297x - 0.6793; R^2 = 0.9641$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.367	0.408	0.388	0.029	30.151	-0.840	0.374	2.367	10	23.7	118.4
	0.355	0.382	0.369	0.019	26.955	-0.997	0.739	5.484	10	54.8	274.2
	0.404	0.458	0.431	0.038	37.468	-0.512	-0.389	0.408	10	4.1	20.4
	0.365	0.377	0.371	0.008	27.376	-0.976	0.690	4.894	10	48.9	244.7
	0.590	0.544	0.567	0.033	60.345	0.420	-2.558	0.003	10	0.0	0.1
riego	0.322	0.355	0.339	0.023	21.909	-1.271	1.377	23.819	10	238.2	1191.0
	0.416	0.426	0.421	0.007	35.786	-0.585	-0.220	0.602	10	6.0	30.1
	0.358	0.371	0.365	0.009	26.283	-1.031	0.819	6.596	10	66.0	329.8
	0.406	0.363	0.385	0.030	29.647	-0.864	0.430	2.693	10	26.9	134.7
	0.568	0.560	0.564	0.006	59.840	0.399	-2.509	0.003	10	0.0	0.2

Anexo 5. Absorbancias-Clon A-1muestreo-foliolo (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.346	0.361	0.354	0.011	26.615	-1.014	2.000
10	0.59	0.57	0.580	0.014	67.255	0.720	1.000
1	0.478	0.371	0.425	0.076	39.354	-0.432	0.000
0.1	0.485	0.441	0.463	0.031	46.262	-0.150	-1.000
0.01	0.523	0.455	0.489	0.048	50.927	0.037	-2.000
0.001	0.498	0.538	0.518	0.028	56.130	0.246	-3.000
0.0001	0.682	0.581	0.632	0.071	76.495	1.180	-4.000
B+			0.763	0.083			
B-			0.205	0.006			
B+ corregido			0.557				

$$y = -0.3253x - 0.4558; R^2 = 0.9178$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.414	0.465	0.440	0.036	42.045	-0.321	-0.415	0.385	10	3.8	19.2
	0.747	0.635	0.691	0.079	87.171	1.916	-7.292	0.000	10	0.0	0.0
	0.349	0.376	0.363	0.019	28.230	-0.933	1.467	29.326	10	293.3	14.3
	0.444	0.332	0.388	0.079	32.805	-0.717	0.803	6.353	10	63.5	31.7
	0.466	0.633	0.550	0.118	61.782	0.480	-2.878	0.001	10	0.0	0.1
riego	0.501	0.561	0.531	0.042	58.463	0.342	-2.452	0.004	10	0.0	0.2
	0.394	0.413	0.404	0.013	35.586	-0.593	0.423	2.648	10	26.5	132.4
	0.405	0.506	0.456	0.071	44.916	-0.204	-0.774	0.168	10	1.7	8.4
	0.559	0.534	0.547	0.018	61.244	0.458	-2.808	0.002	10	0.0	0.1
	0.454	0.466	0.460	0.008	45.724	-0.171	-0.874	0.134	10	1.3	6.7

Anexo 6. Absorbancias-Clon B-1muestreo -foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.418	0.421	0.420	0.002	33.730	-0.675	2.000
10	0.426	0.398	0.412	0.020	32.508	-0.731	1.000
1	0.485	0.394	0.440	0.064	36.989	-0.533	0.000
0.1	0.528	0.455	0.492	0.052	45.462	-0.182	-1.000
0.01	0.636	0.658	0.647	0.016	70.800	0.886	-2.000
0.001	0.654	0.684	0.669	0.021	74.385	1.066	-3.000
0.0001	0.724	0.762	0.743	0.027	86.443	1.853	-4.000
B+			0.826	0.045			
B-			0.213	0.007			
B+ corregido			0.614				

$$y = -0.5366x - 0.4117; R^2 = 0.9549$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.678	0.656	0.667	0.016	74.059	1.049	-2.722	0.002	10	0.0	0.1
	0.951	0.877	0.914	0.052	114.30	o	o	o	10	o	o
	0.598	0.492	0.545	0.075	54.180	0.168	-1.080	0.083	10	0.8	4.2
	0.609	0.591	0.6	0.013	63.142	0.538	-1.770	0.017	10	0.2	0.8
	0.583	0.453	0.518	0.092	49.780	-0.009	-0.751	0.177	10	1.8	8.9
riego	0.439	0.39	0.4145	0.035	32.915	-0.712	0.560	3.628	10	36.3	181.4
	0.405	0.388	0.3965	0.012	29.982	-0.848	0.813	6.507	10	65.1	325.3
	0.481	0.484	0.4825	0.002	43.995	-0.241	-0.317	0.481	10	4.8	24.1
	0.428	0.44	0.434	0.008	36.093	-0.571	0.298	1.984	10	19.8	99.2
	0.479	0.555	0.517	0.054	49.617	-0.015	-0.739	0.183	10	1.8	9.1

Anexo 7. Absorbancias-Clon B-1muestreo-foliolo (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.313	0.327	0.320	0.010	19.735	-1.403	2.000
10	0.399	0.388	0.394	0.008	32.239	-0.743	1.000
1	0.465	0.454	0.460	0.008	43.467	-0.263	0.000
0.1	0.489	0.529	0.509	0.028	51.888	0.076	-1.000
0.01	0.551	0.572	0.562	0.015	60.820	0.440	-2.000
0.001	0.686	0.685	0.686	0.001	81.916	1.511	-3.000
0.0001	0.762	0.751	0.757	0.008	93.995	2.751	-4.000
B+			0.792	0.063			
B-			0.204	0.004			
B+ corregido			0.588				

$$y = -0.5273x - 0.3274; R^2 = 0.9642$$

	R1	R2	mean	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.396	0.362	0.379	0.024	29.772	-0.858	1.007	10.153	100	1015.3	10.2
	0.654	0.654	0.654	#DIV/0!	76.557	1.183	-2.865	0.001	100	0.1	0.0
	0.386	0.414	0.400	0.020	33.345	-0.693	0.693	4.928	100	492.8	4.9
	0.582	0.45	0.516	0.093	53.079	0.123	-0.855	0.140	100	14.0	0.1
	0.619	0.563	0.591	0.040	65.839	0.656	-1.865	0.014	100	1.4	0.0
riego	0.416	0.49	0.453	0.052	42.361	-0.308	-0.037	0.919	100	91.9	0.9
	0.645	0.651	0.648	0.004	75.536	1.127	-2.759	0.002	100	0.2	0.0
	0.526	0.495	0.511	0.022	52.144	0.086	-0.784	0.165	100	16.5	0.2
	0.334	0.468	0.401	0.095	33.515	-0.685	0.678	4.766	100	476.6	4.8
	0.412	0.467	0.440	0.039	40.065	-0.403	0.143	1.390	100	139.0	1.4

Anexo 8. Absorbancias-Clon C-1muestreo -foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.533	0.452	0.493	0.057	44.639	-0.215	2.000
10	0.39	0.344	0.367	0.033	24.702	-1.115	1.000
1	0.462	0.406	0.434	0.040	35.346	-0.604	0.000
0.1	0.489	0.464	0.477	0.018	42.097	-0.319	-1.000
0.01	0.543	0.573	0.558	0.021	55.044	0.202	-2.000
0.001	0.646	0.64	0.643	0.004	68.546	0.779	-3.000
0.0001	0.684	0.731	0.708	0.033	78.793	1.312	-4.000
B+			0.841	0.151			
B-			0.212	0.001			
B+ corregido			0.630				

$$y = -0.4801x - 0.6774; R^2 = 0.9918$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.474	0.461	0.4675	0.009	40.667	-0.378	-0.624	0.238	10	2.4	11.9
	0.436	0.421	0.4285	0.011	34.472	-0.642	-0.073	0.845	10	8.5	42.3
	0.402	0.444	0.431	0.025	34.869	-0.625	-0.110	0.777	10	7.8	38.9
	0.428	0.436	0.432	0.006	35.028	-0.618	-0.124	0.751	10	7.5	37.6
	0.485	0.468	0.4765	0.012	42.097	-0.319	-0.747	0.179	10	1.8	9.0
riego	0.655	0.528	0.5915	0.090	60.365	0.421	-2.287	0.005	10	0.1	0.3
	0.626	0.528	0.577	0.069	58.062	0.325	-2.089	0.008	10	0.1	0.4
	0.694	0.6	0.647	0.066	69.182	0.809	-3.095	0.001	10	0.0	0.0
	0.453	0.555	0.504	0.072	46.465	-0.142	-1.116	0.077	10	0.8	3.8
	0.456	0.519	0.4875	0.045	43.844	-0.247	-0.895	0.127	10	1.3	6.4

Anexo 9. Absorbancias-Clon C-1muestreo-foliolo (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.539	0.535	0.537	0.003	51.808	0.072	2.000
10	0.422	0.39	0.406	0.023	30.848	-0.807	1.000
1	0.453	0.497	0.475	0.031	41.888	-0.327	0.000
0.1	0.576	0.527	0.552	0.035	54.128	0.165	-1.000
0.01	0.625	0.607	0.616	0.013	64.448	0.595	-2.000
0.001	0.633	0.681	0.657	0.034	71.008	0.896	-3.000
0.0001	0.692	0.707	0.700	0.011	77.808	1.255	-4.000
B+			0.838	0.055			
B-			0.213	0.004			
B+ corregido			0.625				

$$y = -0.4116x - 0.3215; R^2 = 0.9916$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.578	0.664	0.621	0.061	65.248	0.630	-2.312	0.005	10	0.0	0.2
	0.458	0.465	0.462	0.005	39.728	-0.417	0.232	1.704	10	17.0	85.2
	0.451	0.561	0.506	0.078	46.848	-0.126	-0.474	0.335	10	3.4	16.8
	0.533	0.509	0.521	0.017	49.248	-0.030	-0.708	0.196	10	2.0	9.8
	0.537	0.607	0.572	0.049	57.408	0.299	-1.506	0.031	10	0.3	1.6
riego	0.658	0.654	0.656	0.003	70.848	0.888	-2.939	0.001	10	0.0	0.1
	0.557	0.638	0.598	0.057	61.488	0.468	-1.918	0.012	10	0.1	0.6
	0.568	0.693	0.631	0.088	66.768	0.698	-2.476	0.003	10	0.0	0.2
	0.567	0.481	0.524	0.061	49.728	-0.011	-0.755	0.176	10	1.8	8.8
	0.642	0.695	0.669	0.037	72.848	0.987	-3.179	0.001	10	0.0	0.0

Anexo 10. Absorbancias-Clon A-2muestreo-foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.688	0.653	0.671	0.025	66.034	0.665	2.000
10	0.446	0.446	0.446	0.000	33.818	-0.671	1.000
1	0.553	0.527	0.540	0.018	47.307	-0.108	0.000
0.1	0.654	0.572	0.613	0.058	57.782	0.314	-1.000
0.01	0.529	0.781	0.655	0.178	63.809	0.567	-2.000
0.001	0.673	0.705	0.689	0.023	68.688	0.786	-3.000
0.0001	0.730	0.738	0.734	0.006	75.146	1.106	-4.000
B+			0.907	0.078			
B-			0.210	0.010			
B+ corregido			0.697				

$$y = -0.3378x - 0.1744; R^2 = 0.9687$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.558	0.636	0.597	0.055	55.486	0.220	-1.169	0.068	10	0.7	3.4
	0.445	0.480	0.463	0.025	36.186	-0.567	1.163	14.559	10	145.6	728.0
	0.445	0.411	0.428	0.024	31.235	-0.789	1.820	66.050	10	660.5	3302.5
	0.793	0.718	0.756	0.053	78.231	1.279	-4.303	0.000	10	0.0	0.0
	0.727	0.684	0.706	0.030	71.056	0.898	-3.175	0.001	10	0.0	0.0
riego	0.708	0.723	0.716	0.011	72.491	0.969	-3.385	0.000	10	0.0	0.0
	0.489	0.561	0.525	0.051	45.155	-0.194	0.059	1.146	10	11.5	57.3
	0.452	0.425	0.439	0.019	32.742	-0.720	1.615	41.193	10	411.9	2059.6
	0.412	0.455	0.434	0.030	32.024	-0.753	1.712	51.502	10	515.0	2575.1
	0.560	0.548	0.554	0.008	49.316	-0.027	-0.435	0.367	10	3.7	18.4

Anexo 11. Absorbancias-Clon A-2muestreo-foliolo -(-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.640	0.576	0.608	0.045	56.803	0.274	2.000
10	0.425	0.427	0.426	0.001	31.578	-0.773	1.000
1	0.579	0.568	0.574	0.008	52.021	0.081	0.000
0.1	0.615	0.595	0.605	0.014	56.387	0.257	-1.000
0.01	0.650	0.615	0.633	0.025	60.199	0.414	-2.000
0.001	0.704	0.713	0.709	0.006	70.732	0.882	-3.000
0.0001	0.744	0.726	0.735	0.013	74.405	1.067	-4.000
B+			0.920	0.081			
B-			0.198	0.009			
B+ corregido			0.722				

$$y = -0.3361x - 0.1828; R^2 = 0.9239$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.659	0.839	0.749	0.127	76.346	1.172	-4.030	0.000	10	0.0	0.0
	0.809	0.676	0.743	0.094	75.445	1.122	-3.884	0.000	10	0.0	0.0
	0.597	0.522	0.560	0.053	50.081	0.003	-0.554	0.280	10	2.8	14.0
	0.623	0.515	0.569	0.076	51.398	0.056	-0.710	0.195	10	1.9	9.7
	0.637	0.607	0.622	0.021	58.743	0.353	-1.595	0.025	10	0.3	1.3
riego	0.621	0.660	0.641	0.028	61.307	0.460	-1.913	0.012	10	0.1	0.6
	0.531	0.524	0.528	0.005	45.646	-0.175	-0.024	0.945	10	9.5	47.3
	0.539	0.589	0.564	0.035	50.705	0.028	-0.628	0.236	10	2.4	11.8
	0.547	0.541	0.544	0.004	47.933	-0.083	-0.298	0.504	10	5.0	25.2
	0.476	0.545	0.511	0.049	43.289	-0.270	0.260	1.818	10	18.2	90.9

Anexo 12. Absorbancias-Clon B-2muestreo-foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	1.134	1.016	1.075	0.083	108.259	#;NUM!	2.000
10	0.572	0.821	0.697	0.176	60.897	0.443	1.000
1	0.546	0.447	0.497	0.070	35.871	-0.581	0.000
0.1	0.544	0.516	0.530	0.020	40.063	-0.403	-1.000
0.01	0.595	0.557	0.576	0.027	45.819	-0.168	-2.000
0.001	0.664	0.651	0.658	0.009	56.017	0.242	-3.000
0.0001	0.757	0.672	0.715	0.060	63.149	0.539	-4.000
B+			1.009	0.108			
B-			0.210	0.012			
B+ corregido			0.799				

$$y = -0.2884x - 0.651; R^2 = 0.9796$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.673	0.503	0.588	0.120	47.320	-0.107	-1.885	0.013	10	0.1	0.7
	0.670	0.700	0.685	0.021	59.458	0.383	-3.585	0.000	10	0.0	0.0
	0.597	0.474	0.536	0.087	40.751	-0.374	-0.960	0.110	10	1.1	5.5
	0.418	0.430	0.424	0.008	26.799	-1.005	1.227	16.864	10	168.6	843.2
	0.455	0.528	0.492	0.052	35.245	-0.608	-0.148	0.711	10	7.1	35.6
riego	0.422	0.406	0.414	0.011	25.547	-1.070	1.452	28.284	10	282.8	1414.2
	0.365	0.405	0.385	0.028	21.919	-1.270	2.148	140.52	10	1405.3	7026.3
	0.484	0.432	0.442	0.038	29.051	-0.893	0.839	6.899	10	69.0	344.9
	0.387	0.441	0.414	0.038	25.547	-1.070	1.452	28.284	10	282.8	1414.2
	0.509	0.506	0.508	0.002	37.247	-0.522	-0.449	0.356	10	3.6	17.8

Anexo 13. Absorbancias-ClonB-2muestreo -foliolo (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log (X)
100	0.593	0.424	0.509	0.120	52.027	0.081	2.000
10	0.367	0.328	0.348	0.028	24.134	-1.145	1.000
1	0.429	0.475	0.452	0.033	42.238	-0.313	0.000
0.1	0.53	0.507	0.519	0.016	53.760	0.151	-1.000
0.01	0.567	0.594	0.581	0.019	64.501	0.597	-2.000
0.001	0.66	0.688	0.674	0.020	80.700	1.431	-3.000
0.0001	0.734	0.737	0.736	0.002	91.355	2.358	-4.000
B+			0.785	0.074			
B-			0.208	0.012			
B+ corregido			0.577				

$$y = -0.6627x - 0.481; R^2 = 0.9832$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.359	0.386	0.373	0.019	28.465	-0.922	0.665	4.621	10	46.2	23.0
	0.397	0.416	0.407	0.013	34.356	-0.647	0.251	1.783	10	17.8	89.2
	0.461	0.507	0.484	0.033	47.782	-0.089	-0.592	0.256	10	2.6	12.8
	0.632	0.785	0.709	0.108	86.677	1.873	-3.552	0.000	10	0.0	0.0
	0.781	0.673	0.727	0.076	89.882	2.184	-4.022	0.000	10	0.0	0.0
riego	0.394	0.382	0.388	0.008	31.150	-0.793	0.471	2.958	10	29.6	147.9
	0.562	0.592	0.577	0.021	63.895	0.571	-1.587	0.026	10	0.3	1.3
	0.419	0.367	0.393	0.037	32.017	-0.753	0.410	2.573	10	25.7	128.7
	0.428	0.413	0.421	0.011	36.781	-0.542	0.091	1.234	10	12.3	61.7
	0.431	0.446	0.439	0.011	39.900	-0.410	-0.108	0.780	10	7.8	39.0

Anexo 14. Absorbancias-Clon C-2muestreo-foliolo (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.303	0.310	0.307	0.005	23.164	-1.199	2.000
10	0.314	0.345	0.330	0.022	27.698	-0.959	1.000
1	0.393	0.350	0.372	0.030	35.978	-0.576	0.000
0.1	0.405	0.461	0.433	0.040	48.103	-0.076	-1.000
0.01	0.487	0.500	0.494	0.009	60.030	0.407	-2.000
0.001	0.512	0.555	0.534	0.030	67.915	0.750	-3.000
0.0001	0.599	0.605	0.602	0.004	81.419	1.477	-4.000
B+			0.696	0.104			
B-			0.189	0.009			
B+ corregido			0.507				

$$y = -0.444x - 0.4692; R^2 = 0.9851$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.334	0.291	0.313	0.030	24.347	-1.134	1.497	31.386	10	313.9	1569.3
	0.311	0.318	0.315	0.005	24.741	-1.112	1.449	28.105	10	281.1	1405.3
	0.323	0.281	0.302	0.030	22.277	-1.250	1.758	57.234	10	572.3	2861.7
	0.338	0.302	0.320	0.025	25.826	-1.055	1.319	20.869	10	208.7	1043.4
	0.308	0.302	0.305	0.004	22.868	-1.216	1.681	48.021	10	480.2	2401.1
riego	0.372	0.379	0.376	0.005	36.767	-0.542	0.164	1.460	10	14.6	73.0
	0.299	0.299	0.299	0.000	21.686	-1.284	1.835	68.443	10	684.4	3422.1
	0.393	0.414	0.404	0.015	42.287	-0.311	-0.356	0.440	10	4.4	22.0
	0.398	0.368	0.383	0.021	38.245	-0.479	0.022	1.053	10	10.5	52.6
	0.338	0.363	0.351	0.018	31.838	-0.761	0.658	4.547	10	45.5	227.3

Anexo 15. Absorbancias-Clon C-2muestreo-foliolo (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.373	0.379	0.376	0.004	34.625	-0.636	2.000
10	0.32	0.366	0.343	0.033	28.123	-0.938	1.000
1	0.406	0.387	0.397	0.013	38.664	-0.461	0.000
0.1	0.437	0.399	0.418	0.027	42.899	-0.286	-1.000
0.01	0.473	0.478	0.476	0.004	54.228	0.170	-2.000
0.001	0.552	0.596	0.574	0.031	73.633	1.027	-3.000
0.0001	0.616	0.634	0.625	0.013	83.681	1.635	-4.000
B+			0.708	0.070			
B-			0.200	0.013			
B+ corregido			0.508				

$$y = -0.5082x - 0.5714; R^2 = 0.959$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/g)
sequia	0.357	0.377	0.367	0.014	32.852	-0.715	0.282	1.916	10	19.2	95.8
	0.348	0.372	0.36	0.017	31.473	-0.778	0.407	2.551	10	25.5	127.6
	0.395	0.329	0.362	0.047	31.867	-0.760	0.371	2.349	10	23.5	117.5
	0.306	0.362	0.334	0.040	26.350	-1.028	0.898	7.909	10	79.1	395.5
	0.298	0.324	0.311	0.018	21.819	-1.276	1.387	24.375	10	243.7	1218.7
riego	0.32	0.29	0.305	0.021	20.637	-1.347	1.526	33.579	10	335.8	1678.9
	0.336	0.285	0.3105	0.036	21.721	-1.282	1.398	25.022	10	250.2	1251.1
	0.32	0.318	0.319	0.001	23.395	-1.186	1.210	16.204	10	162.0	810.2
	0.405	0.492	0.4485	0.062	48.908	-0.044	-1.038	0.092	10	0.9	4.6
	0.355	0.387	0.371	0.023	33.640	-0.679	0.212	1.631	10	16.3	81.6

Anexo 16. Absorbancias-Clon A-1muestreo-xilema (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.271	0.278	0.275	0.005	11.892	-2.003	2.000
10	0.360	0.345	0.353	0.011	21.831	-1.276	1.000
1	0.770	0.694	0.732	0.054	70.185	0.856	0.000
0.1	0.687	0.561	0.624	0.089	56.424	0.258	-1.000
0.01	0.647	0.667	0.657	0.014	60.629	0.432	-2.000
0.001	0.776	0.762	0.769	0.010	74.899	1.093	-3.000
0.0001	0.821	0.859	0.840	0.027	83.946	1.654	-4.000
B+			0.966	0.045			
B-			0.181	0.006			
B+ corregido			0.785				

$$y = -0.4297x - 0.6793; R^2 = 0.9641$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.301	0.279	0.290	0.016	13.867	-1.826	1.919	82.990	100	8299.0	83.0
	0.340	0.322	0.331	0.013	19.091	-1.444	1.282	19.162	100	1916.2	19.2
	0.338	0.465	0.402	0.090	28.074	-0.941	0.444	2.782	100	278.2	2.8
	0.388	0.372	0.380	0.011	25.334	-1.081	0.678	4.759	100	475.9	4.8
	0.376	0.383	0.379	0.004	25.250	-1.085	0.685	4.842	100	484.2	4.8
riego	0.352	0.318	0.335	0.024	19.601	-1.411	1.228	16.906	100	1690.6	16.9
	0.363	0.335	0.349	0.020	21.385	-1.302	1.046	11.108	100	1110.8	11.1
	0.394	0.404	0.399	0.007	27.755	-0.957	0.471	2.956	100	295.6	3.0
	0.436	0.416	0.426	0.014	31.196	-0.791	0.195	1.566	100	156.6	1.6
	0.428	0.502	0.465	0.052	36.165	-0.568	-0.176	0.667	100	66.7	0.7

Anexo 17. Absorbancias-Clon A 1muestreo-xilema (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.475	0.428	0.452	0.033	42.807	-0.290	2.000
10	0.509	0.541	0.525	0.023	54.800	0.193	1.000
1	0.907	0.928	0.918	0.015	118.847	#¡NUM!	0.000
0.1	0.6	0.665	0.633	0.046	72.342	0.961	-1.000
0.01	0.725	0.694	0.710	0.022	84.906	1.727	-2.000
0.001	0.763	0.73	0.747	0.023	90.944	2.307	-3.000
0.0001	0.954	0.761	0.858	0.136	109.056	#¡NUM!	-4.000
B+			0.802	0.092			
B-			0.189	0.007			
B+ corregido			0.613				

$$y = -0.3253x - 0.4558; R^2 = 0.9178$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.326	0.284	0.305	0.030	18.901	-1.456	4.170	14792	100	0.0	0.0
	0.470	0.472	0.471	0.001	45.989	-0.161	1.633	42.959	100	4295.9	43.0
	0.439	0.486	0.470	0.027	45.880	-0.165	1.642	43.816	100	4381.6	43.8
	0.403	0.453	0.428	0.035	38.972	-0.448	2.196	157.17	100	0.0	0.0
	0.502	0.477	0.490	0.018	49.007	-0.040	1.396	24.886	100	2488.6	24.9
riego	0.408	0.408	0.408	0.000	35.708	-0.588	2.470	294.87	100	0.0	0.0
	0.417	0.463	0.440	0.033	40.930	-0.367	2.037	108.77 5	100	0.0	0.0
	0.436	0.560	0.498	0.088	50.394	0.016	1.287	19.378	100	1937.8	19.4
	0.639	0.503	0.571	0.096	62.306	0.503	0.334	2.158	100	215.8	2.2
	0.546	0.484	0.515	0.044	53.168	0.127	1.070	11.741	100	1174.1	11.7

Anexo 18. Absorbancias-Clon B 1muestreo-xilema (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.416	0.411	0.414	0.004	30.757	-0.812	2.000
10	0.381	0.393	0.387	0.008	26.534	-1.018	1.000
1	0.457	0.435	0.446	0.016	35.936	-0.578	0.000
0.1	0.518	0.492	0.505	0.018	45.339	-0.187	-1.000
0.01	0.523	0.557	0.540	0.024	50.916	0.037	-2.000
0.001	0.585	0.591	0.588	0.004	58.566	0.346	-3.000
0.0001	0.675	0.692	0.684	0.012	73.785	1.035	-4.000
B+			0.848	0.137			
B-			0.221	0.006			
B+ corregido			0.628				

$$y = -0.3789x - 0.6294; R^2 = 0.9754$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.373	0.312	0.343	0.043	19.442	-1.422	2.091	123.19	100	12319	23.2
	0.345	0.319	0.332	0.018	17.769	-1.532	2.382	241.19	100	24119	24.2
	0.341	0.388	0.358	0.026	21.912	-1.271	1.693	49.289	100	4928.9	49.3
	0.38	0.37	0.363	0.021	22.709	-1.225	1.571	37.274	100	3727.4	37.3
	0.364	0.363	0.364	0.001	22.789	-1.220	1.559	36.261	100	3626.1	36.3
riego	0.366	0.345	0.356	0.015	21.514	-1.294	1.755	56.834	100	5683.4	56.8
	0.293	0.333	0.313	0.028	14.741	-1.755	2.971	935.10	100	93510.	935.1
	0.36	0.309	0.335	0.036	18.167	-1.505	2.311	204.66	100	20466.	204.7
	0.685	0.531	0.608	0.109	61.753	0.479	-2.926	0.001	100	0.1	0.0
	0.553	0.498	0.535	0.032	50.173	0.007	-1.679	0.021	100	2.1	0.0

Anexo 19. Absorbancias-Clon B-1muestreo-xilema (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.472	0.447	0.460	0.018	41.903	-0.327	2.000
10	0.515	0.551	0.533	0.025	53.942	0.158	1.000
1	0.571	0.595	0.583	0.017	62.131	0.495	0.000
0.1	0.661	0.642	0.652	0.013	73.351	1.013	-1.000
0.01	0.711	0.737	0.724	0.018	85.226	1.752	-2.000
0.001	0.769	0.771	0.770	0.001	92.760	2.550	-3.000
0.0001	0.955	0.674	0.815	0.199	100.049	#¡NUM!	-4.000
B+			0.814	0.036			
B-			0.204	0.009			
B+ corregido			0.611				

$$y = -0.5625x + 0.6591; R2 = 0.976$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.43	0.584	0.507	0.109	49.683	-0.013	1.194	15.641	100	1564.1	15.6
	0.584	0.661	0.623	0.054	68.601	0.782	-0.218	0.606	100	60.6	0.6
	0.649	0.589	0.621	0.030	68.410	0.773	-0.202	0.628	100	62.8	0.6
	0.64	0.642	0.641	0.001	71.631	0.926	-0.475	0.335	100	33.5	0.3
	0.676	0.695	0.685	0.010	78.893	1.318	-1.172	0.067	100	6.7	0.1
riego	0.617	0.56	0.568	0.046	59.620	0.390	0.479	3.013	100	301.3	3.0
	0.854	0.584	0.683	0.148	78.565	1.299	-1.137	0.073	100	7.3	0.1
	0.444	0.793	0.619	0.247	67.946	0.751	-0.164	0.686	100	68.6	0.7
	0.554	0.497	0.526	0.040	52.713	0.109	0.979	9.519	100	951.9	9.5
	0.382	0.354	0.368	0.020	26.916	-0.999	2.948	886.14	100	88614.	886.1

Anexo 20. Absorbancias-Clon C-1muestreo-xilema (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.501	0.51	0.506	0.006	49.796	-0.008	2.000
10	0.373	0.359	0.366	0.010	26.128	-1.039	1.000
1	0.481	0.43	0.456	0.036	41.313	-0.351	0.000
0.1	0.529	0.499	0.514	0.021	51.239	0.050	-1.000
0.01	0.588	0.542	0.565	0.033	59.891	0.401	-2.000
0.001	0.619	0.605	0.612	0.010	67.866	0.748	-3.000
0.0001	0.694	0.698	0.696	0.003	82.117	1.524	-4.000
B+			0.801	0.033			
B-			0.212	0.006			
B+ corregido			0.589				

$$y = -0.4704x - 0.4837; R^2 = 0.9797$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.36	0.416	0.388	0.040	29.861	-0.854	0.787	6.124	100	612.4	6.1
	0.843	0.777	0.810	0.047	101.45	o	o	o	100	o	o
	0.585	0.597	0.591	0.008	64.303	0.589	-2.279	0.005	100	0.5	0.0
	0.779	0.714	0.747	0.046	90.685	2.276	-5.866	0.000	100	0.0	0.0
	0.686	0.483	0.585	0.144	63.200	0.541	-2.178	0.007	100	0.7	0.0
riego	0.621	0.54	0.581	0.057	62.521	0.512	-2.116	0.008	100	0.8	0.0
	0.454	0.46	0.457	0.004	41.568	-0.341	-0.304	0.496	100	49.6	0.5
	0.546	0.535	0.541	0.008	55.735	0.230	-1.518	0.030	100	3.0	0.0
	0.665	0.699	0.682	0.024	79.742	1.370	-3.941	0.000	100	0.0	0.0
	0.444	0.414	0.429	0.021	36.817	-0.540	0.120	1.318	100	131.8	1.3

Anexo 21. Absorbancias-Clon C-1muestreo-xilema (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.57	0.561	0.566	0.006	53.273	0.131	2.000
10	0.305	0.353	0.329	0.034	15.970	-1.660	1.000
1	0.439	0.382	0.411	0.040	28.825	-0.904	0.000
0.1	0.571	0.575	0.573	0.003	54.456	0.179	-1.000
0.01	0.644	0.683	0.664	0.028	68.730	0.788	-2.000
0.001	0.726	0.714	0.720	0.008	77.642	1.245	-3.000
0.0001	0.771	0.764	0.768	0.005	85.134	1.745	-4.000
B+			0.862	0.077			
B-			0.228	0.014			
B+ corregido			0.634				

$$y = -0.6881x - 0.8002; R^2 = 0.9749$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.508	0.375	0.442	0.094	33.715	-0.676	-0.180	0.660	100	66.0	0.7
	0.586	0.581	0.584	0.004	56.112	0.246	-1.520	0.030	100	3.0	0.0
	0.541	0.406	0.474	0.095	38.762	-0.457	-0.498	0.317	100	31.7	0.3
	0.409	0.53	0.470	0.086	38.131	-0.484	-0.460	0.347	100	34.7	0.3
	0.383	0.384	0.384	0.001	24.566	-1.122	0.467	2.934	100	293.4	2.9
riego	0.429	0.481	0.455	0.037	35.844	-0.582	-0.317	0.482	100	48.2	0.5
	0.425	0.32	0.373	0.074	22.831	-1.218	0.607	4.046	100	404.6	4.0
	0.398	0.419	0.393	0.029	26.065	-1.043	0.352	2.251	100	225.1	2.3
	0.312	0.35	0.331	0.027	16.285	-1.637	1.216	16.455	100	1645.5	16.5
	0.32	0.357	0.339	0.026	17.468	-1.553	1.094	12.408	100	1240.8	12.4

Anexo 22. Absorbancias-Clon A-2muestreo-xilema (uso) y (-70) (1pocillo sequía y 4 riego)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.342	0.326	0.334	0.011	21.692	-1.284	2.000
10	0.453	0.407	0.430	0.033	39.118	-0.442	1.000
1	0.509	0.505	0.507	0.003	53.095	0.124	0.000
0.1	0.545	0.545	0.545	0.000	59.993	0.405	-1.000
0.01	0.327	0.378	0.353	0.036	25.050	-1.096	-2.000
0.001	0.683	0.615	0.649	0.048	78.871	1.317	-3.000
0.0001	0.681	0.656	0.669	0.018	82.411	1.544	-4.000
B+			0.765	0.087			
B-			0.215	0.006			
B+ corregido			0.551				

$$y = -0.4531x - 0.1001; R^2 = 0.9694$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.674	0.591	0.534	0.176	57.935	0.320	-0.927	0.118	100	11.8	0.1
riego	0.567	0.611	0.589	0.031	67.980	0.753	-1.882	0.013	100	1.3	0.0
	0.527	0.400	0.518	0.114	55.092	0.204	-0.672	0.213	100	21.3	0.2
	0.533	0.484	0.509	0.035	53.367	0.135	-0.519	0.303	100	30.3	0.3
	0.530	0.449	0.490	0.057	49.918	-0.003	-0.214	0.611	100	61.1	0.6

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.453	0.412	0.433	0.029	39.572	-0.423	0.713	5.169	100	516.9	5.2
riego	0.403	0.437	0.420	0.024	37.303	-0.519	0.925	8.416	100	841.6	8.4
	0.399	0.378	0.389	0.015	31.585	-0.773	1.485	30.545	100	3054.5	30.5
	0.485	0.396	0.441	0.063	41.024	-0.363	0.580	3.804	100	380.4	3.8
	0.392	0.418	0.405	0.018	34.580	-0.638	1.186	15.353	100	1535.3	15.4

Anexo 23. Absorbancias-Clon B-2muestreo-xilema (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.305	0.319	0.312	0.010	23.264	-1.193	2.000
10	0.376	0.334	0.355	0.030	33.185	-0.700	1.000
1	0.392	0.427	0.410	0.025	45.759	-0.170	0.000
0.1	0.451	0.478	0.465	0.019	58.448	0.341	-1.000
0.01	0.494	0.531	0.513	0.026	69.522	0.825	-2.000
0.001	0.59	0.548	0.569	0.030	82.558	1.555	-3.000
0.0001	0.62	0.591	0.606	0.021	90.979	2.311	-4.000
B+			0.645	0.079			
B-			0.211	0.005			
B+ corregido			0.433				

$$y = -0.572x - 0.148; R^2 = 0.9917$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABA ng/ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.456	0.446	0.451	0.007	55.333	0.214	-0.633	0.233	100	23.3	0.2
	0.444	0.476	0.46	0.023	57.410	0.299	-0.781	0.166	100	16.6	0.2
	0.449	0.472	0.4605	0.016	57.525	0.303	-0.789	0.163	100	16.3	0.2
riego	0.557	0.6	0.5785	0.030	84.750	1.715	-3.257	0.001	100	0.1	0.0
	0.483	0.619	0.551	0.096	78.405	1.289	-2.513	0.003	100	0.3	0.0
	0.431	0.464	0.4475	0.023	54.526	0.182	-0.576	0.265	100	26.5	0.3
	0.534	0.421	0.4775	0.080	61.447	0.466	-1.074	0.084	100	8.4	0.1

Anexo 24. Absorbancias-Clon B-2muestreo-xilema (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.648	0.637	0.643	0.008	68.526	0.778	2.000
10	0.573	0.595	0.584	0.016	59.156	0.370	1.000
1	0.664	0.620	0.642	0.031	68.446	0.774	0.000
0.1	0.687	0.719	0.703	0.023	78.217	1.278	-1.000
0.01	0.799	0.784	0.792	0.011	92.392	2.497	-2.000
0.001	0.819	0.835	0.827	0.011	98.078	3.932	-3.000
0.0001	0.806	0.841	0.824	0.025	97.517	3.671	-4.000
B+			0.839	0.016			
B-			0.215	0.004			
B+ corregido			0.624				

$$y = -0.8846x + 0.8858; R^2 = 0.9321$$

Anexo 25. Absorbancias Clon C 2muestreo-xilema (uso)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.38	0.353	0.367	0.019	30.209	-0.837	2.000
10	0.492	0.448	0.470	0.031	50.316	0.013	1.000
1	0.482	0.528	0.505	0.033	57.115	0.287	0.000
0.1	0.547	0.502	0.525	0.032	60.903	0.443	-1.000
0.01	0.554	0.559	0.557	0.004	67.120	0.714	-2.000
0.001	0.665	0.623	0.644	0.030	84.119	1.667	-3.000
0.0001	1.019	0.758	0.889	0.185	131.617	#¡NUM!	-4.000
B+			0.726	0.093			
B-			0.211	0.012			
B+ corregido			0.515				

$$y = -0.4223x + 0.1698; R2 = 0.9187$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABAng /ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.487	0.491	0.489	0.003	54.007	0.161	0.022	1.051	100	105.1	1.1
	0.838	0.969	0.9035	0.093	134.53	o	o	o	100	o	o
	0.606	0.591	0.5985	0.011	75.279	1.114	-2.235	0.006	100	0.6	0.0
	0.768	0.665	0.7165	0.073	98.203	4.001	-9.072	0.000	100	0.0	0.0
riego	0.668	0.915	0.7915	0.175	112.77	o	o	o	100	o	o
	0.958	0.967	0.9625	0.006	145.99	o	o	o	100	o	o
	0.663	0.841	0.752	0.126	105.10	o	o	o	100	o	o
	0.593	0.663	0.628	0.049	81.010	1.451	-3.033	0.001	100	0.1	0.0

Anexo 26. Absorbancias-Clon C-2muestreo-xilema (-70)

St[NG/ML]	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	Log(X)
100	0.453	0.322	0.388	0.093	43.427	-0.264	2.000
10	0.334	0.356	0.345	0.016	33.643	-0.679	1.000
1	0.368	0.358	0.363	0.007	37.787	-0.499	0.000
0.1	0.423	0.396	0.410	0.019	48.491	-0.060	-1.000
0.01	0.497	0.421	0.459	0.054	59.887	0.401	-2.000
0.001	0.534	0.502	0.518	0.023	73.469	1.019	-3.000
0.0001	0.578	0.595	0.587	0.012	89.238	2.115	-4.000
B+			0.633	0.022			
B-			0.199	0.011			
B+ corregido			0.434				

$$y = -0.5424x - 0.4309; R^2 = 0.935$$

	R1	R2	prom	SE	%B/B+	logit (Y)	X	ABAng /ml	Diluc.	ABA (ng)	ABA (ng/ul)
sequia	0.355	0.341	0.348	0.010	34.334	-0.648	0.401	2.518	100	251.8	2.5
	0.344	0.371	0.3575	0.019	36.521	-0.553	0.225	1.678	100	167.8	1.7
	0.379	0.354	0.3665	0.018	38.592	-0.464	0.062	1.153	100	115.3	1.2
riego	0.503	0.464	0.4835	0.028	65.527	0.642	-1.979	0.011	100	1.1	0.0
	0.614	0.586	0.6	0.020	92.346	2.490	-5.386	0.000	100	0.0	0.0
	0.378	0.541	0.4595	0.115	60.002	0.406	-1.542	0.029	100	2.9	0.0
	0.556	0.584	0.57	0.020	85.439	1.769	-4.057	0.000	100	0.0	0.0
	0.506	0.637	0.5715	0.093	85.785	1.798	-4.108	0.000	100	0.0	0.0

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN AGUSTIN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL Y ACADÉMICA DE AGRONOMIA



**“DETERMINACION DE IDIOTIPOS DE PLANTA CON
TOLERANCIA A LA SEQUIA BASADO EN EL ESTUDIO DE DIEZ
CLONES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) BAJO CONDICIONES DE
ZONA ARIDA”.**

Tesis Presentado por la Bachiller:

Bonie Vanessa Castillo Santander

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Agrónomo

AREQUIPA - PERU

2013

INDICE GENERAL

RESUMEN

I. INTRODUCCION	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1. IMPORTANCIA Y ORIGEN DE LA PAPA	3
2.2. CLASIFICACION TAXONOMICA Y DESCRIPCION BOTANICA DE LA PAPA	6
2.3. ECOFISIOLOGIA DEL CULTIVO DE LA PAPA	7
2.4. FASES DEL CULTIVO DE LA PAPA	9
2.5. PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA	10
2.6. GENETICA Y MEJORAMIENTO DE LA PAPA	10
2.7. FISIOLOGIA DE LAS PLANTAS AL ESTRES ABIOTICO	11
2.7.1. ESTRES	11
2.7.2. ESCAPE Y TOLERANCIA	12
2.7.3. SEQUIA	13
2.8. RELACIONES HIDRICAS DEL CULTIVO DE PAPA	14
2.8.1. FOTOSINTESIS	14
2.8.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA	16
2.8.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA	17
2.8.5. REFLECTANCIA	18
2.8.4. CONTENIDO DE CLOROFILA	19
2.8.6. AREA FOLIAR	20
2.8.7. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR	21
2.8.8. BIOMETRIA	22
2.8.9. BIOMASA	23
2.8.10. RENDIMIENTO	24
III. MATERIALES Y METODOS	26
3. 1. LUGAR DE EXPERIMENTACION	26
3.1.1. UBICACION POLITICA	26
3.1.2. UBICACION GEOGRAFICA	26
3.2. CARACTERISTICAS CLIMATICAS	27
3.3. CARACTERISTICAS EDAFICAS	28
3.4. HISTORIAL DE CAMPO	30
3.5. FECHA DE ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO	30
3.6. MATERIAL	30
3.6.1. MATERIAL VEGETAL	30
3.6.2. MATERIAL DE CAMPO	38
3.6.3. MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPOS	40
3.7. METODOLOGIA	41
3.7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	41
3.7.2. CONDICIONES DEL EXPERIMENTO	44
3.7.2.1 PREPARACION DEL TERRENO	44

3.7.2.2. SIEMBRA	44
3.7.2.3 RIEGO	45
3.7.2.4. CONTROL DE MALEZAS	49
3.7.2.5. FERTILIZACION	49
3.7.2.6. PESTICIDAS	50
3.7.2.7. APORQUE	51
3.7.2.8. SANIDAD VEGETAL.....	51
3.7.2.9. COSECHA	51
3.8. PARAMETROS EVALUADOS	52
3.8.1. FOTOSINTESIS.....	52
3.8.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA	53
3.8.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA	54
3.8.4. REFLECTANCIA	55
3.8.5. CONTENIDO DE CLOROFILA	56
3.8.6. AREA FOLIAR.....	56
3.8.7. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR	57
3.8.7. BIOMETRIA	61
3.8.8. BIOMASA.....	63
3.8.9. RENDIMIENTO Y NUMERO DE TUBERCULOS.....	64
3.8.10. INDICES DE COSECHA Y SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRES POR SEQUIA .	65
3.9. ANALISIS ESTADISTICOS	65

IV. RESULTADOS Y DISCUSION 66

4.1. FOTOSINTESIS ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	66
4.1.1. FOTOSINTESIS CON VARIACIONES DE TEMPERATURA	66
4.1.2. FOTOSINTESIS CON VARIACIONES DE RADIACION	70
4.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$).....	74
4.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (g g^{-1}).....	78
4.3 REFLECTANCIA (Normalized Difference Vegetation Index).....	82
4.4. CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD)	89
4.5. AREA FOLIAR (cm^2).....	93
4.6. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR	95
4.7. BIOMETRIA	98
4.7.1. ALTURA DE PLANTA (cm)	98
4.7.2. COBERTURA FOLIAR	104
4.7.3. LONGITUD DE HOJA (cm)	107
4.7.4. DIAMETRO DE TALLO.....	113
4.8. BIOMASA.....	117
4.8.1. PESO SECO DE HOJAS Y TALLOS	117
4.8.3. PESO SECO DE TUBERCULOS.....	122
4.9. RENDIMIENTO Y NUMERO DE TUBERCULOS.....	126
4.11. INDICE DE COSECHA.....	131
4.12. INDICE DE SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRES.....	133

V. CONCLUSIONES 134

VI. RECOMENDACIONES..... 135

VII. BIBLIOGRAFIA 137

VIII. ANEXOS 148

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Período del año 1961 – 2011 del cultivo de papa.....	5
Cuadro 2. Registros meteorológicos de los meses de octubre 2011 – febrero 2012.....	28
Cuadro 3. Análisis físico - químico del suelo del campo experimental Santa Rita de Sigwas.	29
Cuadro 4. Listado de material genético de clones en papa.....	30
Cuadro 5. Diseño completamente al azar con un factorial.....	41
Cuadro 6. Tratamientos en estudio.....	41
Cuadro 7. Cronograma de los riegos para el tratamiento de riego normal.....	46
Cuadro 8. Cronograma de los riegos para el tratamiento de sequía.....	48
Cuadro 9. Fuentes y cantidades de fertilizantes aplicados por hectárea.....	50
Cuadro 10. Productos comerciales y cantidades de pesticidas aplicados.....	50
Cuadro 11. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 DDE y con una temperatura de 22°C	67
Cuadro 12. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 21 DDE y con una temperatura de 30°C. ...	69
Cuadro 13. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 36 DDE con radiación 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$..	72
Cuadro 14. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a 36 DDE con radiación 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$..	73
Cuadro 15. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) a los 14 DDE.....	76
Cuadro 16. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) a los 32 DDE.....	77
Cuadro 17. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 14 DDE.....	80
Cuadro 18. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 32 DDE.....	81
Cuadro 19. Reflectancia (NDVI) a los 81 DDS (10 DDE).....	85
Cuadro 20. Reflectancia (NDVI) a los 85 DDS (15 DDE).....	86
Cuadro 21. Reflectancia (NDVI) a los 92 DDS (21 DDE).....	87
Cuadro 22. Reflectancia (NDVI) a los 99 DDS (28 DDE).....	88
Cuadro 23. Contenido de clorofila (SPAD) a los 81 DDS (10 DDE).....	91
Cuadro 24. Contenido de clorofila (SPAD) a los 85 DDS (15 DDE).....	92
Cuadro 25. Area foliar (cm^2) a los 84 DDS (13 DDE).....	95
Cuadro 26. Termoestabilidad de la membrana celular (dS m^{-1}) a los 103 DDS (32 DDE)	97
Cuadro 27. Altura de planta (cm) a los 70 DDS.....	101
Cuadro 28. Altura de planta (cm) a los 93 DDS (22 DDE).....	102
Cuadro 29. Altura de planta (cm) a los 109 DDS (38 DDE).....	103
Cuadro 30. Cobertura foliar (%) a los 50 DDS.....	106
Cuadro 31. Cobertura foliar (%) a los 87 DDS (16 DDE).....	107
Cuadro 32. Longitud de hoja (cm) a los 70 DDS.....	110

Cuadro 33. Longitud de la hoja (cm) a los 93 DDS (22 DDE)	111
Cuadro 34. Longitud de la hoja (cm) a los 109 DDS (38 DDE)	112
Cuadro 35. Diámetro de tallo (cm) a los 84 DDS (13 DDE).....	115
Cuadro 36. Diámetro de tallo (cm) a los 110 DDS (39 DDE).....	116
Cuadro 37. Peso seco de hojas (g pta ⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)	120
Cuadro 38. Peso seco de tallos (g pta ⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)	121
Cuadro 39. Peso seco de hojas y tallos (g pta ⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE).....	122
Cuadro 40. Peso seco de tubérculos (g pta ⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)	125
Cuadro 41. Peso seco de tubérculos (g pta ⁻¹) a los 110 DDS (39 DDE)	126
Cuadro 42. Rendimiento de tubérculos (kg/campo experimental) a 118 DDS (47 DDE)	129
Cuadro 43. Número de tubérculos a los 118 DDS (47 DDE).....	130
Cuadro 44. Índice de cosecha	132
Cuadro 45. Índice de susceptibilidad al estrés.....	133
Cuadro 46. Resumen de cada una de las evaluaciones realizadas en los diez clones.	134
Cuadro 47. Primer muestreo de suelo en el campo experimental antes del riego.	148
Cuadro 48. Primer muestreo de suelo en el campo experimental después del riego.....	149
Cuadro 49. Segundo muestreo de suelo en el campo experimental antes del riego.....	149
Cuadro 50. Segundo muestreo de suelo en el campo experimental después del riego.	149
Cuadro 51. Primer muestreo de suelo en el tratamiento de sequía.....	150
Cuadro 52. Primer muestreo de suelo en el tratamiento de sequía.....	150
Cuadro 53. Primera prueba de uniformidad de riego	152
Cuadro 54. Análisis de Varianza fotosíntesis a 21 DDE y con una temperatura de 22 °C	153
Cuadro 55. Análisis Varianza fotosíntesis a 21 DDE con temperatura 22 °C, riego normal ..	153
Cuadro 56. Análisis Varianza fotosíntesis a 21 DDE con temperatura 22 °C, sequía	154
Cuadro 57. Análisis Varianza fotosíntesis a 21 DDE y con una temperatura de 30 °C	154
Cuadro 58. Análisis Varianza fotosíntesis a 21 DDE con temperatura 30 °C, riego normal ..	155
Cuadro 59. Análisis Varianza fotosíntesis a 21 DDE con temperatura de 30 °C, sequía .	155
Cuadro 60. Análisis Varianza fotosíntesis a 36 DDE con radiación 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$..	155
Cuadro 61. Análisis Varianza fotosíntesis 36 DDE radiación 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, riego normal ..	156
Cuadro 62. Análisis Varianza fotosíntesis a 36 DDE radiación 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sequía...	156
Cuadro 63. Análisis Varianza para fotosíntesis a 36 DDE con radiación de 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$..	156
Cuadro 64. Análisis Varianza fotosíntesis 36 DDE cradiación 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, riego normal	157
Cuadro 65. Análisis Varianza fotosíntesis a 36 DDE con radiación 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sequía...	157
Cuadro 66. Análisis de Varianza para el área específica de la hoja a los 14 DDE	157

Cuadro 67. Análisis de Varianza área específica de la hoja a los 14 DDE, riego normal.	158
Cuadro 68. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 14 DDE, sequía	158
Cuadro 69. Análisis de Varianza para el área específica de la hoja a los 32 DDE	158
Cuadro 70. Análisis Varianza en área específica de la hoja a los 32 DDE, riego normal.	159
Cuadro 71. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 32 DDE, sequía	159
Cuadro 72. Análisis de varianza para el contenido relativo de agua a los 14 DDE	159
Cuadro 73. Análisis Varianza para contenido relativo de agua a 14 DDE, riego normal .	160
Cuadro 74. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a 14 DDE, sequía...	160
Cuadro 75. Análisis de varianza para el contenido relativo de agua a los 32 DDE	160
Cuadro 76. Análisis Varianza para contenido relativo de agua a 32 DDE, riego normal .	161
Cuadro 77. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a 32 DDE, sequía...	161
Cuadro 78. Análisis de varianza para la reflectancia a los 10 DDE.....	161
Cuadro 79. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 10 DDE, riego normal	162
Cuadro 80. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 10 DDE, tratamiento sequía..	162
Cuadro 81. Análisis de varianza para la reflectancia a los 15 DDE.....	162
Cuadro 82. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 15 DDE, riego normal	163
Cuadro 83. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 15 DDE, tratamiento sequía..	163
Cuadro 84. Análisis de varianza para la reflectancia a los 21 DDE.....	163
Cuadro 85. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 21 DDE, riego normal	164
Cuadro 86. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 21 DDE, tratamiento sequía..	164
Cuadro 87. Análisis de varianza para la reflectancia a los 28 DDE.....	164
Cuadro 88. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 28 DDE, riego normal	165
Cuadro 89. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 28 DDE, tratamiento sequía..	165
Cuadro 90. Análisis de varianza para el contenido de clorofila a los 10 DDE	165
Cuadro 91. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a 10 DDE, riego normal	166
Cuadro 92. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 10 DDE, sequía	166
Cuadro 93. Análisis de varianza para el contenido de clorofila (SPAD) a los 15 DDE....	166
Cuadro 94. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a 15 DDE, riego normal	167
Cuadro 95. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 15 DDE, sequía	167
Cuadro 96. Análisis de varianza para el área foliar a los 13 DDE	167
Cuadro 97. Análisis de Varianza para el área foliar a los 13 DDE, riego normal.....	168
Cuadro 98. Análisis de Varianza para el área foliar a los 13 DDE, tratamiento sequía....	168
Cuadro 99. Análisis varianza para termoestabilidad de la membrana celular a 32 DDE..	168
Cuadro 100. Análisis Varianza termoestabilidad membrana celular 32 DDE, riego normal..	169

Cuadro 101. Análisis Varianza para termoestabilidad de membrana celular a 32 DDE, sequía...	169
Cuadro 102. Análisis de varianza para la altura de planta a los 70 DDS	169
Cuadro 103. Análisis de varianza para la altura de planta a los 22 DDE.....	170
Cuadro 104. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 22 DDE, riego normal ..	170
Cuadro 105. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 22 DDE, sequía.....	170
Cuadro 106. Análisis de varianza para la altura de planta a los 38 DDE.....	171
Cuadro 107. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 38 DDE, riego normal ..	171
Cuadro 108. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 38 DDE, sequía.....	171
Cuadro 109. Análisis de varianza para la cobertura foliar (%) a los 51 DDS	172
Cuadro 110. Análisis de varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE.....	172
Cuadro 111. Análisis de Varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE, riego normal .	172
Cuadro 112. Análisis de Varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE, sequía.....	173
Cuadro 113. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 70 DDS.....	173
Cuadro 114. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE.....	173
Cuadro 115. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE, riego normal .	174
Cuadro 116. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE, sequía	174
Cuadro 117. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE.....	174
Cuadro 118. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE, riego normal .	175
Cuadro 119. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE, sequía	175
Cuadro 120. Análisis de varianza para el diámetro de tallo a los 13 DDE	175
Cuadro 121. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 13 DDE, riego normal	176
Cuadro 122. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 13 DDE, sequía	176
Cuadro 123. Análisis de varianza para el diámetro de tallo a los 39 DDE	176
Cuadro 124. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 39 DDE, riego normal	177
Cuadro 125. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 39 DDE, sequía	177
Cuadro 126. Análisis de varianza para el peso seco de hojas a los 13 DDE.....	177
Cuadro 127. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas a 13 DDE, riego normal ...	178
Cuadro 128. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas a los 13 DDE, sequía.....	178
Cuadro 129. Análisis de varianza para el peso seco de tallos a los 13 DDE.....	178
Cuadro 130. Análisis de Varianza para el peso seco de tallos a 13 DDE, riego normal ..	179
Cuadro 131. Análisis de Varianza para el peso seco de tallos a los 13 DDE, sequía.....	179
Cuadro 132. Análisis de varianza para el peso seco de hojas y tallos a los 13 DDE	179
Cuadro 133. Análisis Varianza para peso seco de hojas y tallos a 13 DDE, riego normal	180
Cuadro 134. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas y tallos a 13 DDE, sequía.	180

Cuadro 135. Análisis de varianza para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE.....	180
Cuadro 136. Análisis de Varianza para peso seco de tubérculos a 13 DDE, riego normal	181
Cuadro 137. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE, sequía	181
Cuadro 138. Análisis de varianza para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE.....	181
Cuadro 139. Análisis de Varianza para peso seco de tubérculos a 39 DDE, riego normal	182
Cuadro 140. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE, sequía	182
Cuadro 141. Análisis de varianza para el rendimiento de tubérculos a los 47 DDE.....	182
Cuadro 142. Análisis Varianza para rendimiento de tubérculos a 47 DDE, riego normal	183
Cuadro 143. Análisis de Varianza para el rendimiento de tubérculos a 47 DDE, sequía	183
Cuadro 144. Análisis de varianza para el número de tubérculos a los 47 DDE.....	183
Cuadro 145. Análisis de Varianza para número de tubérculos a 47 DDE, riego normal ..	184
Cuadro 146. Análisis de Varianza para el número de tubérculos a los 47 DDE, sequía...	184
Cuadro 147. Análisis de varianza para el índice de cosecha	184
Cuadro 148. Análisis de Varianza para el índice de cosecha, tratamiento riego normal ..	185
Cuadro 149. Análisis de Varianza para el índice de cosecha, tratamiento sequía.....	185

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Area sembrada de papa en la Región Arequipa (ha).....	4
Figura 2. Producción de papa en la Región Arequipa (t)	4
Figura 3. Rendimiento promedio de papa en la Región Arequipa (Kg ha ⁻¹).....	5
Figura 4. Ubicación geográfica del campo experimental en el distrito de Santa Rita de Siguan 26	26
Figura 5. Croquis de la distribución de los tratamientos	43
Figura 6. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 dde y con una temperatura de 22°C	69
Figura 7. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 dde y con una temperatura de 30°C....	70
Figura 8. Fotosíntesis a los 36 dde y con una radiación de 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	73
Figura 9. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 36 dde y con una radiación de 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.	74
Figura 10. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) a los 14 dde.	77
Figura 11. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) a los 32 dde.	78
Figura 12. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 14 dde	80
Figura 13. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 32 dde	82
Figura 14. Reflectancia (NDVI) a los 10 dde.....	86
Figura 15. Reflectancia (NDVI) a los 15 dde.....	87
Figura 16. Reflectancia (NDVI) a los 21 dde.....	88
Figura 17. Reflectancia (NDVI) a los 28 dde.....	89
Figura 18. Contenido de clorofila (SPAD) a los 10 dde.....	92
Figura 19. Contenido de clorofila (SPAD) a los 15 dde.....	93
Figura 20. Area foliar (cm^2) a los 13 dde	95
Figura 21. Termoestabilidad de la membrana celular (dS m^{-1}) a los 32 dde.....	98
Figura 22. Altura de planta (cm) a los 70 dds	102
Figura 23. Altura de planta (cm) a los 22 dde	103
Figura 24. Altura de planta (cm) a los 38 dde	104
Figura 25. Cobertura foliar (%) a los 50 dds	106
Figura 26. Cobertura foliar (%) a los 16 dde.....	107
Figura 27. Longitud de hoja (cm) a los 70 dds.....	110
Figura 28. Longitud de hoja (cm) a los 22 dde.....	111
Figura 29. Longitud de hoja (cm) a los 38 dde.....	112
Figura 30. Diámetro de tallo (cm) a los 13 dde	115
Figura 31. Diámetro de tallo (cm) a los 39 dde	116

Figura 32. Peso seco de hojas (g pta^{-1}) a los 13 dde.....	120
Figura 33. Peso seco de tallos (g pta^{-1}) a los 13 dde.....	121
Figura 34. Peso seco de hojas y tallos (g pta^{-1}) a los 13 dde	122
Figura 35. Peso seco de tubérculos (g pta^{-1}) a los 13 dde.....	125
Figura 36. Peso seco de tubérculos (g pta^{-1}) a los 39 dde.....	126
Figura 37. Rendimiento de tubérculos (kg/parcela) a los 47 dde	129
Figura 38. Número de tubérculos a los 47 dde	130
Figura 39. Índice de cosecha de los diez clones	132
Figura 40. Esquema de la distribución de los envases en la subunidad de riego.	151

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Estación meteorológica modelo HOBO U30 en Santa Rita de Sigwas.	27
Foto 2. Clon 370121	31
Foto 3. Clon 386292.3	32
Foto 4. Clon 393708.31	33
Foto 5. Clon 394881.8	34
Foto 6. Clon 397077.16	35
Foto 7. Clon 398098.203	36
Foto 8. Clon 398192.592	37
Foto 9. Campo experimental	42
Foto 10. Siembra en el campo experimental.	44
Foto 11. Riego en el campo experimental	45
Foto 12. Desmalezado manual	49
Foto 13. Cosecha manual del campo experimental.	52
Foto 14. Colocación del foliolo dentro de la cámara del cabezal del equipo	53
Foto 15. Foliolos de papa sumergidos en agua destilada	54
Foto 16. Reflectómetro	55
Foto 17. Clorofilómetro SPAD 502 Minolta	56
Foto 18. Medición del área foliar	57
Foto 19. Discos de hoja de papa colocados en tubos de ensayo con agua destilada	59
Foto 20. Colocación de los tubos de ensayo en Baño María	59
Foto 21. Tubos de ensayo sometidos a autoclavado.....	60
Foto 22. Lectura de la conductividad eléctrica de los discos de hoja de papa	60
Foto 23. Medición de la altura de planta	62
Foto 24. Evaluación de cobertura foliar	62
Foto 25. Medición de la longitud de hoja.....	63
Foto 26. Cosecha de la planta de papa para la biomasa.	64
Foto 27. Bolsas de tubérculos pesadas en campo para el rendimiento.....	64
Foto 28. Sacabocado para el muestreo de suelo	150
Foto 29. Muestra de suelo pesada y codificada	151
Foto 30. Envases de plástico distribuidos en la subunidad de riego.....	152
Foto 31. Campo experimental	185
Foto 32. Unidad experimental	186

Foto 33. Emergencia de las plántulas de papa.....	186
Foto 34. Medidor de fotosíntesis portátil LI-6400XT marca LI-COR	187
Foto 35. Cabezal del equipo de fotosíntesis con el sensor	187
Foto 36. Foliolos codificados en la bandeja	188
Foto 37. Foliolos colocados junto con un gel pack	188
Foto 38. Agua destilada para la hidratación de los foliolos.....	189
Foto 39. Triple enjuague a los discos de hoja de papa	189
Foto 40. Tubos de ensayo con gel pack para ser transportados.....	190
Foto 41. Tubos de ensayo colocados para realizar autoclavado.....	190
Foto 42. Tubos de ensayo después del autoclavado	191
Foto 43. Lectura de la conductividad eléctrica en los tubos de ensayo.....	191
Foto 44. Evaluación de cobertura foliar.	192
Foto 45. Etiquetado de los clones para las evaluaciones de biometría.....	192

I. INTRODUCCION

La papa, tallo modificado alimenticio de gran valor nutritivo, es originaria de nuestro país, dicha especie se cultiva ahora en casi todos los países de la civilización moderna, y además constituye uno de los alimentos más importantes para la población mundial.

Dicho cultivo se desarrolla en la costa, sierra y valles interandinos, desde el nivel del mar hasta los 3500 – 4000 m.s.n.m.

El cultivo de papa en el Perú es sembrado preponderantemente en la región andina, que presenta riesgo respecto al incremento de la temperatura y la sequía, pues la actual variabilidad climática provoca períodos de sequía que afectan las diversas etapas fenológicas del cultivo.

Villagarcía *et al.* (1990), indican que la irregular distribución de lluvias y heladas, son las principales variables climáticas que afectan la producción agropecuaria en la sierra peruana. El cultivo de papa que crece en zonas alto andinas está sometido constantemente a condiciones ambientales desfavorables; por ello, de acuerdo a Mendoza y Estrada (1979), es probable que dichos clones tengan adaptaciones y mecanismos que les permite crecer y sobrevivir en estos ambientes propensos a la sequía y a las heladas.

El calentamiento global provocado por el cambio climático que experimenta el mundo y la escasez de agua para la agricultura en los próximos años, hacen necesario la determinación de idiotipos de los cultivos en condiciones de estrés hídrico que sean tolerantes a la sequía, Estos aspectos mejorarán la capacidad de adaptación al cambio climático en los sistemas de producción de papa.

1.1. HIPOTESIS

La adecuada identificación de idiotipos de papa pueden establecer ciertos criterios de selección para factores abióticos como la sequía, donde la característica poligénica interacciona con el ambiente y hace difícil el mejoramiento genético y selección de clones de papa tolerantes.

1.2. OBJETIVO

- Determinar idiotipos de papa con mejores características para tolerancia a la sequía.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. IMPORTANCIA DE LA PAPA

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos alimenticios más valiosos para la humanidad (CIP, 1990).

En el año 2011, con un área sembrada total mundial de 89 250 901 ha y una producción total de 1 720 902,746 t año⁻¹ (FAO, 2013).

La papa es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas. En el Perú ocupa actualmente el segundo lugar en superficie de siembra respecto a los cultivos anuales de mayor importancia (FAO, 2013).

El nivel de productividad variará concomitante y significativamente en función de las condiciones climáticas y de la calidad con que los insumos de producción sean provistos para el cultivo (CIP, 1990).

El cultivo de la papa en Arequipa en el 2011 (MINAG, 2013) se cultivaron 8 037 ha (Figura 1), obteniéndose una producción de 263 439 t (Figura 2) con un rendimiento promedio de 32 778 kg ha⁻¹ (Figura 3).

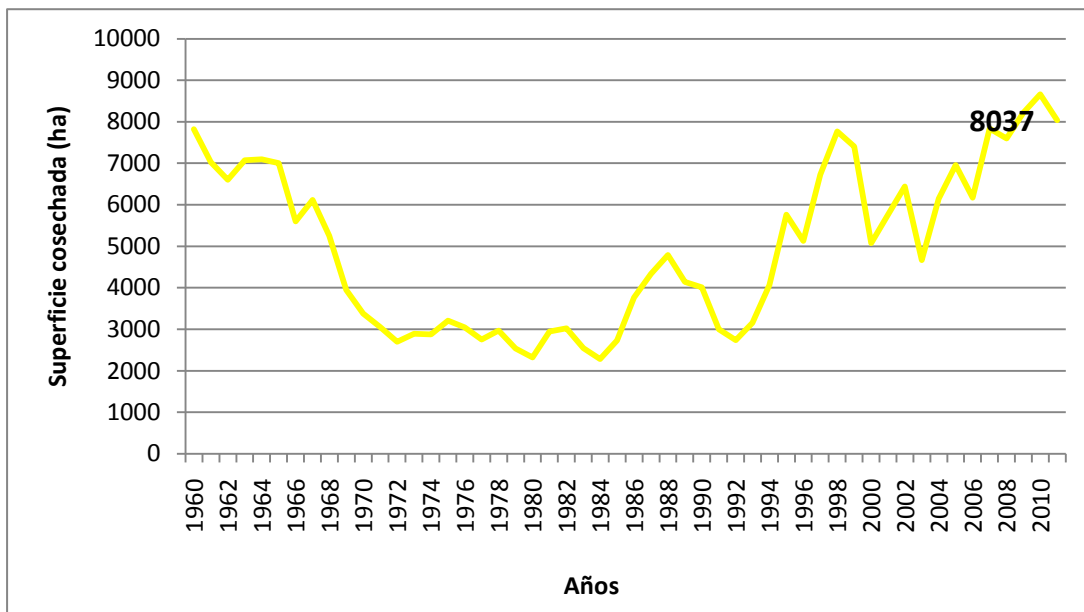


Figura 1. Area sembrada de papa en la Región Arequipa (ha). Adaptado de Ministerio de Agricultura – MINAG. 2013

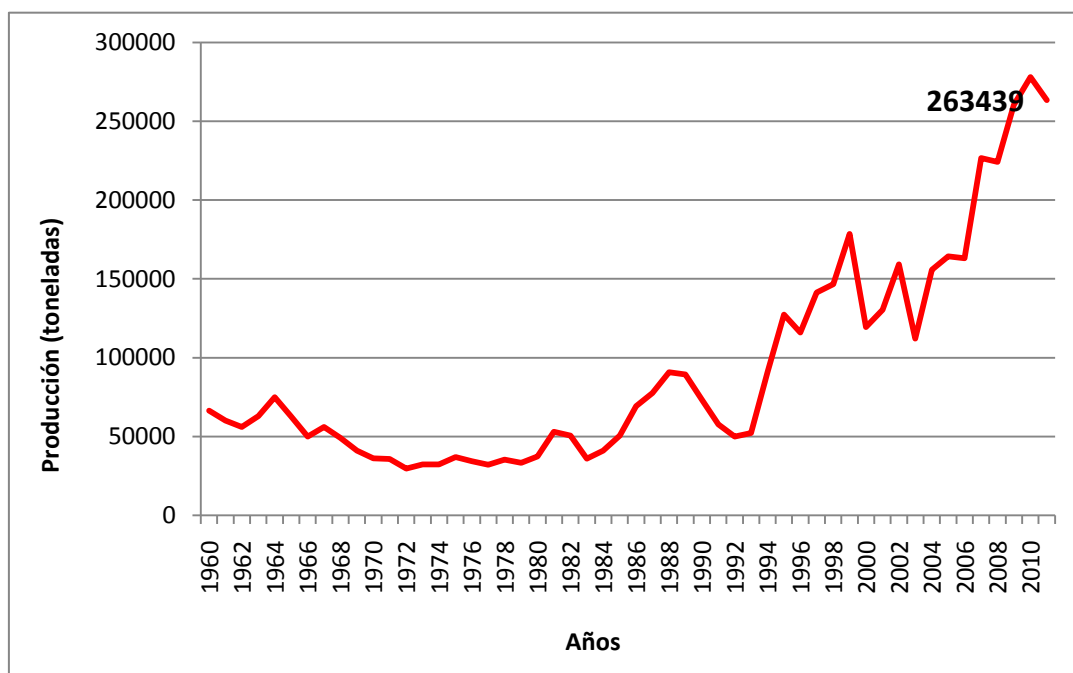


Figura 2. Producción de papa en la Región Arequipa (t). Adaptado de Ministerio de Agricultura – MINAG. 2013

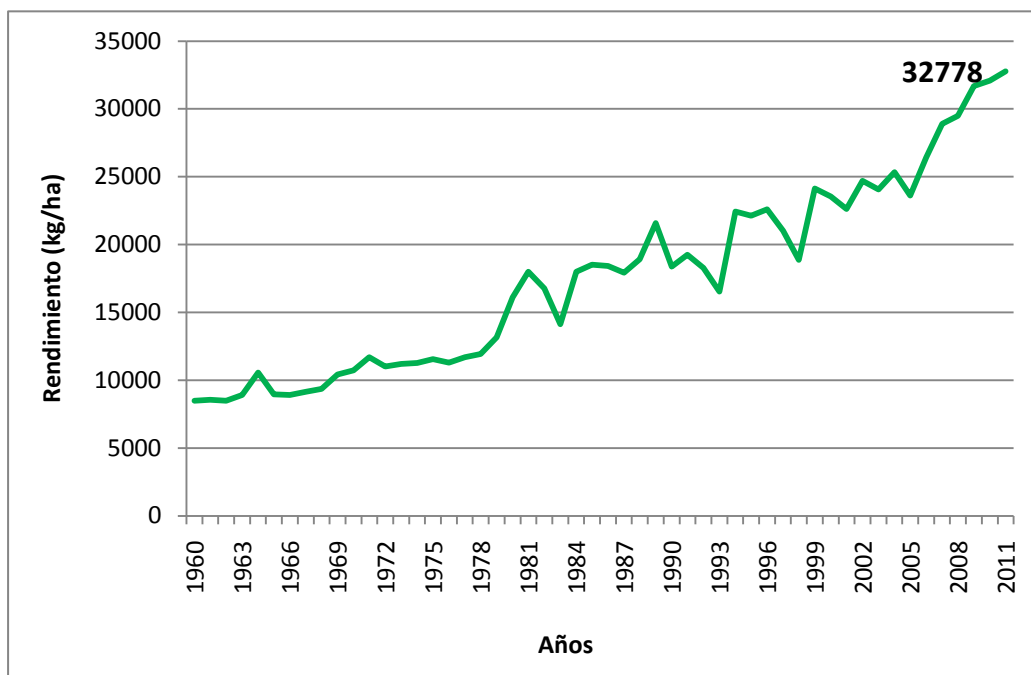


Figura 3. Rendimiento promedio de papa en la Región Arequipa (Kg ha⁻¹).

Adaptado de Ministerio de Agricultura – MINAG. 2013

Durante el período 1961-1970 al 2001-2010 el área cosechada (Cuadro 1) se incrementó solo en un 0,6%. Sin embargo la producción creció en 113%, sustentado en el mayor rendimiento que también aumentó en el mismo porcentaje. Por otro lado, la expansión del área cosechada en los últimos diez años (2000 al 2011) fue de 18%, habiendo un aumento de la producción del 50%, respecto al período anterior (1981-1990) en el que hubo una reducción significativa del área. Asimismo, se incrementó el rendimiento en 30% para ese mismo período.

Cuadro 1. Período del año 1961 – 2011 del cultivo de papa

Variable	1961-1970	1971-1980	1981-1990	1991-2000	2001-2011
Area cosechada (mil ha)	261	253	196	223	295
Rendimiento (t ha ⁻¹)	5,8	6,7	8,2	9,5	13,8
Producción (miles de t)	1,53	1,69	1,62	2,18	3,73

Fuente: FAO-STAT, 2012

2.2. CLASIFICACION TAXONOMICA Y DESCRIPCION BOTANICA DE LA PAPA

Muchos autores se han ocupado de la clasificación de los *Solanum* tuberíferos. Según Ochoa (1999), indica que al presente existen todavía tópicos controvertidos y problemas no resueltos. Así, se ha usado el siguiente esquema:

Familia	: Solanaceae
Género	: Solanum L.
Sub género	: Potatoe
Sección	: Petota Dumortier
Sub sección	: Potatoe
Especie	: <i>Solanum tuberosum</i> L.
Nombre común	: Papa

La descripción botánica de la papa es la siguiente:

La raíz es axonomorfa, es decir, cuyo eje es preponderante, ramificado, con los ejes secundarios poco desarrollados, esto cuando la planta procede de semilla. Cuando se siembra un tubérculo se forman raíces adventicias que se originan de los nudos basales del brote. El tallo es herbáceo, hueco, el color depende del cultivar; así este puede ser morado, marrón, rojizo. Las plantas que crecen de semilla botánica tienen un solo tallo principal. Las plantas que crecen de un tubérculo, pueden tener varios tallos principales que son los que emergen de cada yema; de los tallos principales provienen los tallos secundarios. A los tallos subterráneos que se desarrollan a partir de las yemas de la parte subterránea de los tallos principales y secundarios se les denomina estolones. La longitud y la dirección de los estolones es un carácter varietal. Los tubérculos son tallos modificados que son los que constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta de papa. Los tubérculos son usualmente formados del estolón basal bajo condiciones de elevado estatus de hidratos de carbono de la planta (Vásquez, 1988).

Las hojas son imparipinnadas, de forma, color y tamaño variable, con folíolos simétricos o asimétricos. Además hay un número de pequeños folíolos secundarios. Poseen hoja

pseudoestipular (Jara, 1997). La flor es de diversos colores, las flores son hermafroditas, tetracíclicas, pentámeras y completas. Inflorescencia tipo cima (Jara, 1997).

El fruto – semilla cuando están maduros son de forma redonda oval (1 a 3 cm de diámetro), de color verde a amarillento o castaño rojizo a violeta. Tiene dos lóculos con 200 a 300 semillas, pero debido a factores de esterilidad puede formar frutos sin semilla (Cabrera y Escobal, 1993). La producción de frutos está relacionada con la capacidad de las plantas para producir descendencia, la que está influenciada por una serie de factores de naturaleza genética, ambiental, etc. (Chávez *et al.*, 1997).

2.3. ECOFISIOLOGIA DEL CULTIVO DE LA PAPA

Fisiológicamente la Papa es un cultivo C3 (fijan el CO₂ realizando el ciclo de Calvin, catalizado por la enzima Rubisco, existe un proceso respiratorio no mitocondrial que consume O₂ y produce CO₂ estimulado por la luz, conocido como fotorrespiración, cobra importancia en las plantas C3 porque la velocidad de la fotosíntesis neta decae al fijarse menos carbono con el mismo gasto de agua, además para compensar la pérdida de CO₂ se tiende a una apertura estomática), por lo cual los tejidos estructurales de las hojas no son completos, ya que tienen limitaciones en la captación, almacenamiento y la conversión del CO₂ del aire en azúcares. Una parte de la energía producida en los azúcares por el proceso de la fotosíntesis es utilizada por la planta para su propio crecimiento y sólo una parte de la energía sobrante será después llevada y depositada en los tubérculos bajo la forma de almidón (Medina, 1998).

Una vez ejecutada la siembra del tubérculo – semilla se produce una serie de cambios internos. Inicialmente el tubérculo – semilla se provee de agua y nutrientes de su propia constitución, favorecidos por la humedad y oscuridad del suelo. Las temperaturas altas tienen un efecto positivo en este proceso estimulando un crecimiento más acelerado de los brotes, desde ya se observa cierta dominancia apical (Morby, 1976).

El mecanismo que define el inicio de la tuberización es sustentado por dos teorías, una de ellas se basa en la acumulación de excesos de sustratos en el ápice del estolón y la otra señala la participación de una sustancia inductora de la tuberización. Una vez iniciado dicho mecanismo la planta detiene significativamente su crecimiento aéreo y los tubérculos se convierten en el principal destino de los productos fotosintéticos. Algunos factores medioambientales que favorezcan el crecimiento del follaje, como los altos niveles de nitrógeno presente en el suelo o las altas temperaturas producen al mismo tiempo un retraso en el inicio de la tuberización, por otra parte las sequías y las bajas temperaturas favorecen las condiciones de la iniciación del tubérculo. Hay factores internos y externos (ligados a la planta) que determinan la tuberización de la papa (Hidalgo, 1996).

El fotoperiodo correspondiente a días cortos, favorece a determinados cultivares estimulando el inicio de la tuberización. Los cultivares tardíos son precisamente las que son más estimuladas a tuberizar en días cortos. La papa no es termoperiódica respecto a la floración, pero el frío hace que la tuberización pueda ser más rápida. Cuando el tubérculo – semilla brota y se planta luego de unos días emergen del suelo los primeros talluelos. Del tubérculo – semilla han pasado a los talluelos sustancias de tuberización, fundamentalmente A.B.A. (Acido absícico) entre otras fitohormonas. Las hojas de la nueva planta comienzan a sintetizar más A.B.A., de manera que sumada a la proveniente del tubérculo – semilla, llegan a almacenar un nivel. Con este nivel comienza la tuberización sin dejar de crecer y desarrollarse el follaje. Las hojas sin embargo continúan elaborando más sustancia de tuberización (A. B. A.), hasta que llega a acumular otro nivel mayor, en este momento se produce únicamente el crecimiento del follaje. El ácido indol acético (A. I. A.) y las giberelinas (GA) promueven el crecimiento de los tallos aéreos, pero inhiben la tuberización, pero en la medida que se incrementa el ácido absícico hasta llegar a un cierto nivel, la tuberización se acentúa y se acelera su crecimiento, en tanto el follaje detiene su crecimiento. El etileno apresura el crecimiento y madurez del tubérculo. Durante la translocación de los fotoasimilados, también son conducidos todos estos fitorreguladores hacia los sumideros fisiológicos o tubérculos (Medina, 1995).

En la ecofisiología de la papa tenemos:

En el clima, es un cultivo de clima frío, siendo óptimo un clima templado y una altitud de 3300 m.s.n.m. En el fotoperiodo las plantas de papa cultivadas en nuestro medio ya sea de

Solanum tuberosum o *Solanum andigenum* necesitan para su tuberización de 12 – 16 horas luz día⁻¹, mientras que para especies europeas necesitan 16 – 18 horas luz día⁻¹. Este factor tiene un efecto opuesto, dado que cuando es favorable para el crecimiento del follaje, es desfavorable para la tuberización y viceversa (Jara, 1997).

La temperatura más adecuada para el periodo entre la siembra y la emergencia debe ser calurosa, mientras que para el periodo de crecimiento debe oscilar entre 15 – 22 °C. Se requiere de unos 14 °C para tuberizar (Ramos, 1994).

La humedad relativa debe fluctuar entre 70 – 80%, constante sin llegar a excesos. En la floración y tuberización esta disponibilidad es impostergable, de la cual depende la producción futura. Los suelos para producción comercial y producción de semilla son los suelos arcillo – arenosos, estructura suelta, buen drenaje, con un pH entre ligeramente ácido y neutro (Chávez, 1990).

2.4. FASES DEL CULTIVO DE LA PAPA

Existen cuatro fases marcadas en el cultivo de la papa:

La primera fase es la plantación y la emergencia, la cual abarca el periodo que transcurre entre la plantación hasta que el 80% de los talluelos o brotes emerjan del suelo. Depende del cultivar y de las condiciones de humedad disponible y temperaturas entre 15 – 22 °C. Hay formación de raíces y tallos cortos. La segunda fase es la emergencia hasta el inicio de la tuberización o tuberogénesis, de la emergencia hasta el inicio y pre – crecimiento de los tubérculos (0.5 a 1 cm de grosor). Crecen las raíces, así como el follaje constituyéndose la fase de crecimiento vegetativo, la planta elabora fotoasimilados en las hojas. La tercera fase es la tuberización hasta la floración donde el follaje aumenta y al terminar esta fase no se producen más hojas y empieza la floración. Se forman muchos fotoasimilados y una parte desciende para ir aumentando el tamaño del tubérculo. La cuarta fase desde la floración hasta la cosecha coincide con el inicio poco notorio de la senescencia y con el detenimiento del crecimiento vegetativo. A partir de la floración hay regresión vegetativa y el llenado acelerado del tubérculo. El final de esta fase se conoce por el color amarillo de las hojas, las que después se secan, el tubérculo logra el grado mayor de almidón

acumulado y un mínimo de azúcares que fue la forma inicial en que los fotoasimilados descendían de las hojas a los tubérculos en formación (Medina, 1995).

2.5. PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA

Entre las principales plagas se pueden mencionar: (Ucedas, 1996).

- Gorgojo de los andes (*Premnotrypes* spp.)
- Gusano de tierra (*Copitarsia* spp., *Agrotis* spp.)
- Pulga saltona (*Epitrix* spp.)
- Polilla de papa (*Phthorimaea operculella*, *Tuta absoluta*)
- Mosca minadora (*Liriomyza huidobrensis*)
- Pulgón (*Myzus* spp., *Aphis* spp., *Macrosiphum* spp.)
- Cigarrita (*Empoasca* spp., *Russeliana solanicola*)

Las enfermedades de mayor importancia que afectan a este cultivo son: (Anculle, 1987).

- Costra negra (*Rhizoctonia solani*).
- Pierna negra (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*).
- Racha o Seca seca (*Phytophthora infestans*).
- Alternaria (*Alternaria solani*).
- Marchitez (*Verticillium* spp., *Fusarium* spp.).
- Virus (PLRV, PVY, PVX, PVS, APLV, PMTV).
- Nemátodos (*Globodera pallida*, *Meloidogyne incognita*).

2.6. GENÉTICA Y MEJORAMIENTO DE LA PAPA

En la genética de la papa el número cromosómico básico del género *Solanum* es $X=12$, se sugiere que este es un número derivado del verdadero número cromosómico básico $X=6$. Dentro de las papas cultivadas hay series de especies con diferentes niveles de ploidía: Diploides ($2n=24$), triploides ($2n=36$), tetraploides ($2n=48$), pentaploides ($2n=60$). Debe tenerse en cuenta que para tener éxito en el mejoramiento de la papa, es que esta planta es alógama, constituida por poblaciones muy heterocigotas, el cual debe ser mantenido

durante el programa de mejoramiento, además de conocer su sistema de reproducción, genética y citogenética (Vásquez, 1988).

En relación con los objetivos que plantea el Mejoramiento Genético de la Papa, esta se basa en la adaptación y selección de plantas superiores, es así que Chávez (1999) nos indica la principal estrategia para la adaptación de clones superiores y familias híbridas de papa para tolerancia a estreses bióticos y abióticos relacionados con zonas áridas, las cuales son:

- Mantener una amplia base genética para resistencia a estreses abióticos.
- Incrementar los genes que gobiernan la precocidad, resistencia al calor y la sequía.
- Seleccionar familias y clones promisorios, adaptados a fotoperiodos diversos.
- Buscar la combinación favorable de atributos agronómicos con la calidad para el procesamiento industrial.
- Incorporar en las familias y clones híbridos, genes de inmunidad a los virus PVX, PVY, PLRV, etc.

2.7. FISILOGIA DE LAS PLANTAS AL ESTRES ABIOTICO

La fisiología normal se mantiene bajo condiciones ambientales ideales, pero no siempre la planta se desarrolla bajo esas condiciones, debido a que frecuentemente algún factor es carencial, y varios factores están lejos de ser ideales. Esto crea estrés considerable en el organismo, el cual reacciona a través de varios mecanismos bioquímicos y fisiológicos, que permiten vencer, evitar o neutralizar el estrés (Hsiao, 1973).

Una gran cantidad de investigaciones se han realizado en plantas sometidas a estrés, por dos razones: a) para estudiar los mecanismos de resistencia afectados por estrés y b) porque en la agricultura, las plantas de una u otra forma están sometidas a estrés, y la habilidad de resistir tal estrés tiene gran importancia económica (Armas *et al.*, 1988).

2.7.1. ESTRÉS

Jensen y Salisbury (1988), indican que cuando las plantas se encuentran sujetas a condiciones ambientales que se desvían considerablemente de los normales, los organismos experimentan estrés, el cual siempre ha sido difícil definir (a causa en parte, de sus implicaciones negativas). Levitt (1980), propuso una definición derivada de la física bastante aplicable a la biología, indicando que estrés es “cualquier fuerza que se aplica a un objeto” y deformación es el “cambio de dimensiones que experimenta el objeto como respuesta al estrés”. Este mismo autor sugirió que estrés biológico es cualquier cambio en las condiciones ambientales que pudiera reducir o modificar perjudicialmente el crecimiento y desarrollo de una planta y deformación biológica es la función reducida o modificada.

Cuando el proceso modificado vuelve a la normalidad al eliminar el estrés, se dice que la respuesta al estrés es una deformación estática; de no ser así, la planta ha experimentado una deformación plástica. Milthorpe y Moorby (1982), afirman que en otros casos, si el estrés es demasiado grande, algo puede destruirse y el organismo puede ser irreversiblemente dañado y morir. El desarrollo de resistencia a un factor adverso casi siempre le confiere a la planta algún grado de resistencia a otros factores (Armas *et al.*, 1988).

El estrés hídrico es definido como la respuesta a la falta o el exceso de agua en las plantas. Siendo este factor el que limita la productividad de los ecosistemas naturales y agrícolas. La sequía es definida como el déficit o falta de agua en el suelo para los cultivos y la inundación es el exceso de agua en el suelo. En general, se produce sequía o escasez de agua cuando el suministro es restringido por falta de lluvias o deficiencias en el riego, o bien porque la capacidad de almacenamiento del suelo no es buena. El estrés hídrico no solamente se ve afectado por la falta de agua, sino también por altas temperaturas o por una elevada salinidad (González, 1999).

2.7.2. ESCAPE Y TOLERANCIA

De acuerdo a Levitt (1980), Jones *et al.* (1981) y Armas *et al.* (1988), la naturaleza de la resistencia al estrés puede ser de dos formas: **1.- Escape** (resistencia por evasión), En esta forma de resistencia no están involucradas especializaciones fisiológicas, sino puramente mecánicas y morfológicas que permiten a la planta escapar de los efectos ambientales extremos, de tal forma que las células no se encuentran bajo estrés, aunque este sea muy fuerte (la planta evita el estrés), **2.- Tolerancia** (resistencia por tolerancia), que es cuando la planta sobrevive y aún funciona adecuadamente bajo condiciones internas y externas de extremo estrés. Esta forma de resistencia si implica el desarrollo de mecanismos fisiológicos especiales que permiten que la planta sobreviva bajo condiciones que serían inhibitorias o letales a las especies no resistentes.

En un marco fisiológico, a menudo la tolerancia a estreses abióticos como la sequía está asociada a la supervivencia de la planta. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico, la tolerancia se entiende más bien en términos del rendimiento (magnitud y estabilidad) de un cultivo en condiciones limitantes a la disponibilidad hídrica (Passioura, 1997).

2.7.3. SEQUIA

Kramer (1975), define a la sequía desde un punto de vista agrícola, como la insuficiencia de agua disponible en el suelo para cubrir las necesidades de un cultivo en un determinado estado de desarrollo, que produce en la planta déficits hídricos como para ocasionar reducción en el rendimiento.

Según Armas *et al.* (1988), la sequía es uno de los factores adversos más comunes a que son sometidas las plantas, por lo cual desarrollaron muchos mecanismos de resistencia.

La sequía desde el punto de vista agronómico la podemos definir como la falta de humedad en el suelo, que afecta sensiblemente al normal crecimiento y desarrollo de la planta afectando sus principales funciones y disminuyendo su potencial productivo o rendimiento de sus órganos; puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del desarrollo. Debido a este déficit de agua las plantas reaccionan de diferente forma para contrarrestar estos efectos y normalmente ocurre la disminución de la producción. Si este déficit es demasiado severo y la planta no cuenta con mecanismos de tolerancia, resistencia o evasión, puede ocurrir la

muerte paulatina e irreversible (Jacobsen y Mujica, 1999). El estrés por sequía en papa disminuyó significativamente la producción y la apariencia de tubérculos en todo el material vegetal evaluado en pruebas de campo e invernadero realizadas por Guerrero (1993).

La sequía en términos genéricos puede definirse como una deficiencia de agua que depende de dos factores: las variaciones en el descenso del potencial hídrico en el ambiente y las variaciones en el tiempo o duración de estos descensos (Mamani, 1993). Rodríguez (1988), indica que ésta es una deficiencia ambiental de agua, ya sea en el suelo y/o en la atmósfera y que puede someter a una tensión o esfuerzo a las plantas sobre las cuales incide.

2.8. RELACIONES HIDRICAS DEL CULTIVO DE PAPA

2.8.1. FOTOSINTESIS

Según Armas *et al.* (1988), el abastecimiento de agua a las plantas tiene una íntima relación con los procesos de fotosíntesis, respiración y fotorrespiración; pues estos son afectados ante una carencia de agua.

De acuerdo a Barceló *et al.* (1990), para que el CO₂ penetre en la hoja, necesita que los estomas estén abiertos. Estando regulada dicha apertura por el contenido de agua en las células guardianes, una disminución del contenido relativo de agua cerrará los estomas y disminuirá la fotosíntesis.

Turner y Begg (1981), indican que se ha demostrado que las plantas pierden su actividad fotosintética, conforme el potencial de agua de sus hojas decrece. Estas pérdidas son atribuidas a factores estomatales (cierre de estomas) y a factores no estomatales (disminución de la actividad fotosintética en los cloroplastos). Armas *et al.* (1988), complementan lo expuesto indicando que la disminución del potencial de agua provoca la disminución de la velocidad de fotosíntesis neta, aun cuando la temperatura y la concentración de CO₂ ambiental sean óptimos.

Según Day (1981), así como en estrés de agua causa reducción del área de tejido fotosintético, también puede afectar a la misma fotosíntesis. Indica además que existe una

relación inversa entre la eficiencia fotosintética y la resistencia interna de transferencia de niveles de CO₂.

A nivel metabólico, los cloroplastos pierden su actividad particularmente en reacciones asociadas a las membranas de los tilacoides. El fotosistema II y la fosforilación, son particularmente inhibidas, mientras que el fotosistema I y las actividades enzimáticas del ciclo de Calvin son algo menos afectadas (Boyer, 1976). Chapman y Loomis (1952), determinaron que la fotosíntesis en hojas marchitas de papa, sólo alcanzan la mitad de la fotosíntesis de las hojas turgentes.

Boyer (1976), manifiesta que la planta pierde su actividad fotosintética conforme decrece el potencial de agua de sus hojas, debido al cierre de estomas y a la disminución de la actividad fotosintética en los cloroplastos.

Moorby (1975) determinó que el efecto primario de un periodo de sequía en el cultivo de papa, era la reducción en la tasa fotosintética, por disminución en la absorción de CO₂, debido al incremento en la resistencia estomatal. La declinación del potencial del agua de hojas, era la responsable aparente de incremento en la resistencia estomatal y disminución de la tasa fotosintética. También determinó que la actividad de la enzima Ribulosa – 1,5 – bifosfato – carboxilasa - oxigenasa, disminuiría conforme declinaba el potencial de agua de hojas.

Martinez (1988), en clones de papa y condiciones de invernadero determinó que los efectos del estrés hídrico sobre la fotosíntesis y sobre la reducción del rendimiento es mayor durante la tuberización que durante la formación de estolones.

La fotosíntesis es el proceso fisiológico más afectado por la temperatura alta; el daño causado puede llegar a depender de la estabilidad de los cloroplastos para mantener las reacciones fotosintéticas activas y de la velocidad de síntesis de la clorofila; así mismo, puede llegar a variar de acuerdo a la capacidad de respuesta del genotipo (Crafts-Brandner, 2004).

Salisbury y Ross (2000) manifestaron que a temperaturas elevadas (entre 30 y 35 °C) provocan generalmente el cierre de los estomas. Esto podría ser una respuesta indirecta al

estrés hídrico, o también a un aumento en la tasa respiratoria que puede provocar un incremento en el CO_2 en el interior de la hoja. Una concentración elevada de CO_2 en la hoja sea, probablemente, la explicación correcta al cierre de estomas a temperaturas elevadas en algunas especies, ya que puede evitarse ventilando la hoja de manera continua con aire sin CO_2 . Sin embargo, en algunas plantas las temperaturas elevadas provocan la apertura de los estomas en lugar de su cierre, lo que hace que aumente la transpiración, que a su vez reduce la temperatura en la hoja.

Durante muchos años los fisiólogos vegetales pensaban que las diferentes respuestas estomáticas eran respuestas a la concentración de CO_2 en el interior de la hoja. Por ello el efecto de la luz se explicaba como un efecto indirecto, mediante una disminución de la concentración de CO_2 producida por la fotosíntesis. Sin embargo estudios recientes han demostrado que la luz tiene un efecto importante sobre los estomas, independientemente de la fotosíntesis (Raschke, 1975).

Sharkey y Raschke (1981) manifestaron que a un nivel bajo de luz, la concentración intercelular de CO_2 puede convertirse en el factor regulador principal; pero a un nivel elevado, la respuesta directa a la luz puede sobrecompensar las necesidades de CO_2 para la fotosíntesis y provocar un aumento en la concentración intercelular de CO_2 . También un aumento de la concentración intercelular de CO_2 se daba cuando se aumentaba la luz (porque los estomas estaban abiertos), que es justo lo contrario de lo que podía esperarse si los estomas respondiesen a la luz solo mediante los efectos de la actividad fotosintética sobre la concentración de CO_2 .

Cuando las hojas son iluminadas, la fotosíntesis se realiza a una tasa que depende de como los fotones son distribuidos sobre las hojas y de la eficiencia fotosintética de cada hoja (Jackson, 1980; Lemeur y Blad, 1974).

2.8.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA

Gutiérrez y Schafleitner (2007), menciona que el área específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) representa de manera indirecta el espesor de la misma, habiendo una relación que es determinada en función al área (cm^2) de una hoja o foliolo y su peso seco (g).

Pérez y Hernández (2004) manifiestan que algunos clones aumentan o reducen el área de la hoja expuesta por una deshidratación y pérdida de turgencia de las células. Esto se debe a que el espesor de las hojas en realidad es una característica particular de cada clon.

2.8.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

El contenido relativo de agua (CRA), mide de manera indirecta la turgidez o turgencia de la hoja. Werner (1954), estudió el CRA en hojas de 6 variedades de papa y encontró que el alto contenido de humedad en el suelo origina solo una ligera variación del CRA en las hojas, pero cuando la humedad del suelo decrecía significativamente, las diferencias del CRA eran más evidentes. El contenido relativo de agua representa una relación entre el contenido de agua de la hoja en estado actual y en estado de turgencia. En tal sentido, el contenido relativo de agua puede permitir conocer indirectamente el grado de recuperación de las plantas luego de un periodo de estrés hídrico (Cornejo y Vadia, 1966).

Otros estudios señalan que hay diferencias varietales en el CRA de las hojas aún cuando el potencial del agua del suelo es alto (Epstein y Grant, 1973).

El CRA en las hojas es afectado por las condiciones climáticas, es decir cuando la humedad relativa decrece, se incrementa la demanda evaporativa y el gradiente de vapor de agua de las hojas hacia la atmósfera (Guerrero, 1993).

Li *et al.* (2010) señala que la ausencia de diferencias de contenido relativo de agua puede ser atribuida a una característica del clon, la que posiblemente mantiene el estado de turgencia en las hojas en caso de una cierta restricción de humedad en el suelo.

2.8.5. REFLECTANCIA

La reflectancia es una medida de la radiación reflejada a diferentes longitudes de onda, sobre una cobertura vegetal o superficie determinada. Para medir la reflectancia es necesario hacerlo con sensores remotos multiespectrales por sobre la cobertura de planta del cultivo (Samborski, 2009). Una vez obtenidos los valores de reflectancia a distintas longitudes de onda, es posible calcular índices de vegetación, el más conocido y utilizado es el denominado índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI por sus siglas en inglés: Normalized Difference Vegetation Index). El NDVI combina los valores de reflectancia a dos longitudes de onda (infrarrojo y rojo). Los sensores más difundidos a nivel mundial son el SpectroSense2 (Skye Instruments Inc., Llandrindod Wells, UK), el Green Seeker (Ntech industries, Inc., Ukiah, CA.), el crop Circle ACS-210 (Holland Scientific, Lincoln, NE) y el Jaz (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL).

Samborski (2009) indicó una mayor absorción de la luz en la banda roja por parte de la clorofila habiendo una baja reflectancia en esta banda por el contrario, las paredes de las células de las hojas que poseen agua reflejan la luz en la banda infrarroja cercana habiendo un aumento de la reflectancia en esta banda. Los valores del índice fluctúan entre -1 y 1 a medida que los valores son más altos indica una mayor salud en las plantas (Inman, 2008).

La ecuación que representa este NDVI es (Inman, 2008):

$$NDVI = \frac{(IR - R)}{(IR + R)} \quad \dots\dots\dots (Ec. 01)$$

Donde:

- IR* : Radiación reflejada en el infrarrojo
- R* : Radiación reflejada en el rojo

Bidinger (1978), complementa este efecto, indicando que una reducción en la intercepción de luz por el cultivo equivale a un incremento en la energía incidente sobre la superficie del suelo. Cuando la superficie está seca aumenta la transferencia del calor sensible al

cultivo, pero cuando la superficie del suelo está húmeda, una mayor fracción de la radiación incidente resulta en un incremento de la evaporación a expensas de la transpiración.

2.8.4. CONTENIDO DE CLOROFILA

La clorofila es el pigmento que absorbe la luz en las plantas verdes. Capta la energía solar y la acumula en la planta en forma de proteínas y azúcares. Se encuentra dentro de la membrana de los cloroplastos, que son orgánulos pequeños que se encuentran en las células vegetales. La clorofila es una molécula grande compuesta de hidrógeno, carbono, oxígeno y magnesio coordinado con cuatro átomos de nitrógeno central (Alberts, 1996).

La clorofila puede ser estimada de forma no destructiva y muy fácil en las hojas de las plantas, utilizando ciertos dispositivos.

El análisis de las clorofilas da a conocer el estado de desarrollo de la planta y permite la determinación del estado fisiológico de la planta, con lo cual se puede detectar posibles estreses. En general los contenidos de clorofila aumentan en plantas estresadas o que recibieron riego limitado, este incremento puede estar asociado a un mecanismo adaptativo en la planta frente al estrés hídrico, como es el cambio en el espesor de la hoja, o también debido a la utilización limitada de nutrientes en el suelo por efecto del estrés hídrico o a la interrupción del crecimiento en la planta (Ferri, 2010).

La senescencia de la planta es un proceso genéticamente programado el cual puede ser acelerado por algún tipo de estrés ambiental, como la sequía, el calor y la deficiencia de nitrógeno. La expresión primaria de la senescencia de las hojas es la descomposición de la clorofila y el posterior colapso de la fotosíntesis (Hernández, 2002). Sin embargo, en diversos cultivos se han identificado ciertos genotipos que tienen una senescencia tardía y que permanecen de color verde (Thomas y Howarth, 2000). Esta es la razón por la que la senescencia tardía se discute como parte de los mecanismos de "evitación de deshidratación". Dado que el estrés por sequía acelera el envejecimiento, los genotipos que permanecen verdes son importantes para mantener el área foliar verde bajo estrés lo cual hace que la fotosíntesis dure más tiempo y por lo tanto tiendan a producir más. La

senescencia tardía es en parte regulada por hormonas vegetales endógenas, en algunos casos un aumento de la kinetina en hojas, en otros casos, se asocia con una disminución en el contenido de etileno en la planta. La regulación hormonal puede involucrar al nitrógeno y al estado hídrico de las hojas (Blum, 2011).

Actualmente, una forma rápida y no destructiva para conocer el contenido de clorofila en las hojas es mediante el uso del clorofilómetro Minolta SPAD 502 (por sus siglas en inglés: Soil Plant Analysis Development; SPAD). Este instrumento opera en base a la cantidad de luz absorbida en dos longitudes de onda (660 y 940 nm). Cuanto mayor sea la absorción de luz, mayor será la cantidad de clorofila presente en la hoja (Richardson, 2002). Este tipo de equipo se pone en contacto directo con la hoja al momento de realizar la medición, las unidades de medición son unidades SPAD, que es un contenido relativo de clorofila en relación al equipo.

2.8.6. AREA FOLIAR

El área foliar también es importante para la transpiración de la planta, y es comúnmente considerado un carácter adaptativo para la tolerancia a la sequía, pues reduce su área de la hoja cuando está sometida a un estrés hídrico. Con la reducción de la expansión foliar, también ocurre una reducción en el crecimiento de otros órganos en la planta (Boyer, 1970; Saab y Sharp, 1989), resultando en una reducción de la transpiración que contribuye con evitar el estrés hídrico en las células, incluso cuando la planta presenta un déficit por sequía.

La división celular y la expansión de los tejidos de la hoja tienen un alto grado de correlación (Muller *et al.*, 1998), habiéndose encontrado una correlación negativa entre la tasa inicial de expansión de la hoja y la duración de la expansión. Asimismo, el análisis de la cinemática de la expansión del área foliar, identifican que la tasa de expansión puede verse afectada por factores internos y externos, en ciertas circunstancias un incremento en la duración de la expansión puede verse compensada por una reducción en la tasa de la expansión de la hoja (Cookson *et al.*, 2005). En general, se puede afirmar que el déficit hídrico produce una reducción de la división celular, la expansión del tejido y el desarrollo de la hoja (Granier y Tardieu, 1999).

2.8.7. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

Los efectos ocasionados por la sequía comúnmente se asocian a una desnaturalización irreversible de las enzimas; en la actualidad, estudios recientes han determinado que la sequía produce la ruptura de la membrana celular, dañando severamente su estructura y originando la muerte de la célula, por ende, la termoestabilidad de la membrana celular es un factor importante en la tolerancia a factores abióticos (Rahman *et al.*, 2004).

La capacidad de tolerancia de las plantas involucra una serie de reacciones y mecanismos complejos, siendo la membrana celular uno de los sitios de mayor importancia en la tolerancia al estrés abiótico (Blum, 1988). Algunos autores (Ibrahim y Quick, 2001; Blum, 1988) sugieren que los efectos ocasionados por la sequía pueden llegar a determinarse mediante la termoestabilidad de la membrana celular (TMC). Dicha metodología plantea el hecho de que el daño ocasionado por la sequía puede ser expresado en porcentajes, lo cual da ventajas para su interpretación.

Las membranas celulares son imprescindibles para mantener las actividades metabólicas de la célula en donde la deshidratación celular causa importantes desórdenes en su estructura, por lo que el mantenimiento de la integridad y función de las membranas bajo un nivel de estrés por deshidratación determinado puede tomarse como una medida de tolerancia, siempre que todas las plantas estén sujetas al mismo tipo de estrés (González, 1999).

La capacidad de algunas plantas está estrechamente correlacionado con el potencial genético que posean para esta característica; se ha determinado, mediante investigaciones sobre la termoestabilidad de la membrana, que su capacidad para resistir una sequía está controlada por un grupo reducido de genes y además, se ha encontrado variabilidad genética en diferentes cultivos, lo cual sugiere que este carácter podría ser utilizado como un criterio de selección en la búsqueda de materiales tolerantes a estreses abióticos (Marsh *et al.*, 1985; Ibrahim y Quick, 2001). Esta idea es corroborada por Thiaw y Hall (2004) quienes mencionan que la eficacia de la selección para un rasgo determinado, y en específico para la termoestabilidad de la membrana, depende de la magnitud relativa de las diferencias fenotípicas y genotípicas de una misma población haciendo mención, asimismo, existen muy pocos estudios y por ende, avances en la selección en base a este

criterio.

Shanahan *et al.* (1990) determinaron que existe una alta correlación entre mediciones de termoestabilidad de la membrana celular durante la etapa vegetativa y la etapa reproductiva temprana bajo condiciones controladas. Esto sugiere que el uso apropiado del método de la termoestabilidad de la membrana en la etapa vegetativa, puede ser de gran utilidad para identificar clones tolerantes a estreses abióticos durante etapas tempranas del crecimiento. Ibrahim y Quick (2001) mencionan que de acuerdo a los resultados obtenidos en su trabajo, la termoestabilidad de la membrana podría ser un buen criterio de selección para clones tolerantes a factores abióticos, ya que contempla la variabilidad genética existente en las plantas. Liu y Huang (2000) señalan que cuando las plantas crecen bajo condiciones de campo, pueden soportar periodos de sequía, lo cual puede producir daños a la membrana, por lo que un clon tolerante pudiera tener un efecto negativo de menor nivel sobre la fotosíntesis, con respecto a un clon susceptible.

Diferentes autores han empleado esta metodología en cultivos como soya (Martineau *et al.*, 1979), papa y tomate (Chen *et al.*, 1982), trigo (Saadalla *et al.*, 1990) y garbanzo (Blum *et al.*, 2001). Asimismo, mediante esta técnica se ha podido detectar variabilidad genética para estos cultivos, por lo que el método de la termoestabilidad de la membrana celular es un buen indicador del daño producido por efecto de este tipo de estrés (Blum, 1988).

2.8.8. BIOMETRIA

El efecto del déficit hídrico sobre el crecimiento de las plantas es extremadamente complejo, y su análisis incluye el de todos los procesos fisiológicos.

La altura de planta es una variable que depende del comportamiento genético en donde las relaciones hídricas en el desarrollo de las plantas son determinantes para resistir el déficit hídrico que con frecuencia se mide en la disminución del crecimiento celular, proceso que es extremadamente sensible al estrés. Esta disminución ocurre por disminución de la presión de turgencia, pre – requisito esencial para el alargamiento celular (Hsiao y Acevedo, 1974).

El déficit hídrico afecta tanto la división como el alargamiento celular. Sin embargo, la división celular parece ser menos afectada que el alargamiento celular (Boyer 1971 y Acevedo *et al.* 1979).

La división celular está relacionada al contenido de ácidos nucleicos en las células. Para el alargamiento de las células la presión de turgencia es importante, ya que a la distensión de la pared le sigue la deposición del material componente en esta, lo que provoca el alargamiento o crecimiento (Armas *et al.*, 1988).

Thomas (1986) menciona que la conservación de la cobertura foliar refleja una medida de tolerancia bajo estrés hídrico.

Según Ilahi (1982) y Machado *et al.* (1983) algunas plantas muestran una mayor tolerancia contra la sequía basada en la menor disminución en longitud de hoja ya que de acuerdo a Ilhai (1982), la baja disponibilidad de agua disminuye la expansión celular, lo que influye directamente en la reducción de la longitud foliar.

Martín de Santa Olalla (2005) manifiestan que el crecimiento en diámetro del tallo está dado necesariamente por la división celular que se ve afectado por la baja disponibilidad hídrica. En tal sentido, Narayan y Mishra, (1989) han indicado medir el grado de tolerancia a la sequía a través de varios parámetros, entre ellos el diámetro del tallo, dado que la evaluación sobre la base de uno o dos indicadores puede proporcionar valores limitados, dada la multiplicidad de factores ecofisiológicos y sus interacciones, que contribuyen en dicha tolerancia.

2.8.9. BIOMASA

La tolerancia a la sequía debiera ser expresada en términos de la habilidad de la planta para mantener bajo estrés el rendimiento del tubérculo así como una producción de biomasa e índice de cosecha altos (Fussell *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la acumulación de biomasa es un buen indicador del efecto del estrés hídrico durante periodos prolongados; sin embargo, este criterio debe considerarse con cuidado, ya que bajo un estrés hídrico severo durante periodos cortos, la producción de tubérculo puede disminuir

considerablemente y mantener la producción de biomasa en los órganos vegetativos (Bolaños *et al.*, 1993)

Conforme la planta crece, el tallo presenta un mayor peso seco y la planta se vuelve más fibrosa ya que aparecen materiales estructurales como las ligninas y las hemicelulosas cuando el contenido de humedad es más bajo en el suelo, pudiendo tomarse esto como una medida de tolerancia a la sequía (Loomis y Connor, 1992).

Shock & Feiber (2002) mencionan que el estrés hídrico reduce la producción de materia seca en las hojas. Conn y Stumpf (2002) indican que la actividad de la planta está sujeta al control que sobre su metabolismo ejerce el clon de la misma.

Según Versteeg *et al.* (1982) el agua suministrada tiene un efecto pronunciado sobre la producción de peso seco, los máximos valores se alcanzan con suficientes cantidades de agua, contrariamente a los obtenidos por efecto de una disminución del agua de riego. Green *et al.* (1985) señala que el estrés hídrico en el cultivo de papa no solo reduce la cantidad de luz interceptada, sino también la eficiencia de conversión de esta energía en peso seco.

2.8.10. RENDIMIENTO

Harris (1978) afirma que la papa es una especie muy sensible a la sequía y que el suministro de agua es la principal causa de la variación de los rendimientos año a año. Las plantas de papa pueden responder con incrementos de hasta dos toneladas, por cada centímetro de agua, aplicado por riego o proveniente de la precipitación.

Salter y Goode (1967), señalan que las relaciones hídricas en la planta de papa. En sus diferentes estados de crecimiento, muestra que el periodo más sensible de humedad es durante la tuberización, requiriéndose de un adecuado suministro de agua desde el inicio de la tuberización hasta la madurez completa de los tubérculos para obtener altos rendimientos.

Muñoz (1980) un clon es resistente si disminuye poco su rendimiento bajo condiciones de sequía.

La estabilidad del rendimiento puede abrir un camino nuevo para el desarrollo de criterios de selección al rendimiento principalmente cuando se relaciona para ambientes adversos (Blum, 1988).

Minhas y Bansal (1991) señalan la reducción del rendimiento por sequía está relacionado por el número de tubérculos y el tamaño o por ambos, la sensibilidad por sequía es determinada por la reducción del número de tubérculos.

Fischer y Turner (1978), mencionan que bajo sequía, ocurre un mayor aumento de la materia seca en la raíz que en el vástago, lo que permite una exploración radical extra, reduciéndose en consecuencia el índice de cosecha.

III. MATERIALES Y METODOS

3. 1. LUGAR DE EXPERIMENTACION

El campo experimental se llevó a cabo en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) en el distrito de Santa Rita de Sigwas (Figura 4) y cuya ubicación es como sigue:

3.1.1. UBICACION POLITICA

Departamento : Arequipa
Provincia : Arequipa
Distrito : Santa Rita de Sigwas

3.1.2. UBICACION GEOGRAFICA

Latitud Sur : 16° 29' 27" S
Longitud Oeste : 72° 05' 33"
Altitud : 1 268 msnm



Fuente: Google Earth, 2012

Figura 4. Ubicación geográfica del campo experimental en el distrito de Santa Rita de Sigwas.

3.2. CARACTERISTICAS CLIMATICAS

El clima de Santa Rita de Sigwas se caracteriza por ser subtropical seco teniendo un promedio de 7 mm año⁻¹, una temperatura media anual de 19°C, una radiación solar de 3 397 h año⁻¹, la humedad relativa de 53 %, y una evaporación media de 2 130 mm año⁻¹ (Gobierno Regional de Arequipa, 2011).

Las condiciones climáticas durante el periodo experimental, fueron registradas en una estación meteorológica modelo HOBO U30 (Onset Corporation, Bourne, Massachusetts, EEUU) (Foto 1). La estación meteorológica registró por día los datos de temperatura (°C), humedad relativa (%), radiación (W m⁻²) y precipitación (mm), la cual fue almacenada en la memoria del equipo, posteriormente la estación meteorológica sufrió un desperfecto y los datos climáticos fueron proporcionados por el SENASA – Estación Arequipa.



Foto 1. Estación meteorológica modelo HOBO U30 en Santa Rita de Sigwas.

La información meteorológica correspondiente a los meses, durante el cual se llevó a cabo el experimento se detallan en el Cuadro 2 .

Cuadro 2. Registros meteorológicos de los meses de octubre 2011 – febrero 2012

	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO
T° Max (°C)	28,84	30,07	27,1	29,7	28,6
T° Min (°C)	4,82	6,81	9,2	11,2	12,6
T° Prom. (°C)	17,6	18,6	17,8	18,5	20,0
T° Suelo (°C)	26,6	28,6	29,3	29,6	29,4
H° R (%)	37	47	64	63	63
Precip. (mm)	0	0	0	0	0

Fuente: SENASA 2011 – 2012. Estación Arequipa.

Las características climáticas que se presentaron durante la ejecución del presente trabajo nos determina que las temperaturas promedio del aire entre 17,6 °C y 18,6 °C y las temperaturas del suelo están entre 26,6 °C y 29,3 °C. La humedad relativa varía entre 37% y 64%. La precipitación es nula (0 mm).

3.3. CARACTERISTICAS EDAFICAS

Aparece enclavado sobre las pampas del desierto costero local cuyo territorio es abruptamente cortado por los ríos Sigwas y Vítor los que forman profundos valles transversales y delimitan las pampas de Sigwas.

Se realizó el análisis en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Agua, Plantas y Fertilizantes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina que se pueden apreciar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis físico – químico del suelo del campo experimental Santa Rita de Siguas.

CARACTERIZACIÓN	UNIDADES	VALOR
Clase Textural		Franco arenoso
Arena	%	74
Limo	%	18
Arcilla	%	7
pH		7,6
C.E.	dS/m	1,31
CaCO₃	%	1,30
MO	%	1,33
Fósforo	Ppm	2,9
K₂O	Ppm	336
CIC		8,6
Ca⁺²	meq/100g	5,93
Mg⁺²	meq/100g	1,54
K⁺	meq/100g	0,70
Na⁺	meq/100g	0,41
Al⁺³ + H⁺	meq/100g	0,00
Suma de cationes		8,60
Suma de bases		8,60
% Sat. de bases	%	100

Fuente: Laboratorio de análisis de suelos, agua, plantas y fertilizantes. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Se realizó un muestreo con un barreno, en donde las muestras fueron embaladas y rotuladas siendo analizadas en el laboratorio de análisis de suelos, agua, plantas y fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Cuadro 3), para lo cual se efectuó un análisis de caracterización, se observa que el suelo tiene una clase textural franco arenosa, teniendo moderada capacidad de retención de agua, alta velocidad de infiltración y drenaje presentando una porosidad entre 33 a 42% con una densidad aparente de 1,7 a 1,5 g cm⁻². Tiene un pH de 7,6 lo que representa un suelo de pH medianamente básico con una presencia media de CaCO₃ (1,3%). Para los rendimientos óptimos de papa se requiere de un pH entre 5,0 – 5,8 y tener un rango de tolerancia para un rendimiento satisfactorio, los niveles de pH deben estar entre 4,5 – 7,0. Presenta una conductividad eléctrica de 1,31 dS m⁻¹ en donde el suelo no es salino ni sódico, cabe mencionar la clasificación de suelos salinos dada por Richards *et al.* (1980), los valores menores de 4 dS m⁻¹ en general no son perjudiciales para los cultivos. La materia orgánica demuestra que el suelo es bajo en contenidos de la misma lo cual ayuda a la poca retención del agua

disponible para la planta. El contenido de fósforo de 2,9 ppm es bajo y el contenido de potasio de 336 ppm es muy alto. Presenta una CIC de 8,6 indicando una baja fertilidad potencial del suelo, en cuanto al Ca^{+2} , Mg^{+2} y Na^{+} se encuentran en niveles bajos. En cuanto a sus relaciones: Ca/Mg con 3,85 lo cual no representan una buena relación escapando del rango óptimo, igual condición ocurre en Ca/K con 8,47, el óptimo es de 14-16 y por ultimo Mg/K con 2,20 lo que representa que es suelo posee una buena relación entre estos dos cationes.

3.4. HISTORIAL DE CAMPO

El único antecedente inmediato está referido al establecimiento de alfalfa, a partir del cual no se registraron cultivos en la zona de ensayo.

3.5. FECHA DE ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo se estableció el 27 de octubre de 2011.

3.6. MATERIAL

3.6.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron diez clones de papa como se muestra en el Cuadro 4 que se evaluaron con referencia al estrés hídrico (sequía) y fueron usados posteriormente en el trabajo de investigación. Se utilizaron 5 tubérculos por unidad experimental que representa un surco y 400 tubérculos por tratamiento (riego normal y sequía).

Cuadro 4. Listado de material genético de clones en papa

id	Clones
1	370121
2	386292.3
3	393708.31
4	394881.8
5	395193.4
6	397077.16
7	398098.203
8	398190.523
9	398192.592
10	501065.1

Los diez clones de papa tienen las siguientes características:

370121.- La recolección de este clon es de origen desconocido. Proviene del padre KUFRI JYOTI y de la madre KUFRI NEELMANI. El color predominante de la piel es blanco – crema, la forma del tubérculo es redonda, el color predominante de la pulpa del tubérculo es crema y la profundidad de los ojos del tubérculo es media (Foto 2). El clon es altamente susceptible a la mosca minadora; susceptible al tizón foliar, marchitez bacteriana y al nemátodo del nódulo de la raíz y resistente al virus X de la papa (PVX), virus Y de la papa (PVY) y el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV).



Brote



Hoja



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 2. Clon 370121

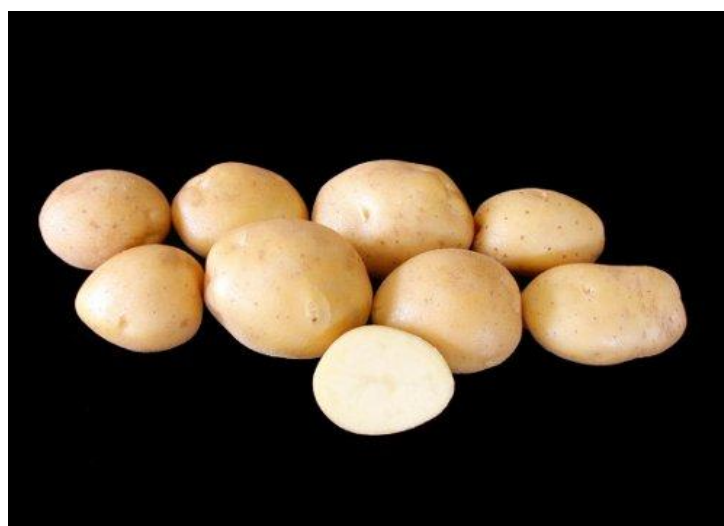
386292.3.- Proviene del padre 375333.1 y de la madre RENSKA. La localidad donde se encuentra la copia de seguridad de este clon es en Argentina y su fecha de adquisición de este clon fue el 23 de diciembre de 1992. El color predominante de la piel es blanco - crema, la forma del tubérculo es redondeada, el color predominante de la pulpa del tubérculo es crema y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 3). El clon es susceptible al virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV); moderadamente resistente al tizón tardío y extremadamente resistente al virus Y de la papa (PVY). Su periodo de crecimiento es de 90 días.



Brote



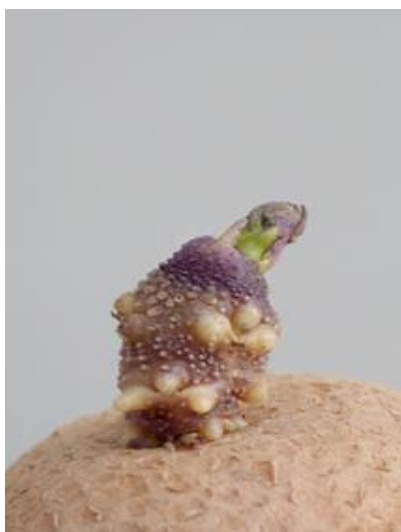
Flor



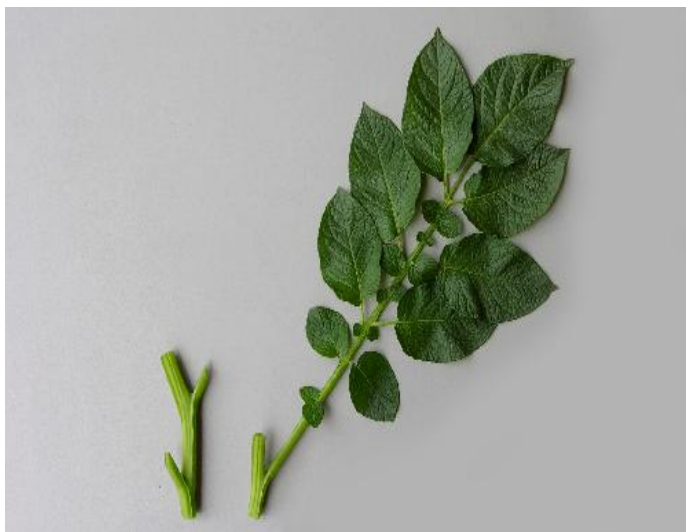
Tubérculo

Foto 3. Clon 386292.3

393708.31.- Proviene del padre 391895.10 (DXY.10) y de la madre PW-31. El color predominante de la piel es blanco – crema, la forma del tubérculo es oblonga, el color predominante de la pulpa del tubérculo es crema y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 4). El clon es moderadamente susceptible al virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV); susceptible al tizón tardío, marchitez bacteriana y mosca minadora; extremadamente resistente al virus Y de la papa (PVY), moderadamente resistente al nemátodo del nódulo de la raíz y resistente al virus X de la papa (PVX). Su periodo de crecimiento es de 90 a 120 días.



Brote



Hoja



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 4. Clon 393708.31

394881.8.- Proviene del padre 386287.1 (XY.4) y de la madre B84-606.5. El color predominante de la piel del tubérculo es blanco - crema, la forma del tubérculo es redondo, el color predominante de la pulpa del tubérculo es blanco y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 5). El clon es altamente susceptible al tizón tardío, virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) y mosca minadora; moderadamente susceptible al nemátodo del nódulo de la raíz, susceptible a la marchitez bacteriana y extremadamente resistente al virus X de la papa (PVX) y el virus Y de la papa (PVY).



Brote



Hoja



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 5. Clon 394881.8

395193.4.- Proviene del padre C92.030 y de la madre 388611.22 (C91.612).

397077.16.- Proviene del padre 392820.1 (C93.154) y de la madre 392025.7 (LR93.221). El color predominante de la piel es blanco – crema, la forma del tubérculo es oblongo alargado, el color predominante de la pulpa del tubérculo es amarillo claro y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 6). El clon es altamente susceptible al virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), marchitez bacteriana y mosca minadora; susceptible al tizón tardío y al nemátodo del nódulo de la raíz y extremadamente resistente al virus X de la papa (PVX) y el virus Y de la papa (PVY). El periodo de crecimiento es de 90 a 120 días.



Brote



Hoja



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 6. Clon 397077.16

398098.203.- Proviene del padre 392639.31 y de la madre 393371.58. El color predominante de la piel es blanco – crema, la forma del tubérculo es oblonga, el color predominante de la pulpa del tubérculo es amarillo claro y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 7). El clon es susceptible al virus X de la papa (PVX), extremadamente resistente al virus Y de la papa (PVY) y resistente al tizón tardío.



Brote



Plantas



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 7. Clon 398098.203

398190.523.- Proviene del padre 392639.2 y de la madre 393077.54. El color predominante de la piel es blanco – crema, el color secundario predominante de la piel es

rosado, la forma del tubérculo es oblongo, el color predominante de la pulpa del tubérculo es crema.

398192.592.- Proviene del padre 392633.54 y de la madre 393077.54. El color predominante de la piel es blanco – crema, la forma del tubérculo es oblongo alargado, el color predominante de la pulpa del tubérculo es crema y la profundidad de los ojos del tubérculo es superficial (Foto 8). Este clon es susceptible al virus Y de la papa (PVY), extremadamente resistente al virus X de la papa (PVX) y resistente al tizón tardío.



Brote



Inflorescencia



Tubérculo

Foto 8. Clon 398192.592

501065.1.- Proviene del padre AC95L-27.3 y de la madre C96H-13.2

3.6.2. MATERIAL DE CAMPO

Los materiales utilizados en el proceso de siembra, evaluaciones y manejo de campo fueron:

- Acrobat MZ W. P. (Dimethomorph + Mancozeb)
- Agua destilada
- Antracol 70% P. M. (Propineb)
- Aspersores marca VYR de bronce con un radio aspersión de 9 m.
- Bandejas de plástico
- Barreno o tornillo muestreado, para determinar la humedad del suelo.
- Baterías recargables para el analizador de fotosíntesis.
- Bidones de agua (trampas para insectos)
- Bisturí
- Bolsas de papel kraft
- Bolsas plásticas
- Caja de tekpor
- Cámara fotográfica
- Carretilla
- Cinta métrica, utilizado para la medición de parámetros de biometría; como son altura de planta y longitud de hojas.
- Cinta masking tape
- Confidor 350 S. C. (Imidacloprid)
- Depósitos de un litro para medir la lámina de riego
- Equipo de riego por aspersión
- Estiércol
- Etiquetas de colores (codificación de las unidades experimentales)
- Evisect 50 S.P. (Thiocyclam hidrógeno oxalato)
- Fitoraz 76% P. M. (Propineb + cymoxanil)
- Fosfato diamónico
- Fungicida para suelo (Pentacloro + Farmathe)

- Furadan 5% G (Carbofuran)
- Ganchos
- Gradillas para colocar los tubos de ensayo.
- Grilla de madera 80 x 60 cm, para medir la cobertura de las plantas.
- Homai W.P. (Tiofanate metil + tiram)
- Karate C. E. (Lambdacihalotrina)
- Lamina fina de plástico
- Lapicero
- Libreta de apuntes
- Lorsban 4E C.E. (Clorpirifos)
- Nitrato de amonio para la fertilización.
- Palas
- Papel toalla
- Paquetes de gel pack
- Pie de rey, instrumento utilizado para la medición del diámetro del tallo
- Picos
- Pipeta descartable de 10 ml.
- Provado Combi 112.5 SC (Betaciflutrina + imidacloprid)
- Plumones indelebles de punta gruesa y delgada
- Rastrillo
- Sacabocado
- Sectoriales de plástico
- Sencor 480 S. C. (Metribuzina)
- Sulfato de potasio para la fertilización.
- Supermil 90 S. P. (Cypermetrina)
- Termómetro
- Tuberías de aluminio, codos, gomas para el sistema de riego
- Tubos de ensayo
- Tractor con implemento
- Trinches

3.6.3. MATERIAL DE LABORATORIO Y EQUIPOS

Los materiales de laboratorio utilizados en:

- Balanza
- Bandejas (para realizar CRA)
- Bolsas de papel kraft
- Congeladora
- Cuchillo
- Lápiz
- Matraz de 100 cc para muestreo de suelo
- Papel toalla
- Pizeta
- Plumón indeleble
- Tabla de picar
- Tijeras de podar

Los equipos utilizados en:

- Analizador de fotosíntesis modelo LI-6400XT, marca LI-COR.
- Autoclave
- Balanza analítica de +/- 0.001, marca Mettler AE-50.
- Balanza de campo modelo JWG-15, marca Jadever.
- Baño María
- Escaner OneTouch 9520 (Vissioner, Pleasanton, California, EEUU) para determinar el área foliar.
- Estufa para el secado de muestras vegetales.
- Laptop Core i3, 3.00 GHz, marca Lenovo.
- Medidor de clorofila (SPAD 502, Minolta)
- Medidor de conductividad eléctrica, marca Tetracon 325-3.
- Programa Compueye LSA (software para la determinación del área de una hoja)
- Programa para el análisis estadístico de datos SAS v.9.2 (SAS Institute, 1990)
- Reflectómetro SpectroSense2 (Skye Instruments Ltd., Llandrindod Wells, Powys, Reino Unido)

3.7. METODOLOGIA

3.7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo se utilizó un diseño completamente al azar con un factorial 2 por 10 con 8 repeticiones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Diseño completamente al azar con un factorial

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD (GL)
Tipo de riego (I)	1
Clones (C)	9
I. C	9
Error experimental	140
Total	159

Los tratamientos en estudio aparecen en el Cuadro 6:

Cuadro 6. Tratamientos en estudio

CLAVE	CLON	TRATAMIENTO	CLAVE	CLON	TRATAMIENTO
T0-R	397077.16	Riego	T0-S	397077.16	Sequia
T1-R	398192.592	Riego	T1-S	398192.592	Sequia
T2-R	398190.523	Riego	T2-S	398190.523	Sequia
T3-R	398098.203	Riego	T3-S	398098.203	Sequia
T4-R	386292.3	Riego	T4-S	386292.3	Sequia
T5-R	393708.31	Riego	T5-S	393708.31	Sequia
T6-R	395193.4	Riego	T6-S	395193.4	Sequia
T7-R	501065.1	Riego	T7-S	501065.1	Sequia
T8-R	394881.8	Riego	T8-S	394881.8	Sequia
T9-R	370121	Riego	T9-S	370121	Sequia

El campo experimental presenta las siguientes características (Foto 9):

- Número de tratamientos : 2
- Número de unidades experimentales : 160
- Área de unidad experimental : 2,16 m²
- Número de surcos por unidad experimental : 1
- Distancia entre surcos : 0,90 m
- Distancia entre plantas : 0,30 m
- Área total específica : 244,8 m²



Foto 9. Campo experimental

La distribución de los tratamientos con un diseño completamente al azar con un factorial de 2 por 10 con 8 repeticiones se observa en la Figura 5.

2 SURCOS DE BORDE									
CALLE DE 1m DE ANCHO	398190.523	CALLE DE 1m DE ANCHO	370121	CALLE DE 1m DE ANCHO	398192.592	CALLE DE 1m DE ANCHO	398098.203	CALLE DE 1m DE ANCHO	SEQUIA
	398192.592		395193.4		397077.16		393708.31		
	397077.16		398098.203		386292.3		370121		
	398098.203		397077.16		394881.8		395193.4		
	386292.3		501065.1		370121		397077.16		
	393708.31		394881.8		398190.523		386292.3		
	395193.4		398190.523		398098.203		501065.1		
	501065.1		398192.592		393708.31		394881.8		
	394881.8		393708.31		395193.4		398192.592		
	370121		386292.3		501065.1		398190.523		
5 SURCOS LIBRES, DISTANCIA ENTRE SURCOS 0,90 m									
CALLE DE 1m DE ANCHO	394881.8	CALLE DE 1m DE ANCHO	397077.16	CALLE DE 1m DE ANCHO	395193.4	CALLE DE 1m DE ANCHO	398190.523	CALLE DE 1m DE ANCHO	RIEGO NORMAL
	398098.203		370121		398192.592		386292.3		
	501065.1		398190.523		394881.8		397077.16		
	370121		386292.3		398098.203		398192.592		
	395193.4		501065.1		397077.16		395193.4		
	397077.16		394881.8		398190.523		501065.1		
	398190.523		395193.4		370121		393708.31		
	386292.3		393708.31		386292.3		370121		
	393708.31		398098.203		501065.1		394881.8		
	398192.592		398192.592		393708.31		398098.203		
2 SURCOS DE BORDE									

Figura 5. Croquis de la distribución de los tratamientos

3.7.2. CONDICIONES DEL EXPERIMENTO

3.7.2.1 PREPARACION DEL TERRENO

La preparación del terreno se realizó con tractor, pasando eje rígido en dos oportunidades, con una tracción mecanizada a una profundidad de 40 cm, se realizó un rastreado, nivelación del terreno y surcado del área experimental, se hizo un recojo de piedras en todo el terreno y finalmente se hicieron los surcos con un distanciamiento de 0,90 m. Se aplicó guano de corral al fondo del surco en una proporción de 20 t ha⁻¹

3.7.2.2. SIEMBRA

Se realizó el 27 de octubre de 2011. La siembra se realizó de manera manual, colocando 5 tubérculos por unidad experimental que consta de un surco donde se sembraron a una profundidad de 8 a 10 cm aproximadamente con un distanciamiento entre plantas de 0,30 m colocándose la semilla – tubérculo en cada hoyo (Foto 10) con un distanciamiento entre surcos de 0,90 m , se delimitó el área experimental con yeso y cinta que se colocaron a los extremos para limitar todos los surcos y separar la calles de un metro de longitud. También se aplicó un fungicida preventivo Furadan 5% G.



Foto 10. Siembra en el campo experimental.

3.7.2.3 RIEGO

El sistema de riego fue por aspersión (Foto 11) en toda la fase del cultivo, en un inicio el riego se efectuó en ambos tratamientos, los riegos se realizaban de manera interdiaria por un espacio de dos horas aproximadamente, cuando el cultivo alcanzó los 70 días después de la siembra en la etapa de la floración se cortó el riego en el tratamiento destinado a la sequía el 4 de enero de 2012 hasta la cosecha, para esto se utilizó aspersores sectoriales para limitar únicamente el riego para el tratamiento de riego normal (Cuadro 7 y Cuadro 8).



Foto 11. Riego en el campo experimental

Cuadro 7. Cronograma de los riegos para el tratamiento de riego normal

En un inicio el riego se efectuó en ambos tratamientos, los riegos se realizaban de manera interdiaria por un espacio de dos horas aproximadamente.

Nº de riego	Fecha de riego
1	29 de octubre 2011
2	31 de octubre 2011
3	2 de noviembre 2011
4	4 de noviembre del 2011
5	6 de noviembre 2011
6	8 de noviembre 2011
7	11 de noviembre 2011
8	14 de noviembre 2011
9	16 de noviembre 2011
10	18 de noviembre 2011
11	20 de noviembre del 2011
12	22 de noviembre del 2011
13	25 de noviembre del 2011
14	28 de noviembre del 2011
15	30 de noviembre del 2011
16	3 de diciembre del 2011
17	5 de diciembre del 2011
18	8 de diciembre del 2011
19	10 de diciembre del 2011
20	12 de diciembre del 2011
21	14 de diciembre del 2011

22	16 de diciembre del 2011
23	19 de diciembre del 2011
24	21 de diciembre del 2011
25	23 de diciembre del 2011
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	

Cuadro 8. Cronograma de los riegos para el tratamiento de sequía

Nº de riego	Fecha de riego
1	29 de octubre 2011
2	31 de octubre 2011
3	2 de noviembre 2011
4	4 de noviembre del 2011
5	6 de noviembre 2011
6	8 de noviembre 2011
7	11 de noviembre 2011
8	14 de noviembre 2011
9	16 de noviembre 2011
10	18 de noviembre 2011
11	20 de noviembre del 2011
12	22 de noviembre del 2011
13	25 de noviembre del 2011
13	26 de noviembre del 2011
14	28 de noviembre del 2011
15	30 de noviembre del 2011
16	3 de diciembre del 2011
17	5 de diciembre del 2011
18	8 de diciembre del 2011
19	10 de diciembre del 2011
20	12 de diciembre del 2011
21	14 de diciembre del 2011
22	16 de diciembre del 2011
23	19 de diciembre del 2011
24	21 de diciembre del 2011
25	23 de diciembre del 2011
26	26 de diciembre del 2011
27	28 de diciembre del 2011
28	30 de diciembre del 2011
29	2 de enero del 2012
30	4 de enero del 2012

3.7.2.4. CONTROL DE MALEZAS

Se realizó un desmalezado manual continuo (Foto 12) presentándose las malezas más comunes que fueron: Liccha (*Chenopodium album* L.), bledo (*Amaranthus spinosus* L.), pata de pajarito (*Cynodom dactylon* L. Pers), pata de gallina (*Eleusine indica* L. Gaertn) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoschst).



Foto 12. Desmalezado manual

3.7.2.5. FERTILIZACION

La fórmula de fertilización utilizada en el trabajo fue: 189 – 184 – 160. Los fertilizantes usados en los experimentos fueron: Nitrato de amonio, fosfato diamónico y sulfato de potasio (Cuadro 9). La primera fertilización a la siembra (día cero), y la segunda a los 41 días después de la siembra (41 DDS). La aplicación de estos fertilizantes fue de manera localizada, en el fondo del surco entre los tubérculos - semilla (en la siembra), para lo cual se tuvo que pesar los fertilizantes con la dosis recomendada en proporción a cada planta. El pesado de los fertilizantes se realizó utilizando una balanza Mettler 400P y éstas fueron puestas en bolsas de polietileno para ser transportadas hasta las parcelas experimentales.

Cuadro 9. Fuentes y cantidades de fertilizantes aplicados por hectárea

Fuente	Ley (%)	Nivel de extracción (kg)	Cantidad aplicada		Momento de aplicación	
			Area exp. (244.8 m ²)	Hectárea	Siembra (0 dds)	Pre – aporque (41 dds)
Nitrato de amonio	33.5	200	8,55 kg	349,2 kg	4,28	4,28
Fosfato diamónico	18 – 46 – 0	200	9,79 kg	400,0 kg	9,79	-----
Sulfato de potasio	50	180	7,83 kg	320.0 kg	7,83	-----

3.7.2.6. PESTICIDAS

En el trabajo de investigación se utilizaron los siguientes pesticidas (Cuadro 10):

Cuadro 10. Productos comerciales y cantidades de pesticidas aplicados

Producto comercial	Ingrediente activo	Dosis	Control de plagas
Karate C.E.	Lambdacihalotrina	0,2 %	Gusano de tierra
Evisect 50 S.P.	Thiocyclam hidrógeno oxalato	0,25 %	Polilla de la papa
Lorsban 4E C.E.	Clorpirifos	0,6 %	Gusano de tierra
Confidor 350 S. C.	Imidacloprid	0,15 %	Gusano alambre, Mosca blanca, Pulgones
Furadan 5% G	Carbofuran	2,5 kg ha ⁻¹	Insecticida, nematicida
Provado Combi 112.5 S.C.	Betaciflutrina + imidacloprid	0,3 %	Comedores de follaje, barrenadores, trozadores
Supermil 90 S. P.	Cypermotrina	1,1 %	Barrenadores

Producto comercial	Ingrediente activo	Dosis por 100 L de agua (%)	Control de enfermedades
Homai W.P.	Tiofanate metil + tiram	0,1 %	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i>
Fitoraz 76% P. M.	Propineb+cymoxanil	2,5 – 0,5 %	<i>Alternaria solani</i> , <i>Phytophthora infestans</i>
Antracol 70% P. M.	Propineb	2,5 – 0,5 %	<i>Alternaria solani</i>
Acrobat MZ W. P.	Dimethomorph + Mancozeb	0,25 – 0,5 %	<i>Phytophthora infestans</i>

Producto comercial	Ingrediente activo	Dosis por 100 L de agua (%)	Control de malezas
Sencor 480 S. C.	Metribuzina	0,3 %	Malezas

3.7.2.7. APORQUE

Se realizó el pre- aporque a los 41 dds (días después de la siembra) el 5 de diciembre del 2011 y el aporque a los 50 dds el 14 de diciembre del 2012 utilizando una lampa para el pre aporque y después se utilizó un tractor para el aporque.

3.7.2.8. SANIDAD VEGETAL

Se aplicaron diferentes pesticidas a lo largo del cultivo para el control preventivo de daño de plagas como *Agrotis spp.*, *Phthorimaea operculella*, *Tuta absoluta*, *Liriomyza spp.*, pulgón y la presencia de *Russelliana solanicola*. Y también para el ataque de enfermedades fungosas como: *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*.

También se realizó un control etológico donde se utilizaron feromonas para evaluar y controlar las poblaciones de *Phthorimaea operculella* y *Tuta absoluta*, el uso de las feromonas se combinó con una trampa de agua donde se coloca directamente botellas de plástico grandes en el campo con agua hasta unos dos centímetros del borde agregándose un detergente común que ayuda a que el agua penetre en las alas del insecto impidiendo de esta manera que escape. En la botella se suspende un tapón de jebe impregnado con la feromona. También se usó feromonas con un insecticida aplicándose una gota por planta de papa aleatorizándolo por todo el campo experimental para *Phthorimaea operculella* y *Tuta absoluta*

3.7.2.9. COSECHA

La cosecha fue manual (Foto 13) se realizó el 21 de febrero de 2012 extrayendo tres plantas de papa de cada clon por unidad experimental tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía determinándose el peso fresco de los tubérculos.



Foto 13. Cosecha manual del campo experimental.

3.8. PARAMETROS EVALUADOS

3.8.1. FOTOSINTESIS

Se midió la fotosíntesis con un medidor portátil LI-6400XT, marca LI-COR este equipo cuenta con baterías recargables, permitiendo ser usado en campo, así mismo está provisto de una fuente de CO₂, secante de aire para regular la humedad relativa del ambiente, radiación y temperatura que son ajustables. Antes de su uso se procedió con la calibración del equipo para ajustar la radiación, humedad relativa, niveles de CO₂ y temperatura de acuerdo a las necesidades requeridas. Se procedió a evaluar modificando dos valores: la radiación con 1,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura de la hoja con 22°C y 30°C. Después de calibrado el equipo, se anotó el código de la unidad experimental a evaluar, se tomó un foliolo del tercio superior de la planta y se colocó dentro de la cámara hermética del cabezal del equipo donde se ubican los sensores y se procedió con la evaluación (Foto 14), se tomó un foliolo por unidad experimental (un surco) en 8 repeticiones de ambos tratamientos, haciendo un total de 80 foliolos. Los datos evaluados por el instrumento son visualizados en una pantalla LCD que permitió en tiempo real conocer los niveles de fotosíntesis, transpiración, conductancia, temperatura de hoja, que se dan bajo condiciones de radiación y temperatura indicadas, lo cual permitió conocer la variabilidad de la fotosíntesis como respuesta en función del clon. Se tomó 25 valores de fotosíntesis por clon en un mismo foliolo tanto para riego normal y sequía para luego

promediarlos y sacar un solo valor a los 92 DDS (días después de la siembra) (21 DDE – días después del estrés) para la temperatura y a los 107 DDS (días después de la siembra) (36 DDE – días de iniciado el estrés) para la radiación. Antes de guardar los 25 datos se verificó en la pantalla los gráficos de la fotosíntesis los cuales deberían presentar una curva con poca variación, entre una medida y otra. en 80 unidades experimentales de cada tratamiento (riego normal y sequía).



Foto 14. Colocación del foliolo dentro de la cámara del cabezal del equipo

3.8.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA

Una vez que se determinó el peso turgente de los folíolos del tercio medio y superior en la prueba de contenido relativo de agua, se determinó el área foliar (cm^2) de cada foliolo de la hoja (antes de determinar el peso seco) colocándolo en el escáner utilizando el programa Compueye LSA (software para la determinación del área de una hoja) instalado en la computadora. A partir de la determinación del peso seco del foliolo (g) en la prueba de contenido relativo de agua, se calculó el área específica de la hoja ($\text{AEH}, \text{cm}^2 \text{g}^{-1}$). Se realizaron dos evaluaciones a los 85 DDS (14 DDE) y 104 DDS (32 DDE) en un clon por surco en 4 repeticiones en cada tratamiento (riego normal y sequía) haciendo un total de 40 folíolos evaluados de ambos tratamientos, según la siguiente ecuación (Gutierrez y Schafleitner, 2007):

$$\text{AEH} = \frac{\text{Area foliar } (\text{cm}^2)}{\text{Peso seco foliar } (\text{g})} \dots\dots\dots (\text{Ec. 02})$$

3.8.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

El contenido relativo de agua se determinó extrayendo con un bisturí un foliolo del tercio medio o superior, en donde fue envuelto en una lámina de plástico (con el fin de disminuir las pérdidas por transpiración), y fue colocado dentro de una hoja de papel toalla, y codificado antes de ser pesado.

El muestreo se realizó por la mañana (05:00 – 07:00 h) y en la tarde (16:00 – 18:00 h). Lo primero que se hizo con los foliolos obtenidos fue pesarlos en fresco (PF) utilizando una balanza analítica, luego a estos foliolos se les colocó cinta masking tape en un extremo y se pegaron en una bandeja de plástico sumergiéndose en agua destilada durante 12 horas (Foto 15), para luego volverlos a pesar y obtener el peso turgente (PT). En ese momento se aprovechó la turgencia de los foliolos para escanearlos utilizando el programa CompuEye, LSA y obtener el área específica de cada foliolo (AE). Luego, los foliolos fueron llevados al horno durante 24 horas aproximadamente y a 80°C para obtener su peso seco (PS). Se realizaron dos evaluaciones a los 85 DDS (14 DDE) y 104 DDS (32 DDE) en un clon por unidad experimental (un surco) en 4 repeticiones en cada tratamiento (riego normal y sequía), haciendo un total de 40 foliolos evaluados en ambos tratamientos. Se utilizó la siguiente ecuación para hallar el contenido relativo de agua:

$$CRA = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso turgente} - \text{Peso seco}} \dots\dots\dots (Ec. 03)$$



Foto 15. Foliolos de papa sumergidos en agua destilada

3.8.4. REFLECTANCIA

Para determinar el NDVI (Índice de vegetación diferencial normalizado) se usó un reflectómetro (Skye Instruments), el cual tiene un sensor que mide la luz roja que incide en el campo y la luz infrarroja que es la reflejada por el cultivo. El sensor está conectado a una pequeña computadora (Pocket hp) la cual tiene una pantalla LCD donde se observa los valores de la luz roja incidida y la luz infrarroja reflejada en el campo. Se midió la reflectancia colocando el instrumento a un extremo de la unidad experimental, tomando como evaluación una unidad experimental (un surco) de cada clon que consta de 5 plantas, tanto en el tratamiento de riego normal como en sequía en 8 repeticiones. Se sabe que una planta con las mejores condiciones refleja mayor luz infrarroja y menor luz roja, comparada con una planta sometida a algún estrés. También este NDVI puede medir de manera indirecta el grado de sanidad y vigor de la planta, siendo los valores más altos los que corresponden a plantas desarrolladas y vigorosas y por el contrario, valores bajos de este índice pueden tratarse de plantas con poco desarrollo, poco verdor de las hojas o que sufrieron algún daño ya sea por estrés abiótico o bióticos. En total las mediciones se obtuvieron en cuatro ocasiones; a los 81 DDS (10 DDE), 85 DDS (15 DDE), 92 DDS (21 DDE) y 99 DDS (28 DDE) en 80 unidades experimentales (8 repeticiones) en cada tratamiento (riego normal y sequía).



Foto 16. Reflectómetro

3.8.5. CONTENIDO DE CLOROFILA

El contenido de clorofila se determinó con el clorofilómetro (SPAD 502, Minolta). Se tomaron seis lecturas en un foliolo del tercio superior de una planta por unidad experimental, haciendo un total de 80 plantas (8 repeticiones) por tratamiento (riego normal y sequía). En cada foliolo se realizaron lecturas en distintas zonas a lo largo de toda el área, tratando de que las lecturas fueran representativas, luego el equipo promediaba los valores leídos y arrojaba un valor final. Las unidades de medición son propias del equipo, llamadas unidades “SPAD” y que es referido a la absorbancia que presenta la hoja, ante un haz de luz que es emitido por el equipo, en las longitudes de onda en que la clorofila tiene más actividad. Se realizaron dos evaluaciones a los 81 DDS (10 DDE) y 85 DDS (15 DDE).



Foto 17. Clorofilómetro SPAD 502 Minolta

3.8.6. AREA FOLIAR

Se determinó el área foliar primero cosechando la planta entera para luego cortar con un bisturí las hojas completas de la planta de papa. Las hojas completas fueron acomodadas en unas láminas de plástico transparente llamadas vistoras en donde las hojas de las plantas estresadas requirieron mayor tiempo para ser acomodadas en las vistoras, luego fueron escaneadas. El código que tomaba cada imagen era un número igual que tenía la unidad experimental.

Estas imágenes fueron almacenadas en la computadora y con la ayuda del software: “Compu Eye, Leaf & Symptom Area” (Doki, Cairo, Egipto), fue determinada el área foliar (en cm²). Este proceso fue realizado de manera secuencial, debido a la gran cantidad de imágenes almacenadas. Previamente, el software requería la calibración, de una regla o unidad de medida conocida, escaneada bajo las mismas condiciones de las imágenes de hojas. Se realizó una evaluación a los 84 DDS (13 DDE) cosechando una planta entera por surco en 40 unidades experimentales tanto en riego normal como sequía.

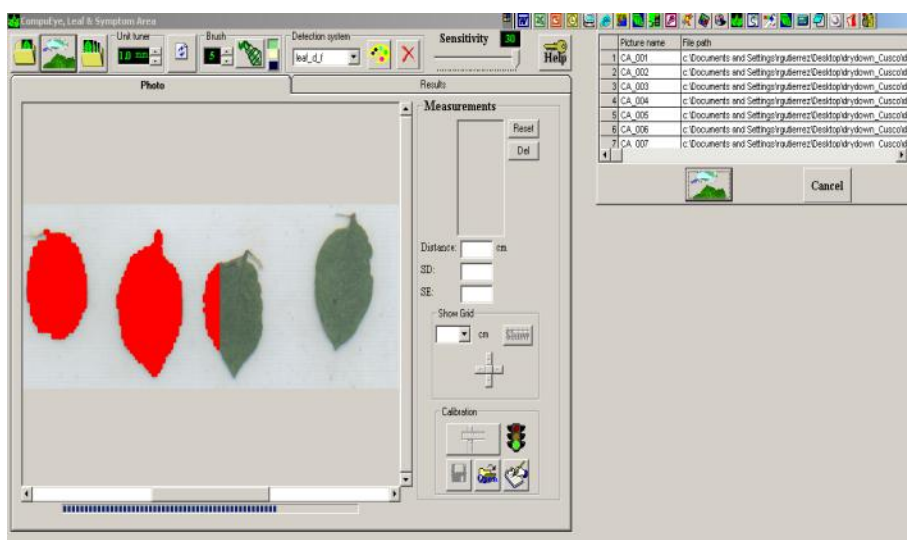


Foto 18. Medición del área foliar

3.8.7. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

Se utilizaron 160 tubos de ensayo en ambos tratamientos (riego normal y sequía) que fueron enjuagados previamente con agua destilada y llenados con 15 ml de agua destilada (Foto 19) utilizando una pipeta descartable de 10 ml en donde se utilizaron 80 tubos de ensayo en los tratamientos de riego normal y 80 tubos de ensayo en el tratamiento de sequía de los cuales 40 tubos de ensayo se iban a someter a la temperatura ambiente y 40 tubos de ensayo se iban a someter a baño María (Foto 20) colocando a los discos de hoja a una temperatura de 50 °C por una hora. De cada clon se tomó 10 discos de hojas extraídas con un sacabocado de 5 foliolos (de cada foliolo se extraía 2 discos de hoja) en donde se colocó 5 discos de hojas para los tubos de ensayo que iban a ser sometidos a temperatura ambiente y 5 discos de hojas para los tubos de ensayo que iban a ser sometidos a Baño María enjuagando tres veces con agua destilada los discos de hoja en cada tubo de ensayo.

Luego los tubos de ensayo se incubaron en una refrigeradora por 24 horas para después realizar una lectura de la conductividad eléctrica antes de someterlos a un autoclavado (Foto 21) y también después se realiza la lectura de la conductividad eléctrica (Foto 22) para ver cuantas de las membranas de las hojas se han roto o disociado en donde el agua destilada esta con las sales de las células rotas por efecto del calor. Se realizó una evaluación a los 103 DDS (32 DDE) en dos plantas de cada clon tomándose las muestras de los folíolos del tercio superior por surco en 4 repeticiones tanto en el tratamiento de riego normal como sequía.

El daño inducido como resultado del estrés por sequía se calculó mediante la fórmula (Martineau *et al.*, 1979):

$$\% \text{ daño} = [(1-(T_1/T_2)) / (1-(C_1/C_2))] \times 100 \dots\dots\dots (\text{Ec. 04})$$

Siendo:

T₁: Conductividad eléctrica de tubos de ensayo sometidos a baño María a 50 °C después del incubado.

T₂: Conductividad eléctrica de tubos de ensayo sometidos a baño María a 50 °C después del autoclavado.

C₁: Conductividad eléctrica de tubos de ensayo a temperatura ambiente después del incubado.

C₂: Conductividad eléctrica de tubos de ensayo a temperatura ambiente después del autoclavado.



Foto 19. Discos de hoja de papa colocados en tubos de ensayo con agua destilada



Foto 20. Colocación de los tubos de ensayo en Baño María



Foto 21. Tubos de ensayo sometidos a autoclavado



Foto 22. Lectura de la conductividad eléctrica de los discos de hoja de papa

3.8.7. BIOMETRIA

Se realizó una evaluación antes de iniciar el estrés por sequía para comparar los datos con las evaluaciones realizadas a los clones en sequía.

Altura de la planta, se midió el tallo principal desde la superficie del suelo hasta el ápice de la planta con una cinta métrica, sin considerar los tallos secundarios (Foto 23). Se realizó una evaluación a los 70 DDS (días después de la siembra) en una planta en 20 unidades experimentales haciendo un total de 20 plantas, colocándole un marcador naranja, tanto en el tratamiento de riego normal como en sequía y dos evaluaciones a los 93 DDS (22 DDE) y 109 DDS (38 DDE) en un clon por surco haciendo un total de 40 plantas en 40 unidades experimentales (4 repeticiones) tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía.

Cobertura foliar se utilizó una grilla de madera de 80 x 60 cm con cuadrados internos de 5 x 5 cm (Korva, 1996) (Foto 24). Se contaba el número de cuadrados que alcanzaba la planta colocándose la grilla en el cuello. Se realizó una evaluación a los 51 DDS en tres clones ya que presentaban una menor cobertura en 80 unidades experimentales tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía y una segunda evaluación a los 87 DDS (16 DDE) en dos clones por surco debido a que su cobertura aumentó y la grilla de madera abarcó dos clones, se evaluó en 80 unidades experimentales tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía.

Longitud de hoja, se tomó la medida de la longitud desde la base de la hoja, hasta el ápice (foliolo terminal) con una cinta métrica sin contar los foliolos secundarios y se utilizó un marcador naranja para el clon, se evaluó la misma planta que se utilizó para las evaluaciones de altura de planta (Foto 25). Se realizó una evaluación a los 70 DDS en una planta por surco en 20 unidades experimentales tanto en el tratamiento de riego normal como en sequía, haciendo un total de 20 plantas y dos evaluaciones a los 93 DDS (22 DDE) y 109 DDS (38 DDE) en una planta por surco en 40 unidades experimentales (4 repeticiones) tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía.

Diámetro de tallo principal, se midió con un vernier manual en el momento de cosechar la planta, se midió el parámetro al momento de cosechar la planta para las evaluaciones de

biomasa. Esta medida se tomó a los 84 DDS (13 DDE) en un clon por surco en 4 repeticiones tanto en el tratamiento de riego normal como de sequía y a los 110 DDS (39 DDE) en un clon por surco en 8 repeticiones tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía.



Foto 23. Medición de la altura de planta



Foto 24. Evaluación de cobertura foliar



Foto 25. Medición de la longitud de hoja.

3.8.8. BIOMASA

Las plantas cosechadas se dividieron en hojas, tallos y tubérculos encima de una tabla de picar cortándolo con un cuchillo y las hojas con un bisturí en donde el peso fresco se realizó con una balanza de campo modelo JWG-15, marca Jadever y colocados en bolsas kraft debidamente etiquetadas (Foto 26). Las raíces no fueron evaluadas debido a que en el tratamiento de sequía se volvieron quebradizas y al momento de cosechar la planta se perdieron raíces no obteniéndose un peso completo. Estos a su vez fueron secados en una estufa por 24 horas a 80 °C para determinar el peso seco de cada uno en una balanza analítica de +/- 0.001 g y la suma de sus componentes dio una referencia de la biomasa seca total producida por cada planta. En la segunda evaluación, en el tratamiento de sequía se tomó toda la planta cosechada (hojas y tallos) sin dividir y los tubérculos obteniéndose solo peso seco. Al final del experimento de campo cada unidad experimental se quedó con tres clones para la cosecha final y se evaluó el rendimiento de los tubérculos frescos. Se realizaron dos momentos de cosecha, en la primera evaluación a los 84 DDS (13 DDE) se cosechó un clon por surco de 40 unidades experimentales (4 repeticiones) tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía, para evaluar parámetros morfológicos como biomasa fresca y seca de hojas, tallos y tubérculos y la segunda evaluación a los 110 DDS (39 DDE) se cosechó un clon por surco de 80 unidades experimentales (8 repeticiones) tanto del tratamiento de riego normal como en el de sequía.



Foto 26. Cosecha de la planta de papa para la biomasa.

3.8.9. RENDIMIENTO Y NUMERO DE TUBERCULOS

El rendimiento en peso fresco de tubérculos, fue directamente obtenido de 160 unidades experimentales en ambos tratamientos a los 118 DDS, se cosechó tres plantas tanto en el tratamiento de riego normal como en el de sequía, donde se eliminó el follaje, se pesaron los tubérculos con una balanza de campo modelo JWG-15, marca Jadever y se contó el número de tubérculos a los 118 DDS (días después de la siembra) por planta en 160 unidades experimentales en ambos tratamientos (Foto 27). No se realizó clasificación de tubérculos.



Foto 27. Bolsas de tubérculos pesadas en campo para el rendimiento

3.8.10. INDICES DE COSECHA Y SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRES POR SEQUIA

El índice de cosecha se calculó a partir del peso seco del tubérculo entre la biomasa seca (pesos secos de las hojas y tallos) y la susceptibilidad al estrés de sequía puede ser cuantificado a través del índice de Susceptibilidad, el cual define la susceptibilidad en función del rendimiento y de la intensidad de la sequía (Fisher y Maurer, 1978).

3.9. ANALISIS ESTADISTICOS

Se realizó los análisis estadísticos con el software SAS/STAT (SAS Institute, 1990), por medio del cual, además de que se realizó el ANVA, se efectuó la comparación de medias (Waller-Duncan).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. FOTOSINTESIS ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

4.1.1. FOTOSINTESIS CON VARIACIONES DE TEMPERATURA

La fotosíntesis medida para los cambios de la temperatura en la cámara de muestras, fue medida inicialmente con una temperatura de 22°C, la cual muestra diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados, realizado el análisis de varianza respectivo, los tratamientos de riego realizados y la interacción entre los clones y los tratamientos mostraron también diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 54 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 55 y Cuadro 56 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para la fotosíntesis a los 21 DDE (días después del estrés) y a los 92 DDS (días después de la siembra) y con una temperatura de 22°C, el La medición de la fotosíntesis con una temperatura de 30°C, presentó diferencias estadísticas altamente significativas por consecuencia de los clones evaluados, al realizar el análisis de varianza respectivo, para los tratamientos de riego realizados y para la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron también diferencias altamente significativas en el Cuadro 57 (Anexos). Para cada uno de los tratamientos de riego (sequía y riego normal), en el análisis de varianza se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 58 y Cuadro 59 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias efectuada para la fotosíntesis a los 21 DDE (días después del estrés) y a los 92 DDS (días después de la siembra) y con una temperatura de 30°C, en el Cuadro 12 y Figura 7 se observó que los clones con mayor fotosíntesis en el tratamiento de riego normal fueron: el 501065.1 ($26,95 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y el 393708.31 ($26,93 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás

clones y el menor valor lo presentó el clon 395193.4 con $9,80 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El clon 398192.592 en el tratamiento de sequía obtuvo el mayor valor de fotosíntesis de $12,29 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 386292.3 con $4,39 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el promedio, la fotosíntesis fue mayor con el riego normal con $20,93 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y menor con el tratamiento de sequía con $7,91 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

En el tratamiento de sequía a los 21 DDE (días después del estrés) y a los 92 DDS (días después de la siembra) y con $22 \text{ }^\circ\text{C}$ y $30 \text{ }^\circ\text{C}$, como respuesta final, el clon que presentó una mayor fotosíntesis a pesar del aumento de temperatura bajo condiciones de sequía fue obtenida por el clon 398192.592, cabe mencionar que la fotosíntesis utiliza la energía solar, el anhídrido carbónico del aire y el agua y los transforma en hidratos de carbono como azúcares y almidón en donde la planta de papa es un organismo especializado en el almacenamiento de los productos de la fotosíntesis (almidón), en tal sentido el clon 398192.592 ha expresado una mayor fotosíntesis por lo cual tendrá una mejor capacidad de adaptación y producción bajo condiciones de estrés.

Se puede considerar que una disminución de la fotosíntesis se da cuando ocurre el estrés hídrico y un aumento en la temperatura la cual se ha manifestado en algunos clones, si la planta no presentaría una cierta tolerancia a la sequía y un incremento en la temperatura, perdería su actividad fotosintética a medida que disminuye el contenido de agua en las hojas esto se debería al cierre estomático que esta regulado por las células oclusivas impidiendo de alguna manera la penetración del CO_2 en las hojas, esto es corroborado por Turner y Begg (1981) quien explica los factores que provocan las pérdidas de la actividad fotosintética, la fotosíntesis también se ve afectada por las temperaturas elevadas habiendo un aumento de la transpiración lo que provocaría un mayor ingreso de CO_2 en la hoja y por ende una mayor concentración lo que provocaría un cierre de estomas en algunas especies de plantas, sin embargo hay otro tipo de respuesta ante las temperaturas elevadas que sería una apertura de estomas ocasionando un aumento en la transpiración teniendo como respuesta la reducción de la temperatura en la hoja funcionando como un proceso de

refrigeración, asimismo estudios realizados por Salisbury y Ross (2000) dan sustento a esta explicación. La fotosíntesis ante las variaciones de temperatura estaría relacionada también con la capacidad de respuesta de cada clon. En el Cuadro 12 se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta una mayor fotosíntesis en comparación con el tratamiento de sequía. Esta respuesta es clara en vista de que existe un estrés hídrico provocando un cierre estomático causando una disminución en la concentración de CO_2 y por lo tanto una menor fotosíntesis en las plantas que presentan estrés hídrico. Según Armas *et al.* (1988), el abastecimiento del agua en las planta tiene una íntima relación con el proceso de fotosíntesis, indicando además que este proceso se ve afectado ante una carencia de agua.

Cuadro 11 y Figura 6 mostró que en el tratamiento de riego normal el clon 393708.31 presentó un mayor valor de fotosíntesis de $28,30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 395193.4 con $9,83 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor fotosíntesis fueron: el 398192.592 con $9,82 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y el 394881.8 con $9,59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y los menores valores fueron presentados por los clones: el 386292.3 con $4,35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y el clon 370121 con $4,31 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el promedio, la fotosíntesis en el tratamiento de riego normal presentó un mayor valor de $22,16 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fue menor en el tratamiento de sequía con $6,78 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La medición de la fotosíntesis con una temperatura de 30°C, presentó diferencias estadísticas altamente significativas por consecuencia de los clones evaluados, al realizar el análisis de varianza respectivo, para los tratamientos de riego realizados y para la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron también diferencias altamente significativas en el Cuadro 57 (Anexos). Para cada uno de los tratamientos de riego (sequía y riego normal), en el análisis de varianza se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 58 y Cuadro 59 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias efectuada para la fotosíntesis a los 21 DDE (días después del estrés) y a los 92 DDS (días después de la siembra) y con una temperatura de 30°C, en el Cuadro 12 y Figura 7 se observó que los clones con mayor fotosíntesis en el tratamiento de riego normal fueron: el 501065.1 (26,95 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y el 393708.31 (26,93 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero sí con los demás clones y el menor valor lo presentó el clon 395193.4 con 9,80 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El clon 398192.592 en el tratamiento de sequía obtuvo el mayor valor de fotosíntesis de 12,29 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 386292.3 con 4,39 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el promedio, la fotosíntesis fue mayor con el riego normal con 20,93 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y menor con el tratamiento de sequía con 7,91 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

En el tratamiento de sequía a los 21 DDE (días después del estrés) y a los 92 DDS (días después de la siembra) y con 22 °C y 30 °C, como respuesta final, el clon que presentó una mayor fotosíntesis a pesar del aumento de temperatura bajo condiciones de sequía fue obtenida por el clon 398192.592, cabe mencionar que la fotosíntesis utiliza la energía solar, el anhídrido carbónico del aire y el agua y los transforma en hidratos de carbono como azúcares y almidón en donde la planta de papa es un organismo especializado en el almacenamiento de los productos de la fotosíntesis (almidón), en tal sentido el clon 398192.592 ha expresado una mayor fotosíntesis por lo cual tendrá una mejor capacidad de adaptación y producción bajo condiciones de estrés.

Se puede considerar que una disminución de la fotosíntesis se da cuando ocurre el estrés hídrico y un aumento en la temperatura la cual se ha manifestado en algunos clones, si la planta no presentaría una cierta tolerancia a la sequía y un incremento en la temperatura,

perdería su actividad fotosintética a medida que disminuye el contenido de agua en las hojas esto se debería al cierre estomático que esta regulado por las células oclusivas impidiendo de alguna manera la penetración del CO₂ en las hojas, esto es corroborado por Turner y Begg (1981) quien explica los factores que provocan las pérdidas de la actividad fotosintética, la fotosíntesis también se ve afectada por las temperaturas elevadas habiendo un aumento de la transpiración lo que provocaría un mayor ingreso de CO₂ en la hoja y por ende una mayor concentración lo que provocaría un cierre de estomas en algunas especies de plantas, sin embargo hay otro tipo de respuesta ante las temperaturas elevadas que sería una apertura de estomas ocasionando un aumento en la transpiración teniendo como respuesta la reducción de la temperatura en la hoja funcionando como un proceso de refrigeración, asimismo estudios realizados por Salisbury y Ross (2000) dan sustento a esta explicación. La fotosíntesis ante las variaciones de temperatura estaría relacionada también con la capacidad de respuesta de cada clon. En el Cuadro 12 se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta una mayor fotosíntesis en comparación con el tratamiento de sequía. Esta respuesta es clara en vista de que existe un estrés hídrico provocando un cierre estomático causando una disminución en la concentración de CO₂ y por lo tanto una menor fotosíntesis en las plantas que presentan estrés hídrico. Según Armas *et al.* (1988), el abastecimiento del agua en las planta tiene una íntima relación con el proceso de fotosíntesis, indicando además que este proceso se ve afectado ante una carencia de agua.

Cuadro 11. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 DDE y con una temperatura de 22°C

Clones	Fotosíntesis $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
	Riego	Sequía
393708.31	28,30 \pm 0,32 a	6,72 \pm 0,37 c
501065.1	26,79 \pm 0,34 b	5,67 \pm 0,09 d
386292.3	25,77 \pm 0,11 c	4,35 \pm 0,13 e
370121	27,24 \pm 0,18 b	4,31 \pm 0,44 e
398190.523	22,55 \pm 0,28 d	9,35 \pm 1,00 b
397077.16	23,00 \pm 0,19 d	5,71 \pm 0,82 d
398098.203	25,71 \pm 0,33 c	5,73 \pm 0,45 d
394881.8	18,57 \pm 0,59 e	9,59 \pm 0,36 ab
398192.592	13,84 \pm 0,17 f	9,82 \pm 0,15 a
395193.4	9,83 \pm 1,73 g	6,53 \pm 0,26 c
Promedio	22,16 \pm 0,42 a	6,78 \pm 0,41 b

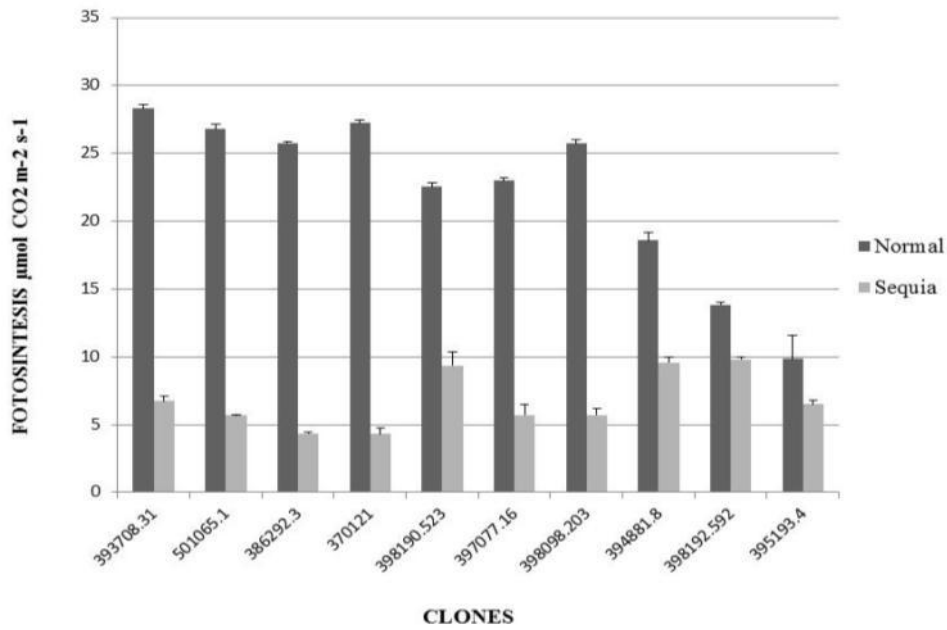


Figura 6. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 DDE y con una temperatura de 22°C

Cuadro 12. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 DDE y con una temperatura de 30°C.

Clones	Fotosíntesis $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
	Riego	Sequia
393708.31	26,93 \pm 0,20 a	9,76 \pm 0,32 c
501065.1	26,95 \pm 0,15 a	5,79 \pm 0,20 g
386292.3	17,83 \pm 0,20 g	4,39 \pm 0,89 i
370121	26,00 \pm 0,19 b	5,29 \pm 0,78 h
398190.523	22,83 \pm 0,09 d	11,74 \pm 0,12 b
397077.16	24,26 \pm 0,22 c	7,38 \pm 0,18 e
398098.203	18,70 \pm 0,79 f	6,94 \pm 0,14 f
394881.8	22,31 \pm 0,27 e	8,55 \pm 0,05 d
398192.592	13,74 \pm 0,20 h	12,29 \pm 0,05 a
395193.4	9,80 \pm 0,15 i	6,94 \pm 0,18 f
Promedio	20,93 \pm 0,25 a	7,91 \pm 0,29 b

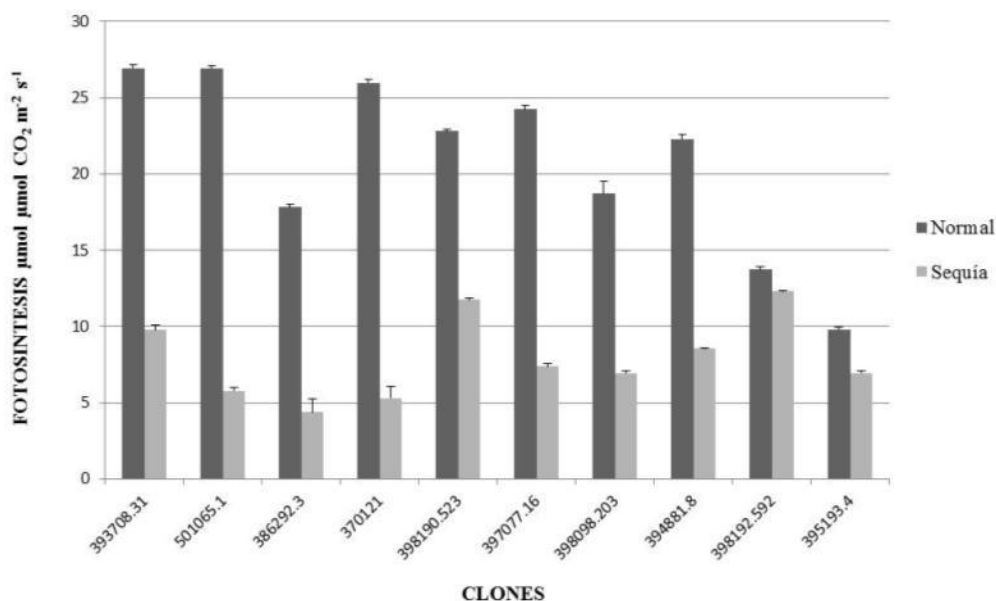


Figura 7. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 21 DDE y con una temperatura de 30°C .

4.1.2. FOTOSÍNTESIS CON VARIACIONES DE RADIACION

La fotosíntesis medida para los cambios en la cantidad de radiación incidente, fue medida inicialmente con una radiación de $1\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la cual manifestó diferencias estadísticas altamente significativas producto de los clones evaluados, al hacer el análisis de varianza respectivo, los tratamientos de riego y la interacción entre los clones y los tratamientos manifestaron también diferencias estadísticas altamente significativas observándose esto en el Cuadro 60 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se manifestaron diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos observándose esto en el Cuadro 61 y Cuadro 62 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para la fotosíntesis a los 36 DDE (días después del estrés) y a los 107 DDS (días después de la siembra) y con una radiación de $1\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en el Cuadro 13 y Figura 8 se observó que en el tratamiento de riego normal el clon 398098.203 obtuvo el mayor valor de fotosíntesis de $20,43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias estadísticamente significativas y el menor valor lo presentó el clon 370121 con un valor de $10,14 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor fotosíntesis

fueron: el 394881.8 ($12,85 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y el 398190.523 ($12,59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y los menores valores fueron presentados por los clones: 397077.16 con $8,14 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y el clon 386292.3 con $8,11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El promedio fue mayor en la fotosíntesis de riego normal con $14,82 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y menor con el tratamiento de sequía con $9,85 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La medición de la fotosíntesis con una radiación de $1\ 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ indicó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados, realizado el análisis de varianza respectivo, los tratamientos de riego realizados y la interacción entre los clones y los tratamientos indicaron también diferencias estadísticas altamente significativas lo cual se observa en el Cuadro 63 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en el análisis de varianza, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas, esto se observa en el Cuadro 64 y Cuadro 65 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias realizada para la fotosíntesis a los 36 DDE (días después del estrés) y a los 107 DDS (días después de la siembra) con una radiación de $1\ 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en el Cuadro 14 y Figura 9 se observó que el clon 394881.8 en el tratamiento de riego normal obtuvo el mayor valor de fotosíntesis de $17,11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 370121 con $11,10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El clon 394881.8 en el tratamiento de sequía obtuvo el mayor valor de fotosíntesis de $14,41 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones con diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 397077.16 con un valor de $8,29 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con $13,79 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y menor en sequía con $10,30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

En el tratamiento de sequía a los 36 DDE (días después del estrés) y a los 107 DDS (días después de la siembra) y con $1\ 000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $1\ 500 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como respuesta final, el clon que presentó una mayor fotosíntesis a pesar de las variaciones en la radiación bajo condiciones de sequía fue obtenida por el clon 394881.8, en la evaluación con radiación de $1\ 000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ el clon 398190.523 presentó también una mejor respuesta bajando su fotosíntesis con radiación de $1\ 500 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como se

mencionó anteriormente la planta de papa es un organismo especializado en el almacenamiento de los productos de la fotosíntesis (almidón), por lo tanto el clon 394881.8 ha expresado una mayor fotosíntesis ante las variaciones de radiación por lo cual tendría una mejor capacidad de adaptación bajo condiciones de estrés.

La radiación tiene un efecto importante sobre los estomas en donde a medida que se aumenta la radiación y los estomas se encuentren abiertos ocurriría un aumento en la concentración de CO₂ al interior de hoja y por lo tanto una mayor fotosíntesis, esto es sustentado por Raschke (1975), que en estudios recientes demostró que la luz tiene un efecto importante sobre los estomas. Debido al estrés hídrico que provoca el cierre de los estomas y una reducción del área del tejido fotosintético causa una disminución de la fotosíntesis en donde el clon 394881.8 a pesar de estar bajo estrés hídrico responde aumentando su fotosíntesis ante un aumento en la radiación. Con respecto a la radiación, la tasa fotosintética dependerá también de la eficiencia fotosintética de cada hoja. Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta una mayor fotosíntesis en comparación con el tratamiento de sequía. Esto se debe a que existe un estrés hídrico provocando un cierre estomático causando una disminución en la concentración de CO₂ y por lo tanto una menor fotosíntesis en las plantas que presentan estrés hídrico. Según Moorby (1975), el efecto primario en un periodo de sequía en el cultivo de papa es la reducción fotosintética.

Cuadro 13. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 36 DDE y con una radiación de 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Clones	Fotosíntesis $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	
	Riego	Sequía
393708.31	16,09 \pm 0,15 c	10,62 \pm 0,35 b
501065.1	18,94 \pm 0,23 b	9,83 \pm 0,13 c
386292.3	15,72 \pm 0,15 d	8,11 \pm 0,50 f
370121	10,14 \pm 0,25 h	8,85 \pm 0,20 e
398190.523	11,73 \pm 0,11 g	12,59 \pm 0,17 a
397077.16	15,97 \pm 0,17 c	8,14 \pm 0,19 f
398098.203	20,43 \pm 0,52 a	9,25 \pm 0,13 d
394881.8	12,07 \pm 0,29 f	12,85 \pm 0,53 a
398192.592	15,19 \pm 0,13 e	9,64 \pm 0,13 c
395193.4	11,89 \pm 0,33 fg	8,64 \pm 0,43 e
Promedio	14,82 \pm 0,23 a	9,85 \pm 0,28 b

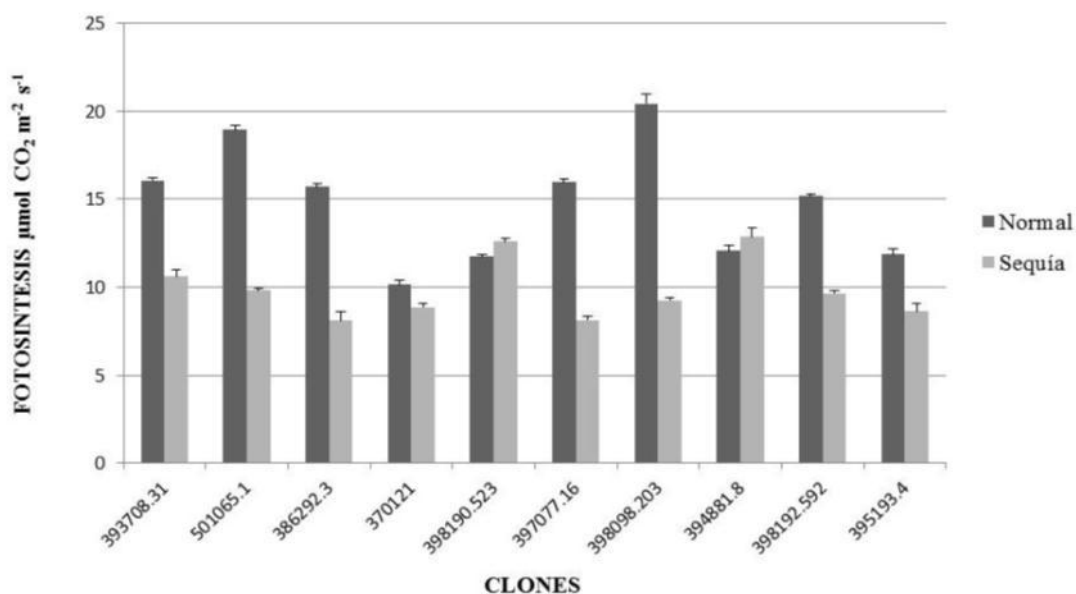


Figura 8. Fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Cuadro 14. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a los 36 DDE y con una radiación de 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Clones	Fotosíntesis $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	
	Riego	Sequía
393708.31	13,15 \pm 0,50 e	10,71 \pm 0,14 c
501065.1	15,44 \pm 0,11 c	9,33 \pm 0,21 e
386292.3	12,83 \pm 0,19 f	8,57 \pm 0,21 g
370121	11,10 \pm 0,24 h	8,89 \pm 0,07 f
398190.523	12,98 \pm 0,18 ef	11,38 \pm 0,21 b
397077.16	14,60 \pm 0,14 d	8,29 \pm 0,22 h
398098.203	12,23 \pm 0,32 g	10,65 \pm 0,22 c
394881.8	17,11 \pm 0,33 a	14,41 \pm 0,13 a
398192.592	12,44 \pm 0,46 g	10,80 \pm 0,18 c
395193.4	16,07 \pm 0,25 b	9,95 \pm 0,08 d
Promedio	13,79 \pm 1,85 a	10,30 \pm 1,71 b

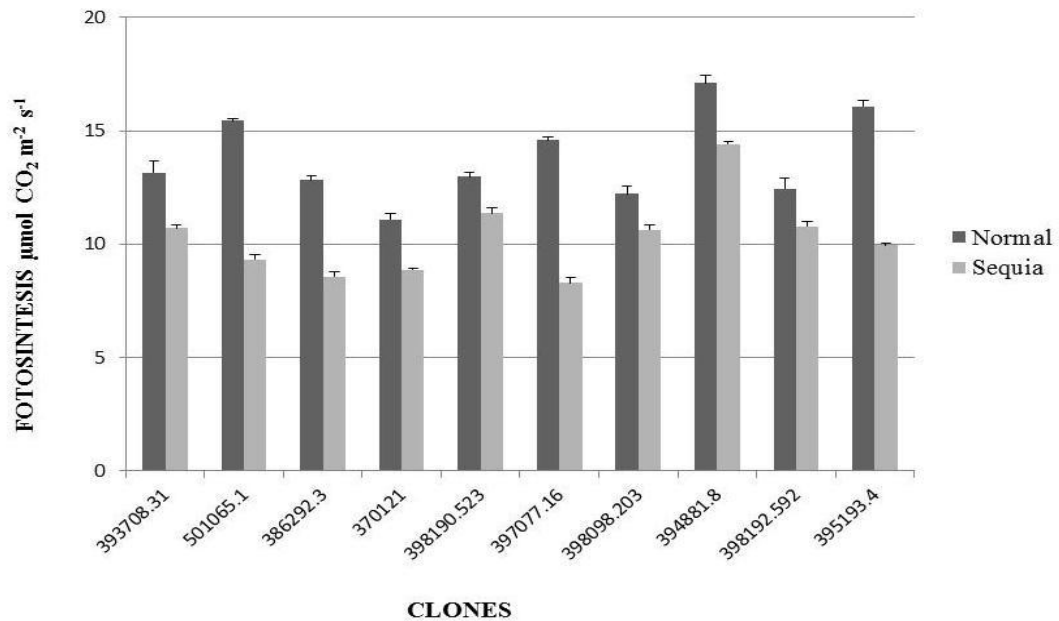


Figura 9. Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 36 DDE y con una radiación de $1\,500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

4.2. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA ($\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$)

La medición del área específica de la hoja muestra diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados, realizado el análisis de varianza respectivo, los tratamientos realizados y la interacción de los clones con los tratamientos mostraron diferencias estadísticas no significativas con el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 66 (Anexos). En los análisis de varianza, en el tratamiento de riego se encontraron diferencias estadísticas no significativas y en el tratamiento de sequía se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 67 y Cuadro 68 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para el área específica de la hoja a los 14 DDE (días después del estrés) y 85 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 15 y Figura 10 se encontró que en el tratamiento de riego normal no se encuentran diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor del área específica de la hoja fue el clon 397077.16 con $283,24 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ y el menor valor lo presentó el clon 394881.8 con $201,95 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$. En el tratamiento de sequía, el clon el 397077.16 con mayor área específica de la hoja tuvo un valor de $273,61 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$

en comparación con los otros nueve clones con diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 370121 con un valor de $171,85 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$. En el promedio, el área específica de la hoja fue mayor en el tratamiento de riego normal con $233,23 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ y menor en sequía con $221,72 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$.

El área específica de la hoja medida mostró diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, realizado el análisis de varianza respectivo, la interacción de los clones y los tratamientos mostraron diferencias estadísticas no significativas con el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 69 (Anexos). En los análisis de varianza, en el tratamiento de riego se encontraron diferencias estadísticas no significativas y en el tratamiento de sequía se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 70 y Cuadro 71 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias realizada para el área específica de la hoja a los 32 DDE (días después del estrés) y 104 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 16 y Figura 11 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 398098.203 con mayor área específica de la hoja obtuvo el valor de $337,25 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 370121 con $245,68 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$. En el tratamiento de sequía, el clon 397077.16 obtuvo el mayor valor de área específica de la hoja con $270,22 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo presentó el clon 370121 con $163,19 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$. En el promedio fue mayor en riego normal con $284,62 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ y menor en sequía con $216,36 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$.

En el tratamiento de sequía a los 14 DDE (días después del estrés), 85 DDS (días después de la siembra) y 32 DDE (días después del estrés) y 104 DDS (días después de la siembra), el clon 397077.16 presentó una mayor área específica de la hoja, sin embargo es necesario detallar que los valores del área específica de la hoja altos o muy bajos no son precisamente los ideales para poder determinar a una planta con tolerancia a la sequía y buena capacidad de producción, en tal sentido clones como el 393708.31 y 386292.3 que han expresado valores intermedios tendrían mejor capacidad de adaptación y producción bajo condiciones de estrés basado en el área específica de la hoja.

Si bien con un área específica de la hoja elevada me indicaría una mayor capacidad para adquirir energía solar y dióxido de carbono, y por tanto obtienen una mayor ganancia de carbono mediante la fotosíntesis determinando unas altas tasas de crecimiento, esto supondría una inversión preferente en superficie foliar por parte de la planta estando en desventaja frente a una sequía ya que una superficie foliar amplia significaría una gran transpiración y pérdida de agua, la cual no sería compensada por la absorción de agua por las raíces. Este rasgo morfológico aparentemente simple de la planta nos permite conocer indirectamente el espesor de la hoja, esto es mencionado por Gutiérrez y Schafleitner (2007). Algunos clones frente a la sequía se manifestaron con un aumento o una reducción en el área específica de la hoja siendo una característica genética de cada clon, esto es mencionado por Pérez y Hernández (2004) donde manifiestan que algunos clones pueden aumentar o reducir el área de la hoja frente a una deshidratación.

Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal frente al tratamiento de sequía no presentó diferencias estadísticas significativas, esto se podría deber a la evaluación realizada a los 14 DDE (días después del estrés) donde todavía los clones no manifiestan un aumento o reducción de área específica de la hoja, a comparación del Cuadro 16 en donde se observó que el promedio de tratamiento normal presentó un área específica de la hoja elevada en comparación con el tratamiento de sequía, esto se debe a que estos clones están sometidos a estrés hídrico sufriendo una pérdida de turgencia de las células de las hojas manifestándose en una reducción.

Cuadro 15. Área específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a los 14 DDE

Clones	Área específica de la hoja $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$	
	Riego	Sequía
393708.31	223,55 ± 11,44 a	220,80 ± 9,98 bc
501065.1	230,08 ± 54,66 a	203,29 ± 28,37 cd
386292.3	226,89 ± 52,41 a	220,85 ± 52,52 bc
370121	207,78 ± 23,95 a	171,85 ± 50,18 d
398190.523	277,20 ± 68,15 a	262,88 ± 29,59 ab
397077.16	283,24 ± 129,44 a	273,61 ± 23,58 a
398098.203	227,50 ± 27,03 a	232,27 ± 25,64 abc
394881.8	201,95 ± 9,15 a	194,95 ± 6,92 cd
398192.592	244,60 ± 38,85 a	234,10 ± 18,36 abc
395193.4	209,56 ± 16,68 a	202,60 ± 24,12 cd
Promedio	233,23 ± 55,24 a	221,72 ± 39,86 a

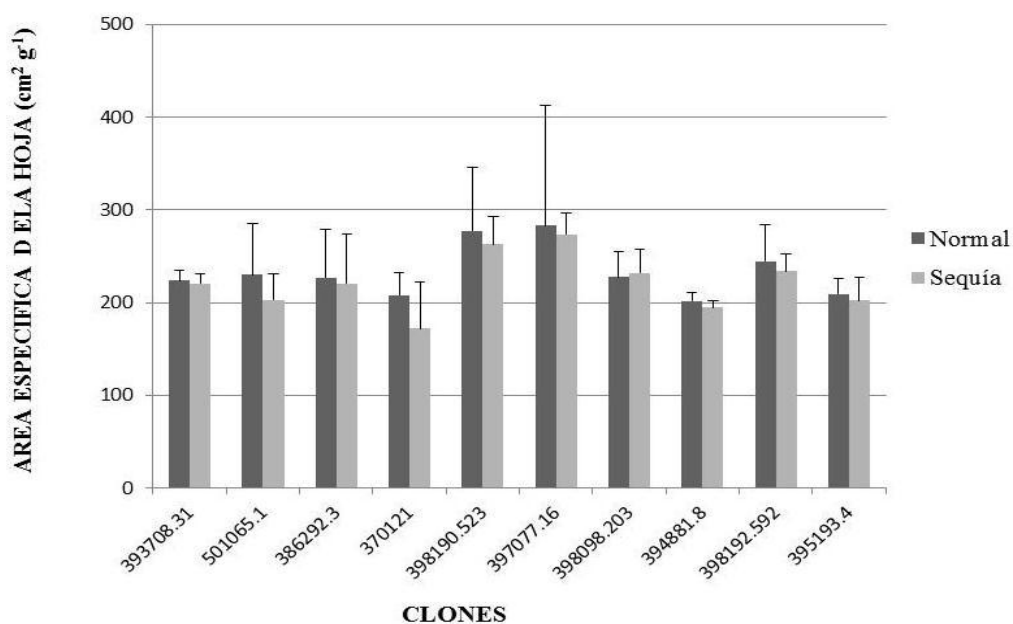


Figura 10. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a los 14 DDE

Cuadro 16. Area específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a los 32 DDE

Clones	Area específica de la hoja $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$	
	Riego	Sequia
393708.31	260,35 \pm 35,47 ab	218,55 \pm 10,78 cde
501065.1	275,90 \pm 35,80 ab	198,47 \pm 10,19 ef
386292.3	299,95 \pm 34,84 ab	212,75 \pm 28,69 cdef
370121	245,68 \pm 41,72 b	163,19 \pm 36,08 g
398190.523	283,41 \pm 14,13 ab	249,99 \pm 25,55 ab
397077.16	291,77 \pm 6,18 ab	270,22 \pm 12,77 a
398098.203	337,25 \pm 37,79 a	230,82 \pm 27,98 bcd
394881.8	297,09 \pm 82,33 ab	186,79 \pm 16,19 fg
398192.592	306,20 \pm 62,82 ab	232,68 \pm 24,59 bc
395193.4	248,61 \pm 52,66 ab	200,16 \pm 14,89 def
Promedio	284,62 \pm 48,20 a	216,36 \pm 35,92 b

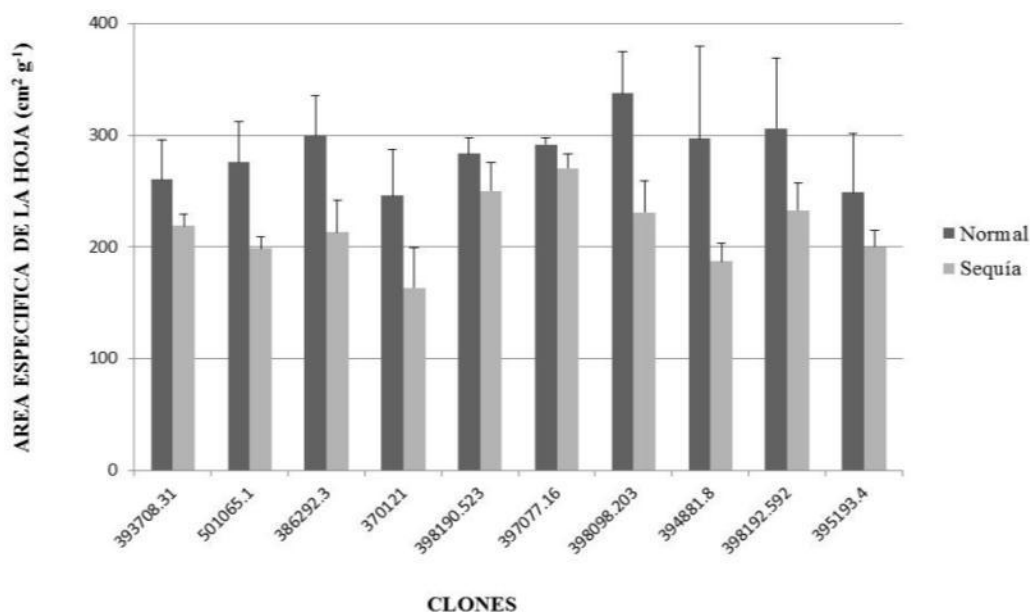


Figura 11. Area específica de la hoja (cm² g⁻¹) a los 32 DDE

4.3. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (g g⁻¹)

El contenido relativo de agua no mostró diferencias estadísticas significativas por efecto de los clones evaluados y la interacción entre los clones y tratamientos, realizado el análisis de varianza respectivo, los tratamientos realizados mostraron diferencias estadísticas significativas con el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 72 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se encontraron diferencias estadísticas no significativas para cada uno de ellos, lo cual explica que no hay variación encontrada por los cultivares en el Cuadro 73 y Cuadro 74 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para el contenido relativo de agua relativo de agua a los 14 DDE (días después del estrés) y 85 DDS (días después de la siembra), en el siembra), en el Cuadro 17 y

Figura 12 se encontró que en el tratamiento de riego normal no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor del contenido relativo de agua fue el clon 370121 con 0,76 g g⁻¹ y el menor valor lo obtuvo el clon 398192.592 con 0,70 g g⁻¹. En el tratamiento de sequía, tampoco se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor

valor del contenido relativo de agua fue el clon 394881.8 con $0,75 \text{ g g}^{-1}$ y el menor valor lo obtuvo el clon 398190.523 con $0,63 \text{ g g}^{-1}$. Asimismo, se encontró que en el promedio el tratamiento de riego normal fue de $0,73 \text{ g g}^{-1}$ y menor en sequía con $0,70 \text{ g g}^{-1}$.

La medición del contenido relativo de agua presenta diferencias estadísticas no significativas por efecto de los clones evaluados y la interacción de los tratamientos con los clones, realizado el análisis de varianza respectivo, los tratamientos realizados presentaron diferencias estadísticas altamente significativas realizando el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 75 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en el análisis de varianza realizado, se presentaron diferencias estadísticas no significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 76 y Cuadro 77 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias, en el contenido relativo de agua a los 32 DDE (días después del estrés) y 104 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 18 y Figura 13 se encontró que en el tratamiento de riego normal no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor del contenido relativo de agua fue el clon 395193.4 con $0,83 \text{ g g}^{-1}$ y el menor valor lo obtuvo el clon 398192.592 con $0,72 \text{ g g}^{-1}$. En el tratamiento de sequía, tampoco se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor del contenido relativo de agua fue el clon 393708.31 con $0,70 \text{ g g}^{-1}$ y el menor valor lo obtuvo el clon 501065.1 con $0,57 \text{ g g}^{-1}$. Presentó un mayor promedio en riego normal con $0,73 \text{ g g}^{-1}$ y menor en sequía con $0,65 \text{ g g}^{-1}$.

En el tratamiento de sequía a los 32 DDE (días después del estrés) y 104 DDS (días después de la siembra), de acuerdo con la comparación de medias, el clones 393708.31 tuvo el mayor valor de contenido relativo de agua, sin diferenciarse significativamente con los demás clones mientras que el clon 501065.1 tuvo el menor valor sin diferenciarse significativamente con los demás clones. Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas entre fechas.

Este comportamiento en general, es el mismo encontrado por Li et al. (2010) que señala que posiblemente los clones mantengan el estado de turgencia en las hojas en caso de una cierta restricción de humedad en el suelo, pero se contradice con lo obtenido por Werner (1954) que indicó que cuando la humedad del suelo disminuía significativamente, las

diferencias en el contenido relativo de agua eran más evidentes. La ausencia de diferencias en el contenido relativo de agua puede ser atribuida a una característica del clon, en donde genéticamente estos clones tendrían una mejor disposición a la tolerancia antes un estrés hídrico basado solo en el contenido relativo de agua, que es un parámetro que me permite detectar la tolerancia de plantas, lo cual es detallado por Cornejo y Vadia (1966).

Cuadro 17. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 14 DDE

Clones	Contenido relativo de agua g g^{-1}	
	Riego	Sequía
393708.31	0,75 \pm 0,02 a	0,74 \pm 0,08 a
501065.1	0,74 \pm 0,10 a	0,64 \pm 0,08 a
386292.3	0,72 \pm 0,05 a	0,69 \pm 0,09 a
370121	0,76 \pm 0,07 a	0,72 \pm 0,06 a
398190.523	0,70 \pm 0,05 a	0,63 \pm 0,09 a
397077.16	0,73 \pm 0,07 a	0,71 \pm 0,03 a
398098.203	0,77 \pm 0,04 a	0,72 \pm 0,04 a
394881.8	0,76 \pm 0,04 a	0,75 \pm 0,05 a
398192.592	0,70 \pm 0,08 a	0,69 \pm 0,02 a
395193.4	0,72 \pm 0,01 a	0,69 \pm 0,10 a
Promedio	0,73 \pm 0,06 a	0,70 \pm 0,07 b

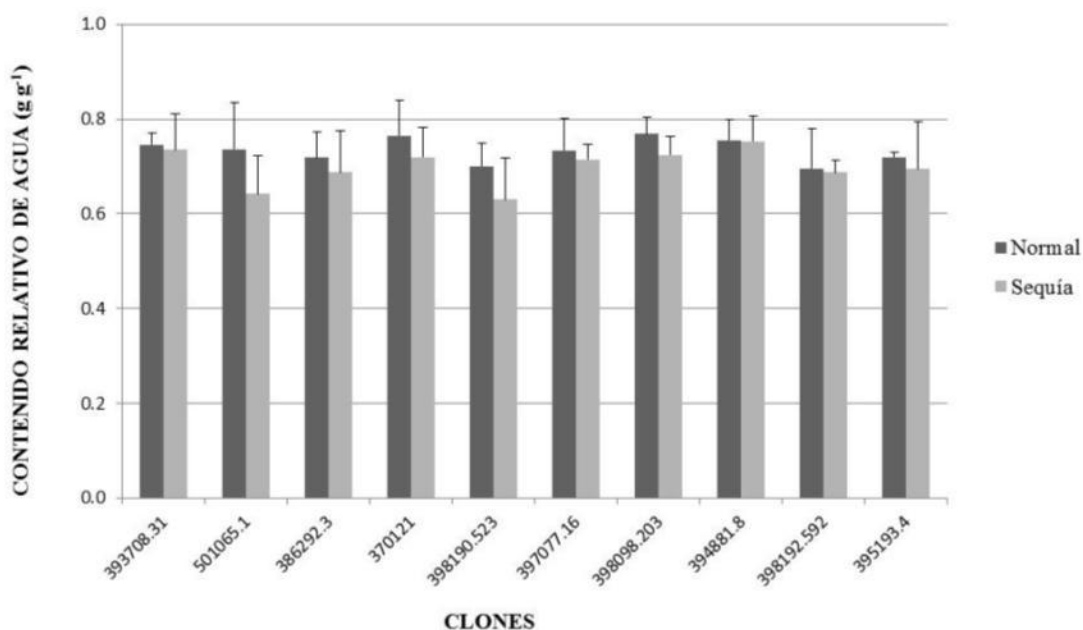


Figura 12. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 14 DDE

Cuadro 18. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 32 DDE

Clones	Contenido relativo de agua g g^{-1}	
	Riego	Sequía
393708.31	0,76 \pm 0,05 a	0,70 \pm 0,09 a
501065.1	0,74 \pm 0,02 a	0,57 \pm 0,10 a
386292.3	0,75 \pm 0,03 a	0,60 \pm 0,07 a
370121	0,80 \pm 0,04 a	0,69 \pm 0,11 a
398190.523	0,73 \pm 0,02 a	0,62 \pm 0,11 a
397077.16	0,79 \pm 0,09 a	0,66 \pm 0,08 a
398098.203	0,78 \pm 0,08 a	0,65 \pm 0,11 a
394881.8	0,74 \pm 0,09 a	0,69 \pm 0,07 a
398192.592	0,72 \pm 0,03 a	0,67 \pm 0,07 a
395193.4	0,83 \pm 0,03 a	0,69 \pm 0,05 a
Promedio	0,73 \pm 0,06 a	0,65 \pm 0,09 b

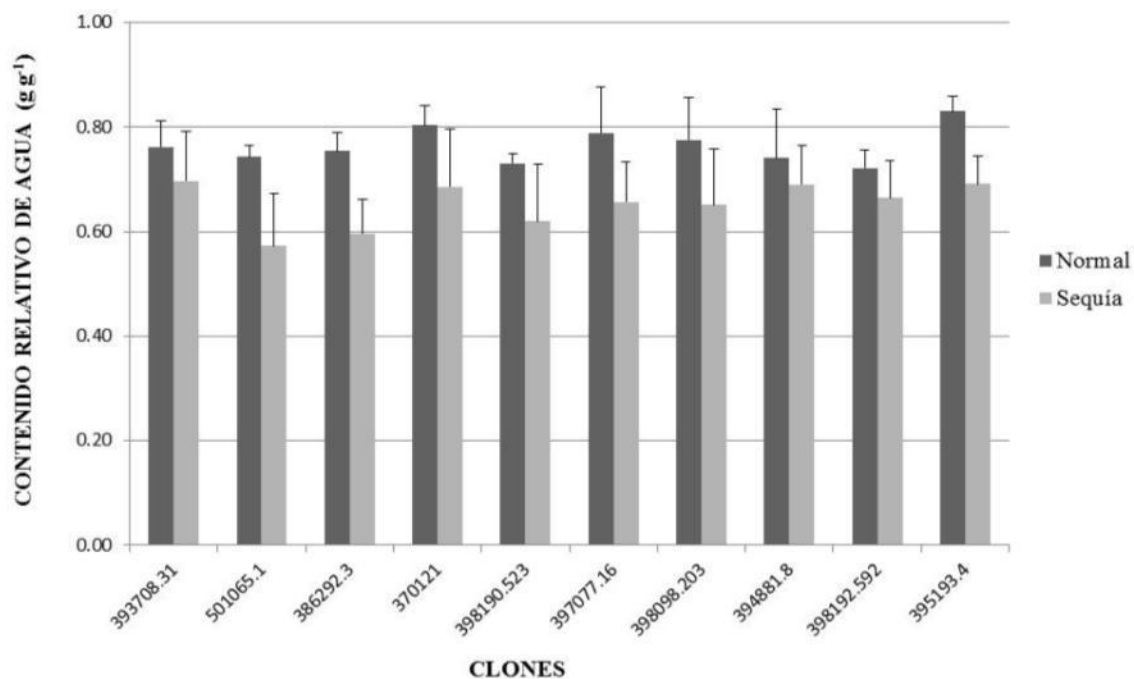


Figura 13. Contenido relativo de agua (g g^{-1}) a los 104 DDS (32 DDE)

4.3 REFLECTANCIA (Normalized Difference Vegetation Index)

La reflectancia mostró diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, realizado el análisis de varianza respectivo, y el efecto de la interacción entre los clones y los tratamientos mostraron diferencias estadísticas no significativas realizando también el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 78 (Anexos). En los análisis de varianza para el tratamiento de riego normal, se encontraron diferencias estadísticas no significativas y para el tratamiento de sequía se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 79 y Cuadro 80 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para la reflectancia a los 10 DDE (días después del estrés) y 81 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 19 y Figura 14 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 395193.4 dio el mayor valor de reflectancia de 0,90 NDVI en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor fue presentado por el clon 398098.203 con 0,86 NDVI. En el tratamiento de sequía, el clon 395193.4 dio el mayor valor de reflectancia de 0,87 NDVI en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y los menores valores fueron presentados por los clones: el 394881.8 con 0,807 NDVI y el clon 398192.592 con 0,810 NDVI. En el promedio, la reflectancia fue mayor en el tratamiento de riego normal con 0,88 NDVI y menor en sequía con 0,84 NDVI.

En el análisis de varianza respectivo, en la medición de la reflectancia se encontró diferencias estadísticas significativas por efecto de los clones evaluados, en los tratamientos realizados se encontró diferencias estadísticas altamente significativas y en la interacción entre tratamientos y clones se encontraron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 81 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en el análisis de varianza, se encontró diferencias estadísticas no significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 82 y Cuadro 83 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias en la reflectancia a los 15 DDE (días después del estrés) y 85 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 20 y Figura 15 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon con mayor reflectancia fue el 395193.4 con 0,89 NDVI en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo obtuvo el clon 398190.523 con 0,85 NDVI. En el tratamiento de sequía, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor de la reflectancia fue el clon 395193.4 con 0,84 NDVI y el menor valor lo obtuvo el clon 398098.203 con 0,80 NDVI. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con 0,88 NDVI y menor en sequía con 0,83 NDVI.

En la medición de la reflectancia se manifestó diferencias estadísticas altamente significativas producto de los clones evaluados, al hacer el análisis de varianza respectivo, los tratamientos de riego y la interacción entre los clones y los tratamientos también manifestaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 84 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se manifestó diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 85 y Cuadro 86 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para la reflectancia a los 21 DDE (días después del estrés) y 92 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 21 y Figura 16 se observó que en el tratamiento de riego normal, los clones con mayor valor de reflectancia fueron: el 395193.4 con 0,92 NDVI y el 501065.1 con 0,92 NDVI en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y el menor valor de reflectancia fue el clon 394881.8 con 0,86 NDVI. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor reflectancia fueron: el 501065.1 con 0,86 NDVI, el 370121 con 0,86 NDVI, el 395193.4 con 0,85 NDVI, el 393708.31 con 0,84 NDVI y el 398098.203 con 0,83 NDVI, en comparación con los demás clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ellos, pero si con los demás clones y el menor valor de reflectancia fue el clon 398192.592 con 0,71 NDVI. En el promedio fue mayor la reflectancia en el tratamiento de riego normal con 0,89 NDVI y menor con el tratamiento de sequía con 0,80 NDVI.

La reflectancia medida presentó diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados, al hacer el análisis de varianza respectivo, los tratamientos de riego y la interacción entre los clones y los tratamientos también manifestaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 87 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 88 y Cuadro 89 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias en la reflectancia a los 28 DDE (después del estrés) y 99 DDS (después de la siembra) se presentó que en el tratamiento de riego normal, en el Cuadro 22 y Figura 17, los clones con mayor valor de reflectancia fueron: el 501065.1 con 0,91 NDVI, el 395193.4 con 0,91 NDVI y el 393708.31 con 0,91 NDVI en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y el menor valor de reflectancia fueron los clones: el 394881.8 con 0,87 NDVI y el 398192.592 con 0,87 NDVI. En el tratamiento de sequía, el clon 501065.1 dio el mayor valor de reflectancia de 0,79 NDVI en comparación con los otros nueve clones siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor de reflectancia fueron los clones: el 394881.8 con 0,62 NDVI y el 398192.592 con 0,61 NDVI. El promedio de la reflectancia fue mayor con el tratamiento de riego normal con 0,89 NDVI y menor con el tratamiento de sequía con 0,70 NDVI.

Dentro del tratamiento de sequía se observa que a los 21 DDE (días después del estrés), 92 DDS (días después de la siembra) y a los 28 DDE (después del estrés) y 99 DDS (después de la siembra), como resultado final el clon 501065.1 presentó una mayor reflectancia, cabe mencionar que en anteriores fechas de evaluación los clones 395193.4 y 398190.523 presentaron también una mayor respuesta en la reflectancia, es necesario mencionar que un valor elevado del índice (NDVI) cercano a 1 me indica una cubierta vegetal en un buen estado de salud que se caracteriza por el contraste entre la banda del rojo, la cual es absorbida en gran parte por las hojas, que es reflejada en su mayoría, en donde el clon 501065.1 presentó una mejor disposición genética a tolerar el estrés hídrico manteniendo un índice elevado de 0,79 NDVI basado solo en la reflectancia.

Se puede considerar que el contenido de agua en la cobertura vegetal no solo influiría de una manera directa en la reflectancia en donde afecta las bandas de absorción, sino también de una manera indirecta ya que de la humedad depende la turgencia celular y este factor determina la estructura interna de la hoja, es decir, que la reflectancia estaría controlada principalmente por el contenido de agua en las hojas en donde la reflectancia muestra valores relativamente bajos en la banda roja debido a una mayor absorción de luz por parte de la clorofila y un aumento en la banda infrarroja debido a la estructura interna de las hojas, esto es corroborado por Samborski (2009).

Analizando los promedios de ambos tratamientos, se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta un mayor índice de vegetación en comparación con el tratamiento de sequía. Esta respuesta es clara en vista que en sequía hay un desbalance hídrico ocasionando un menor contenido de agua en las hojas y por ende una menor reflectancia en la banda del infrarrojo. Los valores que se acercan a 1 indican una mayor salud en las plantas, lo cual es indicado por Inman (2008).

Cuadro 19. Reflectancia (NDVI) a los 81 DDS (10 DDE)

Clones	Reflectancia NDVI	
	Riego	Sequía
393708.31	0,89 ± 0,02 ab	0,84 ± 0,01 ab
501065.1	0,89 ± 0,03 ab	0,85 ± 0,03 ab
386292.3	0,89 ± 0,02 ab	0,83 ± 0,02 bc
370121	0,88 ± 0,04 ab	0,86 ± 0,02 ab
398190.523	0,86 ± 0,04 ab	0,84 ± 0,03 ab
397077.16	0,89 ± 0,03 ab	0,85 ± 0,03 ab
398098.203	0,86 ± 0,03 b	0,83 ± 0,03 bc
394881.8	0,87 ± 0,03 ab	0,81 ± 0,03 c
398192.592	0,86 ± 0,03 ab	0,81 ± 0,02 c
395193.4	0,90 ± 0,04 a	0,87 ± 0,04 a
Promedio	0,88 ± 0,03 a	0,84 ± 0,03 b

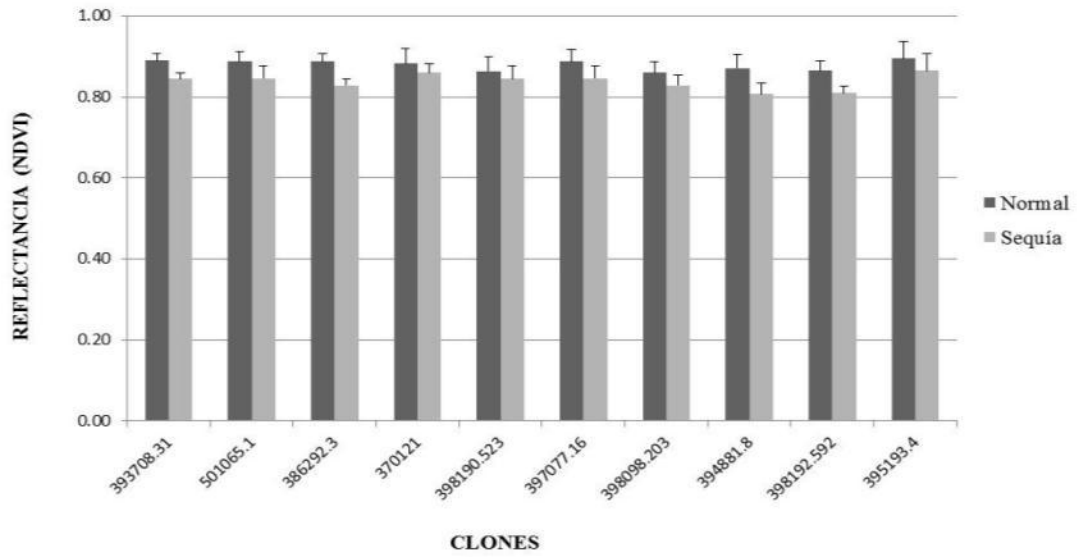


Figura 14. Reflectancia (NDVI) a los 81 DDS (10 DDE)

Cuadro 20. Reflectancia (NDVI) a los 85 DDS (15 DDE)

Clones	Reflectancia NDVI	
	Riego	Sequia
393708.31	0,89 ± 0,03 ab	0,83 ± 0,03 a
501065.1	0,89 ± 0,03 ab	0,84 ± 0,03 a
386292.3	0,89 ± 0,03 ab	0,82 ± 0,02 a
370121	0,87 ± 0,04 ab	0,83 ± 0,02 a
398190.523	0,85 ± 0,03 b	0,84 ± 0,03 a
397077.16	0,88 ± 0,03 ab	0,84 ± 0,04 a
398098.203	0,86 ± 0,03 ab	0,80 ± 0,05 a
394881.8	0,86 ± 0,03 ab	0,82 ± 0,03 a
398192.592	0,87 ± 0,03 ab	0,81 ± 0,01 a
395193.4	0,89 ± 0,02 a	0,84 ± 0,03 a
Promedio	0,88 ± 0,03 a	0,83 ± 0,03 b

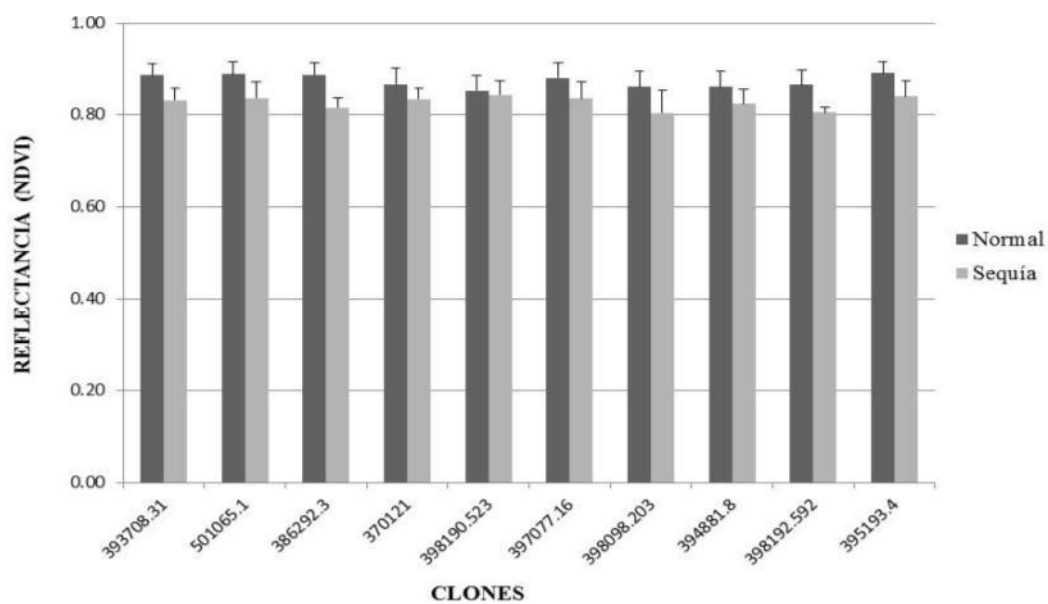


Figura 15. Reflectancia (NDVI) a los 85 DDS (15 DDE)

Cuadro 21. Reflectancia (NDVI) a los 92 DDS (21 DDE)

Clones	Reflectancia NDVI	
	Riego	Sequía
393708.31	0,92 ± 0,02 ab	0,84 ± 0,04 a
501065.1	0,92 ± 0,01 a	0,86 ± 0,05 a
386292.3	0,90 ± 0,02 ab	0,76 ± 0,05 cd
370121	0,91 ± 0,01 ab	0,85 ± 0,04 a
398190.523	0,87 ± 0,05 cd	0,82 ± 0,05 ab
397077.16	0,91 ± 0,01 ab	0,78 ± 0,07 bc
398098.203	0,71 ± 0,40 bc	0,83 ± 0,04 a
394881.8	0,86 ± 0,06 d	0,72 ± 0,05 de
398192.592	0,87 ± 0,03 cd	0,71 ± 0,04 e
395193.4	0,92 ± 0,01 a	0,85 ± 0,06 a
Promedio	0,90 ± 0,11 a	0,80 ± 0,07 b

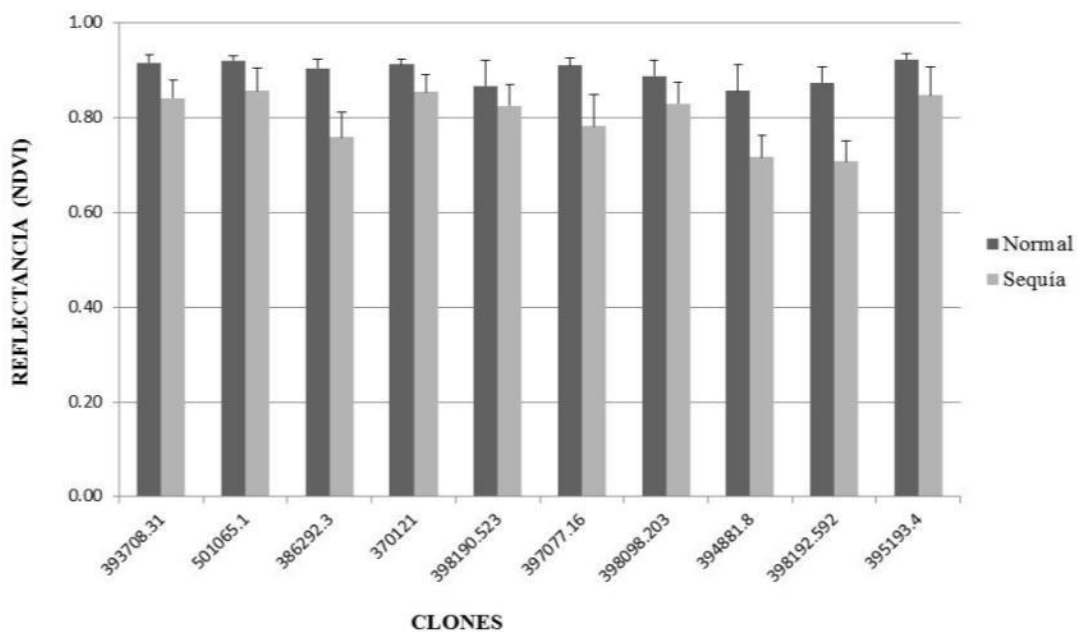


Figura 16. Reflectancia (NDVI) a los 92 DDS (21 DDE)

Cuadro 22. Reflectancia (NDVI) a los 99 DDS (28 DDE)

Clones	Reflectancia NDVI	
	Riego	Sequia
393708.31	0,91 ± 0,02 a	0,74 ± 0,06 ab
501065.1	0,91 ± 0,01 a	0,79 ± 0,07 a
386292.3	0,90 ± 0,02 ab	0,64 ± 0,05 cd
370121	0,91 ± 0,01 ab	0,75 ± 0,06 ab
398190.523	0,88 ± 0,05 bc	0,70 ± 0,09 bc
397077.16	0,89 ± 0,03 abc	0,65 ± 0,05 cd
398098.203	0,90 ± 0,03 ab	0,76 ± 0,07 ab
394881.8	0,87 ± 0,03 c	0,62 ± 0,03 d
398192.592	0,87 ± 0,03 c	0,61 ± 0,05 d
395193.4	0,91 ± 0,01 a	0,73 ± 0,10 ab
Promedio	0,89 ± 0,03 a	0,70 ± 0,09 b

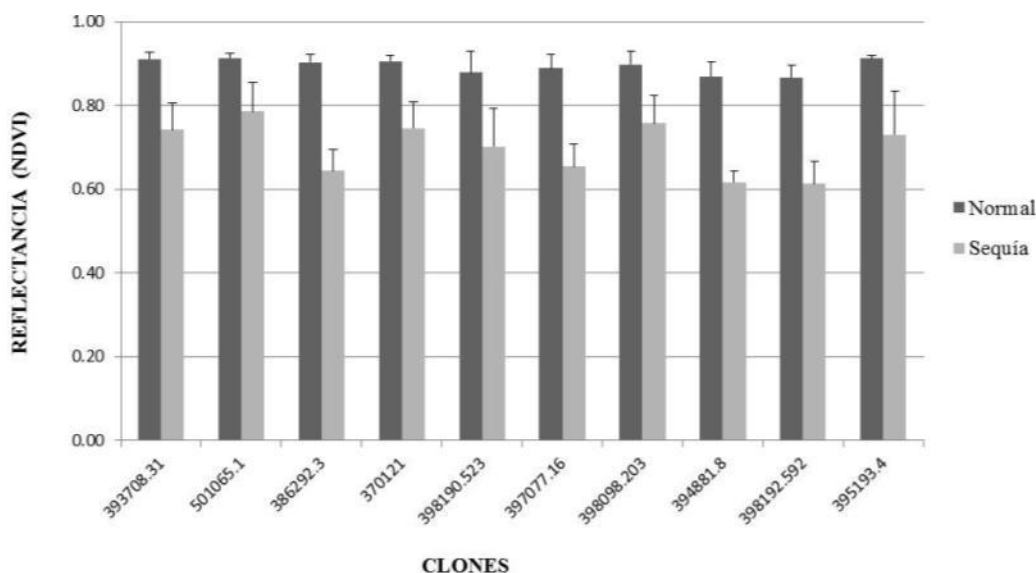


Figura 17. Reflectancia (NDVI) a los 99 DDS (28 DDE)

4.4. CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD)

La medición del contenido de clorofila manifestó diferencias estadísticas altamente significativas producto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos manifestaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 90 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se manifestó diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 91 y Cuadro 92 (Anexos).

En la comparación de medias realizada (prueba de Waller-Duncan) para el contenido de clorofila a los 10 DDE (días después del estrés) y 81 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 23 y Figura 18 se observó que en el tratamiento de riego normal el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor del contenido de clorofila de 50,41 SPAD en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor del contenido de clorofila lo obtuvo el clon 398098.203 con 37,68 SPAD. En el tratamiento de sequía, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor del contenido de clorofila de 59,25 en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor del contenido de clorofila lo obtuvo el clon 398098.203

con 41,98 SPAD. El promedio del contenido de clorofila fue mayor en sequía con 49,90 SPAD y menor en riego normal con 45,32 SPAD.

En el contenido de clorofila medido se encontró diferencias estadísticas altamente significativas producto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos manifestaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 93 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se encontró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 94 y Cuadro 95 (Anexos).

En la prueba de Waller-Duncan para la comparación de medias para el contenido de clorofila a los 15 DDE (días después del estrés) y 85 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 24 y Figura 19 se encontró que en el tratamiento de riego normal el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor del contenido de clorofila de 51,66 SPAD en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo obtuvo el clon 398098.203 con 35,15 SPAD. En el tratamiento de sequía, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor del contenido de clorofila de 57,34 SPAD en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor lo obtuvo el clon 398098.203 con 43,18 SPAD. El promedio de contenido de clorofila fue mayor en sequía con 49,61 SPAD y menor en riego normal con 41,79 SPAD.

El clon 501065.1 presentó un mayor contenido de clorofila bajo condiciones de sequía para las dos fechas de evaluación (10 DDE (días después del estrés) y 81 DDS (días después de la siembra); y 15 DDE (días después del estrés) y 85 DDS (días después de la siembra). Se puede decir que debido a un estrés ambiental como la sequía ocurre la descomposición de la clorofila y un posterior colapso de la fotosíntesis causando como consecuencia el aceleramiento de la senescencia de las hojas siendo un proceso fisiológico de una muerte celular programada, dado que el estrés por sequía acelera el envejecimiento de las hojas, esto es corroborado por Hernández (2002) donde explica la senescencia de las hojas. Un aumento en el contenido de clorofila podría estar asociado a un mecanismo adaptativo por parte de la planta frente a un estrés hídrico teniendo un retraso en la senescencia haciendo que los clones puedan permanecer verdes y poder seguir siendo plantas fotosintéticamente

activas en donde los productos de la fotosíntesis como el almidón pueda ser almacenado en el tubérculo y de esta manera pueda seguir produciendo más, esto es mencionado por Blum (2011) que señala que una senescencia tardía sirve como un mecanismo para evitar la deshidratación y así poder mantener el área foliar verde bajo estrés hídrico.

Se observó que el promedio del tratamiento de sequía fue mayor frente al tratamiento de riego normal en el Cuadro 23 y Cuadro 24, esto se debe a que las plantas que están sometidas a un estrés hídrico o han recibido un riego limitado sufren un aumento de su contenido de clorofila. Ferri (2004) explica que también el aumento de la clorofila se puede deber a la utilización limitada de nutrientes como también a una interrupción del crecimiento de la planta.

Cuadro 23. Contenido de clorofila (SPAD) a los 81 DDS (10 DDE)

Clones	Contenido de clorofila (SPAD)	
	Riego	Sequía
393708.31	48,43 ± 2,41 ab	51,94 ± 3,87 b
501065.1	50,41 ± 6,94 a	59,25 ± 6,00 a
386292.3	47,64 ± 4,00 ab	51,63 ± 2,25 b
370121	45,35 ± 3,05 bc	49,64 ± 2,53 bc
398190.523	45,73 ± 5,49 bc	51,14 ± 5,04 b
397077.16	42,41 ± 3,42 c	46,53 ± 3,41 cd
398098.203	37,68 ± 4,42 d	41,98 ± 2,96 e
394881.8	45,96 ± 3,84 bc	45,10 ± 4,75 de
398192.592	42,56 ± 3,29 c	46,41 ± 7,30 cd
395193.4	43,23 ± 3,76 c	52,46 ± 5,59 b
Promedio	45,32 ± 5,05 b	49,90 ± 6,27 a

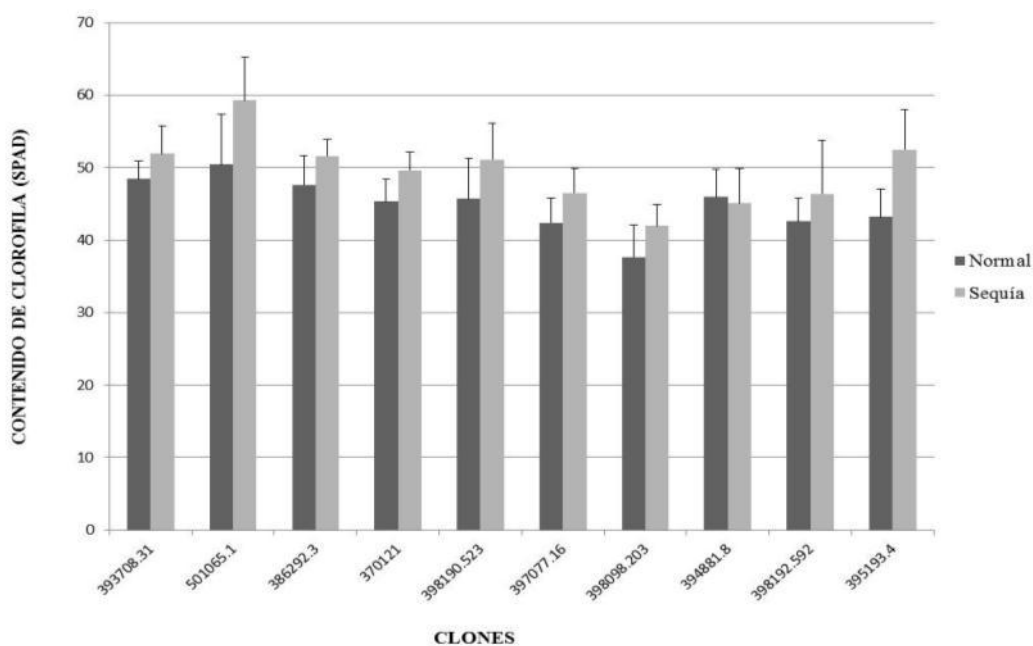


Figura 18. Contenido de clorofila (SPAD) a los 81 DDS (10 DDE)

Cuadro 24. Contenido de clorofila (SPAD) a los 85 DDS (15 DDE)

Clones	Contenido de clorofila (SPAD)					
	Riego		Sequia			
393708.31	39,90 ± 10,53	bc	54,48 ± 5,46	ab		
501065.1	51,66 ± 4,70	a	57,34 ± 7,29	a		
386292.3	42,51 ± 4,68	b	48,93 ± 3,13	cd		
370121	43,46 ± 6,68	b	50,21 ± 3,92	bcd		
398190.523	40,38 ± 4,27	bc	48,15 ± 4,77	cde		
397077.16	40,71 ± 5,90	bc	46,83 ± 7,81	cde		
398098.203	35,15 ± 5,16	c	43,18 ± 2,51	e		
394881.8	40,80 ± 7,36	bc	45,90 ± 6,46	de		
398192.592	39,58 ± 4,36	bc	47,28 ± 4,60	cde		
395193.4	40,43 ± 6,02	bc	51,44 ± 5,00	bc		
Promedio	41,79	7,03	b	49,61	6,41	a

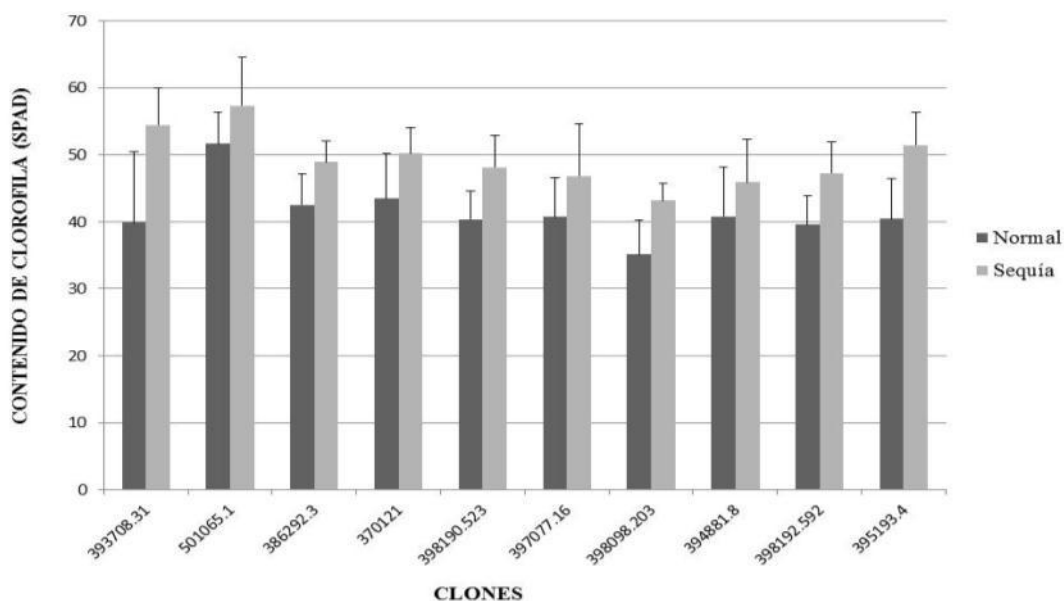


Figura 19. Contenido de clorofila (SPAD) a los 85 DDS (15 DDE)

4.5. AREA FOLIAR (cm²)

La medición del área foliar mostró diferencias estadísticas altamente significativas producto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos también mostraron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 96 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 97 y Cuadro 98 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para el área foliar a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 25 y Figura 20 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clones con mayor valor de área foliar fueron: el 370121 con 15248,4 cm², el 395193.4 con 15085,5 cm² y el 501065.1 con 14674,3 cm² en comparación con los demás clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y el menor valor de área foliar lo obtuvieron los clones: el 398098.203 con 5658,3 cm², el 386292.3 con 5505,9 cm², el 394881.8 con 5001,2 cm² y el 398190.523 con 4328,4 cm². En el tratamiento de sequía, el clon 370121 obtuvo el mayor valor de área foliar de 6829,2 cm² en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor

de área foliar lo obtuvieron los clones: el 398190.523 con 1930,6 cm², el 397077.16 con 1622,3 cm², el 394881.8 con 1513,6 cm², el 386292.3 con 1089,3 cm² y el 398192.592 con 796,8 cm². El promedio de área foliar fue mayor en el tratamiento de riego normal con 9468,4 cm² y menor en sequía con 3482,4 cm².

En el tratamiento de sequía a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), el clon que presentó una mayor área foliar fue obtenida por el clon 370121 indicando que puede afectar de manera negativa la disponibilidad de agua, ya que las hojas grandes que resultan de una expansión foliar al inicio del crecimiento puede provocar un agotamiento precoz del agua, quedando muy poca agua para que la planta pueda completar su ciclo provocando un aumento en la transpiración, en tal sentido para una mejor tolerancia al estrés hídrico se necesita un clon con menor área foliar siendo este el 398192.592, ya que de esta forma estaría reduciendo su área foliar esto es debido a reducción del crecimiento de las hojas con relación a la pérdida de hojas por desprendimiento que podría interpretarse como un efecto de compensación, podría significar también una estrategia de reducción de la pérdida de agua; por otro lado, la disminución del número de hojas implica una reducción del área transpiratoria, esto podría considerarse como un carácter adaptativo por parte del clon 398192.592 para la tolerancia a la sequía evitando el estrés hídrico en sus células, esto es mencionado por Boyer (1970); Saab y Sharp (1989) donde indican que a pesar de que la planta sufre un déficit por sequía reduce su transpiración disminuyendo su área foliar para evitar un estrés hídrico en las células.

Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta una mayor área foliar en comparación con el tratamiento de sequía. Esto se debe a que existe un desbalance hídrico entre el sistema suelo agua planta atmósfera y como consecuencia produce una disminución del área foliar evitando una mayor pérdida de agua en las hojas a causa de la transpiración. Según Granier y Tardieu (1999), el déficit hídrico produce una reducción en la expansión y desarrollo de la hoja.

Cuadro 25. Area foliar (cm²) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Area foliar (cm ²)	
	Riego	Sequía
393708.31	13040,4 ± 1352,0 ab	4818,0 ± 1163,4 b
501065.1	14674,3 ± 4157,3 a	4996,5 ± 841,4 b
386292.3	5505,9 ± 1445,5 d	1089,3 ± 319,7 c
370121	15248,4 ± 4483,9 a	6829,2 ± 1504,4 a
398190.523	4328,4 ± 1135,6 d	1930,6 ± 529,0 c
397077.16	6560,9 ± 1749,3 cd	1622,3 ± 466,7 c
398098.203	5658,3 ± 1565,1 d	5520,5 ± 264,6 b
394881.8	5001,2 ± 1094,8 d	1513,6 ± 438,9 c
398192.592	9581,0 ± 2417,7 bc	796,8 ± 217,3 c
395193.4	15085,5 ± 4157,4 a	5707,3 ± 1585,3 ab

Promedio	9468,4 ± 5004,7 a	3482,4 ± 2328,7 b
-----------------	-------------------	-------------------

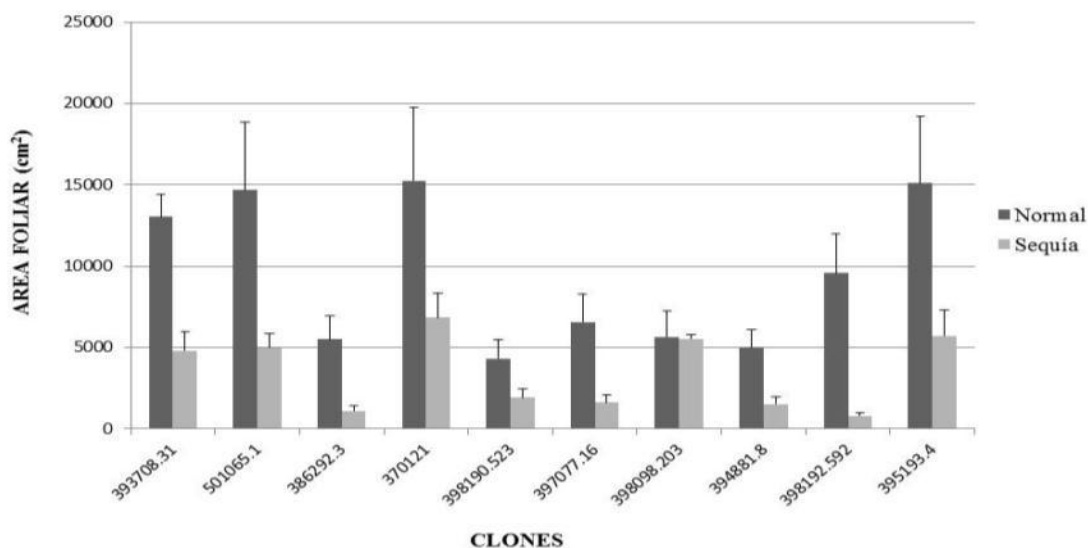


Figura 20. Area foliar (cm²) a los 84 DDS (13 DDE)

4.6. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

La termoestabilidad de la membrana celular medida mostró diferencias estadísticas altamente significativas por efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos mostraron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 99 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró

diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 100 y Cuadro 101 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para la termoestabilidad de la membrana celular a los 32 DDE (días después del estrés) y 103 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 26 y Figura 21 se encontró que en el tratamiento de riego normal, los clones con menor termoestabilidad de la membrana celular fueron: el 370121 con 38,36 dS m⁻¹ y el 397077.16 con 36,33 dS m⁻¹ en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y la mayor termoestabilidad de la membrana celular fueron los clones: 398190.523 con 22,44 dS m⁻¹, el 394881.8 con 22,26 dS m⁻¹ y el clon 398192.592 con 21,78 dS m⁻¹. En el tratamiento de sequía, el clon con menor termoestabilidad de la membrana celular fue el 397077.16 con 30,33 dS m⁻¹ en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y la mayor termoestabilidad de membrana celular fueron para los clones: 398192.592 con 32,82 dS m⁻¹, el 398190.523 con 30,33 dS m⁻¹ y el clon 398098.203 con 29,36 dS m⁻¹. El promedio de termoestabilidad de la membrana celular fue mayor en sequía con 41,17 dS m⁻¹ y menor en riego normal con 28,93 dS m⁻¹.

En el tratamiento de sequía a los 32 DDE (días después del estrés) y 103 DDS (días después de la siembra), el clon con una menor estabilidad de membrana celular fue el 397077.16 pero es necesario mencionar que los niveles elevados de la conductividad eléctrica de la termoestabilidad de la membrana celular, indicando una menor estabilidad ante la sequía no es precisamente lo ideal para poder determinar a una planta con tolerancia ante un estrés hídrico, en tal sentido los clones 398192.592, 398190.523 y 398098.203 presentaron valores de conductividad eléctrica menores manifestando una mayor estabilidad de la membrana celular, por lo cual estos clones tendrían genéticamente una mejor disposición a la tolerancia del estrés hídrico.

Se puede considerar que al ocurrir una deshidratación celular afectará la estructura, composición y funciones de la membrana permitiendo la difusión de solutos fuera de la célula posibilitando la medida del daño producido por el estrés sobre las células de la planta que lo sufre. El estrés produce una disminución del potencial hídrico de las células ya que las membranas celulares son el lugar principal de susceptibilidad al estrés, esto es

corroborado por Gonzales (2001) donde explica que una deshidratación celular causa importantes desórdenes en la estructura de la membrana, debido a esto se infiere que el déficit hídrico afecta las membranas celulares. Asimismo estudios ejecutados por Rahman *et al.* (2004). El mantenimiento de la integridad y función de las membranas celulares podría tomarse como una medida de tolerancia a la sequía siempre que todas las plantas estén sometidas al mismo tipo de estrés, esto estaría relacionado con el potencial genético que posean los clones para esta característica, lo cual es mencionado por Marsh *et al.* (1985) e Ibrahim y Quick (2001) en donde sugieren que este carácter que está controlado por un grupo reducido de genes podría ser utilizado como un criterio de selección en la búsqueda de materiales tolerantes a estreses abióticos.

Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta una mayor termoestabilidad de la membrana celular en comparación con el tratamiento de sequía. Esto se debe a que al haber un estrés hídrico provoca la ruptura de la membrana celular permitiendo la salida de solutos al exterior de la célula haciendo los valores de la conductividad eléctrica en la termoestabilidad de la membrana celular aumenten.

Cuadro 26. Termoestabilidad de la membrana celular (dS m^{-1}) a los 103 DDS (32 DDE)

Clones	Termoestabilidad de la membrana celular (dS m^{-1})	
	Riego	Sequía
393708.31	30,53 \pm 4,72 abc	45,80 \pm 10,78 bc
501065.1	25,53 \pm 5,44 bc	38,91 \pm 4,38 bcd
386292.3	33,13 \pm 9,28 ab	43,63 \pm 6,14 bc
370121	38,36 \pm 10,20 a	48,91 \pm 10,68 ab
398190.523	22,44 \pm 3,89 c	30,33 \pm 7,86 d
397077.16	36,33 \pm 6,72 a	58,38 \pm 6,93 a
398098.203	28,48 \pm 6,74 abc	29,36 \pm 5,00 d
394881.8	22,26 \pm 4,12 c	35,61 \pm 4,79 cd
398192.592	21,78 \pm 4,45 c	32,82 \pm 5,74 d
395193.4	30,47 \pm 4,36 abc	47,97 \pm 7,99 ab
Promedio	28,93 \pm 7,96 b	41,17 \pm 11,09 a

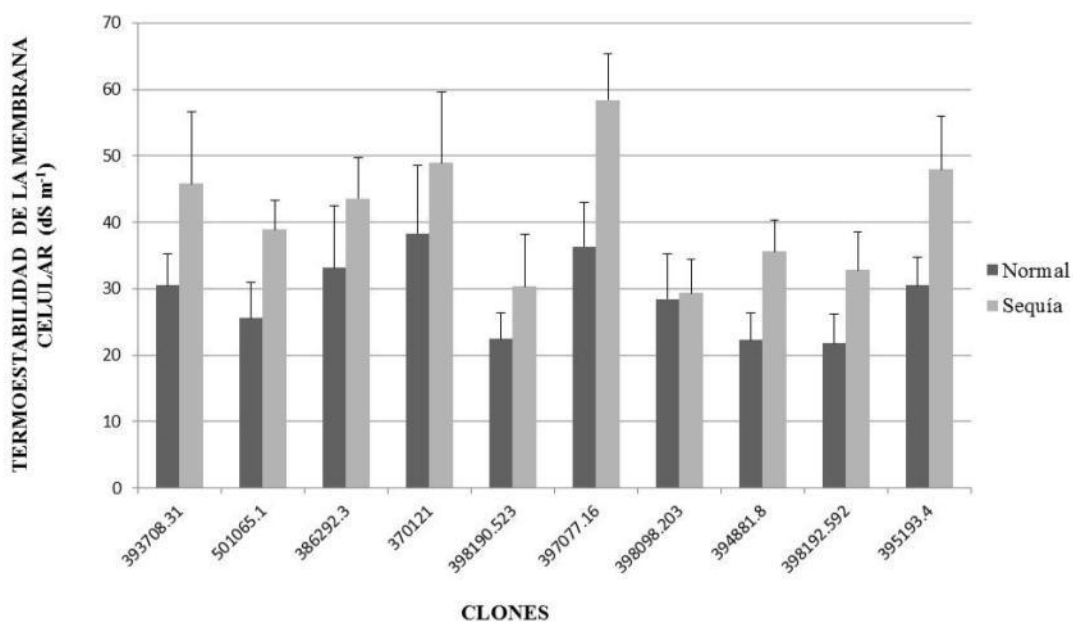


Figura 21. Termoestabilidad de la membrana celular (dS m⁻¹) a los 103 DDS (32 DDE)

4.7. BIOMETRIA

4.7.1. ALTURA DE PLANTA (cm)

La altura de planta presentó diferencias estadísticas significativas debido al efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 102 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para la altura de planta a los 70 DDS (días después de la siembra), antes de aplicar la sequía, en el Cuadro 27 y Figura 22 el mayor valor de la altura de planta fue el clon 395193.4 con 69,05 cm y el clon 501065.1 con 64,70 cm y el menor valor lo obtuvo el clon 394881.8 con 47,10 cm, el 394881.8 con 38,30 cm y el 386292.3 con 36,55 cm.

La medición de la altura de planta presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias

diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 103 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el

Cuadro 104 y Cuadro 105 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para la altura de planta a los 22 DDE (días después del estrés) y 93 DDS (días después de la siembra) en el Cuadro 28 y Figura 23 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor de altura de planta de 86,55 cm en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor de altura de planta lo obtuvieron los clones: 397077.16 con 44,33 cm y el 394881.8 con 38,48 cm. En el tratamiento de sequía, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor de altura de planta de 67,20 cm en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el menor valor de altura de planta lo obtuvieron los clones: 398192.592 con 39,25 cm, 370121 con 38,95 cm, 394881.8 con 29,45 cm y el 386292.3 con 27,23 cm. El promedio de altura de planta fue mayor en el tratamiento de riego normal con 56,64 cm y menor en sequía con 45,34 cm.

La altura de planta mostró diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y los tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas en el Cuadro 106 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 107 y Cuadro 108 (Anexos).

La prueba de Waller - Duncan en la comparación de medias para la altura de planta a los 38 DDE (días después del estrés) y 109 DDS (días después de la siembra) , en el Cuadro 29 y Figura 24 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor de altura de planta de 75,53 cm en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y los clones con el menor valor de altura de planta fueron: el 397077.16 con 45,63 cm, el 394881.8 con 40,53 cm, el 398192.592 con 39,28 cm y el 386292.3 con 38,38 cm. En el tratamiento de sequía, el clon 501065.1 obtuvo el mayor valor de altura de planta de 63,13 cm en comparación con los

otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor valor fue el 394881.8 con 26,88 cm. El promedio fue mayor en riego normal con 53,10 cm y menor en sequía con 41,70 cm.

Como se explicó en la parte de Metodología en el Capítulo de Materiales y métodos, se tomó una evaluación antes de aplicar el tratamiento de sequía para realizar una comparación de resultados. A los 70 DDS (días después de la siembra) en donde los clones con mayor altura de planta fueron 395193.4 y 501065.1 pero al aplicar la sequía en las fechas de evaluación a los 22 DDE (días después del estrés) con 93 DDS (días después de la siembra) y 38 DDE (días después del estrés) con 109 DDS (días después de la siembra), clon 501065.1 que presentó una mayor altura de planta antes de aplicar la sequía y se ha mantenido en las dos fechas de evaluación, sin embargo es necesario detallar que los valores de la altura de planta altos o muy bajos no son precisamente los ideales para poder determinar a una planta con tolerancia a la sequía. Los clones que presentaron valores intermedios de altura de planta a los 70 DDS (días después de la siembra) fueron: el 393708.31, 395193.4 y 398098.203 luego de aplicar la sequía los clones 398190.523, 395193.4, 398098.203, 398192.592 y 370121 en las dos fechas de evaluación que han expresado valores intermedios, tendrían mejor capacidad de adaptación bajo un estrés hídrico basado en la altura de planta.

Se puede decir que la reducción del crecimiento de las plantas es un efecto que se da por el estrés por déficit hídrico. La disminución del crecimiento no se debe a una reducción del metabolismo, sino a una pérdida de turgencia celular debido a la deshidratación. A medida que va disminuyendo el contenido hídrico de la planta lo hace también el de las propias células, de modo que disminuye el volumen celular y la turgencia de la célula, al igual que incrementa la cantidad de solutos y los daños mecánicos sobre la célula. El estrés hídrico inhibe directamente algún mecanismo de crecimiento celular. No es la reducción de fotoasimilados la causa de la reducción del crecimiento de los tejidos en condiciones de sequía más bien una reducción del crecimiento induce a reducciones de la conductancia estomática y la fotosíntesis. La reducción del crecimiento implica la disminución del tamaño y número de hojas, esto es corroborado por Boyer (1971) y Acevedo *et al.* (1979) donde explica que el déficit hídrico afecta el alargamiento celular así como su división celular. En condiciones normales, el agua entra en la célula porque el potencial hídrico interior es más negativo que el exterior. La célula se hincha y la membrana plasmática

ejerce una presión de turgencia frente a la pared celular. En situación de déficit hídrico el potencial hídrico del exterior es menor que el del interior, por tanto el agua tiende a salir. En estas circunstancias la presión de turgencia desaparece y la membrana plasmática se despega de la pared celular en algunos tramos. La consecuencia de la pérdida de turgencia es la ausencia de crecimiento celular, esto es explicado por Armas *et al.* (1988) en donde para el alargamiento celular se necesita una presión de turgencia es importante.

Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal frente al tratamiento de sequía es mayor debido al estrés hídrico que causa una disminución de la división celular y por ende una reducción del crecimiento celular.

Cuadro 27. Altura de planta (cm) a los 70 DDS

Clones	Altura de planta (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	53,40 ± 6,22 a	54,05 ± 5,02 bc
501065.1	65,40 ± 19,23 a	64,70 ± 2,83 a
386292.3	51,85 ± 3,75 a	36,55 ± 0,92 e
370121	47,55 ± 13,93 a	43,30 ± 8,20 de
398190.523	61,60 ± 18,10 a	57,70 ± 0,85 ab
397077.16	55,30 ± 16,26 a	43,25 ± 2,90 de
398098.203	51,85 ± 0,49 a	51,05 ± 7,71 bcd
394881.8	47,10 ± 3,68 a	38,30 ± 0,14 e
398192.592	53,30 ± 0,99 a	46,55 ± 1,34 cde
395193.4	69,05 ± 4,17 a	51,20 ± 6,51 bcd
Promedio	55,64 ± 10,80 a	48,67 ± 9,20 b

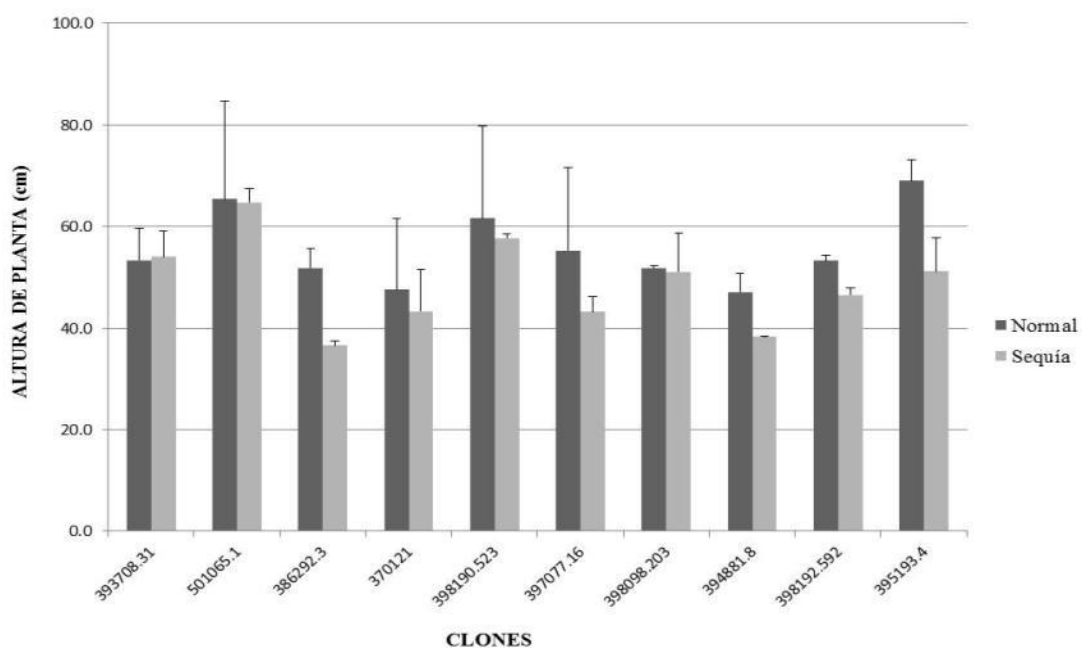


Figura 22. Altura de planta (cm) a los 70 DDS

Cuadro 28. Altura de planta (cm) a los 93 DDS (22 DDE)

Clones	Altura de planta (cm)	
	Riego	Sequia
393708.31	69,00 ± 8,41 ab	45,43 ± 11,62 cd
501065.1	86,55 ± 25,63 a	67,20 ± 3,79 a
386292.3	50,10 ± 6,92 cd	27,23 ± 5,53 d
370121	55,08 ± 8,66 bcd	38,95 ± 5,35 d
398190.523	52,83 ± 10,64 bcd	59,20 ± 10,19 ab
397077.16	44,33 ± 5,01 d	39,70 ± 11,65 cd
398098.203	52,78 ± 7,70 bcd	54,03 ± 1,96 ab
394881.8	38,48 ± 11,33 d	29,45 ± 4,46 d
398192.592	53,40 ± 14,35 bcd	39,25 ± 11,02 d
395193.4	63,90 ± 10,10 bc	52,98 ± 14,39 bc
Promedio	56,64 ± 16,89 a	45,34 ± 14,66 b

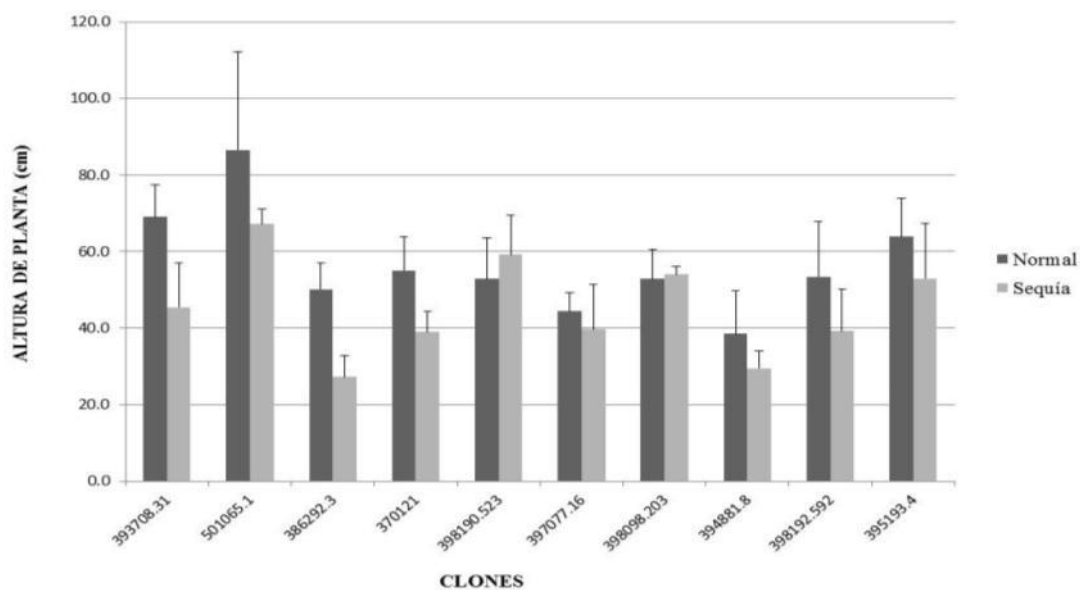


Figura 23. Altura de planta (cm) a los 93 DDS (22 DDE)

Cuadro 29. Altura de planta (cm) a los 109 DDS (38 DDE)

Clones	Altura de planta (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	67,48 ± 15,55 ab	40,68 ± 8,58 c
501065.1	75,53 ± 8,43 a	63,13 ± 9,20 a
386292.3	38,38 ± 7,97 e	34,08 ± 2,69 cd
370121	51,50 ± 7,59 cde	36,88 ± 1,55 c
398190.523	60,13 ± 12,13 bcd	53,05 ± 9,44 b
397077.16	45,63 ± 10,48 e	35,05 ± 2,04 cd
398098.203	47,28 ± 9,62 de	42,25 ± 6,61 c
394881.8	40,53 ± 7,02 e	26,88 ± 4,21 d
398192.592	39,28 ± 11,57 e	41,95 ± 5,79 c
395193.4	65,28 ± 7,30 abc	43,05 ± 9,70 c
Promedio	53,10 ± 15,46 a	41,70 ± 11,43 b

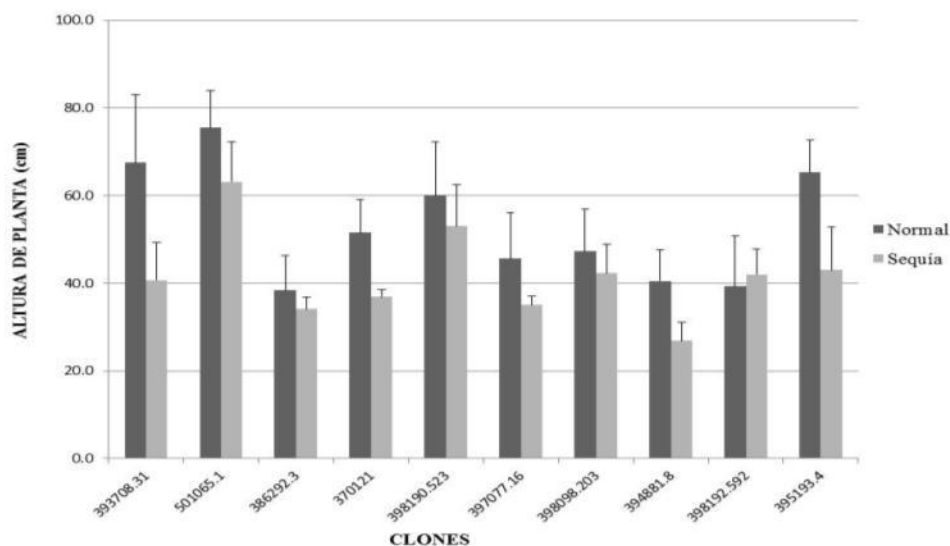


Figura 24. Altura de planta (cm) a los 109 DDS (38 DDE)

4.7.2. COBERTURA FOLIAR

La medición de la cobertura foliar presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados, al hacer el análisis de varianza respectivo, los tratamientos realizados y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 109 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para la cobertura foliar a los 50 DDS (días después de la siembra), antes de aplicar la sequía en el Cuadro 30 y Figura 25 se encontró que en el clon 397077.16 con 20,18 % y el el clon 395193.4 con 18,85 % obtuvieron los mayores valores de cobertura foliar y el clon con menor valor de cobertura foliar fue el 398098.203 con 6,43 %.

La cobertura foliar medida presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y los tratamientos evaluados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas en el Cuadro 110 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 111 y Cuadro 112 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para la cobertura foliar a los 16 DDE (días después del estrés) y 87 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 31 y Figura 26 se encontró que en el tratamiento de riego normal, los clones con mayor cobertura foliar fueron: el 370121 con 36,22 % y el 395193.4 con 32,28 % en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y los que presentaron un menor valor de cobertura foliar fueron: el 386292.3 con 17,88 % y el 394881.8 con 15,59 %. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor cobertura foliar fueron: el 370121 con 23,69 %, el 393708.31 con 22,09 %, el 395193.4 con 20,75 % y el 398098.203 con 20,70 %, en comparación con los otros clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero si con los demás clones y los que presentaron un menor valor de cobertura foliar fueron: el 394881.8 con 8,28 % y el 398192.592 con 7,78 %. El promedio de cobertura foliar fue mayor en el tratamiento de riego normal con 23,27 % y menor en sequía con 15,25 %.

Como se explicó en la parte de Metodología en el Capítulo de Materiales y métodos, se tomó una evaluación antes de aplicar el tratamiento de sequía para realizar una comparación de resultados. A los 50 DDS (días después de la siembra) en donde el clon con mayor cobertura foliar fue el 395193.4 pero después de aplicar la sequía a los 16 DDE (días después del estrés) y 87 DDS (días después de la siembra), el clon 397077.16 que presentó una mayor cobertura foliar, sin embargo es necesario detallar que los valores de cobertura foliar altos o muy bajos no son precisamente los ideales para poder determinar a una planta con tolerancia a la sequía. Los clones que presentaron valores intermedios de cobertura foliar a los 50 DDS (días después de la siembra) fueron: el 501065.1 y 386292.3 luego de aplicar la sequía a los 16 DDE (días después del estrés) y 87 DDS (días después de la siembra) el clon 397077.16 ha expresado un valor intermedio, pudiendo tener una mejor capacidad de adaptación bajo un estrés hídrico basado en la cobertura foliar.

La reducción de la cobertura foliar debido al estrés hídrico ocasiona un deterioro crítico del tejido vegetal que podría estar causada por efectos indirectos del propio desbalance hídrico como la disminución en la longitud de la hoja debido a la deshidratación celular, disminución del área foliar o a un enrollamiento de las hojas causando un deterioro de la cobertura foliar. El clon 397077.16 tendría genéticamente una mejor disposición a la tolerancia del estrés hídrico, como menciona Thomas (1986) la conservación de la cobertura foliar refleja una medida de tolerancia bajo estrés hídrico.

Se observó que el promedio del tratamiento de riego normal frente al tratamiento de sequía, esta respuesta es clara en vista de que existe un desbalance hídrico lo que ocasiona una menor cobertura foliar debido a la deshidratación de las células.

Cuadro 30. Cobertura foliar (%) a los 50 DDS

Clones	Cobertura foliar (%)	
	Riego	Sequía
393708.31	13,24 ± 3,90 cd	12,39 ± 3,64 de
501065.1	14,26 ± 4,20 bc	16,23 ± 4,79 bcd
386292.3	13,33 ± 3,92 cd	16,46 ± 4,85 bcd
370121	15,19 ± 4,48 bc	14,84 ± 4,38 cde
398190.523	11,56 ± 8,06 bc	18,71 ± 5,47 abc
397077.16	20,18 ± 5,80 a	19,84 ± 5,85 ab
398098.203	6,43 ± 4,34 d	11,25 ± 3,19 e
394881.8	12,33 ± 3,42 cd	13,40 ± 3,90 de
398192.592	13,07 ± 3,71 cd	13,20 ± 3,89 de
395193.4	17,93 ± 5,11 ab	18,85 ± 9,61 a
Promedio	14,04 ± 5,64 b	15,68 ± 5,72 a

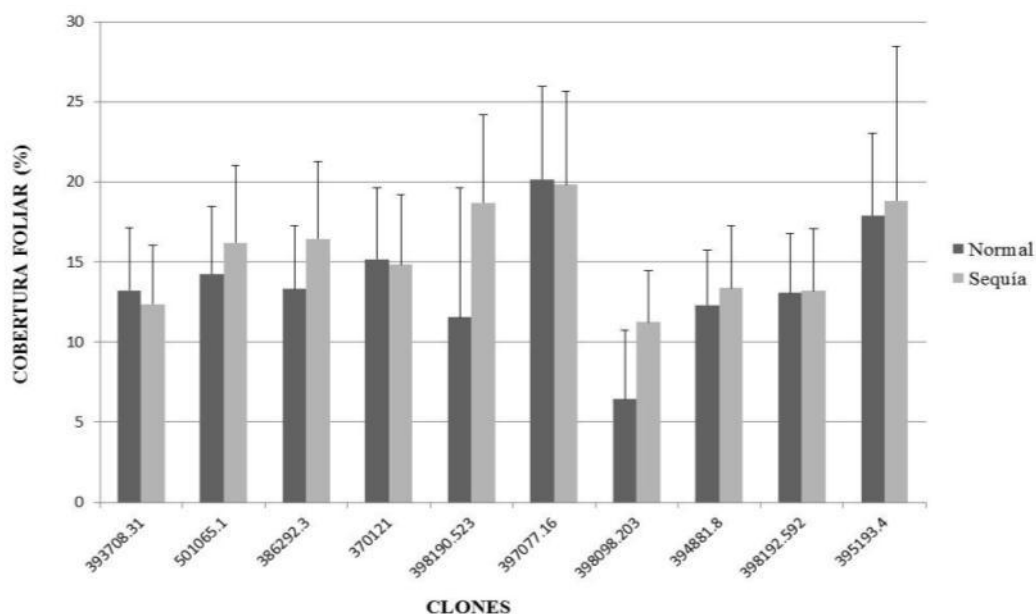


Figura 25. Cobertura foliar (%) a los 50 DDS

Cuadro 31. Cobertura foliar (%) a los 87 DDS (16 DDE)

Clones	Cobertura foliar (%)	
	Riego	Sequía
393708.31	23,31 ± 5,45 bcd	22,09 ± 3,89 a
501065.1	24,31 ± 3,67 bc	16,13 ± 4,75 b
386292.3	17,88 ± 5,08 e	10,31 ± 2,93 cd
370121	36,22 ± 8,63 a	23,69 ± 6,94 a
398190.523	19,22 ± 5,13 cde	11,53 ± 3,27 cd
397077.16	24,83 ± 7,31 b	13,31 ± 3,79 bc
398098.203	19,45 ± 12,47 bc	20,70 ± 4,08 a
394881.8	15,59 ± 4,48 e	8,28 ± 2,36 d
398192.592	18,19 ± 4,29 de	7,78 ± 3,94 d
395193.4	32,28 ± 5,78 a	20,75 ± 6,09 a
Promedio	23,27 ± 8,75 a	15,25 ± 7,09 b

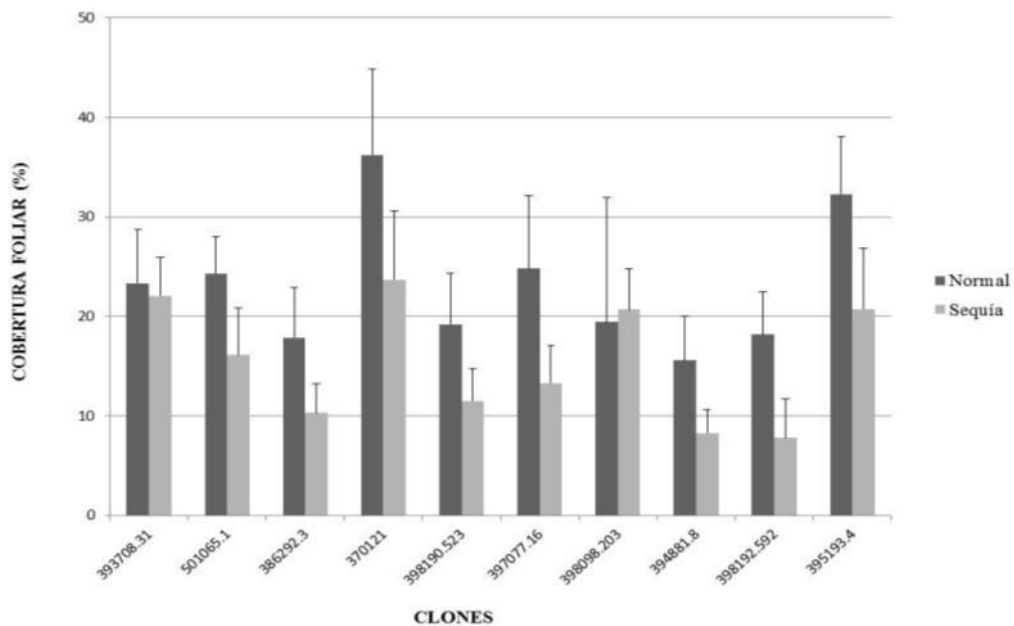


Figura 26. Cobertura foliar (%) a los 87 DDS (16 DDE)

4.7.3. LONGITUD DE HOJA (cm)

La medición de la longitud de hoja presentó diferencias estadísticas no significativas debido al efecto de los clones evaluados y la interacción entre los clones y los tratamientos al hacer el análisis de varianza respectivo, los tratamientos realizados presentaron

diferencias estadísticas altamente significativas y la interacción en el Cuadro 113 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para la longitud de hoja a los 70 DDS (días después de la siembra), antes de aplicar la sequía en el Cuadro 32 y Figura 27 se encontró que el mayor valor de longitud de hoja lo obtuvieron los clones 393708.31 con 19,35 cm y el 398190.523 con 15,25 cm y el menor valor lo obtuvieron los clones 397077.16 con 13,25 cm y el 394881.8 con 9,20 cm.

La longitud de hoja medida presentó diferencias estadísticas significativas debido al efecto de los clones evaluados, diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los tratamientos realizados y la interacción entre los cultivares y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas al hacer el análisis de varianza respectivo en el Cuadro 114 (Anexos). Para el tratamiento de riego normal en los análisis de varianza mostró diferencias estadísticas no significativas y para el tratamiento de sequía mostró diferencias estadísticas significativas en el Cuadro 115 y Cuadro 116 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para la longitud de hoja a los 22 DDE (días después del estrés) y 93 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 33 y Figura 28 se encontró que en el tratamiento de riego normal no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor de longitud de hoja fue el clon 393708.31 con 18,68 cm y el menor valor lo obtuvo el clon 398098.203 con 12,78 cm. En el tratamiento de sequía, el clon 393708.31 obtuvo una mayor longitud de hoja de 14,45 cm en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor valor de longitud de hoja fue el 394881.8 con 9,20 cm. El promedio de la longitud de hoja fue mayor en el tratamiento de riego normal con 14,74 cm y menor en sequía con 12,34 cm.

La medición de la longitud de hoja presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 117 (Anexos). Para el tratamiento de riego normal en los análisis de varianza, se mostró diferencias estadísticas

significativas y para el tratamiento de sequía se mostró diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 118 y Cuadro 119 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller - Duncan) para la longitud de hoja a los 38 DDE (días después del estrés) y 109 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 34 y Figura 29 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 393708.31 dio el mayor valor de longitud de hoja de 18,85 cm. en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y los clones con menor valor de longitud de hojas fueron: el 397077.16 con 14,95 cm, el 386292.3 con 14,70 cm, el 501065.1 con 14,45 cm, el 398098.203 con 13,35 cm, el 398192.592 con 13,13 cm y el 394881.8 con 13,08 cm. En el tratamiento de sequía, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los diez clones pero cabe mencionar el mayor valor de longitud de hoja fue el clon 393708.31 con 12,75 cm y el menor valor lo obtuvo el clon 394881.8 con 9,13 cm. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con 14,94 cm y menor en sequía con 10,99 cm.

En la parte de Metodología en el Capítulo de Materiales y métodos como se explicó se tomó una evaluación antes de aplicar el tratamiento de sequía para realizar una comparación de resultados. A los 70 DDS (días después de la siembra) en donde los clones con mayor longitud de hoja fueron 393708.31 y 398190.523. pero al aplicar la sequía en las fechas de evaluación a los 22 DDE (días después del estrés) con 93 DDS (días después de la siembra) y 38 DDE (días después del estrés) con 109 DDS (días después de la siembra), el clon 393708.31 que presentó una mayor longitud de hoja manteniéndose en las dos fechas de evaluación, cabe mencionar que los valores de longitud de hoja altos o muy bajos no son precisamente los ideales para poder determinar a una planta con tolerancia a la sequía. Los clones que presentaron valores intermedios de longitud de hoja a los 70 DDS (días después de la siembra) fueron: el 395193.4, 398098.203 y 370121 luego de aplicar la sequía los clones 398190.523, 395193.4, 398098.203 y 370121 en las dos fechas de evaluación que han expresado valores intermedios, tendrían mejor capacidad de adaptación bajo un estrés hídrico basado en la longitud de la hoja.

Se puede deducir que al disminuir el contenido de agua en la planta, las células pierden turgencia, en consecuencia la expansión celular se detiene y con ello disminuye el crecimiento de las hojas. Con menor área foliar, es decir, superficie de la hoja, la planta

transpira menos, conservando el agua limitante en el suelo para su uso por períodos más prolongados. Se considera entonces la reducción del área foliar como la primera línea de defensa frente al estrés hídrico, lo cual es sustentado por Ilahi (1982) donde indica que la baja disponibilidad de agua influye directamente en la reducción de la longitud foliar. Se observó que en el Cuadro 34 que el promedio del tratamiento de riego normal frente al tratamiento de sequía es mayor ya que el déficit hídrico produce una disminución del crecimiento celular que es un proceso extremadamente sensible al estrés ocurriendo una disminución en la presión de turgencia siendo un requisito esencial para el alargamiento celular.

Cuadro 32. Longitud de hoja (cm) a los 70 DDS

Clones	Longitud de hoja (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	19,35 ± 0,49 a	14,35 ± 2,19 ab
501065.1	14,20 ± 2,12 a	14,35 ± 0,07 ab
386292.3	16,70 ± 3,25 a	10,60 ± 2,69 bc
370121	13,70 ± 1,70 a	12,55 ± 1,77 abc
398190.523	16,00 ± 1,98 a	15,25 ± 1,91 a
397077.16	13,25 ± 1,91 a	14,85 ± 0,64 ab
398098.203	15,30 ± 0,00 a	12,95 ± 2,62 abc
394881.8	13,40 ± 1,56 a	9,20 ± 0,71 c
398192.592	16,00 ± 0,00 a	14,15 ± 1,20 ab
395193.4	16,35 ± 4,74 a	13,00 ± 0,99 abc
Promedio	15,43 ± 2,45 a	13,13 ± 2,25 b

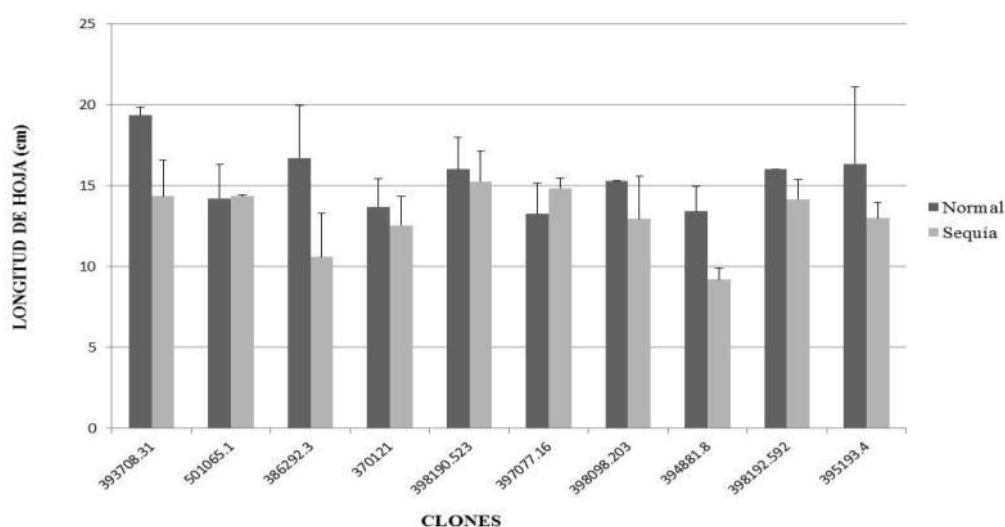


Figura 27. Longitud de hoja (cm) a los 70 DDS

Cuadro 33. Longitud de la hoja (cm) a los 93 DDS (22 DDE)

Clones	Longitud de la hoja (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	18,68 ± 4,33 a	14,45 ± 1,94 a
501065.1	14,35 ± 2,60 a	13,80 ± 1,97 ab
386292.3	15,83 ± 2,22 a	11,25 ± 0,64 abc
370121	13,43 ± 2,02 a	11,98 ± 2,46 abc
398190.523	14,50 ± 3,06 a	12,45 ± 2,42 abc
397077.16	14,28 ± 2,46 a	13,93 ± 2,53 ab
398098.203	12,78 ± 2,58 a	12,20 ± 2,61 abc
394881.8	13,50 ± 1,22 a	9,20 ± 0,61 c
398192.592	14,65 ± 2,83 a	11,03 ± 2,01 bc
395193.4	15,40 ± 4,03 a	13,13 ± 1,25 ab
Promedio	14,74 ± 2,98 a	12,34 ± 2,31 b

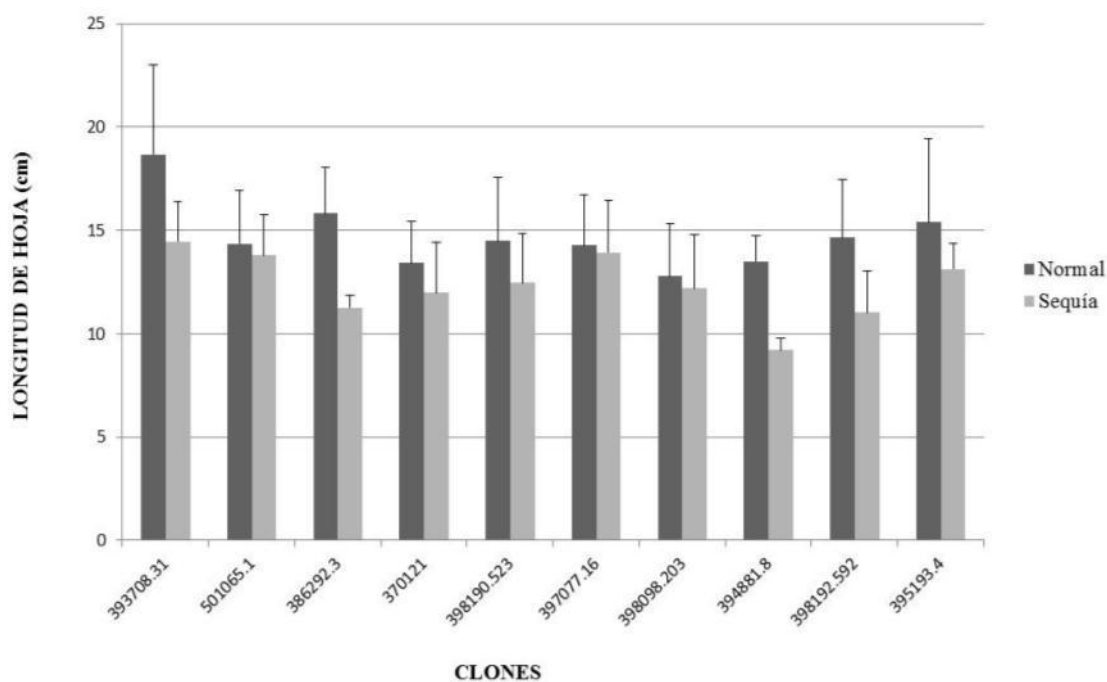


Figura 28. Longitud de hoja (cm) a los 93 DDS (22 DDE)

Cuadro 34. Longitud de la hoja (cm) a los 109 DDS (38 DDE)

Clones	Longitud de la hoja (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	18,85 ± 1,88 a	12,75 ± 3,34 a
501065.1	14,45 ± 2,74 b	12,20 ± 0,59 a
386292.3	14,70 ± 0,74 b	9,68 ± 2,03 a
370121	15,45 ± 2,17 ab	11,08 ± 1,61 a
398190.523	15,88 ± 2,98 ab	10,45 ± 2,53 a
397077.16	14,95 ± 1,65 b	12,58 ± 2,76 a
398098.203	13,35 ± 2,00 b	10,45 ± 1,04 a
394881.8	13,08 ± 1,87 b	9,13 ± 1,21 a
398192.592	13,13 ± 2,63 b	9,73 ± 1,43 a
395193.4	15,60 ± 2,64 ab	11,85 ± 1,42 a
Promedio	14,94 ± 2,55 a	10,99 ± 2,13 b

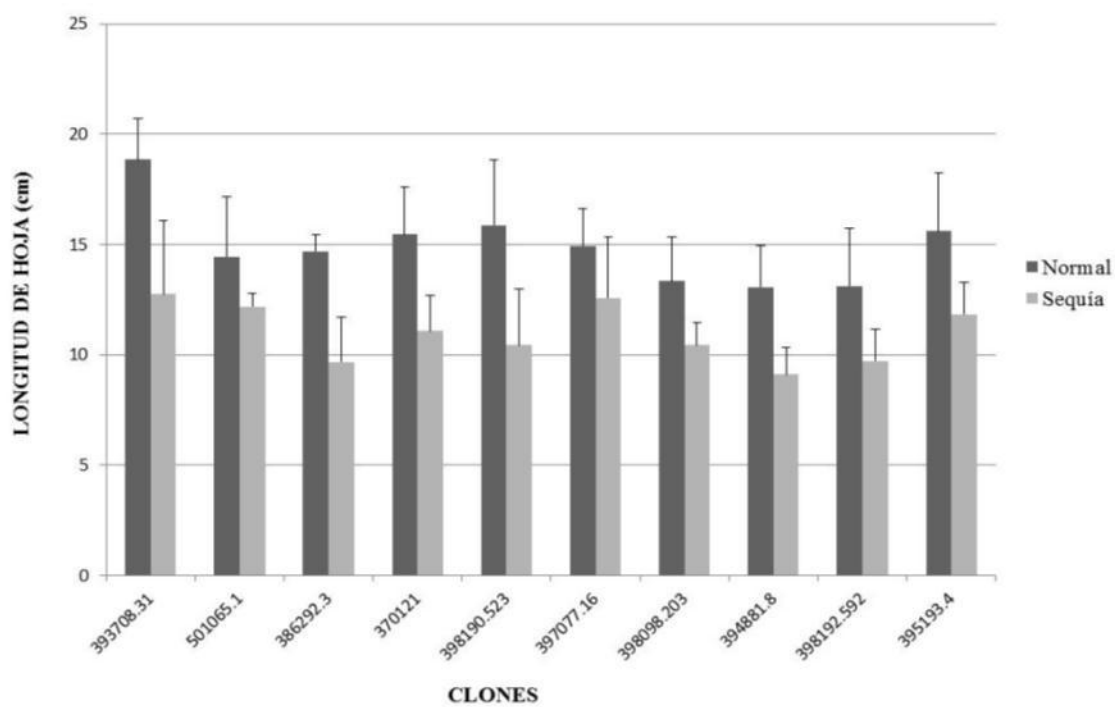


Figura 29. Longitud de hoja (cm) a los 109 DDS (38 DDE)

4.7.4. DIAMETRO DE TALLO

El diámetro de tallo medido presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 120 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 121 y Cuadro 122 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el diámetro de tallo a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 35 y Figura 30 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 501065.1 dio el mayor valor de diámetro de tallo de 1,74 cm. en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor valor de diámetro de tallo fue 386292.3 con 1,08 cm. En el tratamiento de sequía, el clon 370121 dio el mayor valor de diámetro de tallo de 1,35 cm. en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y los clones con el menor valor de diámetro de tallo fueron: el 386292.3 con 0,98 cm, el 398190.523 con 0,98 cm, el 395193.4 con 0,98 cm, el 397077.16 con 0,90 cm, el 398098.203 con 0,73 cm, el 394881.8 con 0,73 cm y el 398192.592 con 0,73 cm. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con 1,30 cm y menor en sequía con 0,96 cm.

La medición del diámetro de tallo presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 123 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 124 y Cuadro 125 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para el diámetro de tallo a los 39 DDE (días después del estrés) y 110 DDS (días después de la siembra), Cuadro 36 y Figura 31 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 393708.31 dio el

mayor valor de diámetro de tallo de 1,55 cm. en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con el menor valor de diámetro de tallo fue el 394881.8 con 0,75 cm. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor valor de diámetro de tallo fueron: el 501065.1 con 1,15 cm y el 370121 con 1,23 cm en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y el clon con el menor valor de diámetro de tallo fue el 394881.8 con 0,23 cm. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con 1,17 cm y menor en sequía con 0,80 cm.

Es necesario detallar que los valores de diámetro de tallo altos o muy bajos no son precisamente los ideales para poder determinar a una planta con tolerancia a la sequía, en tal sentido, los clones que presentaron valores intermedios de diámetro de tallo en la última evaluación a los 39 DDE (días después del estrés) y 110 DDS (días después de la siembra) fueron: el 397077.16, 398098.203, 398192.592 y 370121 tendrían mejor capacidad de adaptación bajo un estrés hídrico basado en el diámetro de tallo. Uno de los principales efectos de la sequía es la reducción de crecimiento, en este caso la disminución del diámetro de tallo, en donde el estrés hídrico podría inhibir algún mecanismo de crecimiento celular. Tanto el comportamiento físico como el metabólico contribuyen a disminuir el crecimiento de la planta en condiciones de déficit hídrico, debido a que el crecimiento está dado necesariamente por la división celular, esto es corroborado por Martín de Santa Olalla (2005) donde manifiesta que el crecimiento del diámetro de tallo se ve afectado por la baja disponibilidad de agua. En la última evaluación que se presenta en el Cuadro 36, se observó que el promedio del tratamiento de riego normal presenta un mayor diámetro de tallo en comparación con el tratamiento de sequía. Esto se debe a una disminución de la división celular y por ende una reducción del alargamiento celular. El diámetro de tallo se considera como uno de los parámetros que pueden medir el grado de tolerancia como señala Narayan y Mishra (1989).

Cuadro 35. Diámetro de tallo (cm) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Diámetro de tallo (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	1,43 ± 0,25 ab	1,00 ± 0,22 bc
501065.1	1,74 ± 0,31 a	1,28 ± 0,10 ab
386292.3	1,08 ± 0,30 c	0,98 ± 0,10 c
370121	1,33 ± 0,10 bc	1,35 ± 0,21 a
398190.523	1,23 ± 0,21 bc	0,98 ± 0,19 c
397077.16	1,38 ± 0,22 bc	0,90 ± 0,24 c
398098.203	1,15 ± 0,15 bc	0,73 ± 0,19 c
394881.8	1,11 ± 0,10 bc	0,73 ± 0,15 c
398192.592	1,23 ± 0,10 bc	0,73 ± 0,19 c
395193.4	1,33 ± 0,26 bc	0,98 ± 0,26 c

Promedio	1,30 ± 0,26 a	0,96 ± 0,27 b
-----------------	---------------	---------------

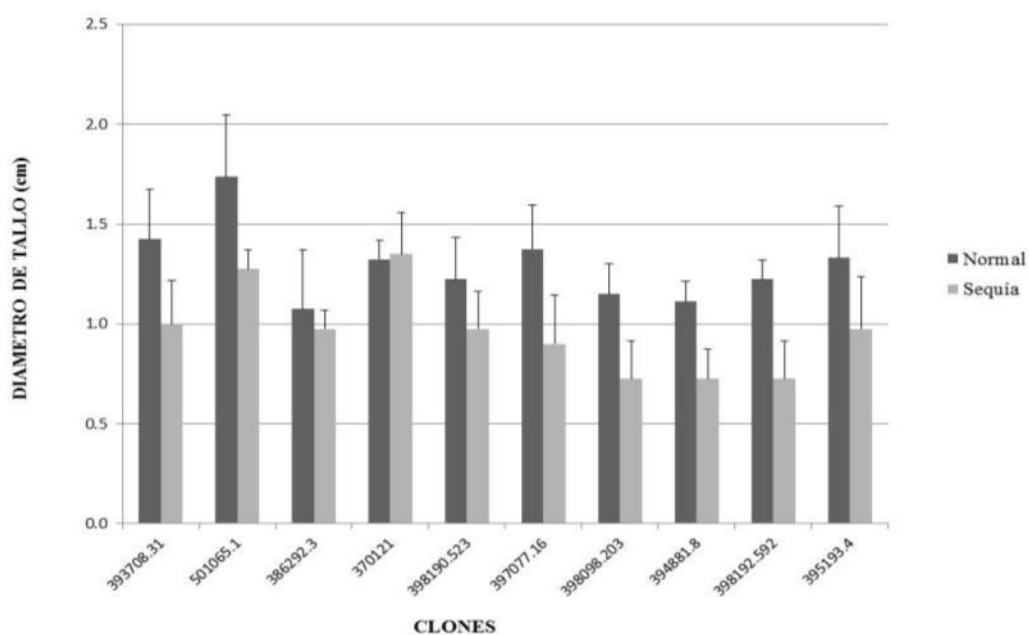


Figura 30. Diámetro de tallo (cm) a los 84 DDS (13 DDE)

Cuadro 36. Diámetro de tallo (cm) a los 110 DDS (39 DDE)

Clones	Diámetro de tallo (cm)	
	Riego	Sequía
393708.31	1,55 ± 0,29 a	1,03 ± 0,30 ab
501065.1	1,43 ± 0,42 ab	1,15 ± 0,26 a
386292.3	0,95 ± 0,19 de	0,45 ± 0,10 de
370121	1,40 ± 0,08 abc	1,23 ± 0,21 a
398190.523	1,28 ± 0,28 abcd	0,98 ± 0,10 ab
397077.16	1,05 ± 0,21 cde	0,63 ± 0,17 cd
398098.203	1,27 ± 0,15 abcd	0,83 ± 0,13 bc
394881.8	0,75 ± 0,13 e	0,23 ± 0,05 e
398192.592	0,98 ± 0,29 de	0,65 ± 0,17 cd
395193.4	1,10 ± 0,26 bcde	0,83 ± 0,22 bc

Promedio	1,17 ± 0,33 a	0,80 ± 0,34 b
-----------------	---------------	---------------

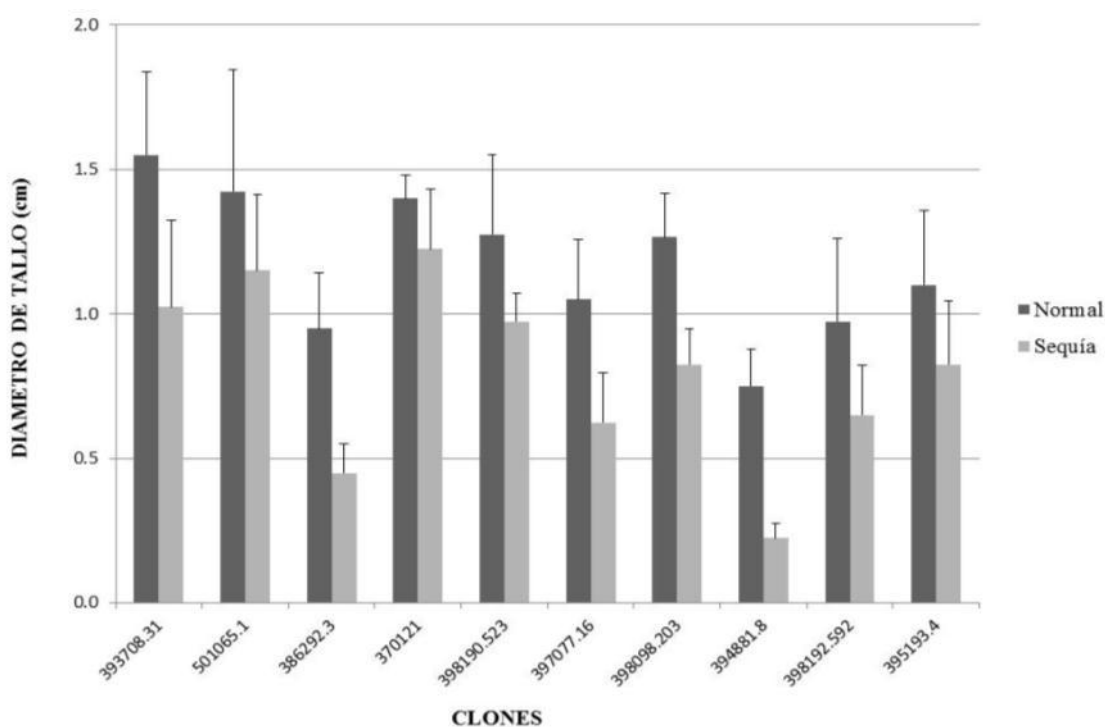


Figura 31. Diámetro de tallo (cm) a los 110 DDS (39 DDE)

4.8. BIOMASA

4.8.1. PESO SECO DE HOJAS Y TALLOS

El peso seco de hojas medido presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 126 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 127 y Cuadro 128 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el peso seco de hojas a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 37 y

Figura 32 se encontró que en el tratamiento de riego normal, los clones con mayor valor de peso seco de hojas fueron: el 370121 con 82,30 g pta⁻¹ y el 395193.4 con 76,18 g pta⁻¹ en comparación con los otros ocho clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y el clon con menor valor de peso seco de hojas fue el 394881.8 con 26,52 g pta⁻¹. En el tratamiento de sequía, el clon 370121 dio el mayor valor de peso seco de hojas de 47,40 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor valor de peso seco de hojas fue el 398192.592 con 6,80 g pta⁻¹. El promedio con mayor peso seco de hojas fue mayor en el tratamiento de riego normal con 54,92 g pta⁻¹ y menor en sequía con 25,79 g pta⁻¹.

La medición del peso seco de tallos presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 129 (Anexos). Para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) en los análisis de varianza, se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 130 y Cuadro 131 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para el peso seco de tallos a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 38 y

Figura 33 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 501065.1 dio el mayor valor de peso seco de tallos de 74,64 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor valor de peso seco de tallos fue el 386292.3 con 16,08 g pta⁻¹. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor valor de peso seco de tallos fueron: el 370121 con 31,90 g pta⁻¹, el 501065.1 con 31,34 g pta⁻¹ y el 398098.203 con 30,85 g pta⁻¹ en comparación con los otros clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y los clones con el menor valor de peso seco de tallos fueron: el 386292.3 con 7,54 g pta⁻¹, el 394881.8 con 7,18 g pta⁻¹, el 397077.16 con 5,90 g pta⁻¹ y el 398192.592 con 4,21 g pta⁻¹. El promedio del peso seco de tallos fue mayor en el tratamiento de riego normal con 38,78 g pta⁻¹ y menor en sequía con 18,41 g pta⁻¹.

El peso seco de hojas y tallos medido presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas no significativas en el Cuadro 132 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal), se mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 133 y Cuadro 134 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el peso seco de hojas y tallos a los 39 DDE (días después del estrés) y 110 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 39 y Figura 34 se encontró que en el tratamiento de riego normal, los clones con mayor valor de peso seco de hojas y tallos fueron: el 370121 con 179,53 g pta⁻¹, el 393708.31 con 168,86 g pta⁻¹ y el 501065.1 con 168,29 g pta⁻¹ en comparación con los otros clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y el clon con menor peso seco de hojas y tallos fue el 394881.8 con 25,22 g pta⁻¹. En el tratamiento de sequía, el clon 370121 dio el mayor valor de peso seco de hojas y tallos de 159,32 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor peso seco de hojas y tallos fue el 394881.8 con 19,55

g pta⁻¹. El promedio presentó un mayor peso seco de hojas y tallos fue en el tratamiento de riego normal con 107,54 g pta⁻¹ y menor en sequía con 60,96 g pta⁻¹.

En el tratamiento de sequía a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), los clones con valores intermedios de peso seco de hojas fueron: 393708.31, 501065.1 y 398190.523, en el peso seco de tallos fueron los clones 393708.31 y 398190.523 pero como respuesta final en la última evaluación del peso seco de hojas y tallos, los clones con valores intermedios fueron el 393708.31 y 397077.16, ya que los valores elevados o bajos de peso seco de hojas y tallos no son precisamente los ideales para calificar a una planta con tolerancia a la sequía.

Se puede considerar que una disminución del agua de riego produce una reducción del peso seco de hojas y tallos, es decir, una reducción de los fotoasimilados que son almacenados en las hojas y tallos en la etapa vegetativa, siendo estos productos de la fotosíntesis que posteriormente se translocarán a los tubérculos. Algunos clones presentaron un mayor peso seco en hojas y tallos como el 370121 pudiendo manifestar una mayor acumulación de fotoasimilados en esas zonas en donde la planta se vuelve más fibrosa, esto puede tomarse como una habilidad de la planta a tolerar la sequía, esto es corroborado por Loomis y Connor (1992) indica que mientras disminuya el contenido de humedad en el suelo los órganos vegetativos adquieren mayor cantidad de materiales estructurales como las ligninas y hemicelulosas, pero a la vez de esta manera la producción del tubérculo se podría ver disminuida manteniendo la biomasa en los órganos vegetativos, esto también se debería a la disposición genética de cada clon ante un estrés.

Se observó en el Cuadro 39 que el promedio del tratamiento de riego normal frente al tratamiento de sequía es mayor debido a una reducción del peso seco frente a un estrés hídrico. Según Conn y Stumpf (1993) indicó que la actividad de la planta está sujeta al control que sobre su metabolismo ejerce cada clon.

Cuadro 37. Peso seco de hojas (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Peso seco de hojas (g pta ⁻¹)	
	Riego	Sequía
393708.31	67,51 ± 19,71 ab	29,47 ± 8,32 cd
501065.1	39,77 ± 3,17 cd	22,46 ± 2,09 de
386292.3	45,57 ± 3,33 bcd	12,19 ± 2,89 fg
370121	82,30 ± 23,73 a	47,40 ± 7,80 a
398190.523	44,48 ± 12,39 cd	29,52 ± 4,81 cd
397077.16	48,26 ± 14,15 bcd	19,27 ± 5,21 ef
398098.203	67,18 ± 18,30 ab	35,15 ± 9,95 bc
394881.8	26,52 ± 7,80 d	13,75 ± 3,76 efg
398192.592	51,47 ± 13,94 bc	6,80 ± 1,74 g
395193.4	76,18 ± 22,17 a	41,90 ± 11,61 ab
Promedio	54,92 ± 21,73 a	25,79 ± 14,03 b

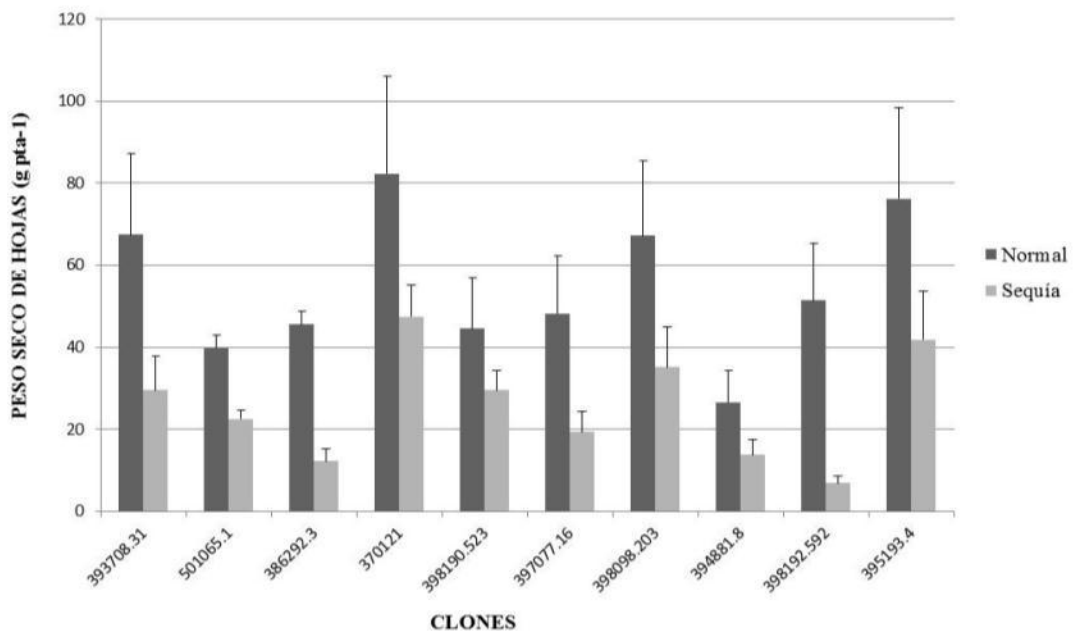


Figura 32. Peso seco de hojas (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Cuadro 38. Peso seco de tallos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Peso seco de tallos (g pta ⁻¹)	
	Riego	Sequía
393708.31	46,93 ± 10,73 bc	14,66 ± 1,61 c
501065.1	74,64 ± 21,27 a	31,34 ± 2,93 a
386292.3	16,08 ± 2,43 e	7,54 ± 0,68 d
370121	53,96 ± 15,47 b	31,90 ± 9,03 a
398190.523	37,52 ± 9,52 cd	23,33 ± 6,73 b
397077.16	23,88 ± 2,15 de	5,90 ± 0,36 d
398098.203	59,60 ± 17,23 ab	30,85 ± 1,22 a
394881.8	26,25 ± 2,47 de	7,18 ± 0,60 d
398192.592	25,09 ± 7,25 de	4,21 ± 0,30 d
395193.4	23,88 ± 1,58 de	27,23 ± 7,36 ab
Promedio	38,78 ± 20,93 a	18,41 ± 11,85 b

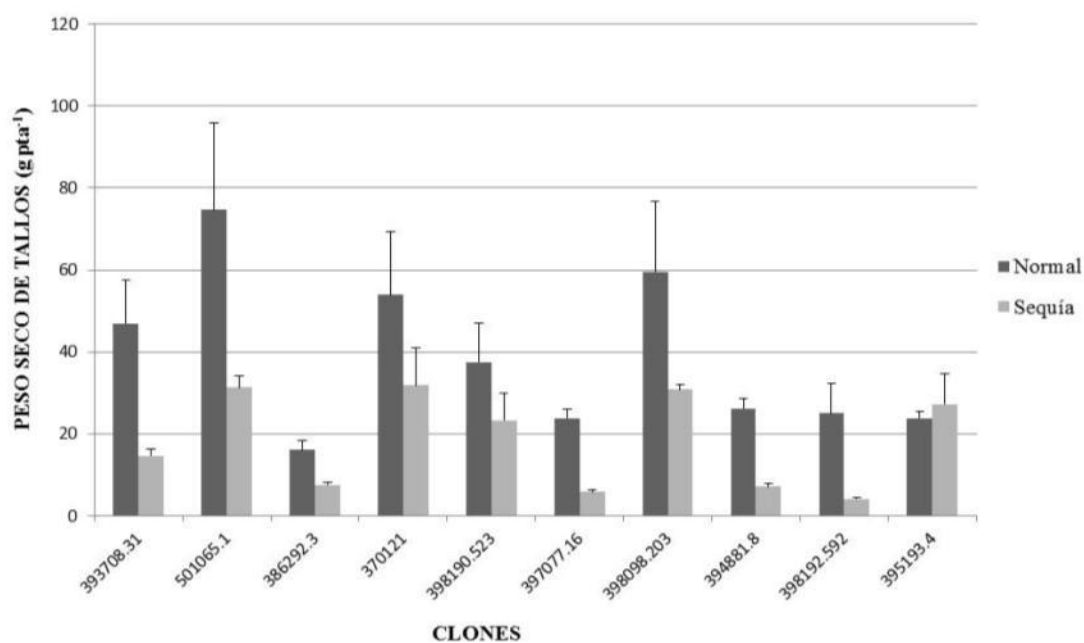


Figura 33. Peso seco de tallos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Cuadro 39. Peso seco de hojas y tallos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Peso seco de hojas y tallos (g pta ⁻¹)	
	Riego	Sequía
393708.31	168,86 ± 25,44 a	62,79 ± 14,47 d
501065.1	168,29 ± 40,46 a	32,89 ± 5,94 fg
386292.3	59,67 ± 16,28 d	35,81 ± 9,30 ef
370121	179,53 ± 41,01 a	159,32 ± 43,51 a
398190.523	100,72 ± 26,11 c	41,31 ± 8,52 ef
397077.16	55,68 ± 16,17 d	50,59 ± 10,21 de
398098.203	122,28 ± 24,11 bc	115,58 ± 25,58 b
394881.8	25,22 ± 6,06 e	19,55 ± 4,61 g
398192.592	68,18 ± 16,86 d	31,34 ± 5,94 fg
395193.4	132,55 ± 27,93 b	80,93 ± 20,37 c
Promedio	107,54 ± 58,52 a	60,96 ± 45,06 b

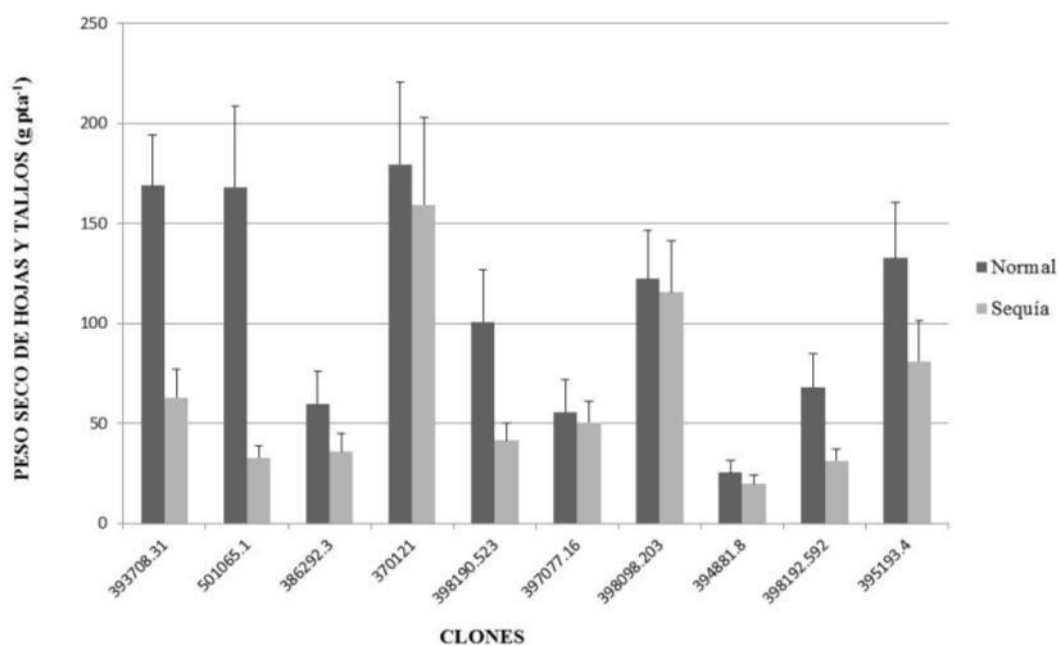


Figura 34. Peso seco de hojas y tallos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

4.8.3. PESO SECO DE TUBERCULOS

El peso seco de tubérculos medido presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el

análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 135 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 136 y Cuadro 137 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 40 y Figura 35 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 393708.31 dio el mayor valor de peso seco de tubérculos de 220,62 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor peso seco de tubérculos fue el 398098.203 con 51,70 g pta⁻¹. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor valor de peso seco de tubérculos fueron: el 395193.4 con 100,73 g pta⁻¹, el 397077.16 con 97,73 g pta⁻¹, el 394881.8 con 94,26 g pta⁻¹ y el 501065.1 con 93,48 g pta⁻¹ en comparación con los otros clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y el clon con menor peso seco de tubérculos fue el 398190.523 con 30,92 g pta⁻¹. El promedio con mayor peso seco de tubérculos fue mayor en el tratamiento de riego normal con 123,44 g pta⁻¹ y menor en sequía con 68,71 g pta⁻¹.

La medición del peso de tubérculos presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 138 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 139 y Cuadro 140 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE (días después del estrés) y 110 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 41 y Figura 36 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 393708.31 dio el mayor valor de peso seco de tubérculos de 682,95 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y los clones con menor peso seco de tubérculos fueron: el 398190.523 con 173,39 g pta⁻¹ y el 398098.203 con 163,09 g pta⁻¹. En el tratamiento de sequía, el clon 397077.16 dio el

mayor valor de peso seco de tubérculos de 233,47 g pta⁻¹ en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor peso seco de tubérculos fue el 501065.1 con 36,83 g pta⁻¹. El promedio fue mayor en el tratamiento de riego normal con 334,81 g pta⁻¹ y menor en sequía con 92,02 g pta⁻¹.

En el tratamiento de sequía a los 13 DDE (días después del estrés) y 84 DDS (días después de la siembra), de acuerdo con la comparación de medias, los clones 501065.1, 397077.16, 394881.8 y 395193.4 tuvieron el mayor peso seco de tubérculos, pero en la última fecha de evaluación que fue a los 39 DDE (días después del estrés) y 110 DDS (días después de la siembra) solo el clon 397077.16 presentó un elevado peso seco de tubérculos, en tal sentido el hecho que la planta pueda mantener una producción de biomasa elevada, en este caso un mayor peso de tubérculos, bajo estrés, sería una disposición genética de la planta para tolerar la sequía y mantener el peso seco de tubérculos.

Se podría decir que una reducción en el peso seco de tubérculos, es decir una disminución de la acumulación de fotoasimilados en el tubérculo (biomasa), este comportamiento se debería a que ante un estrés hídrico ocasiona una menor conductancia estomática lo que provocaría una reducción de la pérdida de agua y de esta manera disminuiría la tasa de desarrollo del estrés y minimizando su severidad pero a la vez reduce la absorción de CO₂ en donde todas esas respuestas tienen como consecuencia la disminución del crecimiento global de la planta y por ende una disminución en la acumulación de biomasa, como indica Verteeg *et al.* (2002) que los valores máximos de peso seco se alcanzan con suficientes cantidades de agua, contrariamente a lo obtenido por efecto de una disminución de riego.

El promedio en el tratamiento de riego normal fue mayor en el tratamiento de sequía, ya que el agua suministrada tiene un efecto importante sobre la producción de peso seco, como menciona Green *et al.* (1985) que el estrés hídrico reduce la eficiencia de conversión de esta energía de los productos de la fotosíntesis en peso seco.

Cuadro 40. Peso seco de tubérculos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Clones	Peso seco de tubérculos (g pta ⁻¹)	
	Riego	Sequía
393708.31	220,62 ± 20,46 a	55,76 ± 15,66 bc
501065.1	135,07 ± 39,68 bc	93,48 ± 6,43 a
386292.3	126,96 ± 28,68 bc	61,11 ± 8,82 bc
370121	100,15 ± 28,44 cd	69,96 ± 18,33 b
398190.523	75,31 ± 20,01 de	30,92 ± 8,46 d
397077.16	128,84 ± 34,14 bc	97,73 ± 28,76 a
398098.203	51,70 ± 14,84 e	39,31 ± 11,56 cd
394881.8	121,80 ± 30,38 c	94,26 ± 23,38 a
398192.592	109,33 ± 32,17 cd	43,87 ± 9,11 cd
395193.4	164,65 ± 39,29 b	100,73 ± 24,06 a
Promedio	123,44 ± 51,85 a	68,71 ± 29,48 b

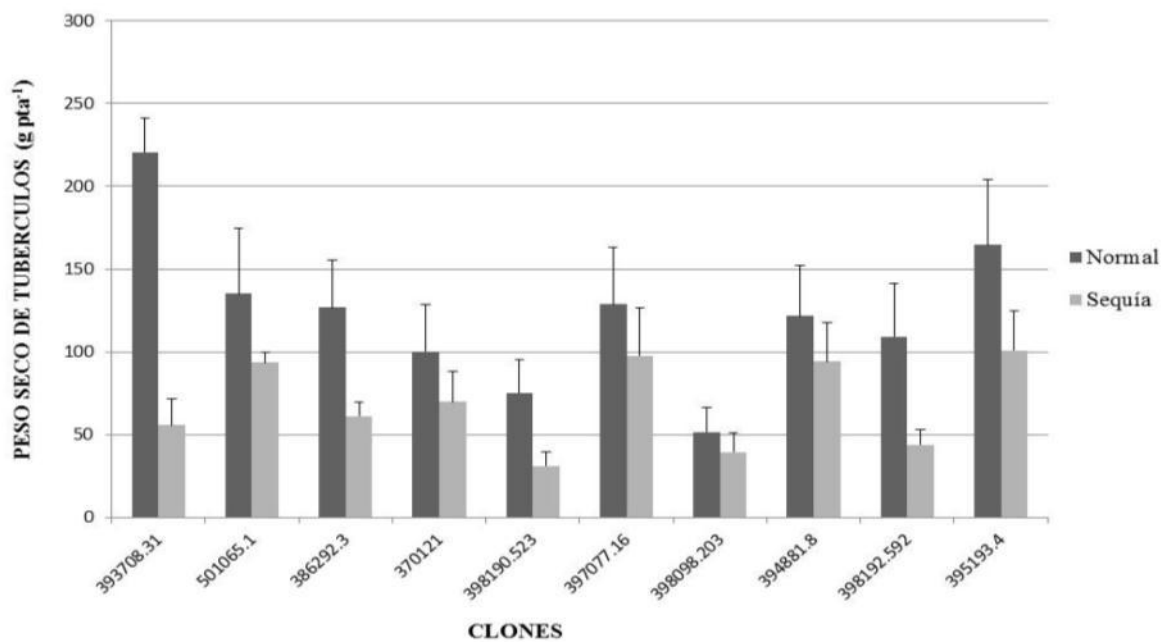


Figura 35. Peso seco de tubérculos (g pta⁻¹) a los 84 DDS (13 DDE)

Cuadro 41. Peso seco de tubérculos (g pta⁻¹) a los 110 DDS (39 DDE)

Clones	Peso seco de tubérculos (g pta ⁻¹)	
	Riego	Sequía
393708.31	682,95 ± 181,46 a	67,75 ± 19,45 cd
501065.1	311,57 ± 78,74 c	36,83 ± 8,97 e
386292.3	279,42 ± 76,68 c	81,87 ± 20,66 c
370121	313,93 ± 82,33 c	86,07 ± 21,54 c
398190.523	173,39 ± 40,80 d	79,15 ± 17,53 c
397077.16	358,96 ± 91,33 c	233,47 ± 59,17 a
398098.203	163,09 ± 27,17 d	45,14 ± 7,62 de
394881.8	293,91 ± 51,59 c	87,63 ± 25,32 c
398192.592	291,92 ± 61,94 c	77,71 ± 21,10 c
395193.4	478,96 ± 127,59 b	124,62 ± 18,47 b
Promedio	334,81 ± 168,48 a	92,02 ± 58,02 b

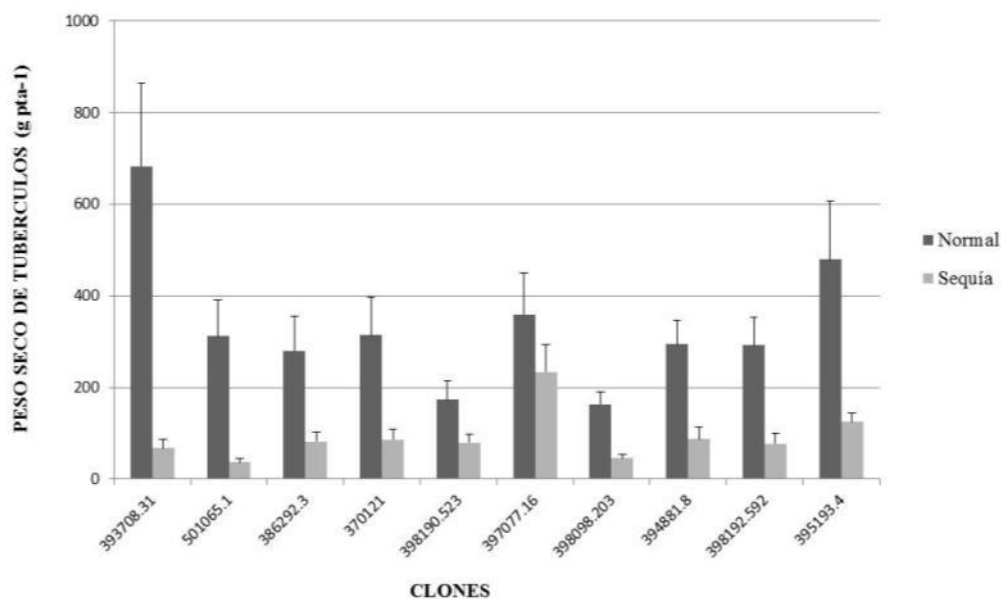


Figura 36. Peso seco de tubérculos (g pta⁻¹) a los 110 DDS (39 DDE)

4.9. RENDIMIENTO Y NUMERO DE TUBERCULOS

El rendimiento de tubérculos medido presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 141 (Anexos). En

los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 142 y Cuadro 143 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el rendimiento de tubérculos a los 47 DDE (días después del estrés) y 118 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 42 y Figura 37 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 395193.4 dio el mayor valor de rendimiento de tubérculos de 1949,9 kg/campo experimental (244,8 m²) en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y los clones con menor rendimiento fueron: el 394881.8 con 951,4 kg/campo experimental (244,8 m²) y el 398098.203 con 795,1 kg/campo experimental (244,8 m²). En el tratamiento de sequía, el clon 398192.592 dio el mayor valor de rendimiento de tubérculos de 641,1 kg/campo experimental (244,8 m²) en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor rendimiento fue el 398098.203 con 236,0 kg/campo experimental (244,8 m²). En el promedio, el mayor rendimiento fue para el tratamiento con riego normal con 1353,43 kg/campo experimental (244,8 m²) y menor con el tratamiento de sequía con 242,05 kg/campo experimental (244,8 m²).

El número de tubérculos presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 144 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 145 y Cuadro 146 (Anexos).

En la comparación de medias (prueba de Waller-Duncan) para el número de tubérculos a los 47 DDE (días después del estrés) y 118 DDS (días después de la siembra), en el Cuadro 43 y Figura 38 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 370121 dio el mayor valor de número de tubérculos de 22,89 en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor número de tubérculos fue el 394881.8 con 8,15. En el tratamiento de sequía, el clon 398192.592 dio el mayor valor de número de tubérculos de 14,14 en comparación con los otros nueve

clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor número de tubérculos fue el 394881.8 con 6,13. EL promedio es mayor en el tratamiento de riego normal con 16,37 y menor con el tratamiento de sequía con 10,56.

A los 47 DDE (días después del estrés) y 118 DDS (días después de la siembra), el clon 398192.592 logró un mayor rendimiento a nivel del campo experimental, cabe mencionar que este clon tendría $23,74 \text{ t ha}^{-1}$, al igual que en el Cuadro 43, el mismo clon presentó un mayor número de tubérculos, en donde el rendimiento bajo estrés hídrico corresponde al rendimiento obtenido en condiciones de limitada disponibilidad de agua para el crecimiento de la planta., como indica Muñoz (1980) que un clon es tolerante si disminuye poco su rendimiento bajo condiciones de sequía.

Se podría considerar que ante un efecto de estrés hídrico se reduce el crecimiento celular, disminuye el área foliar, se reduce la fotosíntesis y como consecuencia provoca una disminución en la producción y rendimiento de los cultivos, esto es corroborado por Harris (1978) donde explica que las variaciones del rendimiento se deben a suministro de agua ya que la papa es sensible a la sequía. Al igual la reducción del número de tubérculos es sensible ante la sequía.

Analizando los promedios de los tratamientos, se encontró que el promedio en el tratamiento de riego normal presentó un mayor rendimiento y número de tubérculos en comparación con el tratamiento de sequía, esta respuesta es clara en vista de que en sequía hay un desequilibrio entre el sistema suelo planta atmósfera. Por lo tanto, hay un desbalance hídrico lo que produce una reducción en el rendimiento y número de tubérculos. Según Blum (1988) explica que la estabilidad del rendimiento puede servir como un criterio de selección especialmente en ambientes adversos.

Cuadro 42. Rendimiento de tubérculos (kg/campo experimental) a los 118 DDS (47 DDE)

Clones	Rendimiento de tubérculos (kg/campo experimental)	
	Riego	Sequía
393708.31	1513,7 ± 388,0 b	482,6 ± 114,9 bcd
501065.1	1491,1 ± 303,8 b	433,8 ± 125,1 cd
386292.3	128,4 ± 376,6 b	434,1 ± 93,6 cd
370121	1335,6 ± 374,6 b	364,8 ± 104,9 de
398190.523	1361,7 ± 329,5 b	587,3 ± 169,3 ab
397077.16	1515,5 ± 380,5 b	596,0 ± 175,3 ab
398098.203	795,1 ± 129,5 c	236,0 ± 66,4 e
394881.8	951,4 ± 258,4 c	331,6 ± 92,1 bcd
398192.592	1331,9 ± 312,3 b	641,1 ± 187,4 a
395193.4	1949,9 ± 426,8 a	561,0 ± 149,1 abc
Promedio	1353,43 ± 50,13 a	242,05 ± 17,29 b

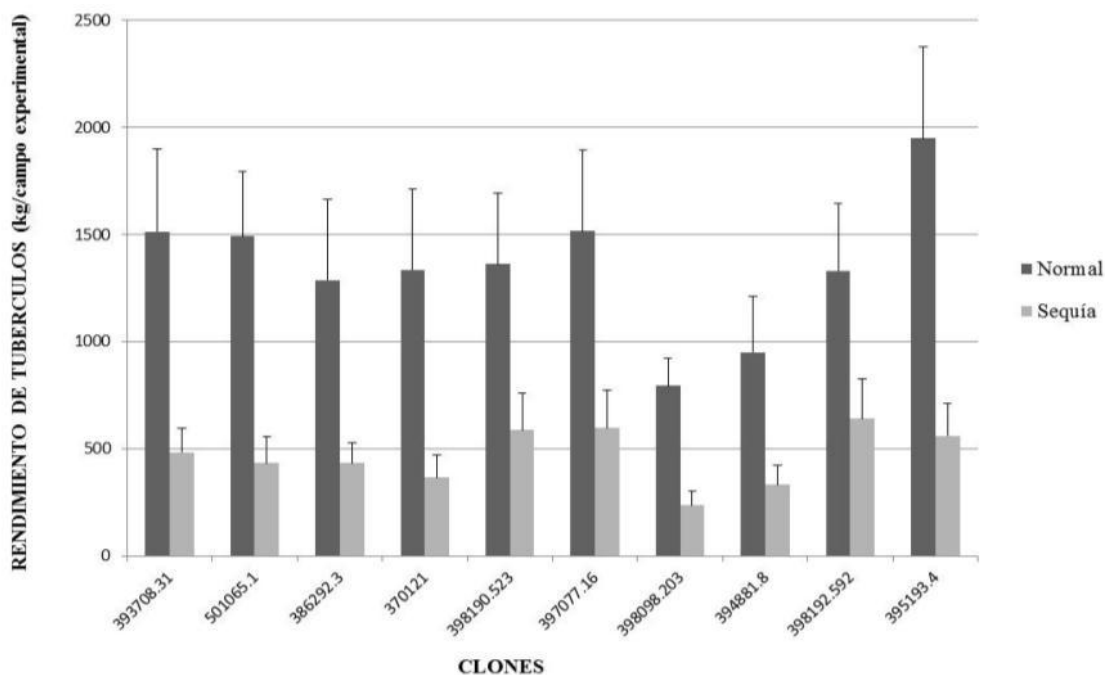


Figura 37. Rendimiento de tubérculos (kg/campo experimental) a los 118 DDS (47 DDE)

Cuadro 43. Número de tubérculos a los 118 DDS (47 DDE)

Clones	Número de tubérculos	
	Riego	Sequía
393708.31	17,94 ± 4,61 bc	12,28 ± 3,62 ab
501065.1	14,77 ± 4,69 c	8,81 ± 2,55 cd
386292.3	18,07 ± 5,28 bc	11,34 ± 2,58 bc
370121	22,89 ± 6,46 a	8,56 ± 2,49 de
398190.523	14,48 ± 4,18 c	13,99 ± 3,85 ab
397077.16	15,88 ± 4,67 bc	11,43 ± 2,93 bc
398098.203	16,92 ± 4,83 bc	7,38 ± 2,14 de
394881.8	8,15 ± 2,30 d	6,13 ± 1,71 e
398192.592	15,43 ± 4,40 bc	14,14 ± 4,09 a
395193.4	19,59 ± 4,96 ab	8,46 ± 2,50 de
Promedio	16,37 ± 5,85 a	10,56 ± 3,78 b

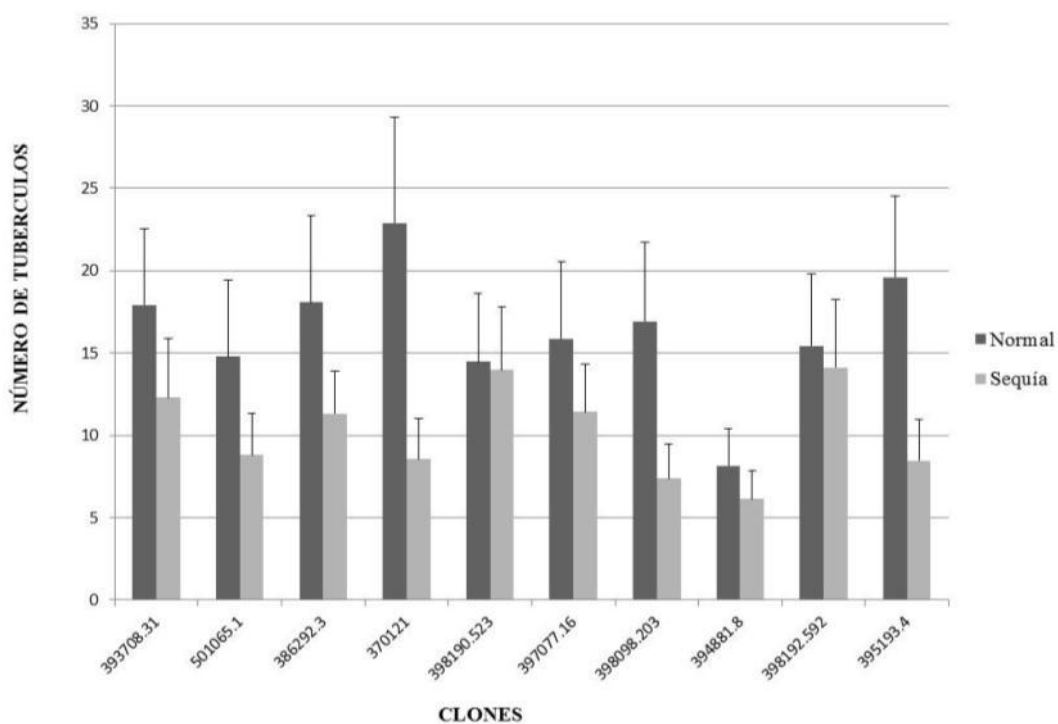


Figura 38. Número de tubérculos a los 118 DDS (47 DDE)

4.11. INDICE DE COSECHA

El índice de cosecha presentó diferencias estadísticas altamente significativas debido al efecto de los clones evaluados y tratamientos realizados, al hacer el análisis de varianza respectivo, y la interacción entre los clones y los tratamientos también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en el Cuadro 147 (Anexos). En los análisis de varianza para cada tratamiento de riego (sequía y riego normal) mostró diferencias estadísticas altamente significativas para cada uno de ellos en el Cuadro 148 y Cuadro 149 (Anexos).

La prueba de Waller-Duncan en la comparación de medias para el índice de cosecha, en el Cuadro 44 y Figura 39 se encontró que en el tratamiento de riego normal, el clon 394881.8 dio el mayor valor de índice de cosecha de 0,920 en comparación con los otros nueve clones, siendo las diferencias significativas estadísticamente y el clon con menor índice de cosecha fue el 398098.203 con 0,570. En el tratamiento de sequía, los clones con mayor índice de cosecha fueron: el 397077.16 con 0,821 y el 394881.8 con 0,815 en comparación con los otros clones, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos y el clon con menor índice de cosecha fue el 398098.203 con 0,289. El promedio del índice de cosecha fue mayor en el tratamiento de riego normal con 0,754 y menor con el tratamiento de sequía con 0,614.

Se puede observar en el tratamiento de sequía, los clones 397077.16 y 394881.8 obtuvieron elevados índices de cosecha, en donde el índice de cosecha no es más que la proporción del peso seco del tubérculo entre la biomasa seca de los pesos secos de las hojas y tallos, esto es mencionado por Fisher y Maurer (1978), se incluye también a la raíz, aunque en este caso se la excluyó dada la dificultad de su medición. El índice de cosecha se tomaría como una medida de eficacia en la distribución de fotoasimilados.

Analizando los promedios de los tratamientos, se encontró que el promedio en el tratamiento de riego normal presentó un mayor índice de cosecha. Esta disminución del índice de cosecha pudo deberse a que los clones durante la sequía distribuyeron más biomasa a la raíz que los clones con el tratamiento de riego normal para aumentar la exploración de la humedad del suelo. Al respecto Fischer y Turner (1978), mencionan que bajo sequía, ocurre un mayor aumento de la materia seca en la raíz que en el vástago, lo

que permite una exploración radical extra, reduciéndose en consecuencia el índice de cosecha.

Cuadro 44. Índice de cosecha

Clones	Índice de cosecha	
	Riego	Sequía
393708.31	0,798 ± 0,03 c	0,523 ± 0,06 d
501065.1	0,647 ± 0,04 d	0,531 ± 0,06 d
386292.3	0,816 ± 0,06 c	0,697 ± 0,06 b
370121	0,633 ± 0,07 d	0,358 ± 0,06 e
398190.523	0,633 ± 0,04 d	0,659 ± 0,07 bc
397077.16	0,863 ± 0,04 b	0,821 ± 0,04 a
398098.203	0,570 ± 0,05 e	0,289 ± 0,06 f
394881.8	0,920 ± 0,02 a	0,815 ± 0,05 a
398192.592	0,809 ± 0,03 c	0,710 ± 0,08 b
395193.4	0,777 ± 0,06 c	0,613 ± 0,04 c
Promedio	0,754 ± 0,12 a	0,614 ± 0,17 b

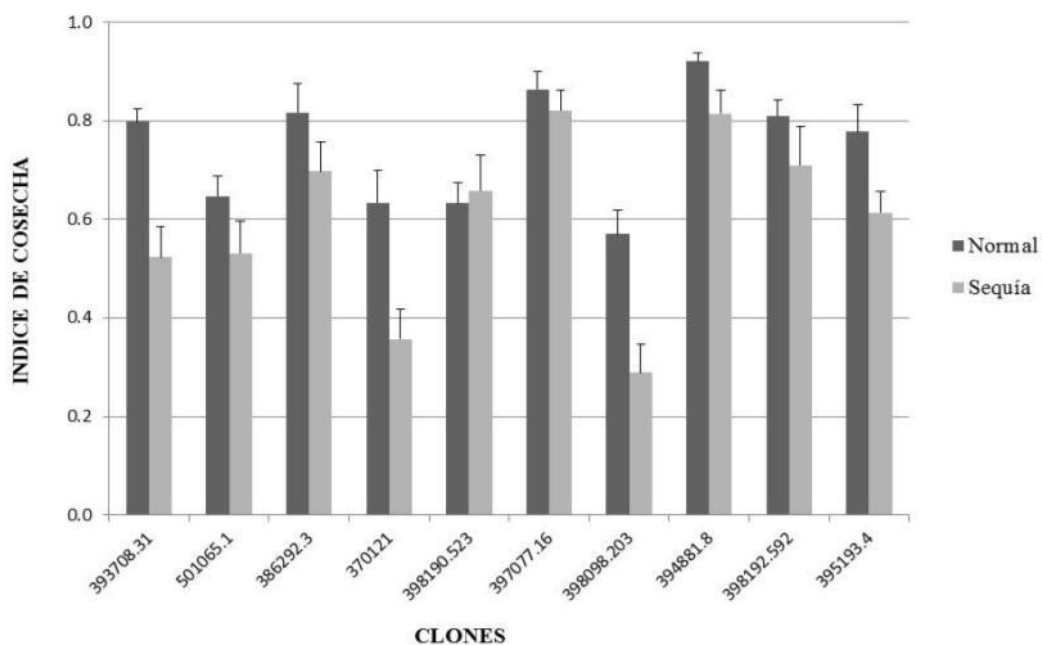


Figura 39. Índice de cosecha de los diez clones

4.12. INDICE DE SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRES

El índice de susceptibilidad al estrés (Cuadro 45), se encontró que el clon 370121 es más susceptible a la sequía puesto que presenta el mayor índice de susceptibilidad de estrés a comparación del clon 398192.592 que tiene un menor índice y resulta ser el más tolerante al estrés por sequía. Se utilizó la siguiente fórmula para hallar el índice de susceptibilidad al estrés (Fisher y Maurer, 1978):

$$IS = ((R1 - R2) / R1) / ((\text{Promedio R1} - \text{Promedio R2}) / \text{Promedio R1})$$

Donde:

R1= Rendimiento del tratamiento de riego

R2= Rendimiento del tratamiento de sequía

La vulnerabilidad de la papa ante los déficits de agua que ocurren durante su ciclo de crecimiento y que traen como consecuencia bajos rendimientos y mala calidad de tubérculos pone de manifiesto el importante papel que cumple el agua. La papa presenta variabilidad genotípica para la resistencia a la sequía y algunos clones se desempeñan mejor que otros durante la sequía, con equipo adecuado y con criterios de selección asociados a la tolerancia a la sequía se pueden seleccionar y mejorar clones adaptados a un medio ambiente determinado.

Cuadro 45. Índice de susceptibilidad al estrés

Clones	Rendimiento de tubérculos (kg/campo experimental)		DSI
	Riego	Sequía	
393708.31	1513,7 ± 388,0 b	482,6 ± 114,9 bcd	83%
501065.1	1491,1 ± 303,8 b	433,8 ± 125,1 cd	84%
386292.3	128,4 ± 376,6 b	434,1 ± 93,6 cd	81%
370121	1335,6 ± 374,6 b	364,8 ± 104,9 de	89%
398190.523	1361,7 ± 329,5 b	587,3 ± 169,3 ab	68%
397077.16	1515,5 ± 380,5 b	596,0 ± 175,3 ab	74%
398098.203	795,1 ± 129,5 c	236,0 ± 66,4 e	86%
394881.8	951,4 ± 258,4 c	331,6 ± 92,1 bcd	80%
398192.592	1331,9 ± 312,3 b	641,1 ± 187,4 a	60%
395193.4	1949,9 ± 426,8 a	561,0 ± 149,1 abc	87%
Promedio	1353,43 ± 50,13 a	242,05 ± 17,29 b	

Cuadro 46. Resumen de cada una de las evaluaciones realizadas en los diez clones.

CLONES	Fotosíntesis				Area específica de la hoja	Cont. relativo de agua	Reflectancia	Contenido de clorofila	Area foliar	Termoestabilidad membrana
	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$				$\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$	g g^{-1}	NDVI	SPAD	cm^2	dS m^{-1}
	F 22°C	F 30°C	F 1000	F 1500	AE	CRA	Reflect.	Clorofila	AF	TMC
398192.592	9,82 a	12,29 a	9,64 c	10,80 c	232,68 bc	0,67 a	0,61 d	47,28 cde	796,8 c	32,82 d
398190.523	9,35 b	11,74 b	12,59 a	11,38 b	249,99 ab	0,62 a	0,70 bc	48,15 cde	1930,6 c	30,33 d
397077.16	5,71 d	7,38 e	8,14 f	8,29 h	270,22 a	0,66 a	0,65 cd	46,83 cde	1622,3 c	58,38 a
394881.8	9,59 a	8,55 d	12,85 a	14,41 a	186,79 fg	0,69 a	0,62 d	45,90 de	1513,6 c	35,61 cd
386292.3	4,35 e	4,39 i	8,11 f	8,57 g	212,75 cdef	0,60 a	0,64 cd	48,93 cd	1089,3 c	43,63 bc
393708.31	6,72 c	9,76 c	10,62 b	10,71 c	218,55 cde	0,70 a	0,74 ab	54,48 ab	4818,0 b	45,80 bc
501065.1	5,67 d	5,79 g	9,83 c	9,33 e	198,47 ef	0,57 a	0,79 a	57,34 a	4996,5 b	38,91 bcd
398098.203	5,73 d	6,94 f	9,25 d	10,65 c	230,82 bcd	0,65 a	0,76 ab	43,18 e	5520,5 b	29,36 d
395193.4	6,53 c	6,94 f	8,64 e	9,95 d	200,16 def	0,69 a	0,73 ab	51,44 bc	5707,3 ab	47,97 ab
370121	4,31 e	5,29 h	8,85 e	8,89 f	163,19 g	0,69 a	0,75 ab	50,21 bcd	6829,2 a	48,91 ab

CLONES	Altura de planta	Cobertura foliar	Longitud de hoja	Diámetro de tallo	Peso seco de hojas y tallos	Peso seco de tubérculos	Rendimiento	Número de tubérculos	Índice de cosecha	Índice susceptibilidad sequía
	cm	%	cm	cm	$\text{g pta}^{-1\text{v}}$	g pta^{-1}	Kg 244,8 m^{-2}			%
	Alt.	Cobert.	Long.	Diámet.	PS Hoj. Tall.	PS Tub.	Rdto.	N° Tub.	IC	ISS
398192.592	41,95 c	7,78 d	9,73 a	0,65 cd	31,34 fg	77,71 c	641,1 a	14,14 a	0,71 b	60
398190.523	53,05 b	11,53 cd	10,45 a	0,98 ab	41,31 ef	79,15 c	587,3 ab	13,99 ab	0,659 bc	68
397077.16	35,05 cd	13,31 bc	12,58 a	0,63 cd	50,59 de	233,47 a	596,0 ab	11,43 bc	0,821 a	74
394881.8	26,88 d	8,28 d	9,13 a	0,23 e	19,55 g	87,63 c	331,6 bcd	6,13 e	0,815 a	80
386292.3	34,08 cd	10,31 cd	9,68 a	0,45 de	35,81 ef	81,87 c	434,1 cd	11,34 bc	0,697 b	81
393708.31	40,68 c	22,09 a	12,75 a	1,03 ab	62,79 d	67,75 cd	482,6 bcd	12,28 ab	0,523 d	83
501065.1	63,13 a	16,13 b	12,20 a	1,15 a	32,89 fg	36,83 e	433,8 cd	8,81 cd	0,531 d	84
398098.203	42,25 c	20,70 a	10,45 a	0,83 bc	115,58 b	45,14 de	236,0 e	7,38 de	0,289 f	86
395193.4	43,05 c	20,75 a	11,85 a	0,83 bc	80,93 c	124,62 b	561,0 abc	8,46 de	0,613 c	87
370121	36,88 c	23,69 a	11,08 a	1,23 a	159,32 a	86,07 c	364,8 de	8,56 de	0,358 e	89

V. CONCLUSION

1. Los clones idiotipos con mejores características para la tolerancia a la sequía fueron: 398192.592, 398190.523 y 397077.16 en donde se explica los valores de las evaluaciones realizadas en ese orden:
 - Fotosíntesis a los 22°C (9,82; 9,35; 5,71 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); 30 °C (12,29; 11,74; 7,38 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);
 - Fotosíntesis a los 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (9,64; 12,59; 8,14 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (10,80; 11,38; 8,29 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$);
 - Contenido relativo de agua (0,67; 0,62; 0,66 g g^{-1});
 - Area específica (232,68; 249,99; 270,22 $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$);
 - Area foliar (796,8; 1930,6; 1622,3 cm^2);
 - Reflectancia (0,61; 0,70; 0,65 NDVI);
 - Contenido de clorofila (47,28; 48,15; 46,83 SPAD);
 - Termoestabilidad de la membrana celular (32,82; 30,33; 58,38 dS m^{-1});
 - Altura de planta (41,95; 53,05; 35,05 cm);
 - Cobertura foliar (7,78; 11,53; 13,31 %),
 - Diámetro de tallo (0,65; 0,98; 0,63 cm);
 - Longitud de hoja (9,73; 10,45; 12,58 cm);
 - Peso seco de hojas y tallos (31,34; 14,31; 50,59 g pta^{-1});
 - Peso seco de tubérculos (77,71; 79,15; 233,47 g pta^{-1});
 - Rendimiento (641,1(26,18 t ha^{-1}); 587,3 (23,99 t ha^{-1}); 596,0 (24,35 t ha^{-1}) $\text{kg}/244,8 \text{ m}^2$);
 - Número de tubérculos (14,14; 13,99; 11,43);
 - Índice de cosecha (0,710; 0,659; 0,821);
 - Índice de susceptibilidad (60; 68; 74 %).

VI. RECOMENDACIONES

El

1. Realizar estas evaluaciones en otras épocas de siembra para el desarrollo del cultivo de papa, bajo las mismas condiciones de suelo, con el fin de establecer si las características del idiotype tolerante a la sequía se mantienen o cambian.
2. Evaluar los clones de papa en diferentes pisos altitudinales para determinar si las características morfofisiológicas de los clones presentan algún cambio.
3. Seguir evaluando una mayor diversidad de clones para determinar sus respuestas en la tolerancia a la sequía.
4. Realizar las pruebas con dos o más tipos de suelos donde estos clones sean cultivados

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Acevedo, E., Fereres, E., Hsiao, T. C. y Henderson, D. W. 1979. Diurnal growth trends, water potential and osmotic adjustment of maize and potatoes leaves in the field. *Plant Physiol.* 64: 476 – 480.
2. Alberts, B. 1996. Introducción a la biología molecular de la célula. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España 1387p.
3. Anculle, A. 1987. Fitopatología Agrícola. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa – Perú.
4. Armas, U. R., Ortega, D. E. y Rodes, G. R. 1988. Fisiología vegetal. Edit. Pueblo y educación, La Habana, Cuba. 325 p.
5. Barceló, C. J., Nicolas, R. G., Sabater, G. B. y Sánchez, T. R. 1990. Fisiología vegetal. Ed. 5. Edit. Pirámide, Madrid, España. 823 p.
6. Bidinger, F. R. 1978. Water Stress effects on Crop Environment Interactions. Proceedings of the International Workshop on the Agroclimatological Research Needs of the Semi-Arid tropics. Ed. ICRISAT. Hyderabad India. Pp 147-153.
7. Bolaños, J. y Edmeades, G. O. 1993. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. Responses in grain yield, biomass and radiation utilization. *Field Crops Res.* 31:233-252.
8. Boyer J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, bean and sunflower at various leaf water potential. *Plant Physiology*, 46: 233-235

9. Boyer, J. S. 1971. Recovery of photosynthesis in sunflower after period of low leaf potential. *Plant Physiology*, 47:816 – 20.
10. Boyer, J. S. 1976. Water Deficits and photosynthesis In: *Water deficits and plant growth*. Ed. Kozlowski, vol 4: 153 – 198. Academic Press. New York.
11. Blum A. 1988. *Plant Breeding for Stress environments*. CRC Press Florida 212.
12. Blum, A., Klueva N. y Nguyen, H. T. 2001. Wheat cellular termotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica* 117:117-123
13. Blum, A. 2011. *Drought Stress and its Impact*. Consultado el 12 de Octubre de 2012. Disponible en <http://www.plantstress.com/>
14. Chávez, R. 1990. *Cultivo de Raíces y Tubérculos*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna – Perú.
15. Chávez, R., Winjntje, A., Berríos, R., Upadhya, M., Zuñiga, P., Colque, S., Cabello, R., Espinoza, J., Cueva, J., Mendoza, H., Amoros, W., Bollo, G., Silesi, P., Monasterio, K. y Huacollo M. 1997. *Nuevas hipótesis y Avances de Selección en el Mejoramiento Genético de Papa y Camote para Adaptación a Suelos Áridos y Salinos*. *Revista Ciencia y Desarrollo*. Tacna – Perú.
16. Chávez, G., Herrera, M. y Carpio, H. 1999. *Estudio sobre el subsector de la papa en el Ecuador*. Quito. CIDES, INIAP-PNRT, COSUDE, CIP. 140 p. (1-70 pp; 71-140 pp)
17. Chapman, H. y Loomis, S. 1952. Photosynthesis in the potato under field conditions. *Plant Physiology* 28: 703 – 16.
18. Chen, T. H. H., Shen, Z. Y. y Lee, P. H. 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Science*. 22:719-725.

19. Cabrera, H. H. y Escobal, V. F. 1993. Cultivo de la papa en la región de Cajamarca. Instituto Nacional de Investigación Agraria INIA. Manual N° 5-93. 128 p.
20. Centro Internacional de la Papa. Informe Anual del CIP, 1990. Lima, Perú. p. 29,37
21. Centro Internacional de la Papa (CIP) 2012. Catalogue of CIP advanced clones. Consultado el 06 de setiembre de 2012. Disponible en <https://research.cip.cgiar.org/redlatinpapa/pages/home.php>
22. Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G., y Doi, R. H. 2002. Bioquímica Fundamental (4 ed.). México: Limusa Wiley. 736 p.
23. Cookson, S. J., Van Lijsebettens, M. y Granier C. 2005. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1355–1366.
24. Cornejo, A. y Vadia, C. 1966. Estudio preliminar de dos métodos para determinar la condición del agua de las plantas y su relación con la condición del agua del suelo. *Agronomía*, 27(3): 211-219.
25. Crafts-Brandner, S. J. y Salvucci, M. E. 2004. Analyzing the impact of high temperature and CO₂ on net photosynthesis: biochemical mechanisms, models and genomics. *Field Crops Res.* 90:75-85.
26. Day, J.H. 1981. *Estuarine Ecology* A.A. Balkerna, Rotterdam. 411 pp.
27. Epstein, E. y Grant, J. 1973. Water stress relations of potato plants under field conditions. *Agronomy journals* 65:400-404
28. Ferri, L., Perrin, E., Campana, S., Tabacchioni, S, Taccetti, G., Cocchi, P., Ravenni, N., Dalmastri, C., Chiarini, L., Bevivino, A., Manno, G., Mentasti, M. y Fani, R. 2010. Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the

- identification of bacteria: The *Burkholderia cepacia* complex case. J. Microbiol. Methods, In Press.
29. Fischer, R. y Maurer, R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain responses. Aust. J. Agric. Res. 29:897-912.
 30. Fischer, K. S. y Turner, N. C. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. Annual review Plant Physiology 29: 277 - 317
 31. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2013. FAOSTAT Agriculture. Consultado el 16 de enero de 2013. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
 32. Fussell, L. K., Bidinger, F. R. y Bieler, P. 1991. Crop physiology and breeding for drought tolerance: Research and development. Field Crop Research 27: 183-199.
 33. González, J.A., 1999. Ecofisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Fisiología de la resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinua* Willd.). I Curso Internacional. Proyecto Quinua. Ed. Jacobsen y Mujica. Lima. Peru, pp 3-20.
 34. Gutiérrez, R. y Schafleitner, R. 2007. Caracterización morfológica, molecular y de procesamiento para cultivares de papas nativas en la provincia de Canchis-Cusco. Reporte de Investigación para Soluciones Prácticas-ITDG y Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 92p.
 35. Granier, C. y Tardieu, F. 1999. Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. Plant Physiology, 119: 609–619.
 36. Green, C. F., Hebblethwaite, P. D. y Ison, D. A. 1985. A quantitative analysis of varietal and moisture status effects on the growth of *Vicia faba* in relation to radiation absorption. Ann. Appl. Biol. 106: 143 – 155.

37. Guerrero, B. J. A. 1993. Estudio del efecto del déficit hídrico y de la fertilización potásica en algunas características morfofisiológicas y en el rendimiento de las plantas de papa provenientes de semilla sexual. Tesis de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. P. 39-40
38. Harris, P. M. 1978. Water in the potato crop. Ed. Chapman y Hall, London. Pp. 244 – 277.
39. Hernández, R. 2002. Botánica. Mérida, Venezuela. Consultado el 06 de setiembre de 2012. Disponible en <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/transpiracion/>
40. Hidalgo, O. 1996. Progresos en la producción de tubérculos – semillas en Latinoamérica. Revista Latinoamericana de la Papa Vol. 2 (1): 29 – 45.
41. Hsiao, T. 1973. Plant responses to water stress. Ann Rev. Plant Physiology 24: 519 – 70.
42. Hsiao, T. y Acevedo, E. 1974. Plant responses to water deficits, water use efficiency and drought resistance Agric. Meteorol. 14: 59-84.
43. Ibrahim, A. M. H. y J. S. Quick. 2001. Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. Crop Sci. 41:1405-1407.
44. Ilahi, I. 1982. Plant behaviour under water stress. Pakistan Journal of Botany 14, 40-44.
45. Inman, D.; Khosla, R; Reich, R. y Westfall, D.G. 2008. Normalized difference vegetation index and soil color-based management zones in irrigated maize. Agron. J. 100: 60-66
46. Jacobsen, S.E. y Mujica, A. 1999. Uso de instrumentos para la medición de los parámetros fisiológicos de la sequía. I Curso Internacional sobre fisiología de la

- resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima, Perú.
47. Jara, C. 1997. Manual de tuberosas y raíces. UNSA. Arequipa – Perú.
 48. Jackson, J. 1980. Light Interception and utilization by orchard systems. Hort. Rev.2: 208 - 267 p.
 49. Jensen, W. A. y Salisbury, F. B. 1988. Botánica. Ed. McGraw Hill, México. 762 p.
 50. Jones, M.; Turner, N. y Osmond, C. 1981. Mechanism of drought resistance in plants. Academy Press, Australia.
 51. Korva, J.T. 1996. Grids in ground cover measurements. Potato Res. 39:533-540.
 52. Kramer, P. 1975. Fifty years of progress in water relation research. Plant Physiology 54: 463 – 71.
 53. Lemeur, R. y Blad. B. L. 1974. A critical review of light models for estimating the shortwave radiation regime of plant canopies. Agricultural and Forest Meteorology, 14: 225-286.
 54. Lewitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol II. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, U.S.A.
 55. Li, F.; Wei, C.; Zhang, F.; Zhang, J.; Nong, M. y Kang, S. 2010. Water-use efficiency and physiological responses of maize under partial root-zone irrigation. Agricultural Water Management 97:1156–1164
 56. Liu, X. y B. Huang. 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Sci. 40:503-510.
 57. Loomis, R.S. y Connor, D.J. 2002. Crop Ecology, Productivity and management in agricultural systems. Cambridge University Press, New York, USA. 591 p.

58. Machado, R.C.; Souza, H.M.F.; Moreno, M.A. y Alvim, P. De T. 1983. Variables associated with tolerance to water deficit in forage grasses. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 18, 603-608.
59. Mamani, P. 1993. Comportamiento morfológico de dos clones de papa sometido a estrés hídrico por Sequía. Tesis para Magister Scientiae Escuela de Postgrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 92 p.
60. Maroto J. (1983). *Horticultura herbáceo especial*. Edic. Mundi – Prensa. Madrid. España.
61. Marsh, L. E.; Davis, D. E. y Li, P. H. 1985. Selection and inheritance of heat tolerance in the common bean by use of conductivity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110:680-683.
62. Martín de Santa Olalla, F.; López, F. y Calera, A. *Agua y Agronomía*. Mundi-Prensa Libros, S.A., 2005.
63. Martineau, J. R.; Specht, J. E.; Williams, J. H. y Sullivan, C. Y. 1979. Temperature tolerance in soybean. Evaluation of technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19:75-78.
64. Martínez, C. 1988. Expresiones metabólicas de resistencia a la sequía en dos clones de papa sometidas a estrés hídrico. Universidad Nacional Agraria La Molina. Tesis Mg. Sc. Lima Perú 198 p.
65. Medina, E. 1995. Diversity and performance of life-forms of higher plants in tropical dry forests. pp. 221-242. En: Bullock, SH, Mooney HA, and Medina, E. (eds.) *Seasonally dry tropical forests*. Cambridge University Press. Cambridge, UK
66. Medina, A. 1998. Factores de Desórdenes Fisiológicos. En Curso: El Niño como Factor de Desórdenes Fisiológicos y su Influencia en la Agricultura de la Región Sur del País. CIED. Arequipa – Perú.

67. Mendoza, H. y Estrada, N. 1979. Breeding potatoes for tolerance to stress: Heat and frost. Stress physiology in crop plants, H. Mussell L. R. Staples, Editors. John Wiley L. Sons Inc. 228-262 pp.
68. Ministerio de Agricultura 2013. Series históricas de producción agrícola. Consultado el 16 de enero de 2013. Disponible en <http://www.minag.gob.pe/portal/>
69. Milthorpe, F. L. y Moorby, J. 1982. Introducción a la fisiología de los cultivos. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 259 p.
70. Minhas, J.S. y Bansal K. C. 1991. Tuber yield in relation to water stress at different stages of growth in potato (*Solanum tuberosum* L.) y Potato Assoc. 18:1–8.
71. Morby J. y Milthorpe F. L. 1976. Fisiología de los Cultivos. Cap. 8 PAPA. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
72. Moorby, J. 1975. Effect of water deficit on photosynthesis and tuber metabolism in potatoes. Aust. J. Plant Physiology 2: 323 – 333.
73. Muller, B.; Stosser, M. y Tardieu, F. 1998. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to sugar content in the growing zone of maize roots. Plant, Cell and Environment, 21: 149–158.
74. Muñoz, O. A. 1980. Resistencia a la sequía y mejoramiento genético. Ciencia y Desarrollo 33: 26-35. México.
75. Narayan, D. y Mishra, R. D. Drought resistance in varieties of wheat (*Triticum Sativum*) in relation to root growth and drought indices. Indian J. of Agric. Sci. 59(9): 595-598 1989.
76. Ochoa, C. M. 1999. Las papas de Sudamérica: Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 1036 p.

77. Passioura, J. B. 1997. Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*. 20: 79-83.
78. Pérez, J. A. y Hernández, A. 2004. Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en las hojas de pasto “mulato” (*Brachiaria hibrido*). Programa de ganadería Instituto de recursos genéticos y productividad. Colegio de postgraduados. Estado de México. *Tec Pecu Méx* 2004; 42(3): 447- 458.
79. Rahman, H. U.; Malik, S. A. y Saleem, M. 2004. Heat tolerance of upland cotton during the fruiting stage evaluated using cellular membrane thermostability. *Field Crops Res.* 85:149-158.
80. Ramos, J. L. 1994. Efecto de la humedad del suelo y la infección de *Nacobbus aberrans* en el comportamiento agrofisiológico de los cultivares Alpha (*S. tuberosum*) y Waych'a (*S. andigena*). Tesis, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia. 82 p.
81. Raschke, K. 1975. Stomatal action. *Ann. Rev. Of Plant Physiology* 26: 309 – 340.
82. Richardson, A. D; Duigan, S. P. y Berlin, G.P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytology* 153: 185-194.
83. Rodés, R. G. y Collazo, M. O. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Consultado el 10 de setiembre de 2012. Disponible en http://books.google.com.pe/books?id=FanXSdICoIC&pg=PA69&lpg=PA69&dq=metodologia+de+un+analizador+de+fotos%20ADntesis&source=bl&ots=y5GEO9T3Q9&sig=NV2PKROOHME7_11GKcV_KkkjIac&hl=es419&sa=X&ei=M_ZgUMjvCu3p0QG1t4HICw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=metodologia%20de%20un%20analizador%20de%20fotos%20ADntesis&f=false
84. Rodríguez, A. C. 1988. Efecto de dos microclimas contrastantes en la composición de los tubérculos de diez genotipos de papa. Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Tesis Mg Sc, producción agrícola. Lima, Perú. 65p.

85. Saab, I. N. y Sharp, R. E. 1989. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta*, 466-474.
86. Saadalla, M. M.; Shanahan, J. F. y Quick, J. S. 1990. Heat tolerance in winter wheat: I. Membrane thermoestability and field performance. *Crop Sci.* 30: 247-251.
87. Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 2000. *Fisiología de las plantas*. Thomson Editores Spain. Madrid, España.
88. Salter, P. y Goode, J. 1967. *Commonwealth Agric. Bureaux, Research Review 2, The potato Crop*. Edit por P. Harris. Chapman y Hall, London 1978. Pp 198.
89. Samborski, S. M; Tremblay, N. y Faloon, E. 2009. Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agron. J.* 101: 800-816
90. SAS Institute. 1990. *SAS/STAT User's guide. Version 6, Fourth Edition, Volume 1*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
91. Singh, L. 1996. A. potato ideotype for the Indo – Gangetic plains. *Journal of the Indian Potato Association* 23 (3 – 4): 112 – 120
92. Shanahan, J. F.; Edwards, I. B.; Quick, J. S. y Fenwick, J. R. 1990. Membrane thermoestability and heat tolerance of spring wheat. *Crop Sci.* 30:247-251.
93. Sharkey, T. D. y Raschke, K. 1981. Separation and measurement of direct and indirect effects of light on stomata. *Plant Physiology* 11: 573 – 576.
94. Shock, C. C. y Feibert, E. B. G. 2002. Deficit irrigation of potato. In P. Moutonnet (ed.) *Deficit Irrigation Practices*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *Water Reports* 22:47-55.
95. Turner, N. y Begg, J. 1981. Plant – water relations and adaptation to stress. *Plant and Soil* 58: 97 – 131.

96. Thiaw, S. y Hall, A. E. 2004. Comparison of selection for either leaf-electrolyte-leakage or pod set in enhancing heat tolerance and grain yield of cowpea. *Field Crops Res.* 86:239-253.
97. Thomas, H. 1986. Drought resistance in temperate forage species. En: *Agriculture: drought resistance in plants, physiology and genetic aspects*, 311-317. Ed. L.M. Monti; E. Porcedou.
98. Thomas, H. y Howarth, C. 2000. Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.* 51 (suppl 1):329-337.
99. Ucedas, E. 1996. Principales plagas y enfermedades de la papa en la sierra del Perú. Guía práctica para el agricultor. SENASA . Lima, Perú. 11-37 P.
100. Vázquez, E. 1988. Mejoramiento Genético de la Papa. Amaru Editores. Lima – Perú.
101. Versteeg, M.; Haitzma, H.; Benitez, O. y Velasquez, R. 1982. El potencial y rendimiento en papa (*Solanum tuberosum* L.) en las pampas desérticas del sur del Perú. Factores que influyen en la producción de cultivos alimenticios y forrajeros en áreas desérticas. Instituto Nacional Investigación y Promoción Agropecuaria. Arequipa, Perú. Pp 398.
102. Villagarcía, S.; Ramírez, F.; Aguirre, G.; Malagamba, P.; Medina, C. y Tomassini, L. 1990. Resultados de ensayos de campo sobre fertilización y nutrición mineral en el cultivo de papa. UNALM – CIP, Lima, Perú.
103. Werner, H. O. 1954. Influence of atmospheric and moisture conditions in diurnal variations in relative turgidity of potato leaves. *Univ. Nebraska, Coll. Agri. Exp. Res.* Bull 17

VIII. ANEXOS

1. MUESTREOS DE SUELO

Los muestreos de suelo se hicieron aplicando el método gravimétrico, se realizaron dos muestreos de suelo desde el inicio de la fase experimental y también a partir del tratamiento de sequía se realizaron dos muestreos de suelo de las parcelas (con riego y sequía). Para realizar el control de humedad del suelo se realizó una sectorización del campo experimental en 16 sectores ocho en riego normal y ocho en sequía. El muestreo de suelo se hizo con un sacabocado a una profundidad de 35 cm, se tomaron cinco submuestras por sector, se extrayendo desde el lado medio de la costilla del surco o camellón. Las muestras de suelos fueron pesadas en fresco con un aproximado de 100 g por muestra, se registró el peso fresco luego fueron colocadas en un horno a 105 °C por 24 horas, para luego determinar el peso seco. La humedad gravimétrica (Hd_g) se determinó mediante la siguiente fórmula donde es igual a la diferencia del peso húmedo (PH) y el peso seco (PS) dividido con el peso seco (PS).

$$Hd_g = (PH - PS) / PS \dots\dots\dots (Ec. 04)$$

Cuadro 47. Primer muestreo de suelo en el campo experimental antes del riego.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VR_1_3	103,4	93,4	90,8	80,1	13,9	16,6	15
VR_2_4	90,6	112,8	79,1	101,4	14,5	11,2	13
VR_5_7	114,6	93,8	99,7	82,1	14,9	14,3	15
VR_6_8	100,5	91,5	85,2	77,8	18,0	17,6	18
VS_1_3	91,6	95,9	79,5	77,6	15,2	23,6	19
VS_2_4	92,9	71,2	79,2	61,0	17,3	16,7	17
VS_5_7	93,4	90,4	81,5	80,0	14,6	13,0	14
VS_6_8	95,8	81,3	81,5	70,5	17,5	15,3	16

Cuadro 48. Primer muestreo de suelo en el campo experimental después del riego.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VR_1_3	122,0	128,3	98,4	104,7	24,0	22,5	23
VR_2_4	107,4	126,2	86,7	108,8	23,9	16,0	20
VR_5_7	136,5	134,1	116,5	117,0	17,2	14,6	16
VR_6_8	119,0	119,2	101,0	100,1	17,8	19,1	19
VS_1_3	106,2	106,1	89,0	88,6	19,3	19,8	20
VS_2_4	125,5	129,4	106,2	110,6	18,2	17,0	18
VS_5_7	123,0	122,0	100,3	98,6	22,6	23,7	23
VS_6_8	107,3	104,0	90,7	89,6	18,3	16,1	17

Cuadro 49. Segundo muestreo de suelo en el campo experimental antes del riego.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VR_1_3	103,4	93,4	90,8	80,1	13,9	16,6	15
VR_2_4	90,6	112,8	79,1	101,4	14,5	11,2	13
VR_5_7	114,6	93,8	99,7	82,1	14,9	14,3	15
VR_6_8	100,5	91,5	85,2	77,8	18,0	17,6	18
VS_1_3	91,6	95,9	79,5	77,6	15,2	23,6	19
VS_2_4	92,9	71,2	79,2	61,0	17,3	16,7	17
VS_5_7	93,4	90,4	81,5	80,0	14,6	13,0	14
VS_6_8	95,8	81,3	81,5	70,5	17,5	15,3	16

Cuadro 50. Segundo muestreo de suelo en el campo experimental después del riego.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VR_1_3	122,0	128,3	98,4	104,7	24,0	22,5	23
VR_2_4	107,4	126,2	86,7	108,8	23,9	16,0	20
VR_5_7	136,5	134,1	116,5	117,0	17,2	14,6	16
VR_6_8	119,0	119,2	101,0	100,1	17,8	19,1	19
VS_1_3	106,2	106,1	89,0	88,6	19,3	19,8	20
VS_2_4	125,5	129,4	106,2	110,6	18,2	17,0	18
VS_5_7	123,0	122,0	100,3	98,6	22,6	23,7	23
VS_6_8	107,3	104,0	90,7	89,6	18,3	16,1	17

Cuadro 51. Primer muestreo de suelo en el tratamiento de sequía.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VS_1_3	95,1	88,8	87,1	81,2	9,2	9,4	9%
VS_2_4	89,3	95,7	83,7	89,9	6,7	6,5	7%
VS_5_7	107,8	104,1	99,9	96,6	7,9	7,8	8%
VS_6_8	97,1	99,5	89,5	91,4	8,5	8,9	9%

Cuadro 52. Primer muestreo de suelo en el tratamiento de sequía.

CODIGO	PESO FRESCO (g)		PESO SECO (g)		% HUMEDAD		PROMEDIO (%)
	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (g)	Submuestra 2 (g)	Submuestra 1 (%)	Submuestra 2 (%)	
VS_1_3	91,2	81,9	83,7	74,2	9,0	10,4	10
VS_2_4	80,1	93,4	74,1	87,8	8,1	6,4	7
VS_5_7	100,4	101,3	92,9	93,4	8,1	8,5	8
VS_6_8	92,7	92,6	84,4	84,1	9,8	10,1	10



Foto 28. Sacabocado para el muestreo de suelo

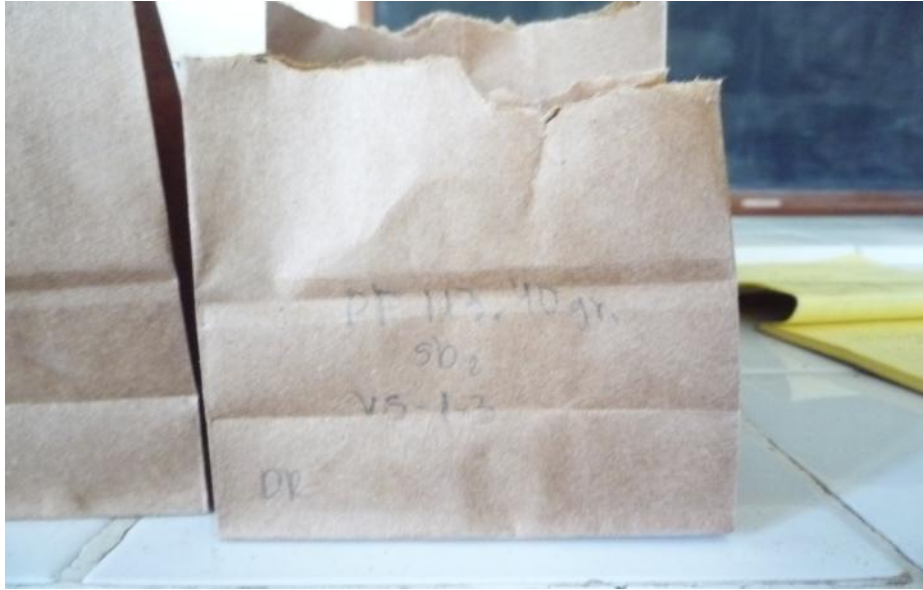


Foto 29. Muestra de suelo pesada y codificada

2. PRUEBA DE UNIFORMIDAD DE RIEGO

La prueba de uniformidad de riego se realizó para verificar que la cantidad de agua que se supone que llega al cultivo, de hecho lo esté haciendo y de esta manera evitar una uniformidad deficiente que significaría que una extensión considerable del terreno no está recibiendo la aplicación de agua adecuada. Para esto, se seleccionó una subunidad de riego (una parte del campo experimental) junto a un aspersor donde se colocaron 25 envases de plástico antes del riego distribuidos de la siguiente manera en la Figura 40 y Foto 30:

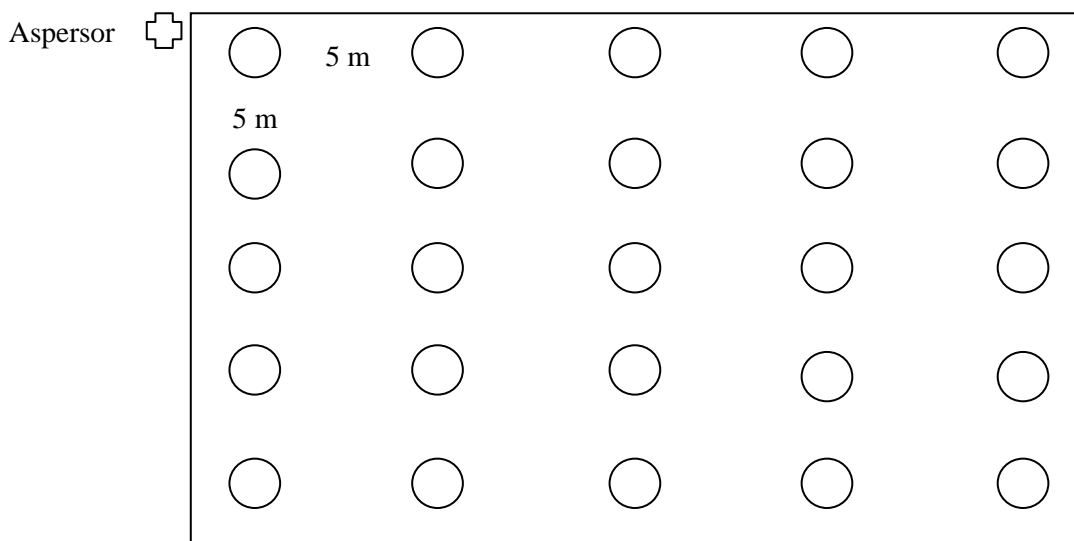


Figura 40. Esquema de la distribución de los envases en la subunidad de riego.



Foto 30. Envases de plástico distribuidos en la subunidad de riego

Se colocó los envases cada 5 m a lo largo y a lo ancho de la subunidad de riego por el campo experimental, después del riego que duraba dos horas aproximadamente se medía la cantidad de agua descargada de cada envase con unas probetas de plástico sacándose un promedio total de la cantidad de agua de los envases convirtiéndose a litros luego a milímetros. Podemos observar en el Cuadro 52 que en las tres pruebas se ha presentado uniformidad en el riego donde los valores no han presentado mucha variación.

Cuadro 53. Primera prueba de uniformidad de riego

Prueba de uniformidad de riego	Milímetros (mm)
Primera prueba	0,211
Segunda prueba	0,212
Tercera prueba	0,200

Cuadro 56. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 21 DDE y con temperatura de 22 °C, tratamiento de sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	314,09	34,90	143,0	<0,0001
Error	70	17,09	0,24		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 7,29 0,49 6,78

3.2. FOTOSINTESIS A LOS 21 DDE (DIAS DESPUES DEL ESTRES) Y CON UNA TEMPERATURA DE 30 °C

Cuadro 57. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 21 DDE y con una temperatura de 30 °C

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1344,17	149,35	1147,65	<0,0001
Tratamiento	1	6788,08	6788,08	52160,80	<0,0001
Trat x Clon	9	1602,70	178,08	1368,38	<0,0001
Error	140	18,22	0,13		
Total	159	9753,17			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 2,50 0,36 14,42

Cuadro 58. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 21 DDE y con una temperatura de 30 °C, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2438,04	270,89	2821,0	<0,0001
Error	70	6,72	0,10		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 1,48 0,31 20,93

Cuadro 59. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 21 DDE y con una temperatura de 30 °C, tratamiento de sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	508,84	56,54	344,2	<0,0001
Error	70	11,50	0,16		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 5,13 0,41 7,91

3.3. FOTOSINTESIS A LOS 36 DDE (DIAS DESPUES DEL ESTRES) Y CON UNA RADIACION DE 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Cuadro 60. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	386,85	42,98	511,8	<0,0001
Tratamiento	1	985,78	985,78	11738,4	<0,0001
Trat x Clon	9	620,33	68,93	820,7	<0,0001
Error	140	11,76	0,08		
Total	159	2004,72			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 2,35 0,29 12,34

Cuadro 61. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	800,07	88,90	1290,5	<0,0001
Error	70	4,82	0,07		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 1,77 0,26 14,82

Cuadro 62. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	207,11	23,01	232,3	<0,0001
Error	70	6,94	0,10		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 3,19 0,31 9,85

3.4. FOTOSINTESIS A LOS 36 DDE (DIAS DESPUES DEL ESTRES) Y CON UNA RADIACION DE 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Cuadro 63. Análisis de Varianza para la fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	348,77	38,75	645,4	<0,0001
Tratamiento	1	489,41	489,41	8150,8	<0,0001
Trat x Clon	9	144,96	16,11	268,2	<0,0001
Error	140	8,41	0,06		
Total	159	991,54			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 2,03 0,25 12,05

Cuadro 64. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	264,52	29,39	329,2	<0,0001
Error	70	6,25	0,09		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
2,17	0,30	13,79

Cuadro 65. Análisis de Varianza en fotosíntesis a los 36 DDE y con una radiación de 1 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	229,20	25,47	826,7	<0,0001
Error	70	2,16	0,03		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
1,70	0,18	10,30

3.5. AREA ESPECIFICA DE LA HOJA ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)

Cuadro 66. Análisis de Varianza para el área específica de la hoja a los 14 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	59443,18	6604,80	3,3	0,002
Tratamiento	1	2651,33	2651,33	1,3	0,252
Trat x Clon	9	2509,73	278,86	0,1	0,998
Error	60	119029,84	1983,83		
Total	79	183634,08			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
19,58	44,54	227,48

**Cuadro 67. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 14 DDE,
tratamiento riego normal**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	27709,45	3078,83	1,0	0,453
Error	30	91319,26	3043,98		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
23,66	55,17	233,23

**Cuadro 68. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 14 DDE,
tratamiento sequía**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	34243,47	3804,83	4,1	0,002
Error	30	27710,58	923,69		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
13,71	30,39	221,72

Cuadro 69. Análisis de Varianza para el área específica de la hoja a los 32 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	47087,40	5231,93	4,1	0,0004
Tratamiento	1	93181,73	93181,73	72,6	<0,0001
Trat x Clon	9	16771,08	1863,45	1,5	0,1875
Error	60	77067,39	1284,46		
Total	79	234107,59			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
14,31	35,84	250,49

**Cuadro 70. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 32 DDE,
tratamiento riego normal**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	28623,44	3180,38	1,5	0,18
Error	30	61970,06	2065,67		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
15,97	45,45	284,62

**Cuadro 71. Análisis de Varianza en área específica de la hoja a los 32 DDE,
tratamiento sequía**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	35235,04	3915,00	7,8	<0,0001
Error	30	15097,33	503,24		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
10,37	22,43	216,36

3.6. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (g g⁻¹)

Cuadro 72. Análisis de varianza para el contenido relativo de agua a los 14 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,063	0,007	1,7	0,115
Tratamiento	1	0,025	0,025	5,9	0,018
Trat x Clon	9	0,015	0,002	0,4	0,925
Error	60	0,251	0,004		
Total	79	0,354			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
9,02	0,06	0,72

Cuadro 73. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a los 14 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,023	0,003	0,7	0,694
Error	30	0,108	0,004		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 8,15 0,06 0,73

Cuadro 74. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a los 14 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,055	0,006	1,3	0,283
Error	30	0,143	0,005		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 9,89 0,07 0,70

Cuadro 75. Análisis de varianza para el contenido relativo de agua a los 32 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,078	0,009	1,6	0,136
Tratamiento	1	0,254	0,254	46,7	< 0,0001
Trat x Clon	9	0,032	0,004	0,7	0,745
Error	60	0,327	0,005		
Total	79	0,692			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 10,41 0,07 0,71

Cuadro 76. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a los 32 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,043	0,005	1,6	0,177
Error	30	0,092	0,003		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 7,24 0,06 0,73

Cuadro 77. Análisis de Varianza para el contenido relativo de agua a los 32 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,07	0,01	1,0	0,490
Error	30	0,23	0,01		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 13,56 0,09 0,65

3.7. REFLECTANCIA (NDVI)

Cuadro 78. Análisis de varianza para la reflectancia a los 10 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,030	0,003	4,2	< 0,0001
Tratamiento	1	0,066	0,066	81,6	< 0,0001
Trat x Clon	9	0,009	0,001	1,2	0,321
Error	140	0,114	0,001		
Total	159	0,219			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 3,32 0,03 0,86

Cuadro 82. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 15 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,0148	0,0016	1,9	0,0717
Error	70	0,0616	0,0009		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 3,39 0,03 0,87

Cuadro 83. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 15 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,0141	0,0016	1,8	0,0846
Error	70	0,0610	0,0009		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 3,57 0,03 0,83

Cuadro 84. Análisis de varianza para la reflectancia a los 21 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,20	0,02	13,9	< 0,0001
Tratamiento	1	0,36	0,36	226,5	< 0,0001
Trat x Clon	9	0,07	0,01	5,0	< 0,0001
Error	140	0,22	0,03		
Total	159	0,86			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 4,72 0,40 0,85

Cuadro 85. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 21 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,042	0,005	5,3	< 0,0001
Error	70	0,061	0,001		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 3,29 0,03 0,90

Cuadro 86. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 21 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,231	0,026	11,0	< 0,0001
Error	70	0,164	0,002		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 6,03 0,05 0,80

Cuadro 87. Análisis de varianza para la reflectancia a los 28 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,214	0,024	9,4	< 0,0001
Tratamiento	1	1,535	1,535	607,3	< 0,0001
Trat x Clon	9	0,090	0,010	4,0	0,0002
Error	140	0,354	0,003		
Total	159	2,192			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 6,31 0,05 0,80

Cuadro 88. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 28 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,022	0,002	3,6	0,001
Error	70	0,049	0,001		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 2,95 0,03 0,89

Cuadro 89. Análisis de Varianza para la reflectancia a los 28 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,281	0,031	7,2	< 0,0001
Error	70	0,305	0,004		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 9,45 0,07 0,70

3.8. CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD)

Cuadro 90. Análisis de varianza para el contenido de clorofila a los 10 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2348,89	260,99	13,7	< 0,0001
Tratamiento	1	871,42	871,42	45,8	< 0,0001
Trat x Clon	9	289,85	32,21	1,7	0,10
Error	140	2666,31	19,05		
Total	159	6176,47			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 9,23 4,36 47,27

Cuadro 91. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 10 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	950,24	105,58	6,2	< 0,0001
Error	70	1185,67	16,94		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 9,16 4,12 44,94

Cuadro 92. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 10 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1688,49	187,61	8,9	< 0,0001
Error	70	1480,64	21,15		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 9,27 4,60 49,61

Cuadro 93. Análisis de varianza para el contenido de clorofila (SPAD) a los 15 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2226,94	247,44	7,5	< 0,0001
Tratamiento	1	2504,31	2504,31	76,3	< 0,0001
Trat x Clon	9	295,32	32,81	1,0	0,443
Error	140	4595,27	32,82		
Total	159	9621,84			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 12,61 5,73 45,42

Cuadro 94. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 15 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1263,52	140,39	3,8	0,0007
Error	70	2612,58	37,32		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 14,74 6,11 41,46

Cuadro 95. Análisis de Varianza para el contenido de clorofila a los 15 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1258,74	139,86	4,9	< 0,0001
Error	70	1982,70	28,32		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 10,78 5,32 49,37

3.9. AREA FOLIAR (cm²)

Cuadro 96. Análisis de varianza para el área foliar a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	746240871,9	82915652,4	20,7	< 0,0001
Tratamiento	1	716651019,4	716651019,4	178,8	< 0,0001
Trat x Clon	9	201533440,0	22392604,4	5,6	< 0,0001
Error	60	240543196,0	4009053,0		
Total	79	1904968527,0			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 30,92 2002,26 6475,42

Cuadro 97. Análisis de Varianza para el área foliar a los 13 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	759517957,5	84390884,2	11,7	< 0,0001
Error	30	217300887,8	7243362,9		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 28,42 2691,35 9468,43

Cuadro 98. Análisis de Varianza para el área foliar a los 13 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	188256354,4	20917372,7	27,0	< 0,0001
Error	30	23242308,0	774743,6		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 25,28 880,20 3482,40

3.9. TERMOESTABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR (dS m⁻¹)

Cuadro 99. Análisis de varianza para la termoestabilidad de la membrana celular a los 32 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	3846,26	427,36	9,0	<0,0001
Tratamiento	1	2996,35	2996,35	63,3	<0,0001
Trat x Clon	9	582,02	64,67	1,4	0,22
Error	60	2841,00	47,35		
Total	79	10265,64			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 19,63 6,88 35,06

Cuadro 103. Análisis de varianza para la altura de planta a los 22 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	10842,66	1204,74	10,6	< 0,0001
Tratamiento	1	2554,93	2554,93	22,4	< 0,0001
Trat x Clon	9	1801,28	200,14	1,8	0,10
Error	60	6853,89	114,23		
Total	79	22052,76			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 20,96 10,69 50,99

Cuadro 104. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 22 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	6667,69	740,85	5,0	0,0004
Error	30	4452,89	148,43		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 21,51 12,18 56,64

Cuadro 105. Análisis de Varianza para la altura de planta a los 22 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	5976,26	664,03	8,3	< 0,0001
Error	30	2401,00	80,03		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 19,73 8,95 45,34

3.10.2. COBERTURA FOLIAR (%)

Cuadro 109. Análisis de varianza para la cobertura foliar (%) a los 51 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1394,58	154,95	7,6	< 0,0001
Tratamiento	1	74,90	74,90	3,7	0,06
Trat x Clon	9	100,11	11,12	0,6	0,84
Error	140	2850,36	20,36		
Total	159	4419,95			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 29,88 4,51 15,10

Cuadro 110. Análisis de varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	5080,12	564,46	22,9	< 0,0001
Tratamiento	1	2588,88	2588,88	104,9	< 0,0001
Trat x Clon	9	451,87	50,21	2,0	0,04
Error	60	3455,98	24,69		
Total	79	11576,84			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 25,36 4,97 19,59

Cuadro 111. Análisis de Varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	3060,46	340,05	10,8	< 0,0001
Error	70	2214,42	31,63		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 23,82 5,62 23,61

Cuadro 112. Análisis de Varianza para la cobertura foliar a los 16 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2471,52	274,61	15,5	< 0,0001
Error	70	1241,55	17,74		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 27,05 4,21 15,57

3.10.3. LONGITUD DE HOJA (cm)

Cuadro 113. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 70 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	79,56	8,84	2,2	0,066
Tratamiento	1	52,90	52,90	13,3	0,002
Trat x Clon	9	51,59	5,73	1,4	0,237
Error	20	79,61	3,98		
Total	39	263,66			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 13,98 2,00 14,28

Cuadro 114. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	138,92	15,44	2,5	0,02
Tratamiento	1	114,96	114,96	18,9	< 0,0001
Trat x Clon	9	50,34	5,59	0,9	0,51
Error	60	364,76	6,08		
Total	79	668,97			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 18,21 2,47 13,54

Cuadro 115. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	98,64	10,96	1,3	0,26
Error	30	247,22	8,24		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
19,48	2,87	14,74

Cuadro 116. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 22 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	90,62	10,07	2,6	0,03
Error	30	117,54	3,92		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
16,04	1,98	12,34

Cuadro 117. Análisis de varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	136,77	15,20	3,5	0,002
Tratamiento	1	312,84	312,84	71,0	< 0,0001
Trat x Clon	9	29,90	3,32	0,8	0,66
Error	60	264,21	4,40		
Total	79	743,72			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
16,19	2,10	12,97

Cuadro 118. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	105,83	11,76	2,4	0,04
Error	30	147,85	4,93		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
14,86	2,22	14,94

Cuadro 119. Análisis de Varianza para la longitud de hoja a los 38 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	60,85	6,76	1,7	0,12
Error	30	116,36	3,88		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
17,92	1,97	10,99

3.10.4. DIAMETRO DE TALLO (cm)

Cuadro 120. Análisis de varianza para el diámetro de tallo a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2,48	0,28	6,8	< 0,0001
Tratamiento	1	2,25	2,25	55,3	< 0,0001
Trat x Clon	9	0,55	0,06	1,5	0,17
Error	60	2,45	0,04		
Total	79	7,73			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
17,87	0,20	1,13

Cuadro 124. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 39 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2,26	0,25	4,2	0,002
Error	30	1,81	0,06		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 20,91 0,25 1,17

Cuadro 125. Análisis de Varianza para el diámetro de tallo a los 39 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	3,57	0,40	11,4	< 0,0001
Error	30	1,04	0,03		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 23,37 0,19 0,80

3.11. BIOMASA

3.11.1. PESO SECO DE HOJAS (g pta⁻¹)

Cuadro 126. Análisis de varianza para el peso seco de hojas a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	15508,70	1723,19	12,1	<0,0001
Tratamiento	1	16975,33	16975,33	119,0	<0,0001
Trat x Clon	9	2030,78	225,64	1,6	0,141
Error	60	8556,41	142,61		
Total	79	43071,23			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 29,59 11,94 40,36

Cuadro 127. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas a los 13 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	11196,22	1244,02	5,2	0,0003
Error	30	7224,09	240,80		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
28,25	15,52	54,92

Cuadro 128. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas a los 13 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	6343,26	704,81	15,9	<0,0001
Error	30	1332,32	44,41		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
25,84	6,66	25,79

3.11.2. PESO SECO DE TALLOS (g pta⁻¹)

Cuadro 129. Análisis de varianza para el peso seco de tallos a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	15196,62	1688,51	23,11	<0,0001
Tratamiento	1	8298,53	8298,53	113,6	<0,0001
Trat x Clon	9	2977,33	330,81	4,5	0,0001
Error	60	4383,16	73,05		
Total	79	30855,64			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
29,89	8,55	28,60

Cuadro 130. Análisis de Varianza para el peso seco de tallos a los 13 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	13284,17	1476,02	11,7	<0,0001
Error	30	3798,86	126,63		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 29,02 11,25 38,78

Cuadro 131. Análisis de Varianza para el peso seco de tallos a los 13 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	4889,78	543,31	27,9	<0,0001
Error	30	584,30	19,48		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 23,97 4,41 18,41

3.11.3. PESO SECO DE HOJAS Y TALLOS (g pta⁻¹)

Cuadro 132. Análisis de varianza para el peso seco de hojas y tallos a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	275319,54	30591,06	58,1	<0,0001
Tratamiento	1	88497,67	88497,67	168,1	<0,0001
Trat x Clon	9	68587,02	7620,78	14,5	<0,0001
Error	140	73717,31	526,55		
Total	159	506121,54			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 27,13 22,95 84,58

Cuadro 133. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas y tallos a los 13 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	214599,60	23844,40	36,1	<0,0001
Error	70	46258,88	660,84		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 23,78 25,71 107,54

Cuadro 134. Análisis de Varianza para el peso seco de hojas y tallos a los 13 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	140197,86	15577,54	48,0	<0,0001
Error	70	22727,91	324,68		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 28,60 18,02 63,01

3.11.4. PESO SECO DE TUBERCULOS

Cuadro 135. Análisis de varianza para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	70335,79	7815,09	13,2	<0,0001
Tratamiento	1	59905,93	59905,93	101,1	<0,0001
Trat x Clon	9	32846,26	3649,58	6,2	<0,0001
Error	60	35559,86	592,66		
Total	79	198647,84			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 25,34 24,34 96,08

Cuadro 136. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	78102,07	8678,01	9,7	<0,0001
Error	30	26736,29	891,21		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 24,18 29,85 123,44

Cuadro 137. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 13 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	25079,97	2786,66	9,5	<0,0001
Error	30	8823,58	294,12		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 24,96 17,15 68,71

Cuadro 138. Análisis de varianza para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1032831,45	114759,05	25,0	<0,0001
Tratamiento	1	2357801,92	2357801,92	512,9	<0,0001
Trat x Clon	9	831939,81	92437,76	20,1	<0,0001
Error	60	643642,86	4597,45		
Total	79	4866216,02			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 31,77 67,80 213,42

Cuadro 139. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1645307,77	182811,97	21,4	<0,0001
Error	30	597141,56	8530,59		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 27,59 92,36 334,81

Cuadro 140. Análisis de Varianza para el peso seco de tubérculos a los 39 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	219463,49	24384,83	36,7	<0,0001
Error	30	46501,30	664,30		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 28,01 25,77 92,02

3.12. RENDIMIENTO DE TUBERCULOS

Cuadro 141. Análisis de varianza para el rendimiento de tubérculos a los 47 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	5563796,3	618199,6	9,5	< 0,0001
Tratamiento	1	30440653,3	30440653,3	467,2	< 0,0001
Trat x Clon	9	2645269,1	293918,8	4,5	< 0,0001
Error	140	9122213,1	65158,7		
Total	159	47771931,7			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 27,83 255,26 917,38

Cuadro 142. Análisis de Varianza para el rendimiento de tubérculos a los 47 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	7233868,3	803763,1	7,1	<0,0001
Error	70	7890187,4	112717,0		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 24,80 335,73 1353,56

Cuadro 143. Análisis de Varianza para el rendimiento de tubérculos a los 47 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	975197,05	108355,23	6,2	< 0,0001
Error	70	1232025,75	17600,37		

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 27,57 132,67 481,20

3.13. NUMERO DE TUBERCULOS

Cuadro 144. Análisis de varianza para el número de tubérculos a los 47 DDE

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	902,62	100,29	7,1	< 0,0001
Tratamiento	1	1516,53	1516,53	106,9	< 0,0001
Trat x Clon	9	717,74	79,75	5,6	< 0,0001
Error	160	1986,57	14,19		
Total	179	5123,46			

CV (%) **Raíz del cuadrado medio del error** **Promedio**
 28,25 3,77 13,33

Cuadro 145. Análisis de Varianza para el número de tubérculos a los 47 DDE, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	1067,16	118,57	5,8	< 0,0001
Error	70	1432,31	20,46		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
27,56	4,52	16,41

Cuadro 146. Análisis de Varianza para el número de tubérculos a los 47 DDE, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	553,20	61,47	7,8	< 0,0001
Error	70	554,26	7,92		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
27,44	2,81	10,25

3.14. INDICE DE COSECHA

Cuadro 147. Análisis de varianza para el índice de cosecha

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2,88	0,320	119,3	<0,0001
Tratamiento	1	0,84	0,843	314,3	<0,0001
Trat x Clon	9	0,39	0,043	16,2	<0,0001
Error	140	0,38	0,003		
Total	159	4,49			

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
7,68	0,05	0,67

Cuadro 148. Análisis de Varianza para el índice de cosecha, tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	0,98	0,109	57,0	<0,0001
Error	70	0,13	0,002		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
5,86	0,04	0,75

Cuadro 149. Análisis de Varianza para el índice de cosecha, tratamiento sequía

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Clon	9	2,29	0,254	73,7	<0,0001
Error	70	0,24	0,003		

CV (%)	Raíz del cuadrado medio del error	Promedio
9,76	0,06	0,60

4. FOTOS



Foto 31. Campo experimental



Foto 32. Unidad experimental



Foto 33. Emergencia de las plántulas de papa



Foto 34. Medidor de fotosíntesis portátil LI-6400XT marca LI-COR



Foto 35. Cabezal del equipo de fotosíntesis con el sensor



Foto 36. Foliolos codificados en la bandeja

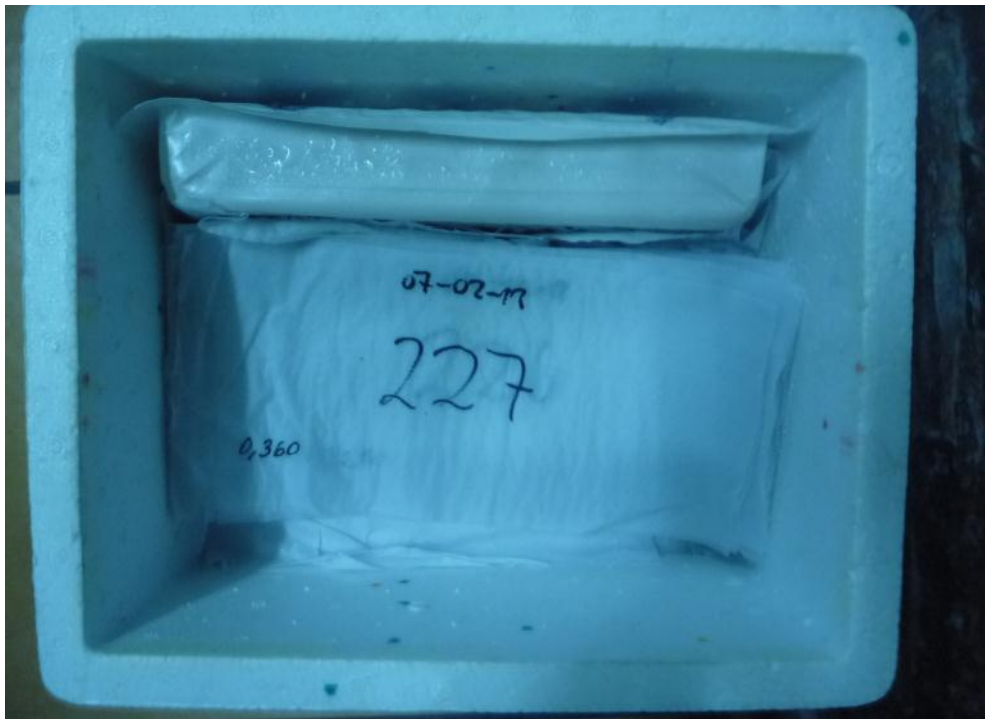


Foto 37. Foliolos colocados junto con un gel pack



Foto 38. Agua destilada para la hidratación de los folíolos



Foto 39. Triple enjuague a los discos de hoja de papa



Foto 40. Tubos de ensayo con gel pack para ser transportados



Foto 41. Tubos de ensayo colocados para realizar autoclavado.



Foto 42. Tubos de ensayo después del autoclavado



Foto 43. Lectura de la conductividad eléctrica en los tubos de ensayo



Foto 44. Evaluación de cobertura foliar.



Foto 45. Etiquetado de los clones para las evaluaciones de biometría.

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**VALIDACIÓN DEL MODELO AQUACROP EN CINCO GENOTIPOS DE TRIGO
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) CULTIVADOS EN CONDICIONES DE
DISPONIBILIDAD DE AGUA CONTRASTANTES**

POR

ALEJANDRO ANDRÉS PEÑA CORNEJO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN-CHILE
2013**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**VALIDACIÓN DEL MODELO AQUACROP EN CINCO GENOTIPOS DE TRIGO
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) CULTIVADOS EN CONDICIONES DE
DISPONIBILIDAD DE AGUA CONTRASTANTES**

POR

ALEJANDRO ANDRÉS PEÑA CORNEJO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN-CHILE
2013**

RECONOCIMIENTOS

La presente Memoria de Título forma parte del Proyecto FONTAGRO ATN/OC - 11943 “Adaptación de sistemas productivos de papa y trigo al cambio climático”; proyecto ejecutado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), el Centro Internacional de la Papa (CIP) y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Uruguay (INIA).

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	6
Resultados y Discusión.....	13
Conclusiones.....	28
Referencias.....	28
Apéndices.....	35

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Cobertura del dosel (%) simulada (línea) y observada (círculo), de cinco cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 - 2013.	20
Tabla 1	Medias de las tasas de crecimiento relativo (TCR) de tallos, hojas y espigas de siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano, en dos periodos. Periodo-I: hoja bandera - inicio de llenado de grano. Periodo-II: espigadura completa - llenado de grano.	14
Tabla 2	Medias de los componentes del rendimiento de siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.	15
Tabla 3	Análisis de correlaciones de los componentes del rendimiento y tasa de crecimiento relativo de las espigas del Periodo-II; de siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.	16
Tabla 4	Medias del contenido de clorofila (SPAD) y de la tasa de degradación de clorofilas (TDC) de siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano, entre el periodo de: espigadura completa - llenado de grano.	17
Tabla 5	Rendimiento ($t\ ha^{-1}$) e índice de sensibilidad a la sequía (DSI), de siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.	18
Tabla 6	Parámetros conservadores o constantes utilizados para ejecutar la simulación.	21

Tabla 7	Parámetros no conservadores ajustados para simular la respuesta de los cultivares Pandora-INIA, Pantera-INIA, Millán-INIA, Kipa-INIA y Qup2542-2004, al establecimiento bajo condiciones de riego y secano, en la zona centro sur de Chile.	23
Tabla 8	Medias de la biomasa aérea total (g), evaluadas en siete cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), entre el periodo de estado de hoja bandera y grano duro, bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.	24
Tabla 9	Evaluación del desempeño del modelo AquaCrop, por medio de Índices estadísticos para predecir el rendimiento de biomasa ($t\ ha^{-1}$), en cinco cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.	26
Tabla 10	Comparación del rendimiento de grano simulado y observado ($t\ ha^{-1}$) y desviación de cinco cultivares de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 - 2013.	27

VALIDACIÓN DEL MODELO AQUACROP EN CINCO GENOTIPOS DE TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM* L.) CULTIVADOS EN CONDICIONES DE DISPONIBILIDAD DE AGUA CONTRASTANTES

AQUACROP MODEL VALIDATION IN FIVE WHEAT GENOTYPE (*TRITICUM AESTIVUM* L.) CULTIVATED IN CONTRASTING WATER AVAILABILITY CONDITIONS

Palabras índice adicionales: modelo AquaCrop, modelo de cultivo, cambio climático, trigo, estrés hídrico.

RESUMEN

Los modelos de cultivos permiten estimar el comportamiento fisiológico y agronómico de cultivares modernos de trigo ante los eventuales escenarios climáticos proyectados, como consecuencia del calentamiento global. El objetivo de este estudio, fue validar el modelo AquaCrop en cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos en riego y secano en la zona centro sur de Chile. Se evaluaron los parámetros del clima, suelo y planta, además del rendimiento con sus componentes. Con esta información se calibró y evaluó el modelo. AquaCrop fue capaz de simular correctamente la cobertura del dosel, mientras que la biomasa producida fue simulada con menor precisión en ambas condiciones hídricas con un RMSE Normalizado entre 13 y 27 % y un índice-D entre 0,93 y 0,99. De los cinco cultivares solamente Pandora-INIA y Qup2542-2004 tuvieron un RMSE Normalizado menor al 20 % y un índice-D promedio de 0,98. Caso contrario sucedió con Kipa-INIA, Pantera-INIA y Millán-INIA, quienes obtuvieron un RMSE normalizado superior al 20 %, pero inferior al 30 % con un índice-D promedio de 0,96 y 0,95 para riego y secano, respectivamente. Por último, el rendimiento no presentó diferencias significativa ($P > 0,05$) entre lo observado y simulado, siendo Qup2542-2004 el de mayor rendimiento bajo condiciones de secano.

SUMMARY

Crop models allow estimating physiological and agronomic behavior of modern wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to eventual projected climate scenarios, resulting from global warming. The goal of this study was to validate the AquaCrop model in five wheat cultivars established in irrigated and dryland conditions in central southern Chile. Climate, soil and plant parameters, yield, and yield components were evaluated. This information was used to calibrate and evaluate the model. AquaCrop was able to correctly simulate canopy cover, while produced biomass was simulated with less accuracy in both water conditions, with a Normalized RMSE between 13% and 27% and an average index-D between 0.93 and 0.99. Among the five cultivars only 'Qup2542-2004' and 'Pandora-INIA' had a normalized RMSE less than 20% and an average index-D of 0.98. The opposite occurred with 'Kipa-INIA', 'Pantera-INIA' and 'Millán-INIA', which had a normalized RMSE greater than 20% but less than 30%, with an average index-D of 0.96 and 0.95 for irrigated and dryland area, respectively. Finally, observed and simulated yield performance did not differ significantly ($P > 0.05$), and 'Qup2542-2004' showed the highest performance under dryland conditions.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cereal más sembrado en Chile (Mellado, 2007) y representa el 45 % de la superficie total sembrada, con aproximadamente 238.410 ha. Así en el país se producen alrededor de 1.365.123 toneladas de grano al año (ODEPA, 2013) y dicha producción se concentra en las regiones del Bío-Bío y de la Araucanía, las cuales agrupan el 73,4 % de la superficie sembrada (González y Foster, 2010). Este cereal se cultiva a lo largo de todo el país (González y Foster, 2010) tanto en riego como en seco (Opazo, 2002). El rendimiento de grano en áreas de riego puede ser cercano al potencial del cultivo (130 Qq ha⁻¹; INIA, 2011, 2012), mientras que en zonas de seco la concentración de las precipitaciones en meses invernales, provoca una escasa humedad en los periodos de crecimiento y llenado de grano (Opazo, 2002); reduciendo así el rendimiento de grano a un potencial de 52 Qq ha⁻¹ (INIA, 2011,

2012). A pesar de lo señalado, el 78,5 % de las explotaciones de trigo en el país se encuentran en áreas de secano (González y Foster, 2010).

Actualmente, existe incertidumbre con respecto a como el clima puede cambiar en el futuro, producto del calentamiento global. En este contexto, la modificación de los parámetros climáticos afectaría inevitablemente la producción agrícola, a pesar que estos efectos pueden variar según la región (Mearns *et al.*, 1997). En Chile, los efectos del cambio climático son complejos, debido a la amplia diversidad geográfica y topográfica existente. En la zona centro sur entre los 37° y 40° S, las temperaturas y las precipitaciones serán las variables más afectadas por el cambio climático (Quintana y Aceituno, 2006; Universidad de Chile, 2006). En esta área, el aumento de las temperaturas se estima entre 1 y 4 °C hacia el año 2100 bajo escenarios de moderada y severa emisiones de gases. Además se reducirían las precipitaciones esperadas en un 25 % en primavera y un 40 % en verano, mientras que en otoño e invierno se mantendrían relativamente constantes (Universidad de Chile, 2006; CEPAL, 2012). Sin duda que estas modificaciones tendrán un impacto sobre los sistemas de producción de cultivos que imperan en Chile (Lizana y Calderini, 2013). Producto de esto, la agricultura necesita adaptarse a dichos cambios para asegurar tanto la producción de alimento como la cadena alimentaria del país y así la supervivencia humana. En este escenario, el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ha desarrollado por más de 50 años cultivares de alto rendimiento potencial con capacidad de adaptación a los diversos ambientes donde se desarrolla el cultivo. Por consiguiente, hoy es relevante conocer el comportamiento fisiológico y agronómico de cultivares modernos ante los eventuales escenarios climáticos proyectados, como consecuencia del calentamiento global. En este sentido, los modelos de simulación de cultivos permiten estimar el impacto del cambio climático en la agricultura, posibilitando el desarrollo de estrategias de mitigación y adaptación (Asseng *et al.*, 2009); además, de generar información para la orientación de los criterios de selección en programas de fitomejoramiento.

Los modelos de cultivos se definen como una simplificación o abstracción de

un sistema real (Hernández *et al.*, 2009; Steduto *et al.*, 2009), que mediante un esquema cuantitativo integrado por variables que caracterizan un ambiente de crecimiento y la fisiología del desarrollo de una especie, permiten la predicción del crecimiento, desarrollo y rendimiento de un cultivo (Monteith, 1996). Dichos modelos, según Link (2005), pueden categorizarse en empíricos, mecánicos y funcionales o de procesos. Los empíricos explican de un modo simple el comportamiento de un cultivo, por lo que son considerados descriptivos (Villegas *et al.*, 2004; Link, 2005; Hernández *et al.*, 2009). El inconveniente de este tipo de modelos es que ignora el funcionamiento fisiológico y no muestra validez en ambientes desiguales al original (Hernández *et al.*, 2009). Por el contrario, los modelos mecanicistas son capaces de reconocer el efecto de múltiples procesos de un cultivo, provocados por los cambios en la condición ambiental o genética (Fletcher *et al.*, 2009). También son capaces de extrapolar los resultados en una amplia gama de ambientes. Por último, los modelos funcionales son herramientas de gestión, que incorporan enfoques simples que describen procesos complejos, sin depender de un gran número de parámetros (Link, 2005).

Desde finales de 1960 se comenzó a integrar los conocimientos fisiológicos en modelos de simulación de cultivos (Steduto *et al.*, 2009). Brouwer y de Witt (1968) desarrollaron los primeros modelos de crecimiento de cultivos. Posteriormente, en la década de los 80 se desarrollaron modelos de crecimiento para los cultivos de maíz, soja, trigo y arroz, incluidos en el paquete DSSAT (sistema de apoyo para las decisiones de transferencia agrotecnológica). En los años 90 y con la ayuda de la informática se logró una mayor participación de los modelos en el estudio y resolución de problemas específicos como el desarrollo y crecimiento de los cultivos, evaluación de respuestas a la fertilización, estrategias de riego, situaciones de estrés, pérdidas por erosión, lixiviación de pesticidas, contaminación del ambiente y calentamiento global, entre otros (Hernández *et al.*, 2009). Actualmente existen muchos paquetes computacionales que permiten modelar el crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos. Estos difieren en su escala de trabajo. Por ejemplo, el modelo-CERES trabaja a nivel de planta individual, mientras que otros como EPIC, ALMANAC y CropSyst, trabajan a nivel

de canopia (Steduto *et al.*, 2009). También se categorizan según su especificidad en modelos-genéricos (APSIM, CropSyst, DSSAT, EPIC y STICS) y modelos específicos que se especializan en sólo un cultivo. Ejemplos de éstos son los modelos AFRCWHEATZ, CERES-WHEAT, NWHEAT, SIRIUS y SOILN para trigo (Semenov *et al.*, 1996). La gran mayoría de estos modelo demandan habilidades para su calibración y operación porque requieren un número grande de parámetros, algunos específicos para los cultivares; complicando su adopción por los agricultores o usuarios finales (Flores-Gallardo *et al.*, 2013).

AquaCrop es un modelo de tipo mecanicista que trabaja a escala de cultivo (canopia), diferenciándose de otros modelos por su simplicidad de implementación, producto del número reducido de parámetros en comparación con otros modelos (Flores-Gallardo *et al.*, 2013). Fue desarrollado por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO) (Steduto *et al.*, 2009). El modelo AquaCrop simula la producción de biomasa y rendimiento de un cultivo a partir del balance hídrico cuantificado en el conjunto suelo-planta-atmosfera (Steduto *et al.*, 2009; Andarzian *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2011). El agua transpirada se convierte diariamente en biomasa usando la evapotranspiración de referencia (ET_0) y la productividad de agua normalizada ($WP=g$ biomasa/g agua transpirada). La partición de biomasa se simula por medio de un índice de cosecha dinámico, el cual aumenta o disminuye según la disponibilidad de agua en el sistema (Hussein *et al.*, 2011).

El proceso que permite definir a un modelo de cultivo como herramienta de decisión se compone por una fase de calibración y otra de validación (Andarzian *et al.*, 2011). La primera, realiza una modificación parcial o total de los coeficientes genéticos del cultivo en el modelo, con el fin de ajustar la relación entre los datos observados empíricamente y los simulados por el modelo (Andarzian *et al.*, 2011). La validación es el proceso que se realiza para determinar si el modelo predice correctamente o no el comportamiento del sistema real (Comerma *et al.*, 1985). AquaCrop ha sido utilizado en maíz (*Zea mays* L.) (Heng *et al.*, 2009; Hsiao *et al.*, 2009), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Farahani *et al.*, 2009; García-Vila *et al.*, 2009; Hussein *et al.*, 2011), girasol (*Helianthus annuus* L.) (Todorovic *et al.*, 2009),

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) (Geerts y Raes, 2009) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Andarzian *et al.*, 2011), bajo diferentes condiciones ambientales, demostrando que el modelo puede simular con precisión la biomasa del cultivo y el rendimiento. Dado los antecedentes antes expuestos, el presente trabajo tuvo como objetivo validar el modelo AquaCrop en cinco genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.), cultivados en dos condiciones hídricas contrastantes, en la zona centro sur de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ambiente de crecimiento, manejo agronómico y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo durante la temporada 2012 - 2013 en el Campo Experimental Santa Rosa del Centro Regional de Investigaciones Quilamapu, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), el cual se encuentra ubicado en la comuna de Chillán (36°31' S, 71°54' O y 220 m.s.n.m.). En esta localidad predomina el clima mediterráneo, con precipitaciones anuales de 1000 a 1200 mm y una evapotranspiración que puede variar entre 860 y 1000 mm (Del Pozo y Del Canto, 1999). Se establecieron siete genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.), de los cuales tres correspondieron a líneas avanzadas (Qup2542-2004, Qup2405-2006 y Qup2540-2004) y cuatro fueron cultivares comerciales (Pantera-INIA, Pandora-INIA, Kipa-INIA y Millán-INIA). Todos desarrollados por el Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Trigo de INIA Chile.

En el ensayo se establecieron dos experimentos en paralelo, uno bajo condiciones de riego y otro bajo condiciones de secano. Ambos fueron sembrados el 31 de agosto del 2012, en parcelas de cuatro metros de longitud, con cinco surcos separados a 0,20 m. La dosis de semilla fue de 200 kg ha⁻¹. Al momento de la siembra, según previo análisis de suelo se aplicaron 260 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico, 90 kg ha⁻¹ de muriato de potasio, 200 kg ha⁻¹ de sulpomag, 10 kg ha⁻¹ de boronatrocalcita y 3 kg ha⁻¹ de sulfato de zinc; posteriormente, al estado de macolla se aplicaron 340 kg ha⁻¹ de urea. En pre emergencia, las malezas gramíneas y de hoja ancha fueron controladas con 800 cc ha⁻¹ de Bacara Forte® (i.a fluenacet + flurtamone + diflufenican). Luego, al término del periodo de macolla

(Feekes 3.0) se controlaron con 300 g 200 L ha⁻¹ de Hussar ® (i.a iodosulfuron metil sodio).

El riego se aplicó por tendido de acuerdo a la demanda del cultivo en tres ocasiones durante la temporada de crecimiento. En condiciones de secano el riego fue suprimido por completo. Para evitar el efecto del riego en condiciones de secano se estableció una zanja de 0,6 m de ancho y 0,5 m de profundidad entre ambos experimentos.

Cada experimento se organizó con un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones.

Evaluaciones

Parámetros del clima

Durante toda la temporada de crecimiento del cultivo, se registró la temperatura mínima y máxima diaria (°C), humedad relativa horaria (%), radiación total (W m⁻²), precipitación acumulada diaria (mm día⁻¹) y velocidad del viento promedio diaria (m s⁻¹). Todos los datos meteorológicos fueron descargados de la Red Agrometeorológica de INIA (Agromet.inia.cl).

Parámetros del suelo

Una vez establecido el ensayo, con un barreno se extrajeron muestras de suelo a cuatro profundidades (0 - 30, 30 - 60, 60 - 90 y 90 - 120 cm), en cuatro sectores; dos en condiciones de riego y dos en condiciones de secano. Con dichas muestras se evaluó la textura del suelo, capacidad de campo (CC) y punto de marchitez permanente (PMP). También se construyó una calicata en donde se determinó la densidad aparente (Da), recolectando cuatro muestras de suelo con el método del cilindro a las profundidades señaladas anteriormente. A estas profundidades, además se evaluó el contenido de humedad del suelo antes y después del riego, con sensores de capacitancia (EC-5, Decagon) en ambas condiciones hídricas. Finalmente, se determinó el contenido de nitrógeno del suelo al establecimiento y antesis (Feekes 10.5.1) extrayendo dos muestras por condición hídrica a tres profundidades (0 - 30, 30 - 60 y 60 - 90 cm).

Parámetros de la planta

Una vez establecido el cultivo, se registró la fecha de siembra, emergencia del 90

% de las plantas y N° de plantas por metro cuadrado. Posteriormente, en los estados de hoja bandera visible (Feekes 8.0), bota (Feekes 10.0), espigadura completa (Feekes 10.5) y grano lechoso (Feekes 11.1), se cosecharon de forma manual muestras de 0,24 m². A partir de estas muestras se seleccionaron 10 tallos. A cada tallo se le extrajo las hojas y con éstas se determinó el área foliar (AF; Area Meter MK2) y el peso seco, lo que permitió estimar el índice de área foliar (IAF). Durante todo el periodo de crecimiento, el IAF se utilizó como un criterio de cobertura. Complementario a esto, se determinó el peso seco de todos los órganos del resto de las muestras de 0,24 m² (tallos, hojas y espigas) mediante secado en horno de aire forzado a 65 °C hasta alcanzar peso constante. Una vez obtenido el peso seco de todos los órganos, se procedió al cálculo de la tasa de crecimiento relativa (TCR) en dos periodos. El Periodo-I correspondió desde la aparición de la hoja bandera (Feekes 8.0) hasta inicio de floración (Feekes 10.5.1), mientras que el Periodo-II fue desde espigadura completa (Feekes 10.5) hasta madurez de cosecha (Feekes 11.4). La TCR se definió como el parámetro (r) en la siguiente ecuación.

$$W_2 = W_1 e^{r(t_2 - t_1)} \quad [1]$$

Donde W_1 y W_2 son el peso seco de la planta en el tiempo t_1 y t_2 , respectivamente. Modificando los términos en la ecuación 1 se pudo obtener la aproximación de la TCR (Hunt, 1990).

$$TCR = r = \frac{\ln(W_2) - \ln(W_1)}{t_2 - t_1} \quad [2]$$

A partir de la aparición de la hoja bandera hasta grano lechoso se registró, en tres oportunidades (78, 98 y 119 días después de la siembra; DDS) el contenido de clorofila de cinco hojas banderas plenamente expandidas. Éstas fueron medidas con el equipo SPAD 502 Minolta en la porción central de la lámina. También, se determinó la tasa de degradación de la clorofila (TDC) a partir de la ecuación 3, donde C_1 y C_2 son el contenido de clorofila de la hoja bandera en el tiempo t_1 y t_2 , respectivamente.

$$TDC = \frac{(C_2) - (C_1)}{t_2 - t_1} \quad [3]$$

Por otro lado, se registró la fecha y duración de las etapas de floración, senescencia y madurez. La senescencia se registró cuando el contenido de clorofila de la hoja bandera comenzó a disminuir, en cambio la floración y madurez fue según escala de Feekes. Una vez alcanzado la madurez de cosecha se procedió a recolectar las cuatro hileras centrales de cada parcela que constaron de 1,5 m de longitud. A partir de ellas se determinó el rendimiento de grano (RG) con una trilladora estacionaria, antes del proceso de cosecha. Se recolectaron manualmente 25 espigas por parcela, con las que se determinó los componentes del rendimiento: número de granos por espiga (NG / Esp), número de granos por metro cuadrado (NG / m²), peso de mil granos (PMG), número de espiguillas por espiga (E / Esp), número de flores por espiguilla (FPE) y número de espigas por metro cuadrado (Esp / m²). El Esp / m² se determinó a través de una proporción matemática entre el número de espigas de la última colecta de 0,24 m² por parcela. En cambio, el NG / m² se contabilizó de acuerdo al NG / Esp y Esp / m², por parcela.

Después de haber determinado el RG para cada cultivar y en cada ambiente hídrico, se realizó el análisis de sensibilidad a la sequía (DSI) propuesto por Fisher y Maurer (1978) con la siguiente ecuación.

$$DSI = \frac{\left[1 - \left(\frac{Y_d}{Y_p}\right)\right]}{D} \quad [4]$$

Donde Y_d corresponde al RG obtenido en condiciones de estrés hídrico, Y_p es el RG obtenido en condiciones sin limitaciones de agua y D es el índice de intensidad del estrés ambiental (Ec.5).

$$D = 1 - \left(\frac{XY_d}{XY_p}\right) \quad [5]$$

Donde XY_d y XY_p son la media del RG de todos los cultivares en ambientes de estrés y sin estrés, respectivamente.

Descripción del modelo de simulación de cultivo

El modelo utilizado en este estudio fue AquaCrop versión 4.0. AquaCrop está estructurado por el suelo, con su balance hídrico; el cultivo, con su crecimiento, desarrollo y rendimiento; el ambiente, con su régimen térmico, precipitaciones, demanda evaporativa y concentración de CO₂, y el manejo agronómico, con las prácticas de riego y fertilización; sin embargo no considera control de plagas y enfermedades (Steduto *et al.*, 2009). AquaCrop se basa en los principios expuestos en 1979 por Doorenbos y Kassam, en donde el rendimiento de los cultivos está en función de la evapotranspiración (Ngetich *et al.*, 2012). Una de las principales características del modelo es la simulación de la cobertura del dosel (CD; ecuación 6 y 7) en lugar del IAF, como base para el cálculo de la transpiración (Andarzian *et al.*, 2011). El modelo AquaCrop simula el crecimiento del dosel asumiendo dos casos. El primero es el crecimiento tipo exponencial que se presenta para la condición $CD \leq \frac{CD_x}{2}$ con la ecuación 6; y la senescencia exponencial para la condición $CD > \frac{CD_x}{2}$ con la ecuación 7 (Steduto *et al.*, 2009; Flores-Gallardo *et al.*, 2013).

$$CD = CD_0 e^{tCGC} \quad \text{para } CD \leq \frac{CD_x}{2} \quad [6]$$

$$CD = CD_x - 0.25 \frac{(CD_x)^2}{CD_0} e^{-tCGC} \quad \text{para } CD > \frac{CD_x}{2} \quad [7]$$

Donde CD₀ es la cobertura inicial del dosel (t=0), CD_x es la cobertura máxima del dosel, CGC es el coeficiente de crecimiento del dosel por unidad de tiempo. El modelo AquaCrop ajusta el CD con respecto a la densidad de plantas ha⁻¹ (Steduto *et al.*, 2009; Flores-Gallardo *et al.*, 2013). Cuando se carece de la cobertura vegetal requerida por AquaCrop se estima con los datos de índice de área foliar (IAF), a partir de la ecuación 8 desarrollada para cultivares de invierno de *Triticum aestivum* L. (Nielsen *et al.*, 2012).

$$CD = 94.00 [1 - \exp(-0.43 \text{ IAF})]^{0.52} \quad [8]$$

El modelo AquaCrop separa los componentes de la evapotranspiración

(evaporación del suelo (E) + transpiración del cultivo (T_r); Steduto *et al.*, 2009; Ngetich *et al.*, 2012) para simular el crecimiento de los cultivos mediante la ecuación 9, la que representa el motor de crecimiento del modelo AquaCrop (Steduto *et al.*, 2009).

$$B = WP \times \sum T_r \quad [9]$$

Donde WP es la productividad del agua normalizada (Ec. 10) y corresponde a la biomasa producida (B) por unidad de agua transpirada (T_r), esta tiende a ser constante para una condición climática dada, Convirtiéndose en un parámetro conservador dentro del modelo (Steduto *et al.*, 2009).

$$WP = \left[\frac{B}{\sum \left(\frac{T_r}{ET_o} \right)} \right]_{[CO_2]} \quad [10]$$

Por otro lado, el RG se deriva de la multiplicación de B y el índice de cosecha (H_i) a partir de la ecuación 11 (Flores-Gallardo *et al.*, 2013).

$$RG = B \times H_i \quad [11]$$

La producción de biomasa y de grano depende de la respuesta del cultivo al estrés hídrico. Dicha respuesta se expresa en el crecimiento y senescencia del dosel, la tasa de transpiración e H_i (Steduto *et al.*, 2009; Andarzian *et al.*, 2011; Ngetich *et al.*, 2012). El H_i se puede modificar negativa o positivamente, dependiendo del grado, momento y duración del estrés (Andarzian *et al.*, 2011).

Estimación de la evapotranspiración de referencia (ET_o)

Este cálculo se realizó con el software ET_o calculator, desarrollado por la división de tierras y aguas de la FAO. Este software determinó la evapotranspiración de referencia (ET_o), a partir de los datos meteorológicos, según la ecuación de FAO Penman-Monteith (Raes, 2012b).

Calibración y validación del modelo

Para la calibración del modelo se utilizaron los datos del cultivar con menor DSI del experimento desarrollado en la temporada 2012 - 2013 bajo condiciones hídricas contrastantes. También, se usaron los datos meteorológicos de la

estación del campo Experimental Santa Rosa. Los datos de entrada se observan en la Tabla 6 y 7. En la Tabla 6 se describen los parámetros conservadores o constantes. Éstos fueron elegidos de acuerdo a lo sugerido por el manual de AquaCrop (Raes *et al.*, 2012a). Por otro lado, no fue considerado la fertilización como un factor limitante durante la simulación. Una vez calibrado el modelo, se procedió a su validación en cinco cultivares de trigo. El modelo se validó comparando los datos observados en campo y las salidas simuladas por el modelo. Los datos observados y simulados utilizados fueron: la biomasa aérea (Ba) y el RG de cada uno de los cinco cultivares, establecidos en condición hídrica contrastantes.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza combinado de los ambientes hídricos mediante un modelo general lineal (proc GLM en SAS; Fox *et al.*, 1997), para determinar los efectos de la condición hídrica, de los cultivares y de la interacción cultivar x ambiente. También se utilizó el test DMS (diferencia mínima significativa), para detectar si existieron diferencias entre las condiciones hídricas. Para realizar estos análisis se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

Para evaluar el modelo se utilizó la raíz del cuadrado medio del error normalizado (RMSE) (Ec.12), el índice de concordancia (D-índice) (Ec.13) y la Prueba t student. Este último análisis se realizó para comparar el RG observado y simulado, a través del programa de Microsoft Excel 2013. Por otro lado, el RMSE normalizado se utilizó para determinar una media en porcentaje de la diferencia relativa de los datos simulados, en comparación con los datos observados, a partir de la ecuación 12, en donde P_i y O_i representaron los valores simulados y observados, respectivamente y M fue la media de la variable observada.

$$RMSE = \left[\sum_{i=1}^n \frac{(P_i - O_i)^2}{n} \right]^{0.5} \times \frac{100}{M} \quad [12]$$

Los resultados de la simulación fueron considerados como excelentes solo si el RMSE normalizado era menor a 10 %. Por otro lado, si el RMSE normalizado era mayor a 10 %, pero menor a 20 % se consideró la simulación como buena, en

cambio sí era mayor a 20 % y menor a 30 % se consideró aceptable. Por último fue considerado una simulación deficiente solo cuando sobrepaso el 30 %.

El índice de concordancia (índex-D) propuesto por Willmott *et al.* (1985), se estimó de acuerdo al estadístico d. Si dicho índice es cercano a uno, mejor será la comparación entre las dos variables (simulada y observada). En la ecuación 13, n representó el número de observaciones, P_i fue la observación estimada, O_i fue la observación medida, $P'_i = P_i - M$ y $O'_i = O_i - M$ (M fue la media de la variable observada).

$$d = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{\sum_{i=1}^n (|P'_i| + |O'_i|)^2} \right] \quad [13]$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la condición hídrica sobre el crecimiento del cultivo

En este experimento, la condición hídrica del suelo ocasionó una reducción significativa ($P \leq 0,05$) en la tasa de crecimiento relativa (TCR) de tallos, hojas y espigas evaluadas en el Periodo-I de crecimiento. En este periodo, la TCR de tallos, hojas y espigas se redujo en un 15,68, 52,63 y 9,72 % bajo la condición de secano relativo a riego. En el Periodo-II la condición hídrica no afectó la TCR de tallos y hojas ($P > 0,05$), pero sí la de espigas ($P \leq 0,05$; Tabla 1). Ésta última se redujo un 19,23 % bajo condiciones de secano relativo a riego. Durante el Periodo-II, el crecimiento de tallos y hojas se detuvo mostrando valores negativos de TCR (Tabla 1). En este periodo, la espiga fue el único órgano que mostró crecimiento, pero con valores de TCR casi tres veces menor a los observados en el Periodo-I (Tabla 1). Los cambios que se produjeron en la TCR de los órganos (tallos, hojas y espigas) con el avance de la fenología son normales en cultivos anuales (Davidson y Campbell, 1984). En trigo, dichos cambios obedecen a mecanismos de partición de la biomasa (Kalapos *et al.*, 1996), por lo que la reducción de la TCR de tallos y hojas se asocia a un aumento de la asignación de biomasa hacia las espigas. De acuerdo al análisis de varianza combinado, las diferencias entre los cultivares fueron significativas ($P \leq 0,05$), para la TCR de tallos y espigas del Periodo-I y sólo para la TCR de espigas del Periodo-II (Tabla 1). El cultivar

Qup2542-2004 obtuvo la mayor TCR de espigas ($0,028 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) del Periodo-II, en cambio, Millán-INIA fue el cultivar con menor TCR de espigas ($0,0180 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Tabla 1); confirmando una correlación significativa ($P \leq 0,05$) entre la TCR de espigas del Periodo-II con el RG y NG/m^2 (Tabla 3). Además, cabe mencionar que no se encontró interacción entre los cultivares y condición hídrica del suelo en todas las TCR evaluadas ($P > 0,05$).

Tabla 1. Medias de las tasas de crecimiento relativo (TCR) de tallos, hojas y espigas de siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano, en dos periodos. Periodo-I: hoja bandera - inicio de llenado de grano. Periodo-II: espigadura completa - llenado de grano.

Cultivares	TCR ($\text{g g}^{-1} \text{ día}$) periodo-I			TCR ($\text{g g}^{-1} \text{ día}$) periodo-II		
	Tallos	Hojas	Espigas	Tallos	Hojas	Espigas
Kipa-INIA	0,049 ab	0,015 a	0,075 a	-0,011 a	-0,011 a	0,024 ab
Millán-INIA	0,046 ab	0,015 a	0,072 ab	-0,014 a	-0,014 a	0,018 b
Pandora-INIA	0,050 a	0,017 a	0,059 b	-0,009 a	-0,009 a	0,025 ab
Pantera-INIA	0,050 a	0,015 a	0,075 a	-0,014 a	-0,014 a	0,021 ab
QUP2405-2006	0,045 ab	0,012 a	0,067 ab	-0,009 a	-0,010 a	0,022 ab
QUP2540-2004	0,041 b	0,014 a	0,070 ab	-0,009 a	-0,009 a	0,024 ab
QUP2542-2004	0,048 ab	0,010 a	0,064 ab	-0,008 a	-0,009 a	0,028 a
Condición hídrica						
Riego	0,051 a	0,019 a	0,072 a	-0,010 a	-0,011 a	0,026 a
Secano	0,043 b	0,009 b	0,065 b	-0,011 a	-0,011 a	0,021 b

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes entre sí (DMS 0.05).

Efecto de la condición hídrica sobre el rendimiento y sus componentes

El RG y sus componentes: NG / Esp , Esp / m^2 y NG / m^2 fueron afectados significativamente por la condición hídrica del suelo ($P \leq 0,05$). Por otro lado, el FPE, PMG y E / Esp no fueron afectados significativamente por la condición hídrica del suelo ($P > 0,05$; Tabla 2). Además, ninguna de estas variables mostró interacción significativa ($P > 0,05$) entre cultivares y condición hídrica del suelo.

El RG se redujo un 21,2 % bajo condiciones de secano relativo a la condición de riego. Los componentes con mayor influencia sobre el RG fueron NG / m^2

($r=0,90$; $P \leq 0,05$) y NG / Esp ($r=0,78$; $P \leq 0,05$) (Tabla 3). Tanto el NG / m², Esp / m², como el NG / Esp fueron fuertemente afectados por la condición hídrica del suelo, mostrando una reducción del 30,69, 16,14 y 16,67 % bajo condiciones de secano relativa a la condición de riego (Tabla 2), respectivamente. Algunos autores, reportan que un estrés hídrico después del periodo de antesis reduce la tasa de llenado de grano, lo que resulta en la reducción del PMG (Shamsi *et al.*, 2011). Los resultados de este trabajo difieren de lo citado anteriormente, debido a que bajo condiciones de sequía el PMG de los cultivares estudiados no fue alterado (Tabla 2). Sin embargo, concuerdan con lo informado en Adhikary *et al.* (2009) y Shamsi *et al.* (2011) quienes plantean que un incremento del RG depende en gran medida del aumento en el número de granos, siendo éste un componente del rendimiento de mayor importancia que el PMG.

Tabla 2. Medias de los componentes del rendimiento de siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.

Cultivares	FPE	E / Esp	NG / Esp	Esp / m ²	NG / m ²	PMG	RG
Kipa-INIA	3 abc	18 b	58 a	336 c	19674 ab	53,6 c	8,09 ab
Millán-INIA	3 c	16 d	37 e	327 c	12366 c	62,1 a	5,93 c
Pandora-INIA	4 ab	16 cd	52 bc	342 c	17741 b	57,1 b	7,19 b
Pantera-INIA	4 ab	16 cd	52 bc	367 bc	18985 ab	55,1 c	7,71 ab
QUP2405-2006	4 ab	15 d	49 dc	426 a	20740 ab	47,5 e	7,41 ab
QUP2540-2004	3 bc	18 bc	46 dc	410 ab	18939 ab	54,7 c	8,02 ab
QUP2542-2004	3 bc	20 a	53 ab	425 a	22761 a	51,0 d	8,41 a
Condición hídrica							
Riego	4a	17 a	54 a	409 a	22141 a	54,1 a	8,43 a
Secano	3a	17 a	45 b	343 b	15346 b	54,8 a	6,64 b

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes entre sí (DMS 0.05). FPE: número de flores por espiguilla; E / Esp: número de espiguillas por espiga; NG / Esp: número de granos por espiga; Esp / m²: número de espigas por metro cuadrado; NG / m²: número de granos por metro cuadrado; PMG: Peso 1000 granos (g); GR: Rendimiento (t ha⁻¹).

Por otro lado, el RG y sus componentes, mostraron diferencias significativas entre cultivares ($P \leq 0,05$; Tabla 2). El cultivar Qup2542-2004, logró el mayor RG, mientras que Millán-INIA el menor (Tabla 2). El mayor RG del cultivar Qup2542-

2004 se debió a su alto NG / m² y bajo PMG. Comportamiento contrario mostró Millán-INIA (Tabla 2).

Tabla 3. Análisis de correlaciones de los componentes del rendimiento y tasa de crecimiento relativo de las espigas del Periodo-II; de siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.

Variables	FPE	E / Esp	NG / Esp	Esp / m ²	NG / m ²	PMG	TCR-II	RG
FPE	1,00	-0,72	0,20	0,05	0,16	-0,25	-0,14	-0,11
E/Esp	-0,72	1,00	0,35	0,29	0,45	-0,17	0,73	0,67
NG/Esp	0,20	0,35	1,00	0,11	0,76	-0,57	0,67	0,79
Esp/m ²	0,05	0,29	0,11	1,00	0,73	-0,79	0,46	0,56
NG/m ²	0,16	0,45	0,76	0,73	1,00	-0,90	0,77	0,90
PMG	-0,25	-0,17	-0,57	-0,79	-0,90	1,00	-0,51	-0,69
TCR-II	-0,14	0,73	0,67	0,46	0,77	-0,51	1,00	0,80
RG	-0,11	0,67	0,79	0,56	0,90	-0,69	0,80	1,00

En negrita, valores significativos al umbral alfa=0.050. FPE: número de flores por espiguilla; E / Esp: número de espiguillas por espiga; NG / Esp: número de granos por espiga; Esp / m²: número de espigas por metro cuadrado; NG / m²: número de granos por metro cuadrado; PMG: Peso 1000 granos (g); GR: Rendimiento (t ha⁻¹).

Contenido de clorofila en la hoja (SPAD)

El contenido de clorofila cambia a través de la temporada de crecimiento del cultivo y comienza a declinar con el inicio de la senescencia de la planta (Matile *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2012). Bajo condiciones de sequía, una mayor duración del área foliar (stay green) ha sido asociada a una mayor tolerancia a sequía y en consecuencia a cultivares más productivos (Guinta *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2008). En todas las fechas de muestreo, los valores de SPAD fueron significativamente menores bajo condiciones de secano que en riego (Tabla 4), lo que coincide con resultados reportados por Ganji *et al.* (2012). Tanto en riego como en secano, el SPAD incrementó hasta los 98 DDS, luego mostró una fuerte caída, la que se acentuó bajo condiciones de secano (Tabla 4). Esto se debió al estrés hídrico, que en el periodo de llenado de granos induce una rápida senescencia en el trigo (Li *et al.*, 2012). La tasa de degradación de las clorofilas (TDC) se determinó como la pendiente de la relación entre el SPAD y el periodo de muestreo (98 y 119 DDS;

Tabla 4). Los resultados muestran que la TDC fue casi cinco veces mayor en condiciones de secano que en riego. Además, los cultivares con la menor y mayor TDC fueron los que obtuvieron la mayor y menor producción de MS, estos fueron: Qup2542-2004 y Millán-INIA, respectivamente.

Tabla 4. Medias del contenido de clorofila (SPAD) y de la tasa de degradación de clorofilas (TDC) de siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano, entre el periodo de: espigadura completa - llenado de grano.

Cultivares	SPAD(78)	SPAD(98)	SPAD(119)	TDC
Kipa-INIA	55,125 a	55,838 a	34,425 ab	0,0303 ab
Millán-INIA	48,800 c	50,438 b	25,088 b	0,0538 b
Pandora-INIA	53,913 ab	56,138 a	26,088 b	0,0441 ab
Pantera-INIA	54,663 a	55,400 a	26,875 b	0,0400 ab
QUP2405-2006	51,325 bc	53,325 ab	34,300 ab	0,0226 ab
QUP2540-2004	51,813 b	53,463 ab	27,913 b	0,0356 ab
QUP2542-2004	53,925 ab	53,675 ab	44,625 a	0,0088 a
Condición hídrica				
Riego	53,621 a	55,071 a	43,375 a	0,0116 a
Secano	51,968 b	53,007 b	19,286 b	0,0556 b

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes entre sí (DMS 0,05).

Selección de cultivares tolerantes a la sequía (DSI)

Se consideró tolerante al estrés hídrico el cultivar con un DSI < 1, mientras que con un DSI > 1 fue considerado sensible (Khan y Naqvi, 2011).

Durante la temporada de crecimiento 2012 - 2013 no existió un patrón en la respuesta a la sequía por parte de los cultivares, debido a que hubo cultivares susceptibles, pero con alto y bajo potencial de RG, así como cultivares tolerantes con alto y bajo potencial de RG (Tabla 5; Apéndice 1). Como un menor valor de DSI indica mayor tolerancia a la sequía (Inostroza *et al.*, 2006), se puede inferir que los cultivares Qup2542-2004, Pandora-INIA y Qup2540-2004 fueron considerados tolerantes con un DSI de 0,61, 0,62 y 0,79, respectivamente. Por

otro lado, Millán-INIA y Pantera-INIA fueron los cultivares susceptibles al estrés hídrico con un DSI de 1,88 y 1,23, respectivamente.

El DSI se utilizó para seleccionar tres grupos de cultivares. Un grupo de dos cultivares tolerantes, con un DSI < 1, otro grupo susceptible con un DSI > 1 y por último se seleccionó un cultivar con un DSI ≤ 1 y con alto rendimiento en condiciones de estrés hídrico (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento ($t\ ha^{-1}$) e índice de sensibilidad a la sequía (DSI), de siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y seco en la zona centro sur de Chile.

Cultivares	Rendimiento ($t\ ha^{-1}$)		DSI
	Riego	Secano	
Pantera-INIA	8,8	6,5	1,23
Pandora-INIA	7,7	6,7	0,62
Kipa-INIA	8,9	7,2	0,91
Millán-INIA	7,4	4,5	1,88
QUP2542-2004	9,0	7,8	0,61
QUP2405-2006	8,4	6,5	1,06
QUP2540-2004	8,8	7,3	0,79

Modelo AquaCrop

Calibración y validación del modelo

La calibración es el proceso de ajuste de los parámetros del modelo para obtener una buena concordancia entre los valores simulados y los medidos en el campo. En general, existen diferentes niveles de concordancia entre los datos observados y simulados, de manera que no siempre dichas predicciones son congruentes con lo observado. Dicha comparación permitió evaluar el desempeño del modelo AquaCrop en condiciones hídricas contrastantes.

Para calibrar el modelo se utilizaron los datos del cultivar Pandora-INIA (Tabla 6 y 7). Por otra parte, la validación se ejecutó de forma independiente, es decir, con los datos de cada cultivar seleccionado (Pandora-INIA, Pantera-INIA, Kipa-

INIA, Millán-INIA y Qup2542-2004), sin realizar ninguna modificación de los parámetros del modelo (Andarzian *et al.*, 2011).

Desarrollo del dosel

El modelo simula la cobertura del dosel a partir de los parámetros observados en las Tablas 6 y 7. De acuerdo a esto, la máxima cobertura se logró entre los 66 y 69 DDS, en cambio la senescencia comenzó entre los 115 y 121 DDS, siendo el cultivar Qup2542-2004 el primero en iniciar la senescencia del dosel, sin embargo esta senescencia fue mucho más lenta que la del resto de los cultivares analizados (Tabla 7).

Por otro lado, la transpiración acumulada del cultivo estimada por el modelo, varió entre 580 y 642 mm bajo condiciones de riego y entre 473 y 554 mm bajo condiciones de secano. En promedio, la transpiración acumulada se redujo en un 14,6 % bajo condiciones de secano, relativo a riego (Apéndice 2). El modelo estima la tasa de transpiración del cultivo en base a la demanda evaporativa de la atmósfera (datos climáticos) y de la cobertura del dosel. La última depende de la expansión foliar, conductancia estomática y tasa de senescencia (Steduto *et al.*, 2009; Salemi *et al.*, 2011). Todas estas variables fisiológicas son fuertemente afectadas por la disponibilidad de agua en el suelo (Steduto *et al.*, 2009), por esto la cobertura del dosel se vio disminuida en condiciones de secano, al igual que la transpiración del cultivo (Figura 1; Apéndice 2).

La simulación de la cobertura del dosel fue excelente (Figura 1). Bajo condiciones de riego, los cultivares Pandora-INIA, Pantera-INIA, Kipa-INIA, Millán-INIA y Qup2542-2004 obtuvieron valores de RMSE normalizado de 6, 6, 8, 8 y 6 %, respectivamente, mientras que bajo condiciones de secano se logró un RMSE normalizado de 7, 5, 4, 5 y 6 %, respectivamente. Dichos resultados son comparables a estudios desarrollados en maíz en distintas condiciones hídricas por AquaCrop, en donde se obtuvieron rangos de RMSE entre 5,06 y 34,53 % (Heng *et al.*, 2009), confirmando una buena simulación de la cobertura del dosel en trigo. Por otro lado, se obtuvo un índice-D de 0,99, 0,98, 0,98, 0,97 y 0,96 para la condición de riego y de 0,94, 0,97, 0,98, 0,95 y 0,96 para la condición de secano.

Figura 1. Cobertura del dosel (%) simulada (línea) y observada (círculo), de cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 – 2013.

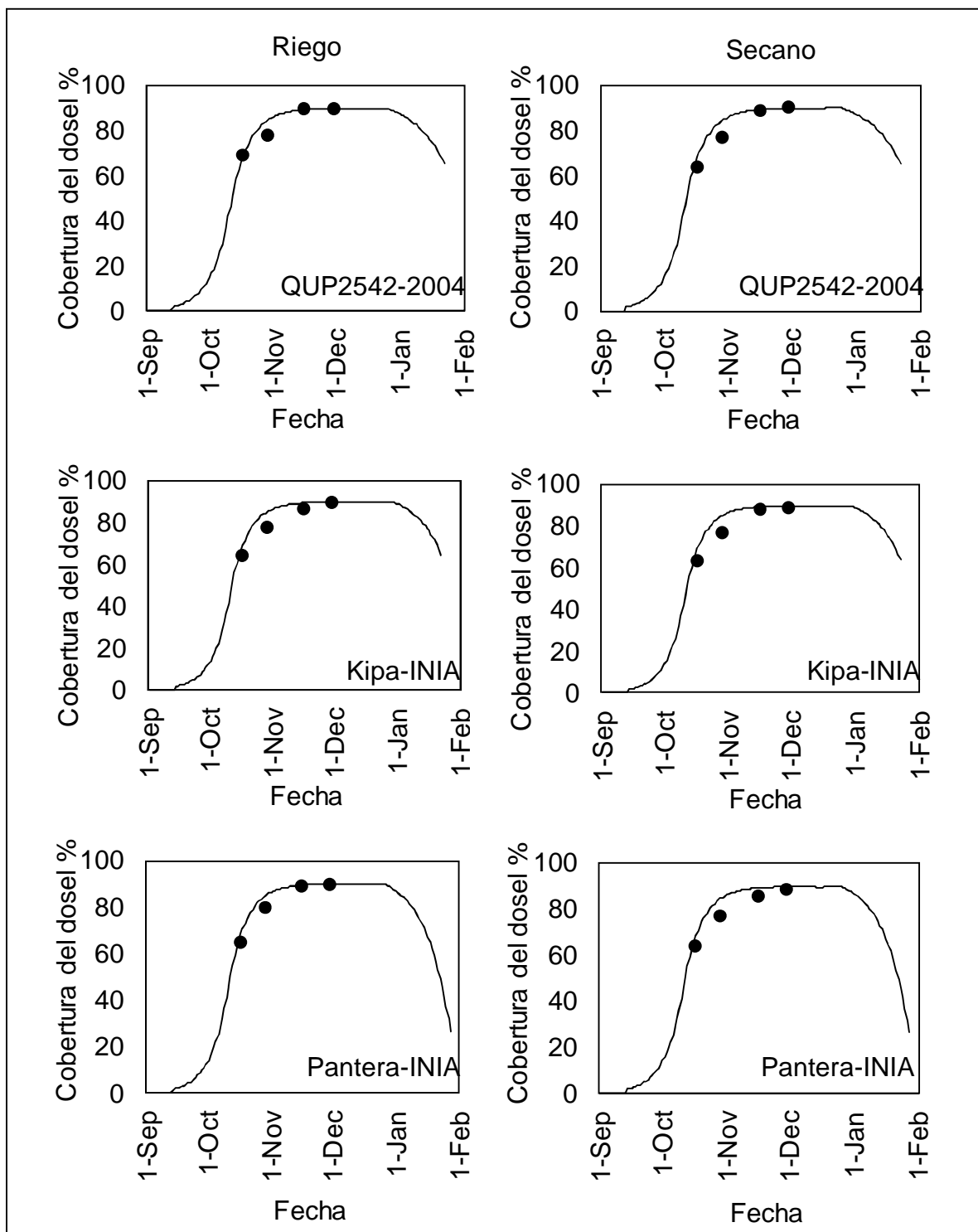


Figura 1. Cobertura del dosel (%) simulada (línea) y observada (círculo), de cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 – 2013 (continuación).

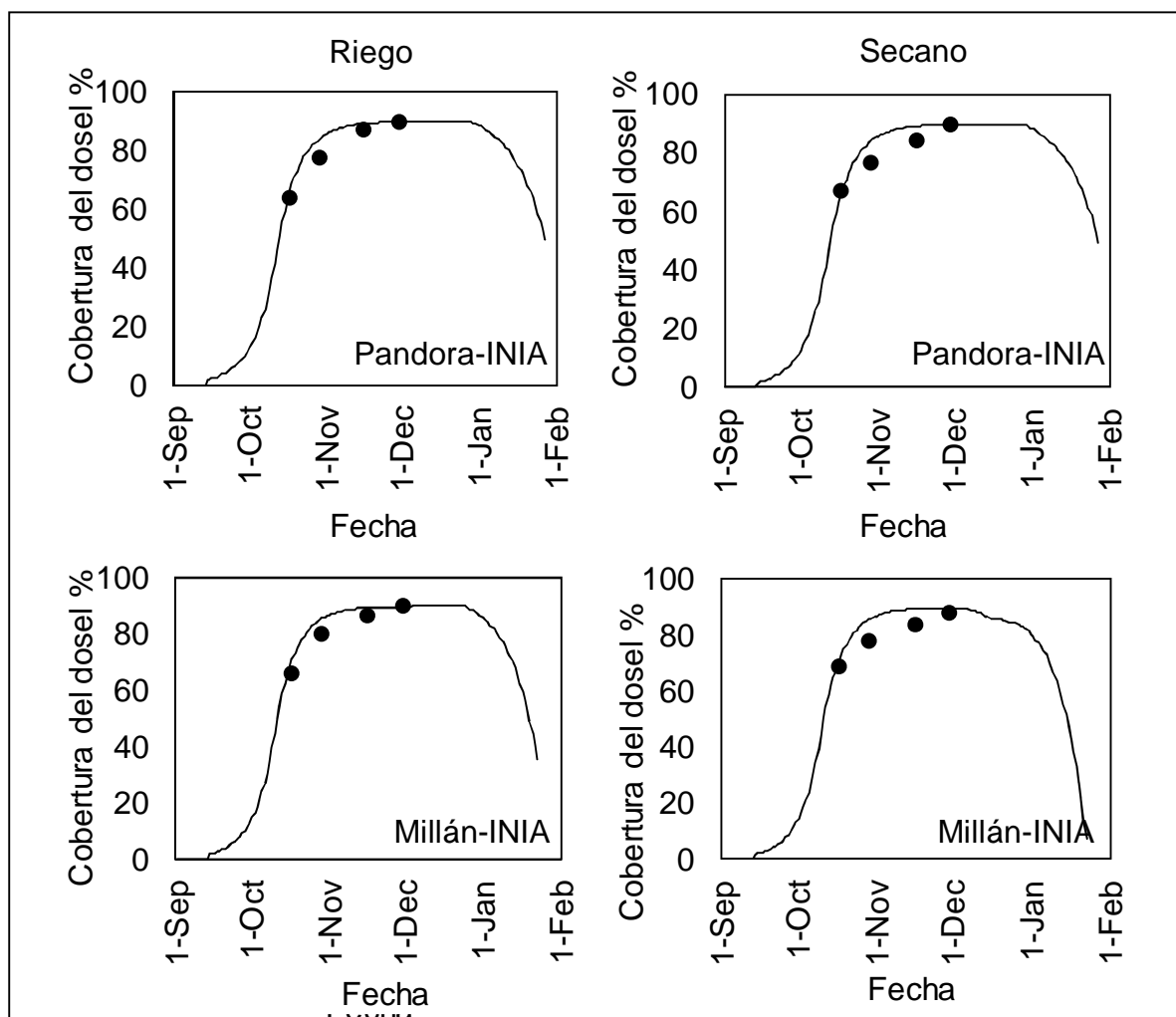


Tabla 6. Parámetros conservadores o constantes utilizados para ejecutar la simulación.

Descripción de parámetros	Pandora-INIA	Unidad o significado
	Valor	
Temperatura base	0	°C
Temperatura de corte	26	°C
Cobertura de la canopia en la siembra al 90% de emergencia	1.5	cm ²

Fuente: Raes *et al.*, 2012a.

Tabla 6. Parámetros conservadores o constantes utilizados para ejecutar la simulación (continuación).

Descripción de parámetros	Pandora-INIA	Unidad o significado
	Valor	
Coefficiente de crecimiento de la canopia	6,5	% día ⁻¹ .
Coefficiente de transpiración del cultivo en CC=100%	1,1	Completa Transpiración de la canopia en relación a la ET _o .
Factor de forma que describe la expansión zona radicular	1,5	Share factor (de participación).
Productividad del agua	15	g (biomasa) m ⁻² , normalizado para el clima y CO ₂ atmosférico.
Máximo umbral de crecimiento de la hoja p(upper)	0,25	Inhibición de la fracción de TAW, por encima del crecimiento de la hoja.
Mínimo umbral de crecimiento de la hoja p(lower)	0,65	Crecimiento de la hoja se detiene por completo.
Forma de la curva del Coeficiente de estrés en el crecimiento de la hoja	5	Curva moderadamente convexa.
Umbral de conductancia estomática p(upper)	0,65	Por encima de este valor, los estomas comienzan a cerrarse.
Forma de la curva del coeficiente de estrés en los estomas	2,5	Curva muy convexa.
Coefficiente del estrés en la senescencia p(upper)	0,7	Por encima de este valor comienza la senescencia de la copa.
Forma de la curva del coeficiente de estrés en la senescencia	2,5	Curva moderadamente convexa.
Coefficiente de inhibición del crecimiento de las hojas HI	S	Incremento por la inhibición del crecimiento de las hojas en floración.
Coefficiente de inhibición de estomas en HI	M	Moderada reducción por inhibición de los estomas en antesis.

Fuente: Raes *et al.*, 2012a.

Tabla 7. Parámetros no conservadores ajustados para simular la respuesta de los cultivares Pandora-INIA, Pantera-INIA, Millán-INIA, Kipa-INIA y Qup2542-2004, al establecimiento bajo condiciones de riego y secano, en la zona centro sur de Chile.

Descripción de parámetros	Pandora-INIA	Pantera-INIA	Millán-INIA	Kipa-INIA	Qup2542-2004	Unidad
N° de plantas	304	333	313	308	346	m ²
Tiempo desde la siembra hasta la emergencia	13	13	13	13	13	Día
Máximo Dosel	69	68	66	67	69	Día
Máxima cobertura de Dosel, CCx	90	90	90	90	90	%
Tiempo desde la siembra a inicio de la senescencia	120	117	116	121	116	Día
Coefficiente de reducción de la canopia CDC	6,9	7,4	8	7,1	5,8	%, por día
Tiempo desde la siembra hasta madurez	150	150	145	150	150	Día
Tiempo desde la siembra a floración	72	73	69	73	75	Día
Duración de la fase de floración	10	10	10	10	10	Día
Máxima profundidad de enraizamiento efectiva, Zx	1,50	1,50	1,20	1,50	1,50	Metros
Mínima profundidad de enraizamiento efectiva, Zn	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	Metros
Tiempo desde la siembra hasta la máxima profundidad de enraizamiento	73	74	70	69	72	Día
Índice de cosecha de referencia, Hio	46	47	45	47	48	%

Biomasa aérea simulada y observada

La biomasa aérea observada a los 60 DDS fue significativamente ($P \leq 0,05$) menor bajo condiciones de riego que en seco, sin embargo a los 78 DDS no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) en cada condición hídrica. Posteriormente, a los 96 y 133 DDS la Ba se redujo en un 5 y 17 % bajo condiciones de seco relativo a la condición de riego, respectivamente (Tabla 8). Además, los cultivares con mayor y menor Ba observada (Tabla 8), fueron los que lograron mayor y menor MS, DSI, RG y menor y mayor TDC; estos fueron: QUP2542-2004 y Millán-INIA.

Tabla 8. Medias de la biomasa aérea total (g), evaluadas en siete cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), entre el periodo de estado de hoja bandera y grano duro, bajo condiciones de riego y seco en la zona centro sur de Chile.

Cultivares	Biomasa aérea ($\text{g}^{-1} \text{m}^{-2}$)			
	60DDS	78DDS	96DDS	133DDS
KIPA-INIA	43.26 abc	108.45 a	259.00 ab	349.25 ab
MILLAN-INIA	41.13 bc	104.02 a	255.55 ab	286.27 b
PANDORA-INIA	38.00 c	119.99 a	245.53 bc	346.74 ab
PANTERA-INIA	42.99 abc	109.90 a	277.09 a	335.17 ab
QUP2405-2006	41.14 bc	105.79 a	225.92 c	308.45 b
QUP2540-2004	49.16 ab	115.30 a	253.56 ab	349.45 ab
QUP2542-2004	51.08 a	124.68 a	262.21 ab	385.08 a
Condición Hídrica				
Riego	38.86 b	109.65 a	260.59 a	367.72 a
Secano	48.78 a	115.53 a	247.66 b	306.68 b

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes entre sí (DMS 0.05).

La Ba simulada se afectó, por el déficit hídrico de igual forma que la Ba observada, disminuyendo en promedio un 4,62 y 8,96 % bajo condiciones de secano relativo a riego, respectivamente (Tabla 9). Estos resultados son una consecuencia de la alteración ocurrida en el desarrollo de la canopia (Figuras 1), ya que ésta determina la cantidad de agua transpirada (Apéndice 2), que a su vez determina la cantidad de Ba producida (Steduto *et al.*, 2009; Salemi *et al.*, 2011).

En la Tabla 9 se observa que el modelo sobrestimó en ambas condiciones hídricas la Ba en los primeros estadios de crecimiento, en comparación con los datos de campo. Sin embargo en periodos posteriores (96 y 133 DDS) la Ba fue subestimada por el modelo en los cultivares como Pandora-INIA y Qup2542-2004 en ambas condiciones hídricas, en cambio en cultivares como Pantera-INIA y Millán-INIA sólo ocurrió en condiciones de riego (Tabla 9). Los valores simulados y observados variaron entre -20 a 131 % en condiciones de riego, mientras que en secano variaron entre -21 a 96 %, confirmando la sobreestimación y subestimación de la producción de Ba por el modelo a lo largo de todo el cultivo (Tabla 9). Estas diferencias no son comparables a los resultados de simulación de maíz y sorgo (Stricevic *et al.*, 2011), posiblemente debido a la existencia de un error en los datos medidos o en la manera de simular del modelo (Andarzian *et al.*, 2011), atribuyendo la variación en la producción de Ba, a factores tales como la presencia de malezas, que puede tener una influencia directa en la extracción de agua y rendimiento global del cultivo, por lo que, el rendimiento del modelo se ve afectado (Ngetich *et al.*, 2012). A pesar de esto, los resultados indican que las predicciones de Ba generadas por el modelo una vez calibrado, fueron consideradas entre buenas y aceptable. El RMSE normalizado varió entre 13 y 27 %, mientras que el Índice-D varió entre 0,93 y 0,99 (Tabla 9). Además, de los cinco cultivares seleccionados, solamente Pandora-INIA y Qup2542-2004 obtuvieron un RMSE normalizado menor al 20 % y un índice-D promedio de 0.98 para ambas condiciones hídricas. Caso contrario sucedió con los cultivares Kipa-INIA, Pantera-INIA y Millán-INIA. Dichos cultivares obtuvieron un RMSE normalizado superior al 20 %, pero inferior al 30 %, con un índice-D promedio de 0,96 y 0,95 para cada una de las condiciones hídricas, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Evaluación del desempeño del modelo AquaCrop, por medio de Índices estadísticos para predecir el rendimiento de biomasa ($t\ ha^{-1}$), en cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile.

Índices	Valor	Genotipos	C.H.	Biomasa		DSV %
				S	O	
Normal – RMSE (%)	18	Pandora-INIA	S	3.282	1.42	131
D-index	0,98			6.224	4.69	33
				9.144	10.62	-14
				14.775	15.47	-4
Normal – RMSE (%)	13	Pandora-INIA	R	3.282	1.75	88
D-index	0,99			6.224	5.3	17
				8.994	9.84	-9
				13.539	13.43	1
Normal – RMSE (%)	23	Kipa-INIA	S	3.43	1.65	108
D-index	0,96			6.381	4.3	48
				9.285	10.9	-15
				14.897	17.32	-14
Normal – RMSE (%)	22	Kipa-INIA	R	3.43	1.96	75
D-index	0,96			6.38	4.73	35
				9.134	10.69	-15
				13.645	11.79	16
Normal – RMSE (%)	20	Qup2542-2004	S	3.459	1.93	79
D-index	0,97			6.402	5.57	15
				9.302	11.08	-16
				14.9	17.37	-14
Normal – RMSE (%)	17	Qup2542-2004	R	3.459	2.32	49
D-index	0,97			6.402	4.82	33
				9.177	10.77	-15
				13.674	14.72	-7
Normal – RMSE (%)	22	Pantera-INIA	S	3.403	1.61	111
D-index	0,96			6.35	4.22	50
				9.256	11.53	-20
				14.844	15.41	-4
Normal – RMSE (%)	22	Pantera-INIA	R	3.403	1.97	73
D-index	0,96			6.35	4.94	29
				9.124	11.56	-21
				13.62	12.52	9

Normal-RMSE: Raíz del cuadrado medio del error normalizado; D-index: Índice de concordancia; C.H.: Condición Hídrica; S: Secano; R: Riego; S: Simulado; O: Observado; DSV: % desviación = $(\text{Simulado} - \text{Observado}) \times 100 / \text{Observado}$.

Tabla 9. Evaluación del desempeño del modelo AquaCrop, por medio de Índices estadísticos para predecir el rendimiento de biomasa ($t\ ha^{-1}$), en cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile (continuación).

Índices	Valor	Genotipos	C.H.	Biomasa		DSV %
				S	O	
Normal – RMSE (%)	23	Millán-INIA	S	3.515	1.64	114
D-index	0,96			6.468	4.22	53
				9.238	10.67	-13
				14.401	13.49	7
Normal – RMSE (%)		27	Millán-INIA	R	3.515	1.79
D-index	0,93	6.431			4.45	45
		8.936			10.63	-16
		12.405			10.37	20

Normal-RMSE: Raíz del cuadrado medio del error normalizado; D-index: Índice de concordancia; C.H.: Condición Hídrica; S: Secano; R: Riego; S: Simulado; O: Observado; DSV: % desviación = (Simulado – Observado) \times 100 / Observado.

Rendimiento de grano simulado y observado

El RG simulado y observado mostró una disminución bajo condiciones de secano relativo a la condición de riego (Tabla 10). El modelo simula el RG a partir de la Ba y del índice de cosecha (Andarzian *et al.*, 2011), por lo que la disminución del RG bajo condiciones de secano se explica por lo expresado anteriormente. Algunos estudios realizados en trigo confirman esta respuesta al déficit hídrico (Silva-Robledo *et al.*, 2007; Andarzian *et al.*, 2011).

Tabla 10. Comparación del rendimiento de grano simulado y observado ($t\ ha^{-1}$) y desviación de cinco cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.), establecidos bajo condiciones de riego y secano en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 - 2013.

Cultivares	Riego		Secano		Prueba t.	DVS%	
	O	S	O	S		R	S
Pantera-INIA	8,8	7,6	6,5	6,9	0,77	-14	6
Pandora-INIA	7,7	7,4	6,7	6,8	0,91	-3	1
Kipa-INIA	8,9	7,7	7,2	7,0	0,52	-13	-3
Millán-INIA	7,4	6,9	4,5	5,9	0,81	-7	31
QUP2542-2004	9,0	7,8	7,8	7,1	0,30	-13	-9

S: Simulado; O: Observado; DVS: % desviación = (Simulado–Observado) \times 100 / Observado; R: Riego; S: Secano.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el RG simulado y observado. De acuerdo a los datos observados y simulados, en condiciones de riego existió una desviación que varió entre -14 y -3 %, mientras que en seco la desviación varía entre -9 y 31 %. Estos resultados indican una reducida sobrestimación y subestimación del RG simulado en condición de riego y seco, respectivamente (Tabla 10). Dicho esto, los cultivares con mayor y menor desviación fueron Pandora y Pantera bajo condiciones de riego, mientras que en seco fueron Kipa y Millán (Tabla 10). Por último el cultivar con mayor RG bajo condiciones de riego y seco fue Qup2542-2004.

CONCLUSIONES

1. El modelo de cultivos AquaCrop fue capaz de simular con precisión la cobertura del dosel de los cinco cultivares de trigo. En cambio, la simulación de la biomasa producida por el modelo fue menos precisa, para los cinco cultivares establecidos en condiciones de riego y seco.
2. El rendimiento de grano observado y simulado no presentó diferencias significativas para ninguno de los cinco cultivares evaluados. Sin embargo, los datos necesitan otra temporada para su validación.
3. El rendimiento de grano en esta investigación fue influenciado significativamente por los el número de granos por metro cuadrado y número de granos por espiga.
4. El cultivar QUP2542-2004 obtuvo el mayor rendimiento de granos en condiciones de riego y seco.

REFERENCIAS

1. Adhikary, S.K., M.Z. Alam and N.K. Paul. 2009. Variation of grain growth of wheat cultivars. Bangladesh J. Agril. Res. 34(3): 351-359. [en línea].
2. Andarzian, B., M. Bannayan, P. Steduto, H. Mazraeh, M.E. Barati, M.A. Barati and A. Rahnama. 2011. Validation and testing of the AquaCrop model under full and deficit irrigated wheat production in Iran. Agric. Water Manag. 100(1): 1-8.

3. Asseng, S., W. Cao, W. Zhang and F. Ludwig. 2009. Crop physiology, modelling and climate change: impact and adaptation strategies. pp: 511-543. In: V.O. Sadras and D.F. Calderini (Eds.). Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy. Elsevier. Burlington, USA.
4. Brouwer, R. and C.T. De Witt. 1968. A simulation model of plant growth with special attention to root growth and its consequences [en línea]. instituuut voor biologisch en scheikundig onderzoek van landbouwgewassen, The Netherlands. <<http://edepot.wur.nl/211777>>. [Consulta: 05 enero 2013].
5. CEPAL (Chile). 2012. La economía del cambio climático en Chile [en línea]. CEPAL. <http://www.eclac.cl/publicaciones/xml/0/47220/La_economia_del_cambio_climatico_en_Chile_Completo.pdf>. [Consulta: 05 enero 2013].
6. Comerma, J., L. Guenni y G. Medina. 1985. Validación del balance hídrico del modelo CERES MAIZ en la zona de Maracay, Estado Aragua Venezuela. Agron. Trop. 35(4-6): 115-132.
7. Davidson, H.R. and C.A. Campbell. 1984. Growth rates, harvest index and moisture use of Manitou spring wheat as influenced by nitrogen, temperature and moisture. Can. J. Plant Sci. 64(4): 825-839.
8. Farahani, H.J., G. Izzi and T.Y. Oweis. 2009. Parameterization and evaluation of the AquaCrop model for full and deficit irrigated cotton. Agron. J. 101(3): 469-476.
9. Fischer, R.A. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I Grain yield responses. Aust. J. Agric. Res. 29(5): 897-912.
10. Fletcher, A.L., R.J. Martin, J.M. de Ruiter, P.D. Jamieson and R.F. Zyskowski. 2009. Simulating biomass and grain yields of barley and oat crops with the Sirius wheat model. pp: 192-202. In: W. Cao, J.W. White and E. Wang (Eds.). Crop modeling and decision support. Tsinghua University Press. Beijing, China.
11. Flores-Gallardo, H., W. Ojeda-Bustamante, H. Flores-Magdaleno, E. Sifuentes-Ibarra y E. Mejía-Saénz. 2013. Simulación del rendimiento de maíz (*Zea mays* L.) en el norte de Sinaloa usando el modelo AquaCrop. Agrociencia 47(4): 347-359.

12. Fox, P.N., J. Crossa and I. Romagosa. 1997. Multi-environment testing and genotype x environment interaction. pp: 117-138. In: R.A. Kempton and P.N. Fox (Eds.). Statistical methods for plant variety evaluation. Chapman & Hall. London, UK.
13. Ganji, F., R. Jabbari and A. Morshedi. 2012. Evaluation of drought stress on relative water content, chlorophyll content and mineral elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Int. J. Agric. Crop Sci.* 4(11): 726-729. [en línea].
14. García-Vila, M., E. Fereres, L. Mateos, F. Orgaz and P. Steduto. 2009. Deficit irrigation optimization of cotton with AquaCrop. *Agron. J.* 101(3): 477-487.
15. Geerts, S. and D. Raes. 2009. Deficit irrigation as an on-farm strategy to maximize crop water productivity in dry areas. *Agric. Water Manag.* 96(9): 1275-1284.
16. Giunta, F., R. Motzo and M. Deidda. 2002. SPAD readings and associated leaf traits in durum wheat, barley and triticale cultivars. *Euphytica* 125(2): 197-205.
17. González, S. and W. Foster. 2010. Region-level yield and area price elasticities for Chilean wheat incorporating climate variables. *Cienc. Investig. Agrar.* 37(3): 47-56.
18. Heng, L.K., T. Hsiao, S. Evett, T. Howell and P. Steduto. 2009. Validating the FAO AquaCrop model for irrigated and water deficient field maize. *Agron. J.* 101(3): 488-498.
19. Hernández, N., F. Soto y A. Caballero. 2009. Modelos de simulación de cultivos. Características y usos. *Cultivos Tropicales* 30(1): 73-82. [en línea].
20. Hsiao, T.C., L. Heng, P. Steduto, B. Rojas-Lara, D. Raes and E. Fereres. 2009. AquaCrop-the FAO crop model to simulate yield response to water: III. Parameterization and testing for maize. *Agron. J.* 101(3): 448-459.
21. Hunt, R. 1990. Basic growth analysis. Unwin Hyman. London, UK.
22. Hussein, F., M. Janat and A. Yakoub. 2011. Simulating cotton yield response to deficit irrigation with the FAO AquaCrop model. *Span. J. Agric. Res.* 9(4): 1319-1330.

23. INIA (Chile). 2011. Informe anual "Fitomejoramiento de trigo Quilamapu" temporada 2010 - 2011. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
24. INIA (Chile). 2012. Informe anual "Fitomejoramiento de trigo Quilamapu" temporada 2011 - 2012. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
25. Inostroza, L., A. del Pozo, I. Matus y P. Hayes. 2007. Tolerancia a sequía en líneas recombinantes con sustitución de cromosomas (RCSLs) obtenidas de la crucea *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (Caesarea 26-24) x *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cv. Harrington. Agric. Téc. (Chile) 67(3): 253-261.
26. Kalapos, T., R. van de Boogaard and H. Lambers. 1996. Effect of soil drying on growth, biomass allocation and leaf gas exchange of two annual grass species. *Plant Soil* 185(1): 137-149.
27. Khan, N. and F.N. Naqvi. 2011. Effect of water stress in bread wheat hexaploids. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 3(5): 487-498. [en línea].
28. Li, P., P. Wu and J. Chen. 2012. Evaluation of flag leaf chlorophyll content index in 30 spring wheat genotypes under three irrigation regimes. *Aust. J. Crop Sci.* 6(6): 1123-1130. [en línea].
29. Link, E.J. 2005. Investigation and modeling of the optimization potential of adapted nitrogen fertilization strategies in corn cropping system with regard to minimize nitrogen losses. Dissertation, Doktors der Agrarwissenschaften. Universität Hohenheim, Fakultät Agrarwissenschaften. Stuttgart, Germany.
30. Lizana, X.C. and D.F. Calderini. 2013. Yield and grain quality of wheat in response to increased temperatures at key periods for grain number and grain weight determination: considerations for the climatic change scenarios of Chile. *J. Agric. Sci.* 151(2): 209-221.
31. Matile, P., S. Ginsburg, M. Schellenberg and H. Thomas. 1988. Catabolites of chlorophyll in senescing barley leaves are localized in the vacuoles of mesophyll cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(24): 9529-9532.
32. Mearns, L.O., C. Rosenzweig and R. Goldberg. 1997. Mean and variance change in climate scenarios: methods, agricultural applications, and measures of uncertainty. *Clim. Change* 35(4): 367-396. [en línea].

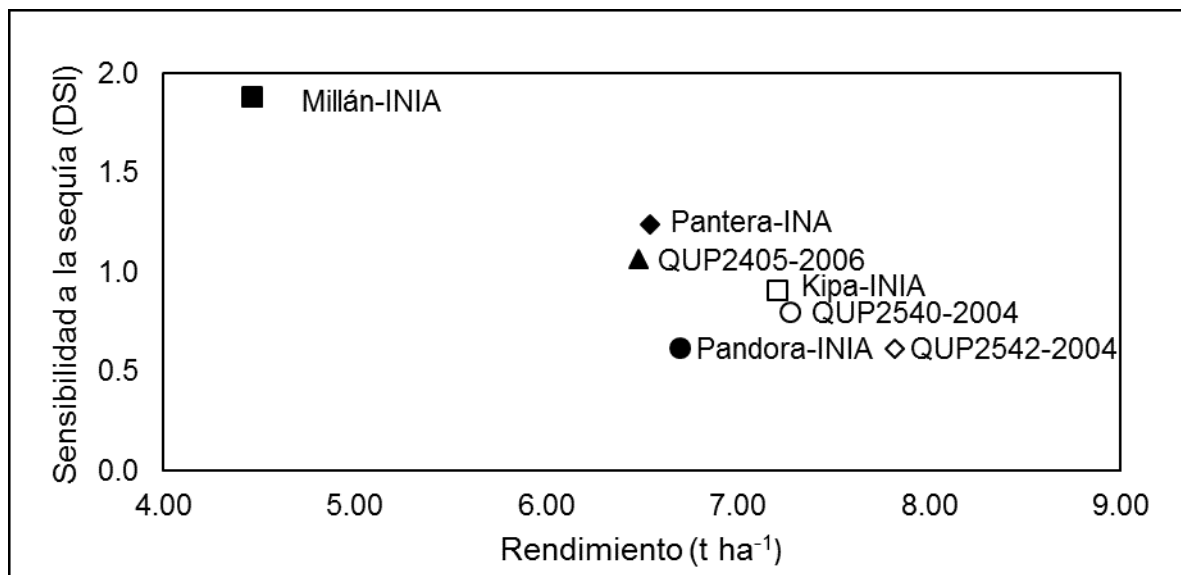
33. Mellado, M. 2007. Botánica y aspectos fisiológicos de la planta. pp. 67-69. En: H. Riquelme (Ed.). El trigo en Chile: cultura, ciencia y tecnología. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
34. Monteith, J.L. 1996. The quest for balance in crop modeling. *Agron. J.* 88(5): 695–697.
35. Ngetich, K.F., D. Raes, C.A. Shisanya, J. Mugwe, M. Mucheru-Muna, D.N, Mugendi and J. Diels. 2012. Calibration and validation of AquaCrop model for maize in sub-humid and semi-arid regions of central highlands of Kenya [en línea]. The Regional Universities Forum for Capacity Building in Agriculture, Uganda. <http://www.ruforum.org/system/files/file/Biennual%202012/PART2_3%20ABSTRACTS/Integrated%20Crop%20Management/Ngetich.pdf>. [Consulta: 05 enero 2013].
36. Nielsen, D., J.J. Miceli-Garcia and D.J. Lyon. 2012. Canopy cover and leaf area index relationships for wheat, triticale, and corn. *Agron. J.* 104(6): 1569–1573.
37. ODEPA (Chile). 2013. Cultivos anuales: superficie, producción y rendimientos [en línea]. ODEPA. <<http://www.odepa.gob.cl/articulos/MostrarDetalle.action?idn=1736&idcla=12>>. [Consulta: 10 marzo 2013].
38. Opazo, M. 2002. Evaluación de la resistencia a estrés hídrico y estabilidad de rendimiento en genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Memoria de título, Ing. Agrón. Mención: Fitotecnia. Universidad de Chile, Fac. Cien. Agron. y For., Esc. Agron. Santiago, Chile.
39. Pozo, A. del y P. del Canto. 1999. Areas agroclimáticas y sistemas productivos en la VII y VIII regiones. Serie Quilamapu N° 13. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
40. Quintana, J. and P. Aceituno. 2006. Trends and interdecadal variability of rainfall in Chile [en línea]. Universidad de Chile. <<http://www.dgf.uchile.cl/ACT19/COMUNICACIONES/Congresos/371-372.pdf>>. [Consulta: 05 enero 2013].
41. Raes, D., P. Steduto, T.C. Hsiao and E. Fereres. 2012a. Annex 1: crop parameters [en línea]. FAO. <<http://www.fao.org/nr/water/docs/AquaCropV40Annexes.pdf>>. [Consulta: 05 enero 2013].

42. Raes, D. 2012b. The ETo calculator evapotranspiration from a reference surface: reference manual. Version 3.2 [en línea]. FAO. <<http://www.fao.org/nr/water/docs/ReferenceManualV32.pdf>>. [Consulta: 15 abril 2013].
43. Salemi, H., M.A.M. Soom, T.S. Lee, S.F. Mousavi, A. Ganji and M.K. Yusoff. 2011. Application of AquaCrop model in deficit irrigation management of winter wheat in arid region. *Afr. J. Agric. Res.* 6(10): 2204-2215. [en línea].
44. SAS Institute. The SAS system for Windows [cd-rom]. Ver. 8. Cary: 1999. 1 cd-rom.
45. Semenov, M.A., J. Wolf, L.G. Evans, H. Eckersten and A. Iglesias. 1996. Comparison of wheat simulation models under climate change. II. Application of climate change scenarios. *Climate Res.* 7(3): 271-281. [en línea].
46. Shamsi, K., M. Petrosyan, G. Noor-mohammadi, A. Haghparast, S. Kobraee and B. Rasekhi. 2011. Differential agronomic responses of bread wheat cultivars to drought stress in the west of Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 10(14): 2708-2715. [en línea].
47. Silva-Robledo, H., M. Ortiz-Lizana y E. Acevedo-Hinojosa. 2007. Relaciones hídricas y ajuste osmótico en Trigo. *Agrociencia* 41(1): 23-34.
48. Steduto, P., T.C. Hsiao, D. Raes and E. Fereres. 2009. AquaCrop-The FAO crop model to simulate yield response to water: I. Concepts and underlying principles. *Agron. J.* 101(3): 426-437.
49. Stricevic, R., N. Djurovic, M. Cosic and B. Pejic. 2011. Assessment of the AquaCrop model in simulating rainfed and supplementally irrigated sweet sorghum growth [en línea]. Iranian National Committee on Irrigation & Drainage, Iran. <http://www.irncid.org/english/PdfView.aspx?FilePrm=GetFileArticles.aspx%3fFilePrm%3d1313_58679.pdf>. [Consulta: 05 enero 2013].
50. Todorovic, M., R. Albrizio, L. Zivotic, M.T. Abi Saab, C. Stockle and P. Steduto. 2009. Assessment of AquaCrop, CropSyst, and WOFOST models in the simulation of sunflower growth under different water regimes. *Agron. J.* 101(3): 509-521.

51. Universidad de Chile. 2006. Estudio de la variabilidad climática en Chile para el siglo XXI, Informe final: Texto [en línea]. CONAMA. <http://www.sinia.cl/1292/articles-50188_recurso_8.pdf>. [Consulta: 05 enero 2013].
52. Villegas, J.R., V.A. González, J.A. Carrillo, M. Livera, F. Sánchez del Castillo y T. Osuna. 2004. Modelos empíricos del crecimiento y rendimiento de tomates podado a tres racimos. Rev. Fitotec. Mex. 27(Número Especial 1): 63-67. [en línea].
53. Willmott, C.J., S.G. Ackleson, R.E. Davis, J.J. Feddema, K.M. Klink, D.R. Legates, J. O'Donnell and C.M. Rowe. 1985. Statistic for the evaluation and comparison of models. J. Geophys. Res. 90(C5): 8995-9005.
54. Xue, D-W., M-C. Chen, M-X. Zhou, S. Chen, Y. Mao and G-P. Zhang, 2008. QTL analysis of flag leaf in barley (*Hordeum vulgare* L.) for morphological traits and chlorophyll content. Biomed. Biotechnol. B 9(12): 938-943. [en línea].

APÉNDICES

Apéndice 1. Distribución de frecuencias del índice de sensibilidad a la sequía (DSI) de los cultivares Pantera-INIA, Pandora-INIA, Kipa-INIA, Millán-INIA, QUP2542-2004, QUP2405-2006 y QUP2540, evaluados en condiciones de riego y seco en la zona central de Chile.



Apéndice 2. Transpiración total simulada del cultivo (mm) de cinco cultivares de trigo, establecidos bajo condiciones de riego y seco en la zona centro sur de Chile, durante la temporada de crecimiento 2012 – 2013.

Cultivares	Condición hídrica	
	Riego (mm)	secano (mm)
Pandora-INIA	639	552
Pantera-INIA	634	549
Kipa-INIA	642	554
Millán-INIA	580	473
Qup2542-2004	641	553
Media	627	536

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ



FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EFICIENCIA DE TRANSPIRACIÓN EN 10 GENOTIPOS
AVANZADOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) EN
CONDICIONES DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL
CIP – SANTA ANA**

TESIS

PRESENTADA POR EL BACHILLER:

MEDRANO RICALDI GINO MATEO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

HUANCAYO – PERÚ

2012

ASESOR

ING. GUSTAVO OSORIO PAGÁN

DEDICATORIA

A mis padres Mateo Medrano y Rosa Ricaldi, por su apoyo incondicional, comprensión y cariño.

A mis hermanos Walter, Maibee, Antonieta por haberme brindado su apoyo tanto económico como moral en el momento que más lo necesite.

A mi familia en general por darme aliento para seguir siempre adelante.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por estar siempre conmigo y por haberme dado la sabiduría y fortaleza para llegar hasta el final del trabajo de investigación.

Al Mg.Sc. Raymundo Gutiérrez Rosales, por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo y por su apoyo incondicional durante todo el proceso de evaluación hasta la culminación del presente trabajo.

Al Ing. Gustavo Osorio Pagán, por su apoyo brindado en el asesoramiento y la ayuda brindada en el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Al Mg.Sc. Abelardo Calderón Rodríguez, por su colaboración y apoyo en los análisis bioquímicos en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Al Centro Internacional de la Papa, por el financiamiento del presente trabajo de investigación.

A los docentes de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional del Centro del Perú, por haberme brindado sus conocimientos durante mi formación profesional.

A los amigos que siempre estuvieron y están ahí para dar su ayuda, su aliento, su compañía, desinteresada.

ÍNDICE

Cap.	Temas	Pág.
	ASESOR	i
	DEDICATORIA	ii
	AGRADECIMIENTO	iii
	ÍNDICE	iv
	RESUMEN	v
	INTRODUCCIÓN	vi
1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1.	MARCO CONCEPTUAL	1
1.2.	MARCO TEÓRICO	3
1.2.1.	Importancia del cultivo de papa	3
1.2.2.	Producción mundial de papa	4
1.2.3.	Producción nacional y regional de papa	5
1.2.3.1.	Datos de época de siembra regional	7
1.2.4.	Requerimientos edafoclimáticos	8
1.2.4.1.	Suelo	8
1.2.4.2.	Temperatura	8
1.2.4.3.	Agua	8
1.2.5.	El agua en la planta	9
1.2.6.	Requerimientos hídricos	9
1.2.7.	Respuestas al déficit hídrico	10
1.2.8.	Mecanismos fisiológicos de respuesta a la sequía	11
1.2.8.1.	Contenido relativo de agua	11
1.2.8.2.	Área foliar y área específica de la hoja	12
1.2.8.3.	Eficiencia de transpiración y uso eficiente de agua	13
1.2.8.4.	Eficiencia del uso del agua	15
1.2.8.5.	Capacidad de extracción de agua por transpiración del cultivo	15
1.2.8.6.	Potencial osmótico	15
1.2.8.7.	Prolina libre en la planta	16
1.2.8.8.	Actividad de la enzima nitrato reductasa	17
1.2.8.9.	Glicina betaína	17
1.3.	MARCO REFERENCIAL	18
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
4.	CONCLUSIONES	89
5.	RECOMENDACIONES	90
6.	BIBLIOGRAFÍA	91
	ANEXOS	98

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa (Huancayo) durante los meses de diciembre 2010 a mayo del 2011. El problema en estudio fue ¿Cuál es la eficiencia de transpiración en 10 genotipos avanzados de papa? Los objetivos fueron determinar la eficiencia de transpiración en 10 genotipos avanzados de papa en condiciones del Valle del Mantaro y establecer los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico. En la metodología para determinar la eficiencia de transpiración se empleó 10 genotipos procedentes de las estaciones experimentales del INIA (Cusco, Ayacucho y Junín) y dos tipos de riego (riego normal y sequía regulada). Para ello se empleó el diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial de 10A x 2B. La técnica para evaluar la transpiración del cultivo fue el de Drydown. Cada variedad fue sembrada en 15 macetas, 5 para la pre cosecha, 5 para el tratamiento de riego normal y 5 para el tratamiento de sequía regulada. La transpiración diaria fue calculada a partir de una diferencia de pesos (transpiración gravimétrica). La cosecha se realizó considerando la biomasa particionada. Asimismo se determinó el área foliar, el contenido relativo de agua, el potencial osmótico y análisis bioquímicos. Los resultados fueron existen diferencias de eficiencia de transpiración de la biomasa entre los 10 genotipos avanzados ya que estos varían sus valores desde 3.78 g.kg^{-1} (395380.8) hasta 5.01 g.kg^{-1} (380389.1). Del mismo modo muestran diferencias de eficiencia de transpiración del tubérculo donde sus valores varían desde 1.18 g.kg^{-1} (399053.11) hasta 3.90 g.kg^{-1} (374080.5). Se identificó mecanismos de tolerancia al estrés hídrico dentro del tratamiento de sequía regulada, los cuales son: menor contenido relativo de agua; menor altura de planta; reduciéndose la producción de biomasa; también presenta un mayor potencial osmótico; una mayor acumulación de prolina; nitrato reductasa y glicina betaína. Además como mecanismo morfológico se afirma que existe un mayor desarrollo radicular en condiciones de estrés hídrico.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia de transpiración es una de las características fisiológicas más importantes y poco estudiadas, habiendo una reducida información al respecto, entender las necesidades o requerimientos del uso de agua facilitará la determinación de las variables que nos permiten conocer la formación de biomasa en función al agua utilizada en las plantas, esto generalmente se traduce en la formación de tubérculos en el cultivo de papa. A pesar de ello, este cultivo es sensible a la sequía y dependiendo del estado fenológico en el cual se encuentre al momento del estrés, dependerán también los mecanismos de respuesta que hace la planta para evitar, adaptarse, tolerar o ser susceptible.

El cambio climático que experimenta el mundo trae consigo muchas anomalías entre las cuales esta la escasez de agua para la agricultura, lo que hace necesario el desarrollo de un mayor conocimiento de la fisiología de los cultivos en condiciones de estrés hídrico así como de las estrategias de identificación y selección de cultivares resistentes a la sequía.

El cultivo de papa en el Perú, es cultivado preponderantemente en la región andina, que presenta riesgo respecto al incremento de la temperatura y la sequía, pues la actual variabilidad climática provoca períodos de sequía que afectan las diversas etapas fenológicas del cultivo.

Conocer algunas las características fisiológicas que intervienen en la tolerancia a la sequía (contenido relativo de agua, potencial osmótico, contenido de prolina, contenido de nitrato reductasa, contenido de glicina betaína), permitirá utilizarlas para explicar la compleja dinámica de las respuestas fisiológicas que ocurren en el cultivo de papa y son útiles en los programas de mejoramiento genético orientados a seleccionar genotipos frente al estrés hídrico (sequía), en consecuencia disponer en un futuro de variedades con mayores niveles de tolerancia y que estos sean utilizados para beneficio de los agricultores. Estos aspectos mejorarán la capacidad de adaptación al cambio climático en los sistemas de producción de papa.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo de investigación son:

- Determinar la eficiencia de transpiración en 10 genotipos avanzados de papa en condiciones del valle del Mantaro.
- Establecer los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico en 10 genotipos avanzados de papa.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. MARCO CONCEPTUAL

Eficiencia

La eficiencia es el uso racional de los medios con que se cuenta para alcanzar un objetivo predeterminado. Se trata de la capacidad de alcanzar los objetivos y metas programadas con el mínimo de recursos disponibles y tiempo, logrando de esta forma su optimización (Enciclopedia Microsoft Encarta, 2009).

Transpiración

Se define como la pérdida de agua en planta en forma de vapor. Aunque en pequeña cantidad del vapor de agua se puede perder a través de aberturas pequeñas (denominadas lenticelas) en la corteza de tallos y ramas jóvenes, la mayor proporción (más del 90%) se escapa por las hojas (Azcon et al., 2000).

Genotipo

La constitución genética de los cultivares de papa es un factor de gran importancia en la resistencia a la sequía, debido a su gran variabilidad genética tanto ontogénica como filogenética. Los genotipos recurrirán a sus modificaciones anatómicas, morfológicas, fisiológicas, fenológicas y bioquímicas para contrarrestar los efectos nocivos de la sequía (Jacobsen y Mujica, 1999)

Sequia

La sequía desde el punto de vista agronómico, se puede definir como la falta de humedad en el suelo que afecta el normal crecimiento y desarrollo de la planta, así como sus principales funciones.

Esta situación disminuye su potencial productivo o el rendimiento de sus órganos que constituyen la fuente principal de uso para el hombre. La sequía puede afectar a la planta en cualquier etapa fenológica de su desarrollo. Debido a este déficit de humedad las plantas reaccionan de diferente forma

para contrarrestar estos efectos. Normalmente disminuye la producción, si el déficit es demasiado severo y/o continuo, y la planta no cuenta con mecanismos de defensa o tolerancia, resistencia o evasión, puede ocurrir su muerte paulatina e irreversible (Jacobsen y Mujica, 1999).

La sequía es un periodo sin lluvia, que por su duración daña el cultivo y reduce significativamente los rendimientos económicos. La sequía comienza cuando se agota el agua disponible del suelo en la zona de la raíz. La sequía puede ser permanente, periódica, o aleatoria y puede ocurrir al inicio, a la mitad, o al final de la estación. La sequía puede ser acumulativa, o específica y breve (Kramer, 1983).

Estrés

Levitt (1980), mencionó que; el estrés es cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para un organismo viviente.

El estrés resulta de un cambio equivocado en el proceso fisiológico debido a un factor o a una combinación de factores ambientales y biológicos, generando daños, el cual ocurre como resultado de un metabolismo equivocado y puede ser expresado en la disminución, en el crecimiento, producción y/o muerte de la planta o parte de ella (Hale y Orcutt, 1987).

Estrés hídrico

El estrés hídrico es definido como la respuesta a la falta o el exceso de agua en las plantas. Siendo este un factor limitante en la productividad de los ecosistemas naturales y agrícolas. El estrés hídrico no solamente se ve afectado por la falta de agua, sino también por altas temperaturas o por una elevada salinidad (González, 1999).

El estrés hídrico en la planta se produce, por exceso de agua, provocada por las inundaciones, esto tiene como consecuencia la anoxia o la hipoxia, o por ausencia o falta de agua en el suelo, que está definida como sequía. Los efectos de la sequía en la planta dependen de la etapa de crecimiento con la que coincida (Ekanayake, 1993).

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1. Importancia del cultivo de papa

La papa constituye el cuarto alimento de mayor consumo en el mundo y su producción, a nivel mundial, es de unos 320 millones de toneladas por año. Esta cantidad tiende a aumentar mientras que la de los otros tres alimentos más consumidos, maíz, trigo y arroz, va decreciendo. Su cultivo se encuentra presente en más de 100 países. Entre ellos los de América del Norte y Europa vienen siendo los mayores productores, aunque en las últimas décadas hubo un crecimiento extraordinario de estas plantaciones en Asia, África y América Latina. La planta de papa es una herbácea de aproximadamente un metro de altura de la que se consume el tubérculo, que es el lugar de reserva de nutrientes. La papa tiene alto contenido de carbohidratos lo que lo posiciona como un alimento de alto valor energético. Además, aunque en menor medida, aporta proteínas en cantidad similar a los cereales y en mayor proporción que otros tubérculos. Su valor nutritivo incluye también aporte de vitamina C (Borba, 2008).

La papa ya forma parte importante del sistema alimentario mundial. Es el producto no cerealero número uno y la producción alcanzó la cifra sin precedentes de 325 millones de toneladas en 2007. El consumo de papa se extiende vigorosamente en el mundo en desarrollo, que hoy produce más de la mitad de la cosecha mundial, y donde la facilidad de cultivo y el gran contenido de energía de la papa la han convertido en valioso producto comercial para millones de agricultores. Es un cultivo muy recomendado para la seguridad alimentaria que puede ayudar a los agricultores de bajos ingresos económicos y a los consumidores vulnerables a atravesar el momento de inestabilidad que experimentan hoy el suministro y la demanda mundial de alimentos . La papa está en primera línea en la lucha contra el hambre y la pobreza en el mundo (FAO, 2009).

La papa es uno de los cultivos alimenticios básicos del mundo. En el Perú; constituye uno de los cultivos más importantes en términos económicos y sociales: se producen en promedio al año 3 millones de toneladas, se plantan (siembra) alrededor de 270 mil hectáreas anuales, se utilizan 29,2

millones de jornales y el valor bruto de la producción llega a 350 millones de dólares. Para la sierra, es el principal cultivo de los pequeños productores, para quienes es una importante fuente de ingresos, alimento e incluso preservación de costumbres ancestrales. Pero también es muy importante para la población urbana, porque este producto provee nutrientes y diversidad a la dieta diaria. La papa es un buen ejemplo de cómo combinando factores agroecológicos con mano de obra eficiente se puede obtener un producto de alto valor alimenticio. No existe otro cultivo alimenticio que produzca tanta energía y proteína por hectárea como la papa y que además presente una amplia versatilidad culinaria. Además de sus extraordinarias cualidades nutritivas. Una papa de 100 gramos posee 90 calorías y 14 % de vitamina C, que viene a ser la mitad de los requerimientos diarios de una persona adulta. Contiene además, 560 miligramos de potasio; de fósforo; 9 de calcio; 7 de sodio; 0,80 de hierro; y 20,9 de magnesio. Su valor calórico equivale a 85 kilocalorías por cada 100 gramos, muy próximo al de las lentejas y al del arroz, cuyo valor calórico es de 87 kilocalorías aproximadamente. Por otro lado es notable su contenido en sales minerales y vitaminas B₁, B₂, B₆. Por desgracia, a pesar de su excepcional valor, el consumo per cápita de los peruanos ha tenido una tendencia oscilante en la década de 1950 era de 128 kilos. Cayó a inicios de la década de 1990 a 32 kilos y en el 2005 llegaba a 70 kilos (Ordinola, 2008).

1.2.2. Producción mundial de papa

La cuna de la papa está en América del Sur, pero esta región tiene el nivel más bajo de producción de papa, de menos de 16 millones de toneladas en 2007. Para la mayoría de los pequeños campesinos de la región andina la papa sigue siendo un cultivo tradicional, y se cultiva con otras especies de papa desconocidas en el resto del mundo. En otros países, como Argentina, Brasil, Colombia y México, está aumentando la producción comercial a gran escala de *Solanum tuberosum* L. (FAO, 2008).

El sector mundial de la papa atraviesa grandes cambios. Hasta inicios del decenio de 1990, casi la totalidad de las papas se producían y consumían en

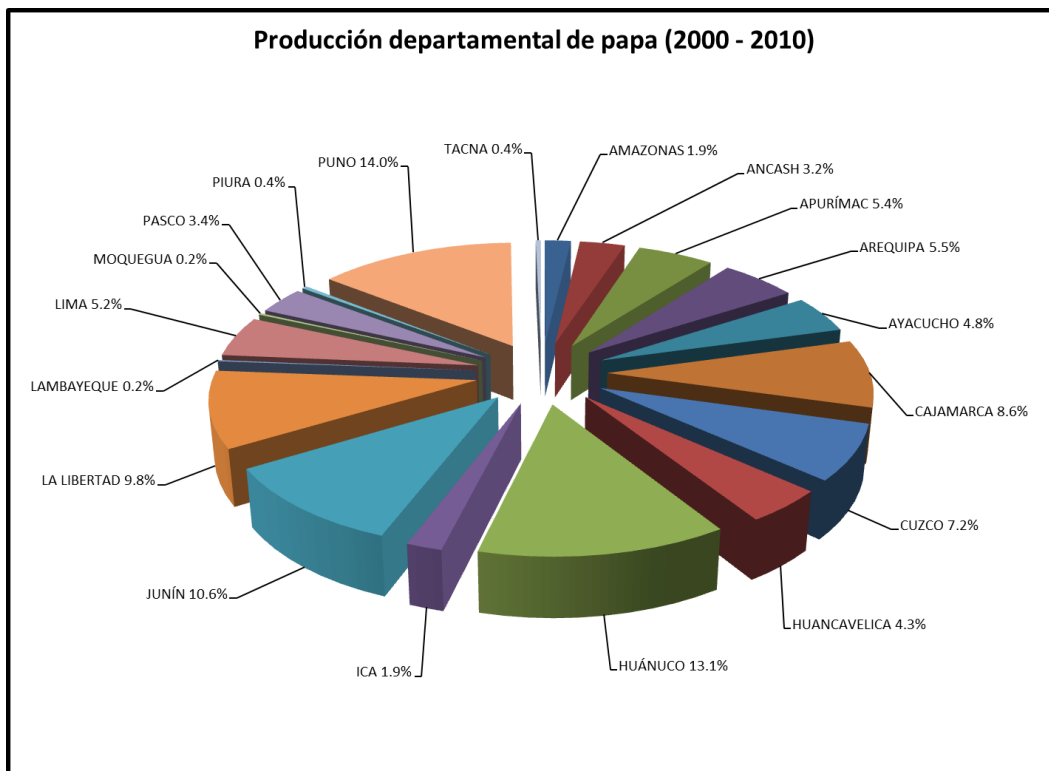
Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. Desde entonces se ha producido un espectacular aumento de la producción y la demanda de papa en Asia, África y América Latina, donde la producción aumento de menos de 30 millones de toneladas a principios del decenio de 1960 a más de 165 millones en 2007. En 2005, por primera vez, la producción de la papa del mundo en desarrollo excedía el del mundo desarrollado. China se ha convertido en el primer productor mundial de papa, y poco menos de una tercera parte de todas las papas hoy se cosecha en China y la India (FAO, 2008).

Asia y Europa son las principales regiones productoras de papa del mundo y en 2007 suministraron el 80% de la producción mundial. Si bien en África y América Latina las cosechas fueron de un volumen mucho menor, la producción fue extraordinaria. América del Norte fue el primer productor indisputable del continente, con más de 40 toneladas por hectárea (FAO, 2008).

1.2.3. Producción nacional y regional de papa

En el Perú existen más 3 mil variedades de papas que se encuentran distribuidas en la región andina de nuestro territorio, la papa se cultiva en 19 de los 24 departamentos del Perú, existiendo condiciones climáticas favorables para la producción de variedades demandadas comercialmente (consumo fresco y procesamiento) durante todo el año. Como se había mencionado, más del 90% de las siembras de papa se instalan en la sierra, concentrándose las unidades agropecuarias dedicadas a este cultivo en las regiones Quechua y Suni, que van desde los 2,300 m.s.n.m. hasta los 4,100 m.s.n.m.

Las principales zonas de producción en la sierra son: Puno 14.0 % (principal departamento productor de papa), Huánuco 13.1%, Junín 10.6% (que posee la mayor extensión dedicada al cultivo), La Libertad 9.8% (principal abastecedor del norte del país), Cajamarca 8.6%, Cusco 7.2%, y Apurímac 5.4%. En la costa, destacan la producción de los departamentos de Arequipa 5.5%, Lima 5.2 % e Ica 1.9%. (MINAG, 2011).



FUENTE: MINAG – OEEE, 2011

El cultivo de la papa es uno de los más importantes en el Perú, durante el periodo 2000 – 2011 se tuvo en promedio una superficie cosechada de 266,000 ha, obteniéndose una producción en promedio de 3 millones 319 mil toneladas, con un rendimiento promedio nacional de 12.46 t.ha^{-1} . La producción del cultivo de la papa en el país es estacional porque se siembra mayormente en la región de la Sierra bajo condiciones de secano y en los meses octubre a diciembre. Del total de superficie dedicada al cultivo de papa, sólo el 30% cuenta con riego, localizándose principalmente en la costa y valles interandinos. Entre las formas de riego existentes predomina el riego por gravedad, siendo la principal fuente abastecimiento el agua de río. (MINAG, 2011)

Así mismo el cultivo de la papa es uno de los más importantes en la región Junín, durante el periodo 2000 – 2011 se tuvo en promedio una superficie cosechada de 22,676 ha, obteniéndose una producción en promedio de 354,045 toneladas, con un rendimiento promedio regional de 15.63 t.ha^{-1} . La producción del cultivo de la papa en la región Junín en su mayoría es

estacional porque se siembra mayormente en las partes altas conocidas como temporal, bajo condiciones de secano y en los meses octubre a diciembre, la parte minoritaria es en zonas con riego. (MINAG, 2011)

La superficie agrícola cultivable en la región Sierra es de 1.2 millones de hectáreas 48% del total nacional, habiendo un 82% de esta área en condiciones de secano. Se estima que esta región cultiva el 96% del área total de papa a nivel nacional. (MINAG, 2008).

1.2.3.1. Datos de época de siembra regional

Cuadro 1. Superficie sembrada del cultivo de papa (Ha/Mes)

	2007	2008	2009	2010	2011
Enero	0	81	190	11	8
Febrero	0	28	9	21	10
Marzo	0	71	33	76	89
Abril	0	124	134	233	218
Mayo	0	464	592	634	544
Junio	0	1,006	1,175	1,097	1,206
Julio	0	1,674	1,604	1,612	1,589
Agosto	2,430	2,273	2,376	2,301	2,243
Septiembre	4,088	3,979	4,174	4,382	4,389
Octubre	6,242	6,009	6,962	6,877	0
Noviembre	5,000	4,841	4,763	5,161	0
Diciembre	743	608	939	1,055	0

Fuente: MINAG, 2012

En el cuadro 1, se observa que; en los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y noviembre se realiza la siembra de la campaña grande (Mayor superficie sembrada en la región Junín), y la menor cantidad de área sembrada se realiza en la campaña chica aparición de las lluvias especialmente para terrenos secanos.

1.2.4. Requerimientos edafoclimáticos

1.2.4.1. Suelo

Es un tubérculo de consumo popular, adaptado a diferentes condiciones climáticas y de suelos de nuestro territorio. Sin embargo, los mejores

rendimientos se logran en suelos franco arenosos, profundos, bien drenados y con un pH de 5,5 a 8,0.

1.2.4.2. Temperatura

La papa es esencialmente un cultivo de clima templado, se ve favorecida por la presencia de temperaturas mínimas ligeramente por debajo de sus normales y máximas ligeramente superiores en el período de tuberización. Aunque hay diferencias de requerimientos términos según la variedad de que se trate, podemos generalizar, sin embargo, que temperaturas máximas o diurnas de 20 a 25°C y mínimas o nocturnas de 8 a 13°C son excelentes para una buena tuberización. La temperatura media óptima para la tuberización es de 20°C, si la temperatura se incrementa por encima de este valor disminuye la fotosíntesis y aumenta la respiración y por consecuencia hay combustión de hidratos de carbono almacenados en los tubérculos. Durante la etapa de germinación y fases tempranas de crecimiento las temperaturas altas, por el contrario favorecen el crecimiento vegetativo. (FAO, 2008)

1.2.4.3. Agua

Las características climáticas de una zona de producción determinan la temporada de lluvias o la temporada en la que existe reserva de agua para el cultivo. No se recomienda a sembrar en zonas donde exista escasez de agua (Egúzquiza, 2000).

El agua es un factor importante en el cultivo de papa. Un buen cultivo de papa requiere 400 a 800 mm de agua. Dependiendo de las condiciones climáticas y de la duración de campaña de cultivo. Para una población de 40000 plantas por hectárea, esto corresponde de 100 a 200 dm³ (litros) de agua por planta en la campaña de cultivo. Tanto la lluvia natural como la irrigación pueden suministrar agua. Su correcto manejo proporciona suficiente cantidad para el crecimiento de la papa y evite que se desperdicie y se emplee mal (Haverkort, 1982).

1.2.5. El agua en la planta

El agua es un componente mayoritario e indispensable para que las plantas puedan vivir y desarrollarse; a su vez el vehículo mediante el cual se transportan los elementos químicos esenciales que el suelo sostiene, desde las raíces hacia las hojas, y los componentes elaborados por estas a los órganos restantes. Proporcionan a los tejidos vegetales la consistencia necesaria para el mantenimiento en el suelo; entre otras funciones, es quien regula la temperatura de la planta evitando con ello determinadas circunstancias, cambios bruscos que pueden dañar su crecimiento (Navarro, 2000).

El agua es el elemento esencial y componente mayoritario de las plantas ya que constituye hasta el 90% del peso fresco en plantas herbáceas y más del 50% en plantas leñosas. El crecimiento de las plantas se halla controlado por los coeficientes de división y ensanchamiento celular y por el abastecimiento de componentes orgánicos e inorgánicos necesarios para la síntesis del protoplasma y de nuevas paredes celulares. El ensanchamiento de las células dependen especialmente de por lo menos un grado mínimo de turgencia (Azcon et al., 2000).

El déficit hídrico en las plantas puede variar desde un pequeño descenso del potencial hídrico hasta el marchitamiento permanente y la muerte por desecación. La absorción reducida del agua del suelo es la causa del déficit hídrico, que a su vez provoca reducciones en el crecimiento (Kramer, 1989). Las especies o variedades de plantas se diferencian en sus requerimientos hídricos óptimos y por tanto en su susceptibilidad al estrés hídrico (Jensen y Salisbury, 1988). Además, esa susceptibilidad puede variar con las etapas de desarrollo de la planta (Nilsen y Orcutt, 1996).

1.2.6. Requerimientos hídricos

El estado de hidratación de una planta es un estado de equilibrio dinámico y el control del grado de hidratación está regulado por diferentes mecanismos fisiológicos. Estos mecanismos reaccionan globalmente a las modificaciones ocasionadas por un efecto “estrés” (Fernández y Johnston, 1986).

En cuanto a la disponibilidad de agua, las plantas de papa tienen respuestas similares a otras plantas mesófitas. Disminuyendo su crecimiento y rendimiento a medida que el estrés hídrico se incrementa (Martínez y Huamán, 1987).

El estrés hídrico en el cultivo de papa no solo reduce la cantidad de luz interceptada, sino también la eficiencia de conversión de esta energía (Green et al., 1985)

1.2.7. Respuestas al déficit hídrico

Las plantas han desarrollado diferentes respuestas frente al estrés hídrico que en conjunto implican asegurar la supervivencia de la especie, aumentar la disponibilidad de agua y mejorar la eficiencia de su uso (Schulze, 1986).

Resulta difícil generalizar en un patrón común la respuesta de las plantas al déficit hídrico, debido a la variedad en duración e intensidad de dicho déficit y a la variedad de modificaciones morfológicas, fisiológicas y de ciclo de vida que existen como caracteres constitutivos de la especie (adaptaciones) y como respuestas a largo (aclimatación) y a corto plazo (regulación). El interés por generalizar los tipos de respuesta ha conducido a establecer «modelos» de comportamiento que describen conjuntos de características que tienden a presentarse a la vez en respuesta a la sequía y que confieren a la especie mayor capacidad de resistir y completar su ciclo bajo esta limitación ambiental. Se describen así tres «estrategias» o modelos de respuesta frente al déficit hídrico que se fundamentan en las respuestas morfológicas y fisiológicas que reducen y/o retrasan la incidencia y los efectos del déficit hídrico:

1. Escapar de la sequía, estrategia que consiste principalmente en acoplar el ciclo biológico a los meses con mayor disponibilidad de agua.
2. Tolerar la desecación, que consiste en un conjunto de modificaciones fisiológicas que permiten soportar un cierto grado de deshidratación de los tejidos sin reducción drástica de la actividad vital.

3. Evitar la deshidratación, estrategia que supone aumentar la capacidad de aprovisionamiento de agua y limitar su gasto, incrementando la eficiencia en el uso del agua, lo que aumenta la capacidad de permanecer y sobrevivir durante los períodos de sequía (Medrano, *et al.*, 2007).

Doorenbos y kassam (1979), mencionan que; cuando no se atienden todas las necesidades de agua del cultivo, el déficit hídrico en la planta afecta en el crecimiento y rendimiento del cultivo, estos efectos pueden variar de acuerdo a la especie o variedad y al periodo vegetativo.

Como reacción al déficit hídrico se observa el cierre de estomas y por consiguiente la disminución de la transpiración. Este mecanismo engloba una serie de ajustes fisiológicos y metabólicos que incluyen la disminución de la fotosíntesis lo que se traduce en la alteración de la traslocación y distribución de fotoasimilados (Prado *et al.*, 1999).

La sequía provocan la reducción del potencial hídrico de los tejidos, las plantas responden a este cambio sintetizando una amplia gama de compuestos denominados osmoprotectante, que actúan como osmolitos facilitando la retención del agua en el citoplasma y por tanto reajustando el potencial hídrico, o bien como verdaderos compuestos protectantes que estabilizan la estructura de las membranas. Estos solutos son compatibles con el funcionamiento celular en condiciones de estrés osmótico. Entre los osmoprotectante encontramos compuestos con átomos de nitrógeno en su molécula como la prolina y los compuestos de amonio cuaternario (Azcon *et al.*, 2000).

1.2.8. Mecanismos fisiológicos de respuesta a la sequia

1.2.8.1. Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua es una medida indirecta del estado de turgencia de la hoja, a la vez es una medida destructiva que puede calcularse a partir del procedimiento propuesto por Barrs y Weatherley (1962). El contenido relativo de agua representa una relación entre el contenido de agua de la hoja en estado actual y en estado de turgencia (Werner, 1954). Las plantas con riego óptimo pueden perder la turgencia en

el día, pero estas vuelven a la turgencia completa durante la noche, lo cual no ocurre en las plantas sometidas a estrés por sequía. En tal sentido, el contenido relativo de agua puede permitir conocer indirectamente el grado de recuperación de las plantas luego de un período de estrés hídrico (Cornejo y Vadia, 1966).

1.2.8.2. Área foliar y área específica de la hoja

El área foliar es una variable determinante en la fotosíntesis, habiendo abundante evidencia por su relación entre la interceptación de luz y la producción de biomasa (Monteith, 1977). La rápida absorción de luz es una característica importante para la productividad del cultivo. Sin embargo, el área foliar también es importante para la transpiración de la planta, y es comúnmente considerado un carácter adaptativo para la tolerancia a la sequía, pues reduce su área de la hoja cuando está sometida a un estrés hídrico. Con la reducción de la expansión foliar, también ocurre una reducción en la fotosíntesis, o en el crecimiento de otros órganos en la planta (Boyer, 1970), resultando en una reducción de la transpiración que contribuye con evitar el estrés hídrico en las células, incluso cuando la planta presenta un déficit por sequía (Saab y Sharp, 1989).

La división celular y la expansión de los tejidos de la hoja tienen un alto grado de correlación (Muller, *et al.*, 1998), habiéndose encontrado una correlación negativa entre la tasa inicial de expansión de la hoja y la duración de la expansión. Asimismo, el análisis de la cinemática de la expansión del área foliar, identifican que la tasa de expansión puede verse afectada por factores internos y externos, en ciertas circunstancias un incremento en la duración de la expansión puede verse compensada por una reducción en la tasa de la expansión de la hoja (Cookson, *et al.*, 2005). En general, se puede afirmar que el déficit hídrico produce una reducción de la división celular, la expansión del tejido y el desarrollo de la hoja (Granier y Tardieu, 1999).

La reducción en el área de la hoja por estrés hídrico es una causa importante en la disminución del rendimiento del cultivo porque reduce la superficie fotosintética (Kramer, 1983; Loggini et al., 1999).

1.2.8.3. Eficiencia de transpiración y uso eficiente de agua

La eficiencia de transpiración puede ser el parámetro más importante en la búsqueda de plantas con uso eficiente de agua. El uso eficiente de agua (UEA) es definido como la cantidad de biomasa producida en una unidad de cultivo (g) por una unidad de agua evaporada y transpirada (kg). La eficiencia de transpiración (ET) es la biomasa producida (g) por unidad de agua transpirada (kg). La transpiración en las plantas puede ser medida a partir de dos métodos, por el método lisimétrico, que consiste en un sistema cerrado que proporciona de manera constante agua a un nivel freático establecido, la transpiración es medida diariamente por el ingreso de agua al sistema. El segundo es el método gravimétrico, que consiste en sellar las salidas de evaporación del suelo y realizar pesos diarios, midiendo por diferencias de pesos el agua transpirada cada día. (Tanner y Sinclair, 1983). La EUA puede variar mucho más que la ET debido a las proporciones relativas entre la evaporación y transpiración, las cuales dependen del índice de área foliar (IAF), las propiedades del suelo y la frecuencia de riego (Tanner, 1981).

La asimilación de dióxido de carbono (CO_2) en una planta está íntimamente vinculada con la pérdida por transpiración del agua, y la relación lineal existente entre la producción de papa y el consumo de agua, fue encontrada diferente para determinadas condiciones agroecológicas (Vos y Haverkort, 2007). Así, la eficiencia de uso de agua en la papa puede variar dependiendo del ambiente, Shalhevet *et al.* (1983), encontró que para Israel puede ser 35 kg biomasa por hectárea por mm de agua, mientras que Feddes (1987) para Holanda fue de $43 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$, Tanner (1981) para Wisconsin en Estados Unidos fue de 36 a $55 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ en tres diferentes años, Trebejo y Midmore, 1990 encontraron que este cambia en La Molina, Perú; de 64 a $127 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$, cuando es verano e invierno respectivamente. Hasta la actualidad no se han realizado estudios en

variedades de papas comerciales para explicar cómo es esta eficiencia de uso de agua, dentro del período del cultivo de la misma y en condiciones agroclimáticas donde estas se producen.

El efecto del tamaño de la maceta también fue analizado por Ray y Sinclair (1998), con el fin de determinar si las cantidades de agua transpirada eran diferentes para los cultivos de maíz y soya, encontrándose que había cambios significativos, pero cuando eran analizadas a partir de una normalización de datos de transpiración, estos no variaban. En tal sentido, Sinclair y Ludlow (1986) y Ray y Sinclair (1997), describen un procedimiento para minimizar las grandes variaciones de la transpiración a través de los días, el mismo que consiste en utilizar dos tratamientos de riego, el primero donde se repone la cantidad de agua transpirada diariamente (plantas control), y el segundo donde se somete a un déficit hídrico regulado (plantas estresadas), permitiéndose una transpiración máxima o umbral por encima de la cual debería de haber reposición del exceso. Esta transpiración umbral es definida previamente por el investigador, en función a la capacidad de agua disponible presente en la maceta y los días que desea demore la prueba. La transpiración normalizada (TN) es:

$$TN = \frac{\text{transpiración_de_planta_estresada}}{\text{transpiración_promedio_de_plantas_control}}$$

Fuente: Ray y Sinclair (1997),

Esta TN es calculada diariamente para cada una de las plantas sometidas a estrés hídrico. La tasa de transpiración normalizada (TTN) es el promedio de las TN para cada día, el fin de la prueba termina cuando la TTN es menor a 0.10.

Concluyéndose, que el tamaño de la maceta no era un factor que pudiera afectar los resultados en los análisis de la eficiencia de transpiración.

1.2.8.4. Eficiencia del uso del agua

Medrano, *et al*, (2007) mencionan que, la eficiencia en el uso del agua (EUA) de las plantas puede entenderse de manera genérica como el volumen de agua que éstas necesitan consumir (evapotranspirar) para incorporar a su biomasa una determinada cantidad de carbono proveniente de la atmósfera (en la que se encuentra en forma de CO₂). De esta manera, la eficiencia en el uso del agua de las plantas dependerá principalmente de dos tipos de factores: en primer lugar, de aquellas características propias de la especie y variedad que tengan relación con la capacidad de optimización de los procesos de asimilación de carbono y de evapotranspiración de agua; y en segundo lugar, de las características del ambiente en el que crece y se desarrolla la planta.

1.2.8.5. Capacidad de extracción de agua por transpiración del cultivo

El agua disponible en el suelo (ADS) puede ser facilitada por la expresión denominada fracción transpirable de agua del suelo (FATS), la misma que es la base de la comparación de las respuestas de la planta bajo un rango de diferentes condiciones de secado del suelo, utilizado en papa por Weisz, *et al.*, (1994) o para maíz y soya por Ray y Sinclair (1997).

Estos valores de FATS relacionados con TTN por Weisz, *et al.*, (1994) encontraron que la variedad BelRus puede seguir extrayendo agua del suelo, mientras la variedad Kathadin ya había disminuido su TTN. Asimismo, Ray y Sinclair, (1998) evaluando dos especies de maíz y soya en diferentes tamaños de macetas, no encontraron diferencias entre este tipo de análisis (FATS vs TTN) para los diferentes tamaños de maceta, lo cual indica que es posible la comparación de patrones de extracción de agua para diferentes cultivares o especies, a partir de diferentes volúmenes de maceta.

1.2.8.6. Potencial osmótico

El potencial osmótico representa la presión hidrostática producida por una diferencia entre la concentración de soluciones. La acumulación de solutos se realiza principalmente en las vacuolas, lo cual protege al citosol de elevadas concentraciones de iones que inhiban las funciones enzimáticas (Salisbury y Ross, 2000).

El potencial osmótico puede ser medido de manera directa de una solución, siendo el método de presión de vapor el más adecuado para líquidos, sin embargo para utilizar este método en plantas hay que reducir a cero la presión de las células vegetales (turgencia), lo cual se logra mediante un congelamiento y descongelamiento rápido, generando cristales de hielo que rompen todas las membranas. Este tratamiento da como resultado una mezcla de citoplasma, savia vacuolar y agua contenida en las paredes celulares (Salisbury y Ross, 2000).

El ajuste osmótico o también llamado osmoregulación, es la capacidad que tiene la planta de autoregular su potencial osmótico cuando cambian las condiciones ambientales, encontrando la planta un nuevo equilibrio en su potencial, este se produce lentamente y tiende a incrementar la tolerancia a la deshidratación (Ledent, 2002).

El único mecanismo claro beneficioso que responde a la acumulación del ajuste osmótico es el mantenimiento del desarrollo de raíces en orden de alcanzar el agua que pueda estar disponible a mayor profundidad del suelo, esto pudiera dar a las plantas acceso a un mayor incremento de reservas de agua para crecer o sobrevivir (Serraj y Sinclair, 2002).

1.2.8.7. Prolina libre en la planta

Como resultado del estrés hídrico se producen cambios bioquímicos en las plantas, algunos de los cuales conlleva a la acumulación de solutos de bajo peso molecular, tales como la prolina y betaínas (Yancy, *et al.*, 1982). Para bajar el potencial hídrico en la planta, se involucra la acumulación de osmolitos compatibles en la osmoregulación que permitan continuar tomando agua adicional desde el ambiente, pues esto tiene un efecto inmediato en el almacenamiento de agua por las plantas. Altos niveles de prolina permiten a la planta mantener un bajo potencial hídrico, adicionalmente actúan como osmoprotectante, donde la prolina sirve como una fuente de energía para regular el potencial de óxido-reducción (Saradhi y Saradhi, 1991; Blum y Ebercon, 1976), como un protector de radicales hidróxi (Smirnoff y Cumbes, 1989), como un soluto que protege las

macromoléculas contra la desnaturalización (Schobert y Tschesche, 1978), como un medio para reducir la acidez en la célula (Venkamp, *et al.*, 1989), y como un compuesto de almacenamiento y fuente de nitrógeno para un rápido crecimiento después del estrés (Singh, *et al.*, 1973).

La prolina es uno de los mecanismos de adaptación de la planta al déficit hídrico (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). El incremento en los niveles de prolina puede incluso alcanzar de diez a cien veces más de su valor normalmente encontrado en plantas bien regadas, no obstante, durante un riego de recuperación estos niveles disminuyen rápidamente (Levy, 1983). Por otro lado, la prolina también es considerada parte de la respuesta adaptativa a otras condiciones ambientales adversas, tales como bajas temperaturas, metales pesados o deficiencia nutricional (Bellinger, *et al.*, 1991; Chiang y Dandekar, 1991, 1995; Delauney y Verma, 1993).

1.2.8.8. Actividad de la enzima nitrato reductasa

La Nitrato Reductasa es una enzima citoplasmática determinante en la síntesis de proteína, dado que interviene directamente en la asimilación del nitrato (NO^{-3}), reduciéndolo a nitrito (NO^{-2}) en las hojas (Hageman, *et al.*, 1967; Hernandez, *et al.*, 1974). La actividad de esta enzima cambia según la disponibilidad de agua dentro de la planta, por lo que se considera un indicador de condiciones de estrés hídrico. Además, también es sensible a factores como la fertilización nitrogenada, el fotoperíodo, la concentración y el flujo de nitratos en el xilema (Shaner y Boyer, 1976).

La reducción de la actividad de la Nitrato Reductasa ha sido atribuida al daño en la capacidad de síntesis de proteínas en plantas con estrés hídrico, debido a la desintegración de los poli-ribosomas (Morilla, *et al.*, 1973).

1.2.8.9. Glicina betaína

La glicina betaína es un compuesto cuaternario de amonio que se encuentra presente en bacterias cianobacterias, algas, animales y varias familias de plantas, pero ausentes en muchos cultivos de interés agrícola (McCue y Hanson, 1990; Rodhes y Hanson, 1993). Estudios genéticos en plantas y en

bacterias han mostrado que la presencia de glicina betaína esta correlacionada con la tolerancia al estrés osmótico y se acumula principalmente en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico (Rodhes y Hanson, 1993).

1.3. MARCO REFERENCIAL

Werner (1954), estudió el contenido relativo de agua en hojas de 6 variedades de papa y encontró que el alto contenido de humedad en el suelo origina solo una ligera variación del contenido relativo de agua en las hojas, pero cuando la humedad del suelo decrecía significativamente, las diferencias en el contenido relativo de agua eran más evidentes. Otros estudios señalan que hay diferencias varietales en el contenido relativo de agua de las hojas aun cuando el potencial del agua del suelo es alto (Epstein y Grant, 1973). El contenido relativo de agua en las hojas es afectado por las condiciones climáticas, es decir cuando la humedad relativa decrece, se incrementa la evaporación y el gradiente de vapor de agua de las hojas hacia la atmósfera (Guerrero, 1993).

En dos experimentos realizados por Ayele (1999), en seis cultivares de Teff (*Eragrostis tef*), evaluados en diferentes estaciones del año, se encontró diferencias significativas en el ajuste osmótico por efecto del genotipo y de la interacción genotipo x estación. Los genotipos con valores de ajuste osmótico alto sobrevivieron por un periodo de tiempo más largo que los de valores más bajos. Sin embargo, la larga supervivencia de los cultivares no fue traducida en altos rendimientos ni en el incremento de peso de la parte aérea por día durante el periodo de estrés. Aún más, el incremento de biomasa aérea mantuvo una correlación negativa con el ajuste osmótico los valores altos de contenido relativo de agua, quizá debido al ajuste osmótico, pudieran haber permitido el retraso de la senescencia de los cultivares de alto ajuste osmótico por lo mucho catorce días en relación a los de bajo ajuste osmótico. Por consiguiente, el ajuste osmótico aparentemente mejora la supervivencia de las plantas sometidas a estrés, confiriéndoles mayores posibilidades de sobrevivir cuando se reinicie el riego o las lluvias. Sin

embargo, la capacidad de un mejor ajuste osmótico tal como una estrategia de supervivencia, es típico de una vegetación natural o de un cultivo no muy domesticado.

Según el comportamiento del ajuste osmótico y el crecimiento de raíces, los resultados sugieren que el crecimiento de la planta y el rendimiento durante y después del estrés pueden haber sido afectados por otros factores diferentes al ajuste osmótico, tales como el crecimiento de raíces, mientras que el ajuste osmótico fue principalmente efectivo en la supervivencia durante el estrés (Ayele, 1999).

Serraj y Sinclair (2002), realizaron un trabajo de revisión para determinar si realmente la acumulación de osmolitos, frecuentemente citado como un mecanismo aceptado para el incremento del rendimiento de cultivos sujetos a sequía, resulta en beneficios que sostienen la actividad de las células y tejidos bajo condiciones de déficit de agua. Luego de revisar numerosos estudios de la asociación entre la acumulación de osmolitos y el rendimiento de cultivo, no encontraron ningún beneficio consistente, salvo algunos estudios que mostraban relaciones positivas entre ambas variables pero éstos habían sido obtenidos bajo graves déficit de agua, con rendimientos extremadamente bajos o condiciones especiales de abastecimiento de agua. Cuando mucho encontraron que el beneficio es la supervivencia de la planta.

Martínez y Moreno (1992), encontraron que, dos variedades peruanas de papa: Yungay y Revolución, híbridos entre *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* x *Solanum tuberosum* L. subsp. *andígena*, fueron cultivadas en campo bajo un sistema de riego por exudación en líneas, en un ambiente semiárido de la costa peruana (La Molina, 230 m de altitud), y sometidas a estrés hídrico por suspensión del riego durante 10 días en el periodo de tuberización, con posterior recuperación del riego. En los periodos de estrés-recuperación fueron registradas las variaciones interdiarias del potencial de agua de hojas, la conductancia foliar, la tasa de fotosíntesis neta y el nivel de prolina en hojas. La variedad Yungay mostró mayor resistencia a la sequía que Revolución. Su mayor resistencia estuvo ligada a su capacidad para

acumular prolina y a su ajuste estomático. Durante el periodo de estrés hídrico Yungay acumuló prolina en forma más rápida y en una mayor cantidad que Revolución y también redujo su conductancia foliar a un nivel que le permitió a su vez mantener una mayor fotosíntesis y recuperarse más rápido que Revolución al finalizar el periodo de déficit hídrico. Los efectos deletéreos del estrés hídrico sobre los rendimientos fueron mayores en Revolución. Estas respuestas son discutidas considerando como posibles mecanismos de resistencia, la acumulación de prolina y sus relaciones con la conductancia foliar y la fotosíntesis y las implicaciones de éstas expresiones para la productividad de la papa bajo situaciones de estrés hídrico.

Schafleitner, Gutiérrez, Espino, *et al.* (2007), realizaron estudios en *Solanum tuberosum* x *Solanum tuberosum* subsp. *andígena* y encontraron que la actividad en la nitrato reductasa fue significativamente menor en las plantas expuestas a la sequía, pero el agotamiento de la actividad era independiente de la producción o el mantenimiento del rendimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El experimento se realizó en la estación experimental Santa Ana del Centro Internacional de la Papa.

2.1.1. Ubicación política

- Lugar : EE. Santa Ana
- Distrito : El tambo
- Provincia : Huancayo
- Departamento : Junín

2.1.2. Ubicación geográfica

- Altitud : 3 260 msnm
- Latitud Sur : 11° 57' 15" del Ecuador
- Longitud Oeste : 75° 15' 18" del meridiano de Greenwich

2.2. DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

2.2.1. Fecha de inicio: 20 de diciembre del 2010

2.2.2. Fecha de culminación: 14 de octubre del 2011

2.3. MATERIAL GENÉTICO

Se utilizó en el experimento 10 genotipos avanzados de papa, los cuales se obtuvieron de las estaciones experimentales del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

Cuadro 2. Datos de Genotipos

Número CIP	Nombre de la Accesoión	Progenitores		Procedencia
		Progenitor Femenino	Progenitor Masculino	
CIP 399062.119	B1C5	395285.5	395282.3	E.E Andenes – Cusco
CIP 399053.11	B1C5	395230.1	395322.11	E.E Andenes – Cusco
C99.977				E.E Canaán - Ayacucho
CIP 393382.44	B3C1	387205.5	387338.3	E.E Canaán - Ayacucho
C99.747				E.E Canaán - Ayacucho
CIP 395380.8	B2C3	392923.50	392921.31	E.E Santa Ana - Junín
RC1496.43B	RC1496.43B			E.E Santa Ana – Junín
CIP 391691.96	SERRANITA	381381.9	LB-CUZ.1	E.E Santa Ana – Junín
CIP 380389.1	Canchan-INIA	BL-1.2	MURILLO III-80	E.E Santa Ana – Junín
CIP 374080.5	Perricholi	801013=(MEX 72 =I-1058)	700764=(Casa Blanca EE-2010)	E.E Santa Ana – Junín

Fuente: Elaboración propia, datos obtenidos desde la base de datos del centro internacional de la papa. (Intranet.cipcgjar.org)

2.3.1. Materiales

a. Campo

- ✓ Sustrato
- ✓ Macetas de plástico de 10"
- ✓ Platos de plástico
- ✓ Malla antiácidos 30 x 30 cm
- ✓ Estacas de plásticos.
- ✓ Tijera
- ✓ Baldes de plástico 15 L
- ✓ Jarra 1 L
- ✓ Probetas de plástico de 25 ml, 250 ml y 500 ml
- ✓ Embudo
- ✓ Tutoros de bambú
- ✓ Bolsas de polietileno
- ✓ Engrapador
- ✓ Bandejas de plástico
- ✓ Cuaderno
- ✓ Plumones
- ✓ Bolsas de papel Kraft N° 2, 10, 12, 25
- ✓ Vestoras
- ✓ Bisturí
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Láminas de plástico (Saran Wrap)
- ✓ Cuchillo

b. Laboratorio

- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Viales de 20 y 24 ml
- ✓ Vaso de precipitación de 1 L
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 50, 100, 250 y 500 ml
- ✓ Placa Petri
- ✓ Pipeta volumétrica 1 ml, 10 ml
- ✓ Pipeta de Pasteur
- ✓ Pipetor de 10 - 200 µml
- ✓ Mortero
- ✓ Gradillas
- ✓ Frasco lavador
- ✓ Estufa eléctrica
- ✓ Congeladora
- ✓ Plumones
- ✓ Bandeja de plástico

c. Reactivos

- ✓ Ninhidrina
- ✓ Tolueno
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Acido sulfosalicilico
- ✓ Acido fosfórico
- ✓ Nitrato de potasio
- ✓ 1-2 Dicloroetano
- ✓ Solución de KI-I
- ✓ Ácido sulfurico

2.3.2. Equipos

- ♣ Balanza electrónica 15 kg máximo, JADEVER (+/- 0.005 kg)
- ♣ Balanza electrónica 150 g máximo, JADEVER (+/- 0.05 g)
- ♣ Balanza digital Mettler 400P,
- ♣ Balanza analítica Mettler AE-50
- ♣ Porómetro, AT Devices, modelo AP-4
- ♣ Microvoltímetro HR-33T y cámara psicrométrica C-52, Wescor Instruments
- ♣ Scanner One Touch, modelo 8600
- ♣ Espectrofotómetro GENESYS™ 20
- ♣ Centrifuga
- ♣ Congeladora
- ♣ Agitador vortex

2.4. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en el presente trabajo es el método científico el cual consistió en una investigación experimental, descriptiva y explicativa.

2.5. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

FACTORES

Niveles

$a_1 = 399062.119$

$a_2 = 399053.11$

$a_3 = 399.977$

$a_4 = 393382.44$

A. GENOTIPOS

$a_5 = 399.747$

$a_6 = 395380.8$

$a_7 = 391496.43B$

$a_8 = 391691.96$

$a_9 = 380389.1$

$a_{10} = 374080.5$

$b_1 =$ Riego normal

B. TIPOS DE RIEGO

$b_2 =$ Sequía regulada

Trat. N°	Combinaciones
1	a_1b_1
2	a_1b_2
3	a_2b_1
4	a_2b_2
5	a_3b_1
6	a_3b_2
7	a_4b_1
8	a_4b_2
9	a_5b_1
10	a_5b_2
11	a_6b_1
12	a_6b_2
13	a_7b_1
14	a_7b_2
15	a_8b_1
16	a_8b_2
17	a_9b_1
18	a_9b_2
19	$a_{10}b_1$
20	$a_{10}b_2$

2.6. DISEÑO METODOLOGICO

a. Población y muestra

Población. Fue constituida por todas las plantas de papa en el experimento.

Muestra. Fue constituida por 5 plantas de papa por tratamiento o repetición, para evaluar las características de producción y procesamiento.

b. Características del experimento

- ✓ Número de factores 2
- ✓ Número de niveles por factor 10 y 2
- ✓ Número de tratamientos 20
- ✓ Número de repeticiones 5

✓ Número de plantas por tratamiento	50
✓ Área neta experimental	32,00 m ²
✓ Área total experimental	64,00 m ²

c. Diseño experimental

En el presente experimento se utilizó el diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial de 10A x 2B con 5 repeticiones por cada tratamiento.

Modelo aditivo lineal

$$X_{ijk} = \mu + \delta_k + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

X_{ijk} = Observación cualesquiera dentro del experimento

μ = Media poblacional

δ_k = Efecto aleatorio del k-ésimo bloque o repetición

τ_i = efecto aleatorio del i-ésimo nivel del factor A

β_j = Efecto aleatorio de j-ésimo nivel del factor B

(τβ)_{ij} = Efecto aleatorio del i-ésimo nivel del factor, interaccionando con el j-ésimo nivel del factor B

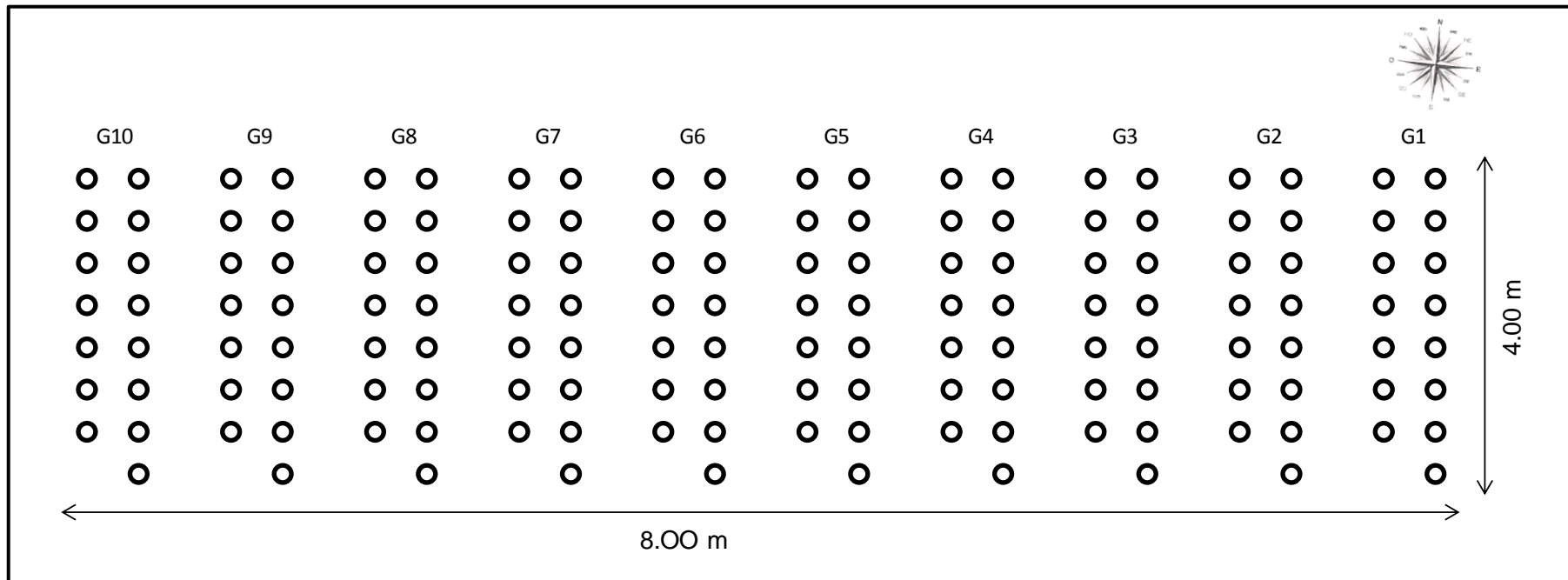
ε_{ijk} = Error experimental

i = 1,2,....., a; niveles del factor A

j = 1,2,....., b; niveles del factor B

k = 1,2,....., r; bloques o repeticiones

Croquis experimental



2.7. CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

2.7.1. Preparación de materiales

Para la instalación del experimento se realizó previamente la preparación de los materiales a utilizar como son:

- ✓ El sustrato que fue una mezcla de (tierra negra + musgo + promex) en una proporción de 2:1:0,1; el cual fue mezclado y extendido en una capa delgada, para realizar un secado al ambiente de manera uniforme, esto con el fin de que el sustrato presente una humedad homogénea.
- ✓ Las mallas antiáfidos los cuales fueron cortados a una medida de 30 x 30 cm, con el fin de poner dentro de la base de cada uno de las macetas y así evitar la pérdida del sustrato por los agujeros que tienen las mismas.

2.7.2. Plantación (Siembra)

Se comenzó la instalación con el pesado de las macetas, los cuales eran taradas en la balanza (maceta + malla), para así proceder a llenar los 2,5 kg de sustrato, logrando homogenizar la cantidad en cada una de ellas, los cuales eran ubicadas de acuerdo al diseño experimental en bloques de 15 unidades experimentales por cada genotipo, al terminar el pesado se procedió a la codificación de las mismas, empezando desde el 101 al 150, esto con el fin de identificar los tratamientos de acuerdo a los genotipos, esta codificación se hizo con estacas de plástico las cuales eran ubicadas en los extremos de cada maceta, luego se procedió a realizar un hoyo en el centro de la maceta, en el cual se enterraban los tubérculos.

2.7.3. Riego

Después de la instalación del experimento el riego era de acuerdo a la necesidad de la planta ello se determinaba a través de la observación visual, antes de iniciar la prueba el riego se realizó con una jarra donde se midió 500 ml de agua y aplicada directamente a cada una de las macetas. Pasado los 45 días de plantación se realizó la saturación de agua a través de riego

pesado esto con el fin de uniformizar el contenido de humedad en cada una de las macetas. Una vez iniciada la prueba de Drydown, la cantidad de agua a agregar diariamente se media a través de probetas de 25, 250, 500 ml y aplicado a cada maceta por un embudo de plástico. Toda esta metodología se aplicó hasta el final de la prueba.

2.7.4. Embolsado

Después obtener uniformidad en cada una de las unidades experimentales, la saturación se realizó por la mañana y por la tarde, se comenzó a poner las macetas dentro de las bolsas que iba desde la base hasta el cuello de la planta, para luego ser dobladas y engrampadas dejando cierta holgura, se usaron las bolsas con el fin de evitar la pérdida de humedad por la evaporación del suelo, al estar bien cerrada toda la evaporación se condensó dentro de la misma; por lo tanto, se reduce al mínimo la pérdida de peso por la evaporación del suelo conocida también como evapotranspiración.

2.7.5. Pesado de macetas

Después de ser llenado las macetas en bolsas, se procedió al pesado de las macetas obteniendo la primera pesa al siguiente día se realizó el pesado de 8:00 a 9:30 a.m., en el mismo orden el cual fueron pesados las macetas el día anterior, de esta misma manera se repitió la metodología durante 3 días consecutivos, esta diferencia de pesas que se obtenían de un día otro se asumió como la transpiración diaria (transpiración gravimétrica).

Posterior a los tres días y una vez definida las 5 macetas de pre cosecha y los 10 restantes que iban a ser sometido al tratamiento de sequía regulada y riego normal, se comenzó con la prueba donde el pesado de macetas se realizó de manera diaria durante 30 días, hasta que la planta alcanzó el porcentaje de transpiración al 10 %, el cual fue determinado de acuerdo a la metodología aplicada en el trabajo de investigación.

2.7.6. Pre cosecha

La pre cosecha realizó a cinco macetas en el inicio de la prueba. El criterio para la selección de cada tratamiento fue ver la transpiración en los tres días anteriores, en las 15 macetas de cada genotipo, ordenando estas 15 transpiraciones en sentido ascendente (de menor a mayor transpiración).

Para la selección de la pre cosecha, se tomaron cinco macetas de la siguiente forma: la primera fue tomada como el valor promedio (o cercano al mismo) de la transpiración del genotipo; la segunda fue tomada como el menor valor de transpiración del genotipo; la tercera fue tomada como el mayor valor de transpiración del genotipo, la cuarta fue tomada del valor medio entre la menor transpiración y la transpiración promedio del genotipo, y la quinta fue tomada del valor medio entre la mayor transpiración y la transpiración promedio del genotipo.

En la pre cosecha se obtuvieron datos de biomasa fresca de manera particionada de hojas, tallos, raíces y en algunas macetas se encontraron tubérculos, los mismos que se llenaron en bolsas de papel kraft de distintos tamaños, cada uno con sus respectivos códigos, seguidamente estos fueron llevados al horno a 80 °C durante 48 horas, pasado este tiempo se sacó del horno, para ser pesado y así obtener los datos de biomasa seca.

Antes de ser cosechado se tomaron datos de altura de planta y número de tubérculos por planta.

2.7.7. Prueba de Drydown

Después de la pre cosecha se realizaron las mediciones de peso de las diez macetas restantes las cuales fueron distribuidas de manera alternada para los dos tratamientos (sequia regulada y el riego normal). El objetivo de utilizar este criterio de selección, fue tomar muestras de toda la distribución de datos de transpiración, en las macetas de cada genotipo.

Las diez macetas restantes que fueron sometidas a los tratamientos se empezaron a pesar diario, de los cuales se obtuvieron los datos de la transpiración diaria y la cantidad de agua a adicionar de acuerdo al

tratamiento, el cual era calculado a través de una hoja de MS Excel, el tratamiento sometido a riego normal recibió diariamente el 80% de la capacidad de campo del suelo en las macetas. Por el contrario el tratamiento de sequía regulada toleró una transpiración máxima de 70 mililitros desde el inicio de la prueba hasta el final de la misma.

2.7.8. Cosecha

La cosecha final se realizó hasta los 97 días después de la plantación, de acuerdo a cada genotipo llegó a una tasa de transpiración normalizada TTN menor a 0,1 ó 10% el cual indicó el momento oportuno de la cosecha.

En el momento de la cosecha se obtuvieron datos de biomasa fresca de manera particionada de hojas, tallos, raíces, tubérculos (número de tubérculos), los mismos que se llenaron en bolsas de papel kraft de distintos tamaños respectivamente, cada uno con sus respectivos códigos, seguidamente estos fueron llevados al horno a 80 °C durante 48 horas, pasado este tiempo se sacó del horno, para ser pesado y así obtener los datos de biomasa seca.

Antes de ser cosechado se tomó datos de altura de planta.

2.7.9. Control fitosanitario

Los productos químicos se utilizaron de manera preventiva, y fue en el momento de la instalación del experimento, tal como se mencionan a continuación.

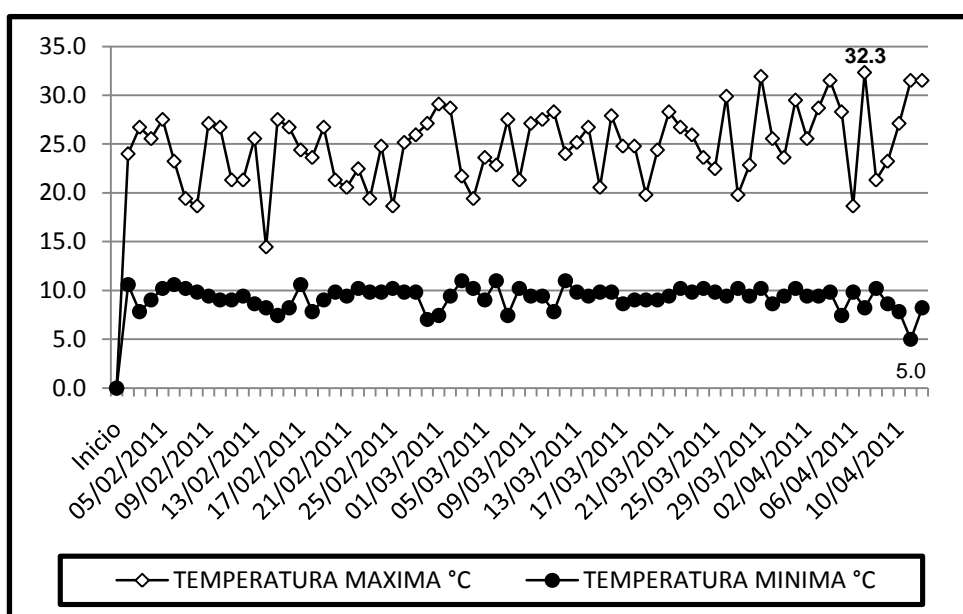
Cuadro 3. Descripción de productos químicos

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis
Farmathe	Benomil	80 g/15 L agua
Pentacoloro	Pentacloronitrobenceno	80 g/15 L agua
Petter	N, P ₂ O ₄ , K ₂ O	50 /15 L agua

2.7.10. Información meteorológica

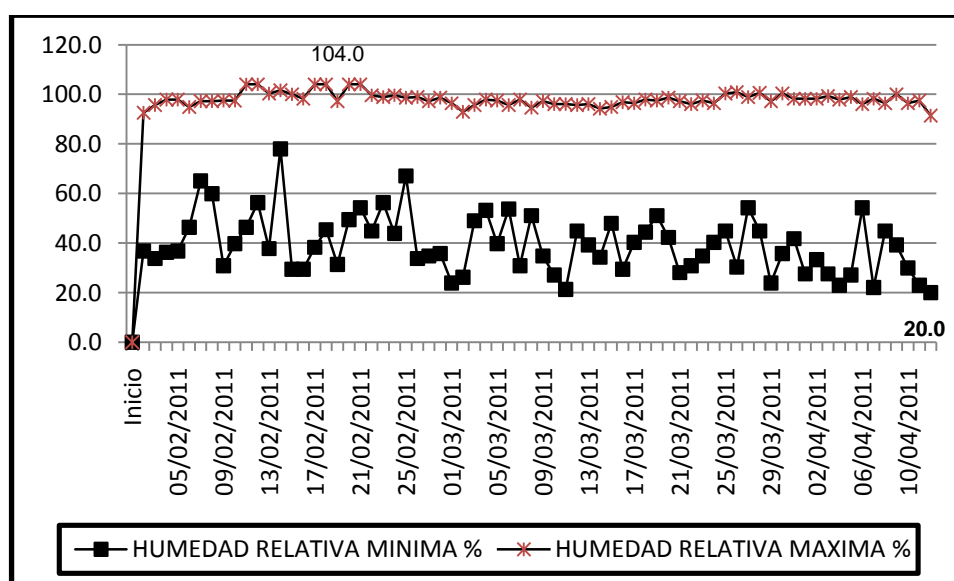
Las variables climáticas de Temperatura y Humedad Relativa, fueron registradas por un instrumento meteorológico llamado HOBO, ubicada dentro del invernadero, específicamente al costado de las macetas en estudio. Los datos registrados se muestran en los gráficos.

Gráfico 1. Temperaturas (°C) en el período de evaluación 2011.



Fuente: Elaboración propia

Gráfico 2. Humedad Relativa (%) en el período de evaluación 2011.



Fuente: Elaboración propia

2.8. REGISTRO DE DATOS

2.8.1. Contenido relativo de agua

El contenido relativo de agua, fue determinado antes de la cosecha final de cada planta. Esta prueba consistió en tomar dos folíolos del tercio superior de cada planta los cuales fueron envueltos en una lámina de plástico (Saran Wrap), con el fin de disminuir las pérdidas por transpiración, luego se colocaron dentro de una hoja de papel toalla previa codificación, a continuación fueron llevados en bandejas al laboratorio donde en la balanza se determinó el peso fresco de los folíolos (g), posteriormente estos folíolos fueron pegados cuidadosamente con la cinta maskingtape en la base de las bandejas para así ser hidratados durante 12 horas, luego se determinó el peso turgente (g), finalmente los folíolos se llevó al horno a 80° C, durante 48 horas donde se determinó el peso seco (g).

$$CRA = \frac{\text{Peso}_{\text{ fresco}} - \text{Peso}_{\text{ seco}}}{\text{Peso}_{\text{ turgente}} - \text{Peso}_{\text{ seco}}}$$

Fuente: Barrs y Weatherly, 1962

2.8.2. Altura de planta

La altura de planta se determinó a través de una wincha métrica de 5 m de longitud. Para determinar la altura se midió desde el cuello de planta hasta la yema apical.

2.8.3. Biomasa

La biomasa fresca y seca en gramos por planta es determinada a partir de los pesos en la cosecha, la cual se realizó considerando la partición de hojas, tallos, tubérculos, raíces, los cuales una vez cosechados fueron pesados, llenados en los distintos tamaños de bolsas de papel Kraft de acuerdo a su necesidad y con sus respectivos códigos. Posteriormente trasladados al horno a 80 °C durante 48 horas para lograr una deshidratación completa y así obtener los datos de biomasa seca.

2.8.4. Área foliar

El área foliar se determinó escaneando las hojas de las plantas durante la cosecha. Los foliolos de las hojas fueron acomodados en unas láminas de plástico transparente (vistoras), seguidamente escaneadas, las imágenes tienen un formato de imagen de mapas bits .BMP y en resolución de 100 dpi, los cuales fueron almacenados en carpetas, para su posterior análisis. Las hojas de las plantas estresadas requirieron mayor tiempo para ser acomodadas en las vistoras, en muchos de los casos, los foliolos fueron separados para mejorar la posición y evitar el traslape. El código que tomaba cada imagen era de acuerdo al código de identificación seguido del número de lámina.

Las imágenes almacenadas fueron analizadas con la ayuda del software: “Compu Eye, Leaf & Symptom Área” (Doki, Cairo, Egipto), el cual determina el área foliar, el síntoma de esta determinación se realiza de acuerdo a las características que son determinadas por el investigador, en consecuencia se determinó el área foliar (cm²). Este proceso fue realizado de manera secuencial, debido a la gran cantidad de imágenes almacenadas. Previamente, el software requería la calibración, de una regla o unidad de medida conocida, escaneada bajo las mismas condiciones de las imágenes mencionadas anteriormente.

2.8.5. Área específica de la hoja

Una vez determinada el peso turgente de los foliolos en la prueba de contenido relativo de agua, se determinó el área foliar (cm²) de los foliolos para este propósito se realizó el escaneado de cada uno ellos y mediante el software: “Compu Eye, LSA” se logró la determinación del área foliar, luego los foliolos son llevados al horno a 80 °C durante 48 horas y así determinar el peso seco, según la metodología antes descrita. A partir de la determinación del área foliar y del peso seco del foliolo (g) en la prueba de contenido relativo de agua, se calculó el área específica de la hoja (*AEH*, cm².g⁻¹) según la siguiente formula:

$$AEH = \frac{\text{Area}_{\text{foliar}}(\text{cm}^2)}{\text{Peso}_{\text{seco}_{\text{foliar}}}(\text{g})}$$

Fuente: Altesor, *et al.*, 1998

2.8.6. Eficiencia de transpiración

La eficiencia de transpiración en gramos de biomasa formada por kilogramo de agua transpirada (g de biomasa.kg⁻¹ H₂O transpirada) en cada maceta, fue determinada a partir del incremento de la biomasa seca (g) desde el inicio de la prueba, hasta la cosecha final. Por tal motivo, la pre cosecha es útil para establecer el punto inicial de la biomasa cuando empieza la prueba. La transpiración acumulada es determinada desde la sumatoria de las transpiraciones diarias de cada maceta, en cada grupo de cultivares nativos y para los tratamientos de riego normal y sequía regulada.

La transpiración diaria ($T_{\text{día}}$) fue calculada a partir de la siguiente formula:

$$T_{\text{día}_{d-1}} = \left(\text{Peso}_{\text{maceta}_{\text{día}_{d-1}}} \right) - \left(\text{Peso}_{\text{maceta}_{\text{día}_{d}}} \right)$$

Las plantas sometidas bajo el tratamiento riego normal, recibieron riego diariamente la misma cantidad de agua transpirada y hasta un 80% de la capacidad de campo del suelo en las macetas. Esto con el fin de no saturar el suelo y dado que la papa es ligeramente sensible a la falta de aire en el suelo. El tratamiento de sequía regulada estuvo sometido a pérdidas sucesivas por transpiración diaria, hasta de 150 mililitros en los 4 primeros días, posteriormente se redujo estas pérdidas sucesivas hasta 70 mililitros hasta el final de la prueba. Los valores de transpiración que excedían los límites antes descritos, fueron repuestos cada día por la aplicación del riego diario en la misma maceta, según cada registro de pesos, el agua a agregar diariamente era medida a través de probetas y aplicada por medio de un embudo, por espacios del embolsado plástico, al nivel de cuello de la planta.

2.8.7. Valor umbral de la fracción transpirable de agua en el suelo

Para minimizar la influencia en la transpiración en el período de la prueba, debido a los factores ambientales, las tasas de transpiración diaria del tratamiento de sequía regulada en cada maceta y del cultivar fueron

normalizadas, a partir del promedio en las plantas sometidas bajo el tratamiento de riego normal o control. Esto es mostrado en la siguiente formula.

$$TT = \frac{\text{transpiración_de_planta_en_sequía_regulada}}{\text{transpiración_promedio_de_plantas_control}}$$

Fuente: Ray y Sinclair, 1997

Donde TT es la transpiración relativa. Una segunda normalización es realizada para remover la variación en TT debida al tamaño de planta. TT diaria de cada maceta en el tratamiento de sequía regulada es dividida entre el promedio de los tres primeros días, en cada una de las macetas (Ray y Sinclair, 1997).

$$TN = \frac{TT_de_la_planta}{TT_promedio_de_tres_primeros_días_de_la_planta}$$

Fuente: Ray y Sinclair, 1997

Donde TN es la transpiración normalizada y sirve para eliminar variaciones, y partir de condiciones iniciales estables como las adecuadas condiciones de agua disponible en el suelo. Después de esta normalización, los valores iniciales de la TN en el tratamiento de sequía regulada fueron cercanos a 1.0, para luego ir descendiendo (Ray et al., 2002). Todo este procedimiento fue realizado en una hoja de cálculo (MS Excel 2007).

La tasa de transpiración normalizada (TTN) es el promedio de las TN para cada día en cada maceta, el fin de la prueba termina cuando la TTN es menor a 0.10. Este término de la prueba indica el momento de la cosecha de cada uno de los genotipos.

La fracción de agua transpirable del suelo (FATS) es medida como la capacidad de extracción de agua en respuesta a la sequía. Los valores diarios de FATS son calculados dividiendo cada día; el peso diario de cada maceta menos el peso final de la maceta (cuando la TTN llega a 0.1 o 10%), entre el peso inicial y el peso final de cada maceta. El FATS se define como 1, cuando está en capacidad de campo (al inicio de la prueba), y es 0

cuando la transpiración de las plantas en las macetas bajo el tratamiento de sequía regulada, son iguales o menores al 10% de la transpiración en condiciones potenciales o tratamiento de riego normal.

$$FATS_{diario} = \frac{\text{Peso}_{diario_de_la_maceta} - \text{Peso}_{final_de_la_maceta}}{\text{Peso}_{inicial_de_la_maceta} - \text{Peso}_{final_de_la_maceta}}$$

Para determinar el valor umbral de la FATS se realiza previamente una relación entre: los valores diarios de la FATS de cada maceta, en conjunto para cada variedad (en el eje X), y los valores diarios de la TN de cada maceta, en conjunto para cada variedad (en el eje Y). La escala de la FATS está invertida y se inicia en 1, en la intersección con el inicio de la TN. El valor umbral de la FATS representa el punto de cambio de la TN, antes de lo cual la TN posee valores cercanos a 1.

2.8.8. Potencial osmótico

El potencial osmótico (MPa) fue medido en las cámaras psicrométricas C-52 (Wescor), determinado con el microvoltímetro HR-33T. El método utilizado para la determinación es "Punto de rocío". Este método consiste en que una vez colocada la muestra en la cámara psicrométrica, y pasado el tiempo de equilibrio de la muestra (30 minutos), se conecta la cámara con el microvoltímetro, corrigiendo la temperatura de la cámara, sobre un valor del microvoltímetro. Manual de operación del HR-33T, que establece los pasos para determinar el potencial de una muestra en bar o MPa.

Las muestras fueron tomadas en el momento de la cosecha, donde se tomaron 3 folíolos, los cuales pertenecían al tercio superior completamente expandida, los cuales se almacenó en una congeladora a una temperatura de -60 C. En el laboratorio se obtuvieron los discos a partir de un sacabocado de 7 mm de diámetro, el cual es adecuado para colocarlo, en la porta muestra de la cámara del psicrométrica (C-52). Se usó nitrógeno líquido, con el fin de romper la membrana celular, al momento de producirse la descongelación de la muestra. Después del tiempo de equilibrio en las cámaras se realizó la lectura con el Microvoltímetro. Para medir el potencial

osmótico se utilizó dos cámaras, las cuales los valores fueron promediados y se obtuvo el valor promedio del potencial osmótico en MPa.

2.8.9. Determinación de prolina

La acumulación de prolina libre en las hojas de plantas bajo estrés hídrico ha sido reportada en numerosas especies vegetales, tales como cebada, trigo, sorgo, algodón, tabaco así como también en papa. En tal sentido, se ha sugerido utilizar la acumulación de prolina como un mecanismo de resistencia a la sequía. En consecuencia el objetivo de este análisis es determinar la concentración de prolina libre por cada planta, las cuales sometidas a los dos distintos tratamientos. La determinación de prolina se realizó por el método descrito por Bates, (1973).

2.8.10. Determinación de nitrato reductasa

La síntesis de la enzima Nitrato Reductasa es auto inducida por el sustrato, o sea por el nitrato, y en las hojas además la actividad de la nitrato reductasa depende de la luz, de tal forma que cuando falta la luz el NO_3^- tiende a acumularse sin ser reducido. Su relación con la fotosíntesis, con el estado fisiológico de la planta, con el estatus nutricional sobre todo en NO_3^- y Mo, con la especie, y con el grado de Strain hace que la actividad de la enzima redunde directamente en la asimilación del Nitrógeno nítrico y en los rendimientos de los cultivos. Por esto, la determinación de la actividad de esta enzima es muy importante sobre todo para su evaluación en comportamiento fisiológico de las plantas que fueron sometidos a los dos distintos tratamiento dentro de la prueba realizada. La determinación de actividad de la enzima tiene como objetivo obtener la cuantificación de los valores para establecer su relación de tolerancia al estrés. La metodología aplicada para su determinación es el método descrito por Neyra y Hageman (1972) y adaptada por Álvarez (1984).

2.8.11. Determinación de glicina betaína

En estudios realizados se ha demostrado que el estrés hídrico causa irregularidades y variaciones en los mecanismos fisiológicos de la planta, y el contenido de glicina betaína no es una excepción, este es un compuesto

cuaternario que se acumula principalmente en las hojas y el tallo de las plantas. La presencia de constituyentes metabólicos que pueden ser correlacionados con las respuestas de las plantas al estrés hídrico y que puedan ser fácil y rápidamente analizados sería de gran valor para confirmar la tolerancia al estrés hídrico y otros. Grieve y Grattan, (1983) han desarrollado una técnica para cuantificar la glicina betaína en tejidos vegetales en la cual a partir de un extracto acuoso se precipitan complejos de glicina betaína los que luego son determinados a través de un espectrómetro. En consecuencia los análisis realizados tienen como objetivo determinar el contenido de glicina betaína para determinar las relaciones con la tolerancia al estrés hídrico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. RESUMEN DE CUADROS DE LOS ANALISIS DE VARIANCIA

Cuadro 4. Resumen de variables para los cuadros de análisis de variancia

ABREV.	VARIABLES
A – CRA	Contenido relativo de agua
B – AP	Altura de planta
C – BHF	Biomasa de hojas en fresco por planta
D – BHS	Biomasa de hojas en seco por planta
E – BTAF	Biomasa de tallos en fresco por planta
F – BTAS	Biomasa de tallos en seco por planta
G – BRF	Biomasa de raíces en fresco por planta
H – BRS	Biomasa de raíces en seco por planta
I – BTUBF	Biomasa de tubérculos en fresco por planta
J – BTUBS	Biomasa de tubérculos en seco por planta
K – NT	Número de tubérculos por planta
L – BTF	Biomasa total en fresco por planta
M – BTS	Biomasa total en seco por planta
N – AFP	Área foliar por planta
O – AEH	Área específica de la hoja por planta
P – ETB	Eficiencia de transpiración de la biomasa
Q – ETT	Eficiencia de transpiración del tubérculo
R – PO	Potencial osmótico
S – P	Contenido de prolina
T – NR	Contenido de nitrato reductasa
U – GB	Contenido de glicina - betaína

Cuadro 5. Resumen de análisis de variancia de las variables en estudio.

F. de V.	G.L.	A - CRA		B - AP		C - BHF		D - BHS		E - BTAF		F - BTAS		G - BRF	
		C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.
Repeticiones	4	0,003	ns	0,011	ns	820,570	ns	6,386	ns	129,669	ns	3,131	ns	9,304	ns
A(Genotipos)	9	0,046	**	0,982	**	3976,472	**	66,822	**	7997,396	**	123,258	**	1960,598	**
B(Riegos)	1	0,751	**	0,279	**	356637,090	**	898,321	**	248471,344	**	338,681	**	11935,344	**
AB	9	0,008	ns	0,021	ns	1494,259	ns	2,631	ns	2314,949	*	2,843	ns	480,583	ns
Error	76	0,003		0,031		856,780		8,992		871,954		8,718		76,032	
S		0,05		0,18		29,27		3,00		29,53		2,95		8,72	
X̄		0,69		1,25		105,43		13,35		110,59		11,46		27,81	
C.V. (%)		7,78		14,22		27,76		22,46		26,70		25,77		31,35	

F. de V.	G.L.	H - BRS		I - BTUBF		J - BTUBS		K - NT		L - BTF		M - BTS		N - AF	
		C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.
Repeticiones	4	0,75	ns	2524,449	ns	114,972	ns	66,040	ns	6925,507	ns	215,083	ns	59657,475	ns
A(Genotipos)	9	47,405	**	27957,01	**	1303,328	**	207,862	**	76819,994	**	3096,575	**	21719499,7	**
B(Riegos)	1	31,114	**	411417,051	**	11914,235	**	750,760	**	3408923,391	**	23088,696	**	618948987,2	**
AB	9	7,219	**	5183,817	ns	208,633	ns	23,160	ns	22891,708	*	235,406	ns	3900011,861	**
Error	76	1,752		3303,94		160,801		42,377		10729,882		309,373		784972,685	
S		1,32		57,48		12,68		6,51		103,59		17,59		885,99	
X̄		4,49		162,61		33,84		15,18		406,44		63,14		5614,76	
C.V. (%)		29,49		35,35		37,47		42,88		25,49		27,86		15,78	

Continuación del cuadro 5.....

F. de V.	G.L.	O - AEH		P - ETB		Q - ETT		R - PO		S - P		T - NR		U - GB	
		C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.	C.M.	Sig.
Repeticiones	4	1362,813	ns	0,106	ns	1,023	ns	0,138	ns	269,233	ns	0,00009	ns	55884,226	ns
A(Genotipos)	9	33044,688	**	1,929	**	7,158	**	0,198	ns	11221,973	**	0,00140	**	1504106,727	**
B(Riegos)	1	812499,107	**	4,728	**	1,762	ns	6,167	**	199464,428	**	0,00225	**	14072838,400	**
AB	9	4227,002	*	0,159	ns	0,548	ns	0,172	ns	11306,903	**	0,00068	*	400092,486	**
Error	76	2012,176		0,144		0,628		0,153		1521,452		0,00026		69880,935	
S		44,86		0,38		0,79		0,39		39,01		0,02		264,35	
X̄		382,54		4,40		3,10		2,34		49,72		0,03		2309,94	
C.V. (%)		11,73		8,62		25,54		16,73		78,45		48,62		11,44	

En el cuadro 5 del resumen de análisis de variancia de las variables en estudio; se observa que, en la fuente de repeticiones de todas las variables en estudio no existe diferencia estadística significativa debido a que las repeticiones dentro del experimento fueron conducidas homogéneamente. En la fuente del factor A (genotipos) existe diferencia estadística altamente significativa debido al carácter genético que gobiernan a cada genotipo en estudio que hacen variar la característica en estudio, a excepción del potencial osmótico donde no existe diferencia estadística significativa. En la fuente de factor B (riegos) existe diferencia estadística altamente significativa debido a los tipos de riego aplicados en el experimento que influyen directamente en 20 variables en estudiadas a excepción en la eficiencia de transpiración del tubérculo donde se observa que no existe diferencia estadística significativa. Mientras que en la fuente de interacción AB en 4 variables en

estudio (H - BRS, N - AFP, S - P, U - GB) existe diferencia estadística altamente significativa debido a que los niveles de cada factor interaccionaron, en 4 variables en estudio (E - BTAF, L - BTF, O - AEH, T - NR) existe diferencias estadísticas significativas debido a que los niveles de cada factor interactuaron ya sea el factor genotipo o factor tipo de riego y en 13 (A - CRA, B - AP, C - BHF, D - BHS, F - BTAS, G - BRF, I - BTUBF, J - BTUBS, K - NT, M - BTS, P - ATB, Q - ETT, R - PO) variables en estudio no existe diferencia estadística significativa debido a que los niveles de cada factor no interaccionaron; es decir, actuaron independientemente.

El coeficiente de variabilidad de las variables contenido relativo de agua y eficiencia de la transpiración son de 7,78 y 8,62% respectivamente, estos son considerados como muy bajo (Osorio, 2000), el cual indica que la respuesta del material experimental dentro de cada tratamiento fue muy homogénea. Así como también observamos que el coeficiente de variabilidad de las variables altura de planta, área foliar, área específica de la hoja, potencial osmótico y el contenido de glicina betaína son de 14,22; 15,78; 11,73, 16.73 y 11,44% respectivamente, estos son considerados como “Bajo”, el cual indica que la respuesta del material experimental dentro de cada tratamiento fue homogénea. Del mismo modo observamos que el coeficiente de variabilidad de la variables biomasa de hojas en fresco, biomasa de hojas en seco, biomasa de tallos en fresco, biomasa de tallos en seco, biomasa de raíces en seco, biomasa total en fresco, biomasa total en seco y eficiencia de transpiración de tubérculo son de 27,76; 22,46; 26,70; 25,77; 29,49; 25,49; 27,86 y 25,54% respectivamente, estos son considerados como moderadamente alto, el cual indica que la respuesta del material experimental dentro de cada tratamiento fue con tendencia a ser heterogénea. También observamos que el coeficiente de variabilidad de las variables biomasa de raíces en fresco, biomasa de tubérculos en fresco y la biomasa de tubérculos en seco son de 31,35; 35,35 y 37,47% respectivamente, estos son considerados como alto, el cual indica que la respuesta del material experimental dentro de cada tratamiento fue heterogénea. Finalmente observamos que el coeficiente de variabilidad de

las variables número de tubérculos, contenido de prolina y contenido de nitrato reductasa son 42,88; 78,45 y 48,62% respectivamente, el cual indica que la respuesta del material experimental dentro de cada tratamiento fue muy heterogénea.

3.2. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (g.g⁻¹)

Cuadro 6. Prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	399053.11	0,852	a			
2	393382.44	0,725	b			
3	C99.747	0,712	b	c		
4	C99.977	0,709	b	c	d	
5	399062.119	0,701	b	c	d	e
6	395380.8	0,690	b	c	d	e
7	374080.5	0,636		c	d	e
8	RC1496.43B	0,633			d	e
9	391691.96	0,631			d	e
10	380389.1	0,629				e

A.L.S.(T)_{0,05}=0,079

En el cuadro 6 de la prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua; se observa que, el genotipo 399053.11 que ocupa el primer lugar según el orden de mérito con un promedio de 0,852 g.g⁻¹ muestra significación estadística con los nueve genotipos restantes, debido a que este genotipo presenta un mayor grado de recuperación frente al estrés hídrico en comparación a los demás genotipos. Tal como es corroborado por **Cornejo y Vadia (1966)** que manifiesta que, el contenido relativo de agua permite conocer indirectamente el grado de recuperación de las plantas luego de un período de estrés hídrico.

Cuadro 7. Prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	0,779	a
2	Sequia regulada	0,605	b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,021

En el cuadro 7 de la prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 0,779 g.g⁻¹ supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 0,605 g.g⁻¹; esto debido a que los tratamientos de sequía regulada son afectados en comparación a los tratamientos de riego normal para el contenido relativo de agua. Propuesto por **Jerez, et al. (1991)**, que menciona que el estrés hídrico provoca serios daños en el alargamiento celular más que en la división celular, ya que al estar las células menos turgentes, se afecta la distensión de la pared celular.

Cuadro 8. Prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₂ b ₁	0,922	a
2	a ₁ b ₁	0,814	a b
3	a ₃ b ₁	0,806	a b
4	a ₄ b ₁	0,790	b c
5	a ₂ b ₂	0,781	b c d
6	a ₆ b ₁	0,774	b c d
7	a ₇ b ₁	0,762	b c d
8	a ₁₀ b ₁	0,757	b c d
9	a ₅ b ₁	0,747	b c d
10	a ₉ b ₁	0,715	b c d e
11	a ₈ b ₁	0,700	b c d e
12	a ₅ b ₂	0,677	c d e f
13	a ₄ b ₂	0,661	d e f g
14	a ₃ b ₂	0,612	e f g h
15	a ₆ b ₂	0,606	e f g h
16	a ₁ b ₂	0,589	e f g h
17	a ₈ b ₂	0,562	f g h
18	a ₉ b ₂	0,544	g h
19	a ₁₀ b ₂	0,516	h
20	a ₇ b ₂	0,505	h

A.L.S.(T)_{0,05}=0,125

En el cuadro 8 de la prueba de significación de los promedios del contenido relativo de agua; se observa que, los tres primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar de esta variable en estudio; así mismo, la interacción a_2b_1 (399053.11 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de $0,922 \text{ g.g}^{-1}$, muestra significación estadística con las 17 interacciones restantes debido a que este genotipo presentó un mayor grado de turgencia en condiciones óptimas de humedad. Tal como es corroborado por **Cornejo y Vadia (1966)**. Las plantas con riego óptimo pueden perder la turgencia en el día, pero estas vuelven a la turgencia completa durante la noche, lo cual no ocurre en las plantas sometidas a estrés por sequía.

3.3. ALTURA DE PLANTA (metros)

Cuadro 9. Prueba de significación de los promedios de la altura de planta para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	RC1496.43B	1,737	a			
2	391691.96	1,642	a	b		
3	C99.977	1,439		b	c	
4	393382.44	1,338			c	d
5	395380.8	1,230			c	d
6	399062.119	1,225			c	d
7	374080.5	1,152				d
8	380389.1	1,131				d
9	C99.747	0,816				e
10	399053.11	0,764				e

A.L.S.(T)_{0,05}=0,259

En el cuadro 9 de la prueba de significación de los promedios de la altura planta; se observa que, los dos primeros genotipos según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por presentar características similares de esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo RC1496.43B que ocupa el primer lugar con un promedio de 1,737 m muestra significación estadística con los ocho genotipos restantes, debido a que este genotipo por sus características genéticas desarrolla una mayor altura.

Cuadro 10. Prueba de significación de los promedios de la altura de planta para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	1,300	a
2	Sequia regulada	1,195	b

A.L.S.(T)_{0,05}= 0.071

En el cuadro 10 de la prueba de significación de los promedios de la altura de planta; se observa que, el tratamiento de riego normal con un promedio de 1,300 m supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con un promedio de 1,195 m; debido a que, en el tratamiento de riego normal el agua contribuye en el crecimiento de las plantas. El cual es corroborado por **Kramer (1989)**, la absorción reducida del agua del suelo es la causa del déficit hídrico, que a su vez provoca reducciones en el crecimiento.

Cuadro 11. Prueba de significación de los promedios de la altura de planta para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₇ b ₁	1,796	a
2	a ₈ b ₁	1,714	a b
3	a ₇ b ₂	1,678	a b c
4	a ₈ b ₂	1,570	a b c d
5	a ₃ b ₂	1,442	a b c d e
6	a ₃ b ₁	1,436	a b c d e
7	a ₄ b ₁	1,354	b c d e
8	a ₄ b ₂	1,322	b c d e f
9	a ₁ b ₁	1,310	b c d e f
10	a ₆ b ₁	1,296	c d e f
11	a ₁₀ b ₁	1,200	d e f g
12	a ₆ b ₂	1,164	d e f g
13	a ₉ b ₁	1,152	e f g
14	a ₁ b ₂	1,140	e f g
15	a ₉ b ₂	1,110	e f g
16	a ₁₀ b ₂	1,104	e f g
17	a ₂ b ₁	0,916	f g h
18	a ₅ b ₁	0,828	g h
19	a ₅ b ₂	0,804	g h
20	a ₂ b ₂	0,612	h

A.L.S.(T)_{0,05}=0,413

En el cuadro 11 de la prueba de significación de los promedios de la altura de planta; se observa que, las seis primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable de estudio. Así mismo, la interacción a_7b_1 (RC1496.43B – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 1,796 m muestra significación estadística con las catorce interacciones restantes, debido a que este genotipo por sus características genéticas desarrolla una mayor altura.

3.4. BIOMASA

3.4.1. Biomasa de hojas en fresco por planta (gramos)

Cuadro 12. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación		
1	399062.119	142,106	a		
2	393382.44	124,366	a	b	
3	380389.1	123,666	a	b	
4	C99.977	113,015	a	b	c
5	RC1496.43B	97,532		b	c
6	374080.5	96,279		b	c
7	399053.11	94,560		b	c
8	391691.96	94,321		b	c
9	C99.747	94,173		b	c
10	395380.8	74,275			c

A.L.S.(T)_{0,05}=42,819

En el cuadro 12 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco; se observa que, los cuatro primeros genotipos según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por presentar características similares de la variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 399062.119 que ocupa el primer lugar con un promedio de 142,106 g muestra significación estadística con los seis genotipos restantes, debido a que este genotipo presentó una mayor cantidad de hojas y folíolos grandes.

Cuadro 13. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	165,1484	a
2	Sequia regulada	45,7102	b

A.L.S.(T)_{0,05}=11,682

En el cuadro 13 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco; se observa que, el tratamiento de riego normal con un promedio de 165,1484 g supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con 45,7102 g, debido a que, en el tratamiento de riego normal el agua contribuye en el crecimiento y desarrollo de las plantas lo que significa una mayor producción de biomasa. Tal como es corroborado por **Martínez y Huamán (1987)**, el cual menciona que en condiciones de estrés hídrico la planta disminuye su crecimiento y ensanchamiento celular la cual se traduce en una menor producción de biomasa foliar.

Cuadro 14. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₁ b ₁	223,288	a
2	a ₄ b ₁	200,204	a b
3	a ₉ b ₁	187,936	a b
4	a ₃ b ₁	175,388	a b c
5	a ₁₀ b ₁	160,934	a b c
6	a ₂ b ₁	149,020	b c
7	a ₅ b ₁	148,212	b c
8	a ₇ b ₁	144,384	b c
9	a ₈ b ₁	143,420	b c
10	a ₆ b ₁	118,698	c d
11	a ₁ b ₂	60,924	d e
12	a ₉ b ₂	59,396	d e
13	a ₇ b ₂	50,680	d e
14	a ₃ b ₂	50,642	d e
15	a ₄ b ₂	48,528	e
16	a ₈ b ₂	45,222	e
17	a ₅ b ₂	40,134	e
18	a ₂ b ₂	40,100	e
19	a ₁₀ b ₂	31,624	e
20	a ₆ b ₂	29,852	e

A.L.S.(T)_{0,05}=68,214

En el cuadro 14 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en fresco; se observa que, las cinco primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio; así mismo, la interacción a₁b₁ (399062.119– Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 223,288 g, muestra significación estadística con las 15 interacciones restantes debido a que este genotipo en condiciones de humedad favorable tiende a una mayor producción de biomasa de hojas en fresco. El cual es corroborado por **Jensen y Salisbury (1988)**, Las especies o variedades de plantas se diferencian en sus requerimientos hídricos óptimos y por tanto en su susceptibilidad al estrés hídrico.

3.4.2. Biomasa de hojas en seco por planta (gramos)

Cuadro 15. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación		
1	399062.119	16,494	a		
2	393382.44	16,031	a		
3	380389.1	15,219	a		
4	C99.977	14,798	a	b	
5	RC1496.43B	14,252	a	b	
6	374080.5	13,671	a	b	c
7	391691.96	13,355	a	b	c
8	C99.747	10,646		b	c
9	399053.11	9,568			c
10	395380.8	9,484			c

A.L.S.(T)_{0,05}=4,387

En el cuadro 15 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco; se observa que, los siete genotipos según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por presentar características similares de esta variable en estudio. Sin embargo los genotipos 399062.119, 393382.44, 380389.1 con promedios de 16,494; 16,031; 15,219 g respectivamente muestran significación estadística con los

tres últimos genotipos según el orden de mérito debido a su carácter intrínseco que los gobierna a cada uno de ellos.

Cuadro 16. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	16,349	a
2	Sequia regulada	10,355	b

A.L.S.(T)_{0,05}=1,197

En el cuadro 16 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 16,349 g supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con 10,355 g, debido a que en el tratamiento de riego normal el agua contribuye en el crecimiento y desarrollo de las plantas mientras que el tratamiento de sequía regulada se produce estrés hídrico por el cual existe disminución en el crecimiento y desarrollo de las plantas debido al mecanismo de evasión que estos presenta a factores adversos tal como lo menciona **Prado et al., (1999)**.

Cuadro 17. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación							
1	a ₁ b ₁	19,958	a							
2	a ₄ b ₁	19,048	a	b						
3	a ₃ b ₁	18,136	a	b	c					
4	a ₉ b ₁	17,870	a	b	c					
5	a ₁₀ b ₁	16,616	a	b	c	d				
6	a ₇ b ₁	16,524	a	b	c	d				
7	a ₈ b ₁	16,266	a	b	c	d				
8	a ₅ b ₁	13,838	a	b	c	d	e			
9	a ₂ b ₁	13,472	a	b	c	d	e			
10	a ₁ b ₂	13,030	a	b	c	d	e			
11	a ₄ b ₂	13,014	a	b	c	d	e			
12	a ₉ b ₂	12,568		b	c	d	e			
13	a ₇ b ₂	11,980			c	d	e	f		
14	a ₆ b ₁	11,762			c	d	e	f		
15	a ₃ b ₂	11,460			c	d	e	f		
16	a ₁₀ b ₂	10,726				d	e	f		
17	a ₈ b ₂	10,444				d	e	f		
18	a ₅ b ₂	7,454					e	f		
19	a ₆ b ₂	7,206					e	f		
20	a ₂ b ₂	5,664							f	

A.L.S.(T)_{0,05}=6,988

En el cuadro 17 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de hojas en seco; se observa que, las once primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar de esta variable en estudio por el efecto del tipo de riego normal. Sin embargo, la interacción a₁b₁ (399062.119–Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 19,958 g muestra significación estadística con las nueve interacciones restantes, debido a que este genotipo con condiciones de riego normal alcanza mayor desarrollo y crecimiento foliar.

3.4.3. Biomasa de tallos en fresco por planta (gramos)

Cuadro 18. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	C99.977	149,155	a			
2	393382.44	145,204	a			
3	399062.119	128,424	a	b		
4	380389.1	121,506	a	b	c	
5	RC1496.43B	116,240	a	b	c	
6	395380.8	109,989	a	b	c	
7	374080.5	108,613	a	b	c	
8	391691.96	86,463		b	c	d
9	C99.747	79,904			c	d
10	399053.11	60,439				d

A.L.S.(T)_{0,05}=43,197

En el cuadro 18 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco; se observa que, los siete genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por presentar características similares de esta variable en estudio. Sin embargo, los genotipos C99.977, 393382.44 con promedios de 149,155 y 145,204 g respectivamente muestran significación estadística con los tres últimos genotipos restantes, debido a que presentaron mayor número de tallos siendo estos vigorosos y por lo tanto tuvieron mayor biomasa.

Cuadro 19. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Normal	160,441	a	
2	Sequia regulada	60,747		b

A.L.S.(T)_{0,05}=11,785

En el cuadro 19 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 160,441 g supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con 60,747 g, debido a que en el tratamiento de riego normal el agua contribuye en el crecimiento de las plantas y por lo tanto presenta mayor biomasa fresca; mientras que, el tratamiento de sequía regulada se produce estrés hídrico por el cual existe disminución en el crecimiento y desarrollo de tallos.

Cuadro 20. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a_4b_1	223,510	a
2	a_3b_1	203,260	a
3	a_1b_1	186,522	a b
4	a_9b_1	176,508	a b c
5	$a_{10}b_1$	167,888	a b c
6	a_7b_1	166,096	a b c
7	a_6b_1	160,690	a b c d
8	a_8b_1	119,806	b c d e
9	a_5b_1	108,720	c d e f
10	a_3b_2	95,050	d e f g
11	a_2b_1	91,406	e f g
12	a_1b_2	70,326	e f g
13	a_4b_2	66,898	e f g
14	a_9b_2	66,504	e f g
15	a_7b_2	66,384	e f g
16	a_6b_2	59,288	e f g
17	a_8b_2	53,120	e f g
18	a_5b_2	51,088	e f g
19	$a_{10}b_2$	49,338	f g
20	a_2b_2	29,472	g

A.L.S.(T)_{0,05}=68,815

En el cuadro 20 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en fresco; se observa que, las siete primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio; así mismo, las interacciones a_4b_1 (393382.44– Riego normal) y a_3b_1 (C99.977 – riego normal) con promedios 223,510 y 203,260 g respectivamente, muestran significación estadística con las 13 interacciones restantes debido a que estos dos primeros genotipos obtuvieron mayor peso de tallos en fresco influenciado por el tipo de riego.

3.4.4. Biomasa de tallos en seco por planta (gramos)

Cuadro 21. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	393382.44	15,886	a			
2	C99.977	14,940	a			
3	399062.119	13,897	a	b		
4	RC1496.43B	13,029	a	b		
5	374080.5	12,973	a	b		
6	380389.1	11,982	a	b		
7	391691.96	10,192		b	c	
8	395380.8	9,919		b	c	
9	C99.747	6,931			c	d
10	399053.11	4,844				d

A.L.S.(T)_{0,05}=4,319

En el cuadro 21 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco; se observa que, los seis genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito, no muestran significación estadística entre ellas por presentar características similares de esta variable en estudio. Sin embargo los genotipos 393382.44 y C99.977 con promedio de 15,886 y 14,940 g respectivamente muestran significación estadística con los ocho genotipos restantes según el orden de mérito, debido a que presentaron mayor número de tallos vigorosos por su mayor contenido de humedad por lo tanto mayor biomasa de tallos en seco.

Cuadro 22. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco para los niveles del factor B, según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Normal	13,300	a	
2	Sequia regulada	9,619		b

A.L.S.(T)_{0,05}=1,178

En el cuadro 22 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 13,300 g supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con 9,619 g, debido a que en el tratamiento de riego normal el agua contribuye en el crecimiento de los tallos mientras que el tratamiento de sequía regulada se produce estrés hídrico por el cual existe disminución en el crecimiento y desarrollo de tallos la cual se traduce en una menor producción del mismo.

Cuadro 23. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco para la interacción AB (genotipos x riegos), Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a_4b_1	18,068	a
2	a_3b_1	16,606	a b
3	a_1b_1	16,286	a b
4	$a_{10}b_1$	15,708	a b
5	a_7b_1	15,128	a b c
6	a_4b_2	13,704	a b c d
7	a_9b_1	13,418	a b c d e
8	a_3b_2	13,274	a b c d e
9	a_8b_1	11,740	a b c d e f
10	a_6b_1	11,528	a b c d e f
11	a_1b_2	11,508	a b c d e f
12	a_7b_2	10,930	b c d e f
13	a_9b_2	10,546	b c d e f
14	$a_{10}b_2$	10,238	b c d e f
15	a_8b_2	8,644	c d e f g
16	a_6b_2	8,310	c d e f g
17	a_5b_1	7,802	d e f g
18	a_2b_1	6,712	e f g
19	a_5b_2	6,060	f g
20	a_2b_2	2,975	g

A.L.S.(T)_{0,05}=6,881

En el cuadro 23 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tallos en seco; se observa que, las once primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_4b_1 (393382.44 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 18,068 g muestra significación estadística con las nueve interacciones restantes, debido a que en condiciones de riego normal existe una mayor extracción de agua del suelo lo que se traduce en una mayor producción de biomasa de tallos en seco.

3.4.5. Biomasa de raíces en fresco por planta (gramos)

Cuadro 24. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	380389.1	55,527	a			
2	374080.5	38,331	b			
3	C99.977	35,259	b			
4	393382.44	35,179	b	c		
5	RC1496.43B	29,036	b	c	d	
6	C99.747	22,436		c	d	e
7	391691.96	21,139			d	e
8	395380.8	20,028			d	e
9	399062.119	15,477				e f
10	399053.11	5,713				f

A.L.S.(T)_{0,05}=12,756

En el cuadro 24 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco; se observa que, el genotipo 380389.1 con un promedio de 55,527 g, que ocupa el primer lugar según el orden de mérito, muestra significación estadística con los nueve genotipos restantes, debido a sus características propias este genotipo produce un mayor número de raicillas lo que se traduce en un mayor peso de raíces.

Cuadro 25. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco para los niveles del factor B, según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	38,737	a
2	Sequia regulada	16,888	b

A.L.S.(T)_{0,05}=3,480

En el cuadro 25 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 38,737 g supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 16,888 g; esto debido a que en condiciones de riego normal existe una mayor contenido de humedad de las raíces en comparación a las raíces del tratamiento de sequía regulada.

Cuadro 26. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación																
1	a_9b_1	74,740	a																
2	$a_{10}b_1$	59,356	a	b															
3	a_4b_1	54,420	a	b	c														
4	a_3b_1	48,596		b	c	d													
5	a_9b_2	36,314			c	d	e												
6	a_7b_1	36,176			c	d	e	f											
7	a_6b_1	30,368				d	e	f	g										
8	a_5b_1	28,448				d	e	f	g										
9	a_8b_1	27,734					e	f	g										
10	a_3b_2	21,922					e	f	g	h									
11	a_7b_2	21,896					e	f	g	h									
12	a_1b_1	20,784					e	f	g	h									
13	$a_{10}b_2$	17,306					e	f	g	h									
14	a_5b_2	16,424					e	f	g	h									
15	a_4b_2	15,938						f	g	h									
16	a_8b_2	14,544							g	h									
17	a_1b_2	10,170							g	h									
18	a_6b_2	9,688								h									
19	a_2b_1	6,752								h									
20	a_2b_2	4,674								h									

A.L.S.(T)_{0,05}=20,320

En el cuadro 26 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en fresco; se observa que, las tres primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio; así mismo, la interacción a_9b_1 (380389.1 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 74,740 g, muestra significación estadística con las diecisiete interacciones restantes debido a que, por la humedad constante presenta raíces más suculentas y de mayor peso por efecto del tipo de riego normal.

3.4.6. Biomasa de raíces en seco por planta (gramos)

Cuadro 27. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en seco para los niveles de factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación					
1	380389.1	8,359	a					
2	374080.5	6,546	a	b				
3	RC1496.43B	5,860		b	c			
4	C99.977	5,439		b	c	d		
5	391691.96	4,620		b	c	d	e	
6	393382.44	4,318			c	d	e	f
7	399062.119	3,557				d	e	f
8	395380.8	2,837					e	f
9	C99.747	2,452						f g
10	399053.11	0,900						g

A.L.S.(T)_{0,05}=1,936

En el cuadro 27 de la prueba de significación de los promedios de raíces en seco; se observa que, los dos genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por presentar respuestas similares de la variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 300389.1 que ocupa el primer lugar con un promedio de 8,359 g muestra significación estadística con los ocho genotipos restantes, debido a que este genotipo tiene como característica mayor desarrollo y crecimiento de raíces como mecanismo de evitar la deshidratación a causa del déficit hídrico. Tal como lo mencionan **Medrano et al., (2007)**.

Cuadro 28. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en seco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Sequia regulada	5,047	a	
2	Normal	3,931		b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,528

En el cuadro 28 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en seco; se observa que, el tratamiento con sequia regulada con un promedio de 5,047 g supera estadísticamente al tratamiento de riego normal que presenta un promedio de 3,931 g; por causas de que en condiciones de hídrico la planta como mecanismo de evasión presenta un mayor número de raíces. Tal como lo afirma **Medrano et al., (2007)**.

Cuadro 29. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en seco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación				
1	a_9b_2	10,872	a				
2	a_7b_2	7,334	b				
3	$a_{10}b_2$	6,760	b c				
4	$a_{10}b_1$	6,332	b c				
5	a_3b_2	6,154	b c d				
6	a_9b_1	5,846	b c d e				
7	a_3b_1	4,724	b c d e f				
8	a_8b_2	4,704	b c d e f				
9	a_8b_1	4,536	b c d e f				
10	a_4b_2	4,386	b c d e f				
11	a_7b_1	4,386	b c d e f				
12	a_4b_1	4,250	b c d e f				
13	a_1b_1	3,990	c d e f h				
14	a_6b_2	3,240	d e f h				
15	a_1b_2	3,124	d e f h				
16	a_5b_2	2,890	e f h				
17	a_6b_1	2,434	f h				
18	a_5b_1	2,014	f h				
19	a_2b_2	1,002	h				
20	a_2b_1	0,798	h				

A.L.S.(T)_{0,05}=3,085

En el cuadro 29 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de raíces en seco; se observa que, la interacción a_9b_2 (380389.1 – sequia regulada) que ocupa el primer lugar con un promedio de 10,872 g muestra significación estadística con las 19 interacciones restantes debido a que este genotipo tiende a una mayor producción y crecimiento de raíces como mecanismo de evasión del estrés hídrico tal como lo afirma **Medrano et al., (2007)**.

3.4.7. Biomasa de tubérculos en fresco por planta (gramos)

Cuadro 30. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación	
1	374080.5	242,791	a	
2	393382.44	199,247	a	b
3	RC1496.43B	186,705	a	b
4	391691.96	174,214	a	b
5	395380.8	173,203	a	b
6	C99.747	162,622	a	b
7	380389.1	160,769	a	b
8	399062.119	145,945		b
9	C99.977	144,235		b
10	399053.11	36,341		c

A.L.S.(T)_{0,05}=84,086

En el cuadro 30 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco; se observa que, los siete genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 374080.5 que ocupa el primer lugar con un promedio de 242,791 g, muestra significación estadística con los tres últimos genotipos restantes, debido a que este genotipo alcanzó una mayor producción de biomasa de tubérculos por efecto de la mayor acumulación de fotosintatos que sirven para la formación de tubérculos corroborado por **Green et al., (1985)**.

Cuadro 31. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Normal	226,749	a	
2	Sequia regulada	98,465		b

A.L.S.(T)_{0,05}=22,940

En el cuadro 31 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco; se observa que, el tratamiento riego normal con promedio de 226,749 g, supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con promedio de 98,465 g, debido a que en condiciones de humedad las plantas tienen una mayor capacidad en la traslocación de fotosintatos hacia los órganos de reserva. Tal como es corroborado por **Green et al. (1985)**. El estrés hídrico en el cultivo de papa no solo reduce la

cantidad de luz interceptada, sino también la eficiencia de conversión de esta energía.

Cuadro 32. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	$a_{10}b_1$	334,410	a
2	a_4b_1	288,728	a b
3	a_8b_1	246,826	a b c
4	a_6b_1	246,298	a b c
5	a_7b_1	238,094	a b c d
6	a_9b_1	231,222	a b c d e
7	a_5b_1	220,170	a b c d e f
8	a_1b_1	217,468	b c d e f
9	a_3b_1	195,194	b c d e f g
10	$a_{10}b_2$	151,172	c d e f g h
11	a_7b_2	135,316	c d e f g h
12	a_4b_2	109,766	d e f g h
13	a_5b_2	105,074	d e f g h
14	a_8b_2	101,602	e f g h
15	a_6b_2	100,108	e f g h
16	a_3b_2	93,276	f g h
17	a_9b_2	90,316	f g h
18	a_1b_2	74,422	g h
19	a_2b_1	49,080	h
20	a_2b_2	23,602	h

A.L.S.(T)_{0,05}=133,953

En el cuadro 32 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en fresco; se observa que, las siete primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar de esta variable en estudio. Así mismo, la interacción $a_{10}b_1$ (374080.5 – riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 334,410 g muestra significación estadística con las trece interacciones restantes, debido a que este genotipo tiende a la mayor producción de biomasa de tubérculos por efecto del riego normal, mencionado por **Martínez y Huamán (1987)**.

3.4.8. Biomasa de tubérculos en seco por planta (gramos)

Cuadro 33. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco para los niveles de factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	393382.44	46,721	a
2	374080.5	44,425	a
3	391691.96	40,230	a
4	RC1496.43B	38,554	a
5	380389.1	35,336	a
6	395380.8	34,600	a
7	399062.119	32,431	a
8	C99.977	30,742	a
9	C99.747	29,814	a
10	399053.11	5,532	b

A.L.S.(T)_{0,05}=18,550

En el cuadro 33 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco; se observa que, los nueve genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para este variable estudio. Superando al genotipo 399053.11 con un promedio 5,532 g que ocupa el décimo lugar, debido a que este último genotipo está considerado que tiene un periodo vegetativo tardío por lo tanto la producción de tubérculos a la fecha de evaluación del experimento fue mínimo.

Cuadro 34. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	44,754	a
2	Sequia regulada	22,923	b

A.L.S.(T)_{0,05}=5,061

En el cuadro 34 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 44,754 g, supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con un promedio de 22,923 g, debido a que en riego normal hubo mayor producción de biomasa de tubérculos en comparación

con el tratamiento de sequía por efecto de la humedad que contribuye a la de traslocación de fotosintatos. Corroborado por **Martínez y Huamán (1987)**. La papa disminuye su rendimiento a medida que el estrés hídrico se incrementa.

Cuadro 35. Prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación					
1	a_4b_1	65,144	a					
2	$a_{10}b_1$	56,412	a	b				
3	a_8b_1	53,989	a	b	c			
4	a_6b_1	47,500	a	b	c	d		
5	a_7b_1	47,012	a	b	c	d		
6	a_9b_1	46,187	a	b	c	d		
7	a_1b_1	46,030	a	b	c	d		
8	a_3b_1	40,034	a	b	c	d		
9	a_5b_1	38,690	a	b	c	d		
10	$a_{10}b_2$	32,438		b	c	d	e	
11	a_7b_2	30,096		b	c	d	e	
12	a_4b_2	28,298		b	c	d	e	
13	a_8b_2	26,471			c	d	e	
14	a_9b_2	24,485			c	d	e	
15	a_6b_2	21,699				d	e	
16	a_3b_2	21,449				d	e	
17	a_5b_2	20,937				d	e	
18	a_1b_2	18,832				d	e	
19	a_2b_1	6,538					e	
20	a_2b_2	4,525					e	

A.L.S.(T)_{0,05}=29,552

En el cuadro 35 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa de tubérculos en seco; se observa que, las nueve primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio; así mismo, la interacción a_4b_1 (393382.44 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio 65,144 g, muestra significación estadística con las once interacciones restantes, debido a que este genotipo tiene como característica una mayor acumulación de fotosintatos en los órganos de reserva (tubérculo) con un riego normal. La condiciones de sequía disminuye

la fotosíntesis la cual causa una alteración en la traslocación y distribución de fotosintatos, tal como lo menciona **Prado et al., (1999)**.

3.5. Número de tubérculos por planta

Cuadro 36. Prueba de significación de los promedios del número de tubérculos para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación		
1	393382.44	24,50	a		
2	399062.119	20,20	a	b	
3	C99.977	18,10	a	b	c
4	380389.1	15,60	a	b	c
5	C99.747	14,10		b	c
6	374080.5	14,10		b	c
7	391691.96	12,30		b	c
8	RC1496.43B	12,10		b	c
9	399053.11	10,90		b	c
10	395380.8	9,90			c

A.L.S.(T)_{0,05}=9,523

En el cuadro 36 de la prueba de significación de los promedios del número de tubérculos; se observa que, los cuatro genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares en esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 393382.44 que ocupa el primer lugar con un promedio de 24,50 tubérculos por planta, muestra significación estadística con los 6 genotipos restantes, debido a que la producción de tubérculos de cada genotipo está relacionada a características propias de la especie a la que pertenece.

Cuadro 37. Prueba de significación de los promedios del número de tubérculos para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Normal	17,92	a	
2	Sequia regulada	12,44		b

A.L.S.(T)_{0,05}=2,598

En el cuadro 37 de la prueba de significación de los promedios del número de tubérculos; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio

de 17,92 tubérculos, supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada con promedio de 12,44 tubérculos; debido a que; las plantas sometidas al tratamiento de sequía regulada son afectados en la traslocación de fotoasimilados lo que se traduce en un menor número de tubérculos en comparación a los tratamientos de riego normal.

Cuadro 38. Prueba de significación de los promedios del número de tubérculos para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación		
1	a_4b_1	29,60	a		
2	a_1b_1	22,00	a	b	
3	a_3b_1	19,40	a	b	c
4	a_4b_2	19,40	a	b	c
5	a_5b_1	19,00	a	b	c
6	a_1b_2	18,40	a	b	c
7	a_9b_1	17,40	a	b	c
8	a_3b_2	16,80	a	b	c
9	$a_{10}b_1$	15,80	a	b	c
10	a_2b_1	15,60	a	b	c
11	a_8b_1	14,80		b	c
12	a_7b_1	14,00		b	c
13	a_9b_2	13,80		b	c
14	$a_{10}b_2$	12,40		b	c
15	a_6b_1	11,60		b	c
16	a_7b_2	10,20		b	c
17	a_8b_2	9,80		b	c
18	a_5b_2	9,20		b	c
19	a_6b_2	8,20		b	c
20	a_2b_2	6,20			c

A.L.S.(T)_{0,05}=15,171

En el cuadro 38 de la prueba de significación de los promedios del número de tubérculos; se observa que, las diez primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_4b_1 (393382.44 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 29,60 tubérculos muestra significación estadística con las 10 interacciones restantes debido a que el déficit hídrico causa la disminución

de la fotosíntesis lo que se traduce en la alteración de la traslocación y distribución de fotoasimilados y por lo tanto menor número de tubérculos.

3.6. Biomasa total en fresco por planta (gramos)

Cuadro 39. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	393382.44	503,996	a
2	374080.5	486,014	a
3	380389.1	461,468	a
4	C99.977	441,664	a
5	399062.119	431,952	a
6	RC1496.43B	429,513	a
7	395380.8	377,495	a
8	391691.96	376,137	a
9	C99.747	359,135	a
10	399053.11	197,053	b

A.L.S.(T)_{0,05}=151,532

En el cuadro 39 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco; se observa que, los nueve genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Superando al genotipo 399053.1 que ocupa el décimo lugar con un promedio de 197,053 g, debido a que la producción de biomasa es una característica intrínseca de cada genotipo ya sea por la especie, por su hábito de crecimiento o ciclo vegetativo.

Cuadro 40. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	591,075	a
2	Sequia regulada	221,810	b

A.L.S.(T)_{0,05}=41,340

En el cuadro 40 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 591,075 g, supera estadísticamente al tratamiento de sequía

regulada con un promedio de 221,810 g; por que los tratamientos de sequía regulada son afectados por el estrés hídrico en la producción de biomasa en comparación a los tratamientos de riego normal. Tal como lo mencionan **Martínez y Huamán (1987)** que, las plantas de papa tienen respuestas al estrés hídrico disminuyendo su crecimiento y rendimiento.

Cuadro 41. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación			
1	a_4b_1	766,862	a			
2	$a_{10}b_1$	722,588	a	b		
3	a_9b_1	670,406	a	b		
4	a_1b_1	648,062	a	b		
5	a_3b_1	622,438	a	b		
6	a_7b_1	584,750	a	b		
7	a_6b_1	556,054	a	b		
8	a_8b_1	537,786	a	b		
9	a_5b_1	505,550		b	c	
10	a_2b_1	296,258			c	d
11	a_7b_2	274,276			c	d
12	a_3b_2	260,890				d
13	a_9b_2	252,530				d
14	$a_{10}b_2$	249,440				d
15	a_4b_2	241,130				d
16	a_1b_2	215,842				d
17	a_8b_2	214,488				d
18	a_5b_2	212,720				d
19	a_6b_2	198,936				d
20	a_2b_2	97,848				d

A.L.S.(T)_{0,05}=241,398

En el cuadro 41 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco; se observa que, las ocho primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_4b_1 (393382.44 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 766,862 g, muestra significación estadística con las doce interacciones restantes, debido a que este genotipo con riego normal aprovecho mejor la extracción de la disponibilidad del agua en el

suelo desarrollando mayor biomasa. Corroborado por **Doorenbos y kassam (1979)**, el déficit hídrico afecta en el crecimiento y rendimiento de la planta.

3.7. Biomasa total en seco por planta (gramos)

Cuadro 42. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en seco para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación		
1	393382.44	82,956	a		
2	374080.5	77,615	a	b	
3	RC1496.43B	71,695	a	b	c
4	380389.1	70,896	a	b	c
5	391691.96	68,397	a	b	c
6	399062.119	66,379	a	b	c
7	C99.977	65,919	a	b	c
8	395380.8	56,840		b	c
9	C99.747	49,843			c
10	399053.11	20,843			d

A.L.S.(T)_{0,05}=25,730

En el cuadro 42 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en seco; se observa que, los siete genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 393382.44 que ocupa el primer lugar con un promedio de 82,956 g muestra significación estadística con los tres genotipos restantes, debido a que este genotipo como característica genética tiene un mayor desarrollo y crecimiento de biomasa. **Doorenbos y kassam (1979)**, mencionan que; los efectos del déficit hídrico pueden variar de acuerdo a la especie o variedad.

Cuadro 43. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en seco para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Normal	78,333	a	
2	Sequia regulada	47,943		b

A.L.S.(T)_{0,05}=7,020

En el cuadro 43 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en seco; se observa que, el tratamiento de riego normal con un promedio de 78,333 g, supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 47,943 g; debido a que las plantas con tratamientos de sequía regulada tienen una menor capacidad de formación de biomasa en comparación a las plantas con tratamiento de riego normal. **Doorenbos y kassam (1979)**, mencionan que; el déficit hídrico en la planta afecta la producción de biomasa en el cultivo.

Cuadro 44. Prueba de significación de los promedios de la biomasa total en seco para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación							
1	a ₄ b ₁	106,510	a							
2	a ₁₀ b ₁	95,068	a	b						
3	a ₈ b ₁	86,531	a	b	c					
4	a ₁ b ₁	86,264	a	b	c					
5	a ₉ b ₁	83,321	a	b	c					
6	a ₇ b ₁	83,050	a	b	c					
7	a ₃ b ₁	79,500	a	b	c	d				
8	a ₆ b ₁	73,224	a	b	c	d	e			
9	a ₅ b ₁	62,344		b	c	d	e	f		
10	a ₇ b ₂	60,340		b	c	d	e	f		
11	a ₁₀ b ₂	60,162		b	c	d	e	f		
12	a ₄ b ₂	59,402		b	c	d	e	f		
13	a ₉ b ₂	58,471		b	c	d	e	f		
14	a ₃ b ₂	52,337			c	d	e	f	g	
15	a ₈ b ₂	50,263			c	d	e	f	g	
16	a ₁ b ₂	46,494			c	d	e	f	g	
17	a ₆ b ₂	40,455				d	e	f	g	
18	a ₅ b ₂	37,341					e	f	g	
19	a ₂ b ₁	27,520						f	g	
20	a ₂ b ₂	14,167								g

A.L.S.(T)_{0,05}=40,990

En el cuadro 44 de la prueba de significación de los promedios de la biomasa total en fresco; se observa que, las ocho primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a₄b₁ (393382.44 – Riego normal), que ocupa el primer

lugar con un promedio de 106,510 g muestra significación estadística con las doce interacciones restantes debido a que este genotipo en condiciones de riego tiende a incrementar la producción de biomasa. **Doorenbos y kassam (1979)**, mencionan que; cuando no se atienden todas las necesidades de agua, el déficit hídrico en la planta afecta en el crecimiento y rendimiento del cultivo.

3.8. ÁREA FOLIAR POR PLANTA (cm²)

Cuadro 45. Prueba de significación de los promedios del área foliar para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	393382.44	7914,046	a			
2	399062.119	7342,873	a			
3	380389.1	7311,956	a			
4	C99.977	6192,841	a	b		
5	C99.747	5135,921		b	c	
6	391691.96	4884,637			c	d
7	399053.11	4826,339			c	d
8	RC1496.43B	4654,212			c	d
9	374080.5	4224,883			c	d
10	395380.8	3659,914				d

A.L.S.(T)_{0,05}=1296,083

En el cuadro 45 de la prueba de significación de los promedios del área foliar; se observa que, los cuatro primeros genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 393382.44 que ocupa el primer lugar con un promedio de 7914,046 cm², muestra significación estadística con los demás genotipos, debido a que este genotipo por características genéticas desarrolla mayor cantidad de folíolos. Tal como lo menciona **Boyer (1970)**, el área foliar es comúnmente considerado un carácter adaptativo de cada especie y/o variedad para la tolerancia a la sequía.

Cuadro 46. Prueba de significación de los promedios del área foliar para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	8102,631	a
2	Sequia regulada	3126,894	B

A.L.S.(T)_{0,05}=353,589

En el cuadro 46 de la prueba de significación de los promedios del área foliar; se observa que, el tratamiento con riego normal con un promedio de 8102,631 cm², supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 3126,894 cm²; debido a que los tratamientos de sequía regulada son afectados en comparación a los tratamientos de riego normal respecto al área foliar. Tal como lo afirman **Granier y Tardieu (1999)**, que el déficit hídrico produce una reducción de la división celular, la expansión del tejido y el desarrollo de la hoja.

Cuadro 47. Prueba de significación de los promedios del área foliar para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₄ b ₁	10611,443	a
2	a ₁ b ₁	10537,205	a
3	a ₉ b ₁	10271,306	a b
4	a ₃ b ₁	9001,192	a b c
5	a ₅ b ₁	8380,131	b c d
6	a ₂ b ₁	7633,917	c d e
7	a ₈ b ₁	6689,914	d e f
8	a ₇ b ₁	6373,096	d e f g
9	a ₁₀ b ₁	5939,777	e f g h
10	a ₆ b ₁	5588,327	e f g h
11	a ₄ b ₂	5216,649	f g h i
12	a ₉ b ₂	4352,606	g h i j
13	a ₁ b ₂	4148,541	h i j
14	a ₃ b ₂	3384,490	i j k
15	a ₈ b ₂	3079,360	j k
16	a ₇ b ₂	2935,329	j k
17	a ₁₀ b ₂	2509,988	j k
18	a ₂ b ₂	2018,762	k
19	a ₅ b ₂	1891,711	k
20	a ₆ b ₂	1731,501	k

A.L.S.(T)_{0,05}=2064,730

En el cuadro 47 de la prueba de significación de los promedios del área foliar; se observa que, las cuatro primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_4b_1 (393382.44 – Riego normal) con un promedio de 10611,443 cm^2 , muestra significación estadística con las dieciséis interacciones restantes debido a que este genotipo por sus características genéticas y en condiciones de humedad óptima tiende a mayor crecimiento celular, lo que se traduce a un mayor desarrollo del área foliar. Tal como lo menciona **Boyer (1970)**, el área foliar es un carácter adaptativo para la tolerancia a la sequía, pues reduce su área de la hoja cuando está sometida a un estrés hídrico.

3.9. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA ($\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$)

Cuadro 48. Prueba de significación de los promedios del área específica de la hoja para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación					
1	380389.1	460,432	a					
2	393382.44	452,835	a	b				
3	399062.119	433,101	a	b	c			
4	C99.977	394,820	a	b	c	d		
5	399053.11	393,486		b	c	d		
6	C99.747	379,245			c	d	e	
7	395380.8	360,846				d	e	
8	391691.96	353,302				d	e	
9	RC1496.43B	314,556					e	f
10	374080.5	282,807						f

A.L.S.(T)_{0,05}=65,620

En el cuadro 48 de la prueba de significación de los promedios del área específica de las hojas; se observa que, los cuatro primeros genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 380389.1 que ocupa el primer lugar con un promedio de 460,432 $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$ muestra significación estadística con los seis genotipos restantes, debido a que este genotipo tiene un mayor

desarrollo foliar y mayor producción de biomasa. Tal como lo menciona **Monteith (1977)**, el área foliar es una variable determinante en la fotosíntesis, por su relación entre la interceptación de luz y la producción de biomasa.

Cuadro 49. Prueba de significación de los promedios del área específica de la hoja para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Normal	472,682	a
2	Sequia regulada	292,404	b

A.L.S.(T)_{0,05}=17,902

En el cuadro 49 de la prueba de significación de los promedios del área específica de las hojas; se observa que, el tratamiento de riego normal con un promedio de 472,682 cm².g⁻¹ supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 292,404 cm².g⁻¹; debido a que en el tratamiento de sequía regulada existe una reducción en el área específica de la hoja en comparación a al tratamiento de riego normal. Esto es corroborado por **Kramer (1983) y Loggini, et al. (1999)**, que mencionan que la reducción del área específica de la hoja es causada por el estrés hídrico.

Cuadro 50. Prueba de significación de los promedios del área específica de la hoja para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₉ b ₁	574,464	a
2	a ₄ b ₁	557,340	a
3	a ₁ b ₁	535,705	a b
4	a ₃ b ₁	495,037	a b c
5	a ₂ b ₁	481,943	a b c d
6	a ₆ b ₁	478,266	a b c d
7	a ₅ b ₁	449,338	b c d e
8	a ₈ b ₁	411,302	c d e f
9	a ₇ b ₁	386,390	d e f g
10	a ₁₀ b ₁	357,032	e f g
11	a ₄ b ₂	348,329	e f g
12	a ₉ b ₂	346,400	e f g h
13	a ₁ b ₂	330,496	f g h
14	a ₅ b ₂	309,151	f g h i
15	a ₂ b ₂	305,030	g h i
16	a ₈ b ₂	295,301	g h i
17	a ₃ b ₂	294,603	g h i
18	a ₆ b ₂	243,427	h i
19	a ₇ b ₂	242,722	h i
20	a ₁₀ b ₂	208,583	i

A.L.S.(T)_{0,05}=104,537

En el cuadro 50 de la prueba de significación de los promedios del área específica de las hojas; se observa que, las seis primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar en esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a₉b₁ (399053.11 – Riego normal), que ocupa el primer lugar con un promedio de 574,464 cm².g⁻¹, muestra significación estadística con las catorce interacciones restantes debido a que este genotipo obtuvo mayor desarrollo y crecimiento foliar en condiciones de riego normal. Esto corroborado por **Kramer (1983)** y **Loggini, et al. (1999)**, que mencionan que la reducción en el área de la hoja por estrés hídrico es una causa importante en la disminución del rendimiento del cultivo porque reduce la superficie fotosintética.

3.10. EFICIENCIA DE TRANSPIRACIÓN

3.10.1. Eficiencia de transpiración de la biomasa (g.kg⁻¹)

Cuadro 51. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación		
1	380389.1	5,007	a		
2	374080.5	4,918	a		
3	C99.747	4,710	a	b	
4	399062.119	4,695	a	b	
5	399053.11	4,544	a	b	
6	391691.96	4,316		b	c
7	393382.44	4,248		b	c
8	RC1496.43B	3,924			c
9	C99.977	3,897			c
10	395380.8	3,778			c

A.L.S.(T)_{0,05}=0,555

En el cuadro 51 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa; se observa que, los cinco primeros genotipos según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 380389.1 que ocupa el primer lugar según el orden de mérito con un promedio de 5,007 g.kg⁻¹ muestra significación estadística con los cinco genotipos restantes, debido a que este genotipo produce mayor biomasa por cada unidad de agua transpirada.

Cuadro 52. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa para los niveles del factor B, según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación	
1	Sequia regulada	4,621	a	
2	Normal	4,186		b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,151

En el cuadro 52 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa; se observa que, el tratamiento riego normal con un promedio de 4,621 g.kg⁻¹ supera estadísticamente al

tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 4,186 g.kg⁻¹; debido a que, las plantas sometidas a estrés hídrico son más eficientes en comparación a las plantas de riego normal.

Cuadro 53. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₉ b ₂	5,442	a
2	a ₁₀ b ₂	5,326	a b
3	a ₅ b ₂	4,919	a b c
4	a ₂ b ₂	4,774	a b c d
5	a ₁ b ₂	4,754	a b c d
6	a ₁ b ₁	4,636	a b c d e
7	a ₉ b ₁	4,571	a b c d e
8	a ₁₀ b ₁	4,510	b c d e f
9	a ₅ b ₁	4,502	b c d e f
10	a ₄ b ₂	4,471	b c d e f g
11	a ₈ b ₂	4,447	b c d e f g
12	a ₂ b ₁	4,314	c d e f g
13	a ₈ b ₁	4,184	c d e f g
14	a ₇ b ₂	4,173	c d e f g
15	a ₄ b ₁	4,026	d e f g
16	a ₃ b ₂	3,963	d e f g
17	a ₆ b ₂	3,942	d e f g
18	a ₃ b ₁	3,831	e f g
19	a ₇ b ₁	3,676	f g
20	a ₆ b ₁	3,614	g

A.L.S.(T)_{0,05}=0,885

En el cuadro 53 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración de la biomasa; se observa que, las siete primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a₉b₁ (380389.1 – Riego normal) que ocupa el primer lugar con un promedio de 5,442 g.kg⁻¹ muestra significación estadística con las trece interacciones restantes, debido a que este genotipo produce mayor cantidad de biomasa por agua transpirada en condiciones de déficit hídrico.

3.10.2. Eficiencia de transpiración del tubérculo (g.kg⁻¹)

Cuadro 54. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	374080.5	3,900	a
2	C99.747	3,861	a b
3	393382.44	3,837	a b
4	391691.96	3,463	a b
5	RC1496.43B	3,344	a b c
6	380389.1	3,253	a b c
7	395380.8	3,156	a b c
8	C99.977	2,732	b c
9	399062.119	2,303	c d
10	399053.11	1,179	d

A.L.S.(T)_{0,05}=1,159

En el cuadro 54 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo; se observa que, los siete genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 374080.5 que ocupa el primer lugar según el orden de mérito con un promedio de 3,900 g.kg⁻¹ muestra significación estadística con los tres genotipos restantes, debido a que este genotipo presenta una mayor capacidad de producir biomasa por unidad de agua transpirada.

Cuadro 55. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Sequia regulada	3,236	a
2	Normal	2,970	a

A.L.S.(T)_{0,05}=0,316

En el cuadro 55 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo; se observa que, el tratamiento de

sequía regulada con un promedio de 3,236 g.kg⁻¹ supera estadísticamente al tratamiento de riego normal que presenta un promedio de 2,970 g.kg⁻¹; debido a que los tratamientos de sequía regulada la eficiencia de transpiración es mayor en comparación a los plantas con tratamiento de riego normal.

Cuadro 56. Prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo para la interacción AB (genotipos x riegos). Según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación			
1	a ₅ b ₂	4,471	a			
2	a ₁₀ b ₂	4,257	a			
3	a ₄ b ₂	3,910	a	b		
4	a ₄ b ₁	3,765	a	b		
5	a ₈ b ₁	3,690	a	b		
6	a ₇ b ₂	3,557	a	b		
7	a ₁₀ b ₁	3,542	a	b		
8	a ₉ b ₂	3,367	a	b		
9	a ₅ b ₁	3,251	a	b		
10	a ₈ b ₂	3,237	a	b	c	
11	a ₆ b ₁	3,193	a	b	c	
12	a ₉ b ₁	3,139	a	b	c	
13	a ₇ b ₁	3,132	a	b	c	
14	a ₆ b ₂	3,119	a	b	c	
15	a ₃ b ₂	2,805	a	b	c	d
16	a ₃ b ₁	2,659	a	b	c	d
17	a ₁ b ₁	2,362		b	c	d
18	a ₁ b ₂	2,243		b	c	d
19	a ₂ b ₂	1,390			c	d
20	a ₂ b ₁	0,968				d

A.L.S.(T)_{0,05}=1,847

En el cuadro 56 de la prueba de significación de los promedios de la eficiencia de transpiración del tubérculo; se observa que, las dieciséis primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a₅b₂ (C99.747 – sequia regulada) que ocupa el primer lugar con un promedio de 4,471 g.kg⁻¹ muestra significación estadística con las cuatro interacciones restantes; debido a que, el factor

genotipo tiene relación con la eficiencia de transpiración, así como también el factor riego.

3.11. VALOR UMBRAL DE LA FRACCIÓN TRANSPIRABLE DE AGUA EN EL SUELO

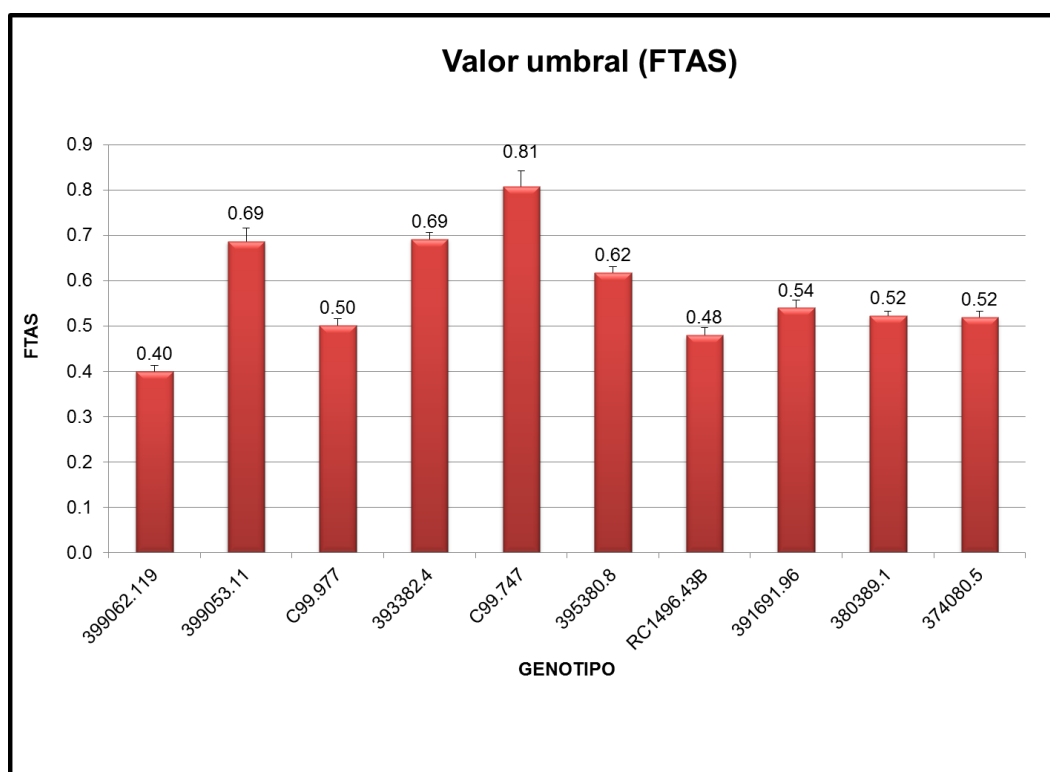


Gráfico 03. Valores de la FTAS

En el gráfico 03; se observa que, existen diferencias entre los valores umbrales de la FATS, concluyéndose que hay diferencias entre la capacidad de extraer agua del suelo por diferentes genotipos. Habiendo algunas variedades que son más sensibles a la capacidad de extracción de agua como el genotipo C99.747; 399053.11; 393382.44 y 395380.8. Mientras las otras pueden seguir extrayendo agua a pesar de que otras variedades ya dejaron de hacerlo normalmente, entre las que destacan 399062.119; RC1496.43B; C99.977 como las más tolerantes.

3.12. POTENCIAL OSMÓTICO (MPa)

Cuadro 57. Prueba de significación de los promedios del potencial osmótico para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	RC1496.43B	2,493	a
2	399053.11	2,453	a
3	C99.747	2,440	a
4	391691.96	2,420	a
5	399062.119	2,403	a
6	395380.8	2,400	a
7	C99.977	2,307	a
8	380389.1	2,200	a
9	393382.44	2,137	a
10	374080.5	2,103	a

A.L.S.(T)_{0,05}=0,572

En el cuadro 57 de la prueba de significación de los promedios del potencial osmótico; se observa que, los diez genotipos no muestran significación estadística entre ellas por presentar respuestas similares en esta variable. Por lo tanto podemos afirmar que no existe relación entre el factor genotipo y el potencial osmótico.

Cuadro 58. Prueba de significación de los promedios del potencial osmótico para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Sequia regulada	2,584	a
2	Normal	2,087	b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,156

En el cuadro 58 de la prueba de significación de los promedios del potencial osmótico; se observa que, el tratamiento sequia regulada con un promedio de 2,584 MPa supera estadísticamente al tratamiento de sequía regulada que presenta un promedio de 2,087 MPa; esto debido a que los tratamientos de sequía regulada tienen un mayor potencial osmótico al presentar un mayor concentración de solutos en la vacuolas en comparación a los de riego normal. Tal como lo mencionan **Salisbury y Ross (2000)**.

Cuadro 59. Prueba de significación de los promedios del potencial osmótico para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación	
1	a_7b_2	2,853	a	
2	a_8b_2	2,827	a	
3	a_2b_2	2,687	a	b
4	a_1b_2	2,673	a	b
5	a_6b_2	2,673	a	b
6	a_5b_2	2,660	a	b
7	a_9b_2	2,527	a	b
8	a_3b_2	2,460	a	b
9	$a_{10}b_2$	2,407	a	b
10	a_5b_1	2,220	a	b
11	a_2b_1	2,220	a	b
12	a_4b_1	2,200	a	b
13	a_3b_1	2,153	a	b
14	a_1b_1	2,133	a	b
15	a_7b_1	2,133	a	b
16	a_6b_1	2,127	a	b
17	a_4b_2	2,073	a	b
18	a_8b_1	2,013	a	b
19	a_9b_1	1,873		b
20	$a_{10}b_1$	1,800		b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,911

En el cuadro 59 de la prueba de significación de los promedios del potencial osmótico; se observa que, las dieciocho primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre por tener respuestas similares para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_7b_2 (RC1496.43B – sequia regulada) con un promedio de 2,853 MPa y la interacción a_8b_2 (391691.96 – sequia regulado) con un promedio de 2,827 MPa, muestra significación estadística con las 2 interacciones restantes, debido a que los genotipos en condiciones de déficit hídrico presenta mayor potencial osmótico encontrando la planta un nuevo equilibrio en su potencial aumentando la tolerancia a la deshidratación, Tal como lo menciona **Ledent (2002)**.

3.13. CONTENIDO DE PROLINA ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)

Cuadro 60. Prueba de significación de los promedios del contenido de prolina para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	399062.119	126,217	a
2	395380.8	83,688	a b
3	391691.96	55,325	b c
4	C99.977	51,623	b c
5	374080.5	48,177	b c
6	C99.747	41,056	b c
7	380389.1	27,543	b c
8	RC1496.43B	24,739	c
9	399053.11	23,329	c
10	393382.44	15,524	c

A.L.S.(T)_{0,05}=57,060

En el cuadro 60 de la prueba de significación de los promedios del contenido de prolina; se observa que, los dos genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener una respuesta similar para esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo 399062.119 que ocupa el primer con un promedio de $126,217 \mu\text{mol.g}^{-1}$, muestra significación estadística con los ocho genotipos restantes, debido a que este genotipo como mecanismo de tolerancia al estrés hídrico acumula mayor cantidad de prolina. Esto es corroborado por **Martínez y Moreno (1992)**, donde encontraron que, la mayor resistencia a la sequía estuvo ligada a su mayor capacidad de acumular prolina y este a su vez determinado por la variedad.

Cuadro 61. Prueba de significación de los promedios del contenido de prolina para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Sequia regulada	94,384	a
2	Normal	5,061	b

A.L.S.(T)_{0,05}=15,567

En el cuadro 61 de la prueba de significación de los promedios del contenido de prolina; se observa que, el tratamiento sequia regulada con un promedio

de 94,384 $\mu\text{moles prolina/g}$ de material fresco, supera estadísticamente al tratamiento de riego normal que presentó un promedio de 5,061 $\mu\text{mol.g}^{-1}$; esto debido a que en condiciones de sequía la planta acumula mayor cantidad de prolina como mecanismo de adaptación al estrés hídrico. Esto es corroborado por **Ramanjulu y Sudhakar (2000)**. El incremento en los niveles de prolina en plantas sometidas a un estrés hídrico puede incluso alcanzar de diez a cien veces más de su valor normalmente encontrado en plantas bien regadas.

Cuadro 62. Prueba de significación de los promedios del contenido de prolina para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación					
1	a_1b_2	246,257	a					
2	a_6b_2	163,872	a	b				
3	a_8b_2	107,443		b	c			
4	a_3b_2	101,167		b	c			
5	$a_{10}b_2$	93,280		b	c	d		
6	a_5b_2	56,400			c	d	e	
7	a_9b_2	53,274			c	d	e	
8	a_7b_2	47,381			c	d	e	
9	a_2b_2	44,706			c	d	e	
10	a_4b_2	30,056			c	d	e	
11	a_5b_1	25,713			c	d	e	
12	a_1b_1	6,177				d	e	
13	a_6b_1	3,503				d	e	
14	a_8b_1	3,207				d	e	
15	$a_{10}b_1$	3,075				d	e	
16	a_7b_1	2,097					e	
17	a_3b_1	2,079					e	
18	a_2b_1	1,952					e	
19	a_9b_1	1,812					e	
20	a_4b_1	0,993					e	

A.L.S.(T)_{0,05}=90,900

En el cuadro 62 de la prueba de significación de los promedios del contenido de prolina; se observa que, las dos primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_1b_2 (399062.119 – sequia regulada) que ocupa el primer lugar

con un promedio de 246,257 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ muestra significación estadística con las dieciocho interacciones restantes debido a que, este genotipo al presentar una mayor biomasa foliar y en condiciones de sequía acumula mayor cantidad de prolina. Esto es corroborado por **Ramanjulu y Sudhakar (2000)** los cuales menciona que, el contenido de prolina es uno de los mecanismos de adaptación de la planta al déficit hídrico y que se presenta en niveles más altos en plantas sometidas a sequía.

3.14. CONTENIDO DE NITRATO REDUCTASA ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)

Cuadro 63. Prueba de significación de los promedios del contenido de nitrato reductasa para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación			
1	RC1496.43B	0,0536	a			
2	391691.96	0,0485	a	b		
3	393382.44	0,0413	a	b	c	
4	C99.977	0,0372	a	b	c	d
5	380389.1	0,0331	a	b	c	d
6	399062.119	0,0300	a	b	c	d
7	395380.8	0,0270		b	c	d
8	374080.5	0,0241			c	d
9	C99.747	0,0218			c	d
10	399053.11	0,0167				d

A.L.S.(T)_{0,05}=0,024

En el cuadro 63 de la prueba de significación de promedios del contenido de nitrato reductasa; se observa que, los seis genotipos que ocupan los primeros lugares según el orden de mérito no muestra significación estadística entre ellos por tener respuestas similares de esta variable en estudio. Sin embargo, el genotipo RC1496.43B que ocupa el primer lugar con un promedio de 0,0536 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ muestra significación estadística con los cuatro genotipos restantes esto se debe a que, en variedades susceptibles a sequía la actividad de la nitrato reductasa se reduce, esto corroborado por **Salisbury, (1985); Jharna et al., (2001)**.

Cuadro 64. Prueba de significación de los promedios del contenido de nitrato reductasa para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Sequia regulada	0,038	a
2	Normal	0,029	b

A.L.S.(T)_{0,05}=0,006

En el cuadro 64 de la prueba de significación de los promedios del contenido de nitrato reductasa; se observa que, el tratamiento sequia regulada con un promedio de 0,038 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ supera estadísticamente al tratamiento de riego normal que presenta un promedio de 0,029 $\mu\text{mol.g}^{-1}$; debido en las plantas sometidas a condiciones de sequía presenta un mayor acumulación de nitrato reductasa en comparación a las plantas sometidas a un riego normal.

Cuadro 65. Prueba de significación de los promedios del contenido de nitrato reductasa para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₇ b ₂	0,075	a
2	a ₈ b ₂	0,055	a b
3	a ₃ b ₂	0,046	a b c
4	a ₉ b ₂	0,046	a b c
5	a ₄ b ₂	0,042	a b c
6	a ₈ b ₁	0,042	a b c
7	a ₄ b ₁	0,040	a b c
8	a ₆ b ₂	0,032	b c
9	a ₇ b ₁	0,032	b c
10	a ₁ b ₁	0,030	b c
11	a ₁ b ₂	0,030	b c
12	a ₁₀ b ₁	0,030	b c
13	a ₃ b ₁	0,028	b c
14	a ₅ b ₁	0,022	b c
15	a ₅ b ₂	0,022	b c
16	a ₆ b ₁	0,022	b c
17	a ₂ b ₁	0,020	b c
18	a ₉ b ₁	0,020	b c
19	a ₁₀ b ₂	0,018	b c
20	a ₂ b ₂	0,014	c

A.L.S.(T)_{0,05}=0,038

En el cuadro 65 de la prueba de significación de los promedios del contenido de nitrato reductasa; se observa que, las siete primeras interacciones según el orden de mérito no muestran significación estadística entre ellas por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_7b_2 (RC1496.43B – sequía regulada) que ocupa el primer lugar con un promedio de $0,075 \mu\text{mol.g}^{-1}$ muestra significación estadística con las trece interacciones restantes, debido a que en su mayoría de los genotipos, en condiciones de sequía presentan una mayor acumulación de nitrato reductasa como mecanismo de adaptación al estrés hídrico.

3.15. CONTENIDO DE GLICINA BETAÍNA ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)

Cuadro 66. Prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína para los niveles del factor A (genotipos), según Tukey.

O.M	Genotipo	Promedio	Significación
1	399053.11	3198,504	a
2	C99.977	2546,066	b
3	393382.44	2492,362	b c
4	RC1496.43B	2438,867	b c
5	395380.8	2263,755	b c d
6	C99.747	2200,439	b c d e
7	399062.119	2110,375	c d e
8	374080.5	2040,790	d e
9	391691.96	1941,114	d e
10	380389.1	1867,141	e

A.L.S.(T)_{0,05}=386,710

En el cuadro 66 de la prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína; se observa que, el genotipo 399053.11 que ocupa el primer lugar según el orden de mérito con un promedio de $3198,504 \mu\text{mol.g}^{-1}$ muestra significación estadística con los nueve genotipos restantes, debido a que, a las características intrínseca de cada genotipo en la acumulación de compuestos amonio cuaternario.

Cuadro 67. Prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína para los niveles del factor B (riegos), según Tukey.

O.M	Riego	Promedio	Significación
1	Sequia regulada	2685,079	a
2	Normal	1934,804	b

A.L.S.(T)_{0,05}=105,500

En el cuadro 67 de la prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína; se observa que, el tratamiento de sequía regulada con un promedio de 2685,079 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ supera estadísticamente al tratamiento de riego normal que presenta un promedio de 1934,804 $\mu\text{mol.g}^{-1}$; debido a que la acumulación de glicina betaína en plantas sometidas a sequia es mayor en comparación a las de riego normal, corroborado por **Rodhes y Hanson (1993)**.

Cuadro 68. Prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína para la interacción AB (genotipos x riegos), según Tukey.

O.M	Interacción	Promedio	Significación
1	a ₂ b ₂	3441,163	a
2	a ₄ b ₂	3018,952	a b
3	a ₁ b ₂	2962,114	a b
4	a ₂ b ₁	2955,845	a b
5	a ₃ b ₂	2920,321	a b
6	a ₇ b ₂	2839,243	a b c
7	a ₅ b ₂	2583,888	b c d
8	a ₆ b ₂	2406,687	b c d e
9	a ₈ b ₂	2247,456	c d e f
10	a ₁₀ b ₂	2242,023	c d e f
11	a ₉ b ₂	2188,946	d e f
12	a ₃ b ₁	2171,811	d e f
13	a ₆ b ₁	2120,824	d e f g
14	a ₇ b ₁	2038,492	d e f g
15	a ₄ b ₁	1965,772	e f g
16	a ₁₀ b ₁	1839,558	e f g h
17	a ₅ b ₁	1816,990	e f g h
18	a ₈ b ₁	1634,773	f g h
19	a ₉ b ₁	1545,336	g h
20	a ₁ b ₁	1258,637	h

A.L.S.(T)_{0,05}=616,049

En el cuadro 68 de la prueba de significación de los promedios del contenido de glicina betaína; se observa que, las seis primeras interacciones según el

orden de mérito no muestran significación estadística entre ellos por tener un comportamiento similar para esta variable en estudio. Así mismo, la interacción a_2b_2 (399053.11 – sequia regulada) que ocupa el primer lugar con un promedio de $3441,163 \mu\text{mol.g}^{-1}$ muestra significación estadística con las catorce interacciones restantes, debido a que la acumulación de glicina betaína está relacionada con plantas sometidas a déficit hídrico, corroborado por **Rodhes y Hanson (1993)**.

4. CONCLUSIONES

- ✓ En el presente trabajo se concluye que existen diferencias de eficiencia de transpiración de la biomasa entre los 10 genotipos avanzados ya que estos varían sus valores desde 3.778 g.kg^{-1} (395380.8) hasta $5,007 \text{ g.kg}^{-1}$ (380389.1). Del mismo modo muestran diferencias de eficiencia de transpiración del tubérculo donde sus valores varían desde 1.179 g.kg^{-1} 399053.11 hasta 3.900 g.kg^{-1} (374080.5).
- ✓ Como mecanismos de tolerancia al estrés hídrico dentro del tratamiento de sequía regulada existen muchos indicadores los cuales son menor contenido relativo de agua con un promedio de $0,605 \text{ g.g}^{-1}$; menor altura de planta con un promedio de 1.195 m ; menor producción de biomasa con un promedio de 221.810 gramos por planta; así mismo presenta un mayor potencial osmótico con un promedio de 2.584 MPa ; una mayor acumulación de prolina con un promedio de $94,384 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$; mayor acumulación de nitrato reductasa con un promedio de $0.038 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ y una mayor acumulación de glicina betaína con un promedio de $2685,079 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$. Además como mecanismo morfológico se afirma que existe un mayor desarrollo radicular en condiciones de estrés hídrico.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar réplicas del presente trabajo en épocas en donde la exposición de luz solar es mayor con la finalidad de medir la conductancia estomática con el Porómetro y de esta manera tener menor margen de error en la determinación de la eficiencia de transpiración.
- Realizar trabajos de investigación en estos mecanismos de evasión identificados en el presente trabajo para determinar su eficiencia en la tolerancia al estrés hídrico.
- Se recomienda utilizar el genotipo 374080.5 ya que presenta una mayor eficiencia de transpiración del tubérculo con un promedio de 3.900 g.kg^{-1} en comparación a los demás genotipos que presentan valores menores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Altesor A.; E. Di Landro; H. May I Ecurra. 1998. Long – Term species change in an Uruguayan grass land. *Journal of vegetation sciencie*, 9: 173-180.
- ✓ Ayele M. 1999. Genetic diversity in Tef (*Eragrostis tef* (Zucc) Trotter) for osmotic adjustment, root traits, and amplified fragment length polymorphism. Tesis doctoral de la Universidad de Texas. EE.UU.
- ✓ Azcón B. J. y Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal. Edicions Universitat de Barcelona. Primera edición. España. 522 pág.
- ✓ Barrs H.D. Weatherley P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science*, 15: 413-428.
- ✓ Bellinger I., Bensaoud A., Larher F. 1991. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. En: Acevedo A. (ed) *Physiology and Breeding of Winter Cereals for Stressed Mediterranean Environments*. INRA, Paris. 449–458 pp.
- ✓ Borba, N. 2008. La papa: un alimento básico – RAP-AL URUGUAY.
- ✓ Boyer J.S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, bean and sunflower at various leaf water potential. *Plant Physiology*, 46: 233-235.
- ✓ Blum A., Ebercon A. 1976. Genotypic responses in Sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science*, 16: 428–431.
- ✓ Cookson S.J., van Lijsebettens M., Granier C. 2005. Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of

- leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1355–1366.
- ✓ Cornejo A., Vaadia C. 1966. Estudio preliminar de dos métodos para determinar la condición del agua de las plantas y su relación con la condición del agua del suelo. *Agronomía*, 27: 211-219.
 - ✓ Chiang H.H., Dandekar A.M. 1991. The regulation of proline accumulation at lower water potentials in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Suppl.* 96: 108.
 - ✓ Chiang H.H., Dandekar A.M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development in response to dessication. *Plant Cell and Environment*, 18: 1280– 1290.
 - ✓ Delauney A.J., Verma D.P.S. 1993. Proline accumulation and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4: 215–223.
 - ✓ Doorenbos, J.; Kassam, A.H. 1979. “efectos del agua sobre los rendimientos del cultivo”. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
 - ✓ Egúsqiza, B.R. 2000. La papa. Producción, transformación y comercialización. Editorial CIMIGRAF 2000. Lima, Perú.
 - ✓ Ekanayake, I.J. 1993. Evaluación de Resistencia a la sequía en genotipos de papa y camote. Guía de investigación CIP 19. Centro internacional de la papa, Lima, Peru. 16 pp.
 - ✓ Enciclopedia Microsoft encarta, Edición 2009.
 - ✓ Epstein, E.; Grant, J., 1973. Water stress relations of potato plants under field conditions. *Agronomy journals* 65:400-404
 - ✓ FAO, 2008. El mundo de la papa Producción y consumo - Año Internacional de la Papa 2008. Tesoro enterrado (Hoja divulgativa)
 - ✓ FAO. 2008. El folleto del año internacional de la papa. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación – Roma, Italia.
 - ✓ FAO. 2009. Nueva luz sobre el tesoro enterrado – reseña de fin de año. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia.

- ✓ Feddes R.A. 1987. Agrometeorological aspects of emergence, water use, growth and dry matter yield of potatoes. *Acta Horticulturae* 214: 45-52.
- ✓ González, J.A. 1999. Eco-fisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Fisiología de la resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinua* Willd.). En: Jacobsen, S.E., Mujica A. I Curso Internacional. Proyecto Quinoa. Lima. Perú. 3-20 p.
- ✓ Granier C., Tardieu F. 1999. Water deficit and spatial pattern of leaf development. Variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiology*, 119: 609–619.
- ✓ Green, C. F., Hebblethwaite, P.D. and Ison, D.A. 1985. A quantitative analysis of varietal and moisture status effects on the growth of vicia fava in relation to radiation absorption. *Ann. App. Biol.* 106: 143 - 155
- ✓ Grieve, C.M.; Grattan, S.R 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant soil* 70, p. 303 – 307.
- ✓ Guerrero B., J. A. 1993. Estudio del efecto del déficit hídrico y de la fertilización potásica en algunas características morfo-fisiológicas y en el rendimiento de las plantas de papa provenientes de semilla sexual. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú 39-40 pág.
- ✓ Hageman R.H., Leng E.R., Dudley J.W. 1967. A Biochemical Approach to Corn Breeding. *Advances in Agronomy*, 19: 45-86.
- ✓ Haverkort, A. J. 1982. Manejo de agua en la producción de papa. Lima – Perú.
- ✓ Jacobsen, S.E.; Mujica, A. 1999. Uso de instrumentos para la medición de los parámetros fisiológicos de la sequía. I curso internacional sobre fisiología de la resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima, Perú.
- ✓ Jensen W.A., Salisbury F.B. 1988. Botánica. México. 2^{da} Edición. 551 pág.

- ✓ Jerez, E.; Torres, W.; Dell'amico, J.; Morales, D. 1991. Indicadores fisiológicos y bioquímicos en el cultivo de la papa en respuesta al estrés hídrico. *Cultivos tropicales* 12(3). P 21 - 28.
- ✓ Kramer, J.P. 1983. *Water relations of plants*. USA. Academic Press Inc. CA.
- ✓ Kramer, J.P. 1989. *Relaciones hídricas de suelos y plantas. Una síntesis moderna*. Edit. Edutex, México.
- ✓ Ledent J.F. 2002. Déficit hídrico y crecimiento de las plantas: Respuestas al déficit hídrico. Comportamiento morfofisiológico / Modelado del crecimiento de las plantas. Manual. Fundación PROINPA - Centro Internacional de la Papa, CIP - Proyecto PAPA ANDINA. 70 pp.
- ✓ Levy D. 1983. Water deficit enhancement of proline and amino nitrogen accumulation in potato plant and its association with susceptibility to drought. Division of Vegetable Crops, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Bet Dagan 50–250.
- ✓ Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E., y Navari-Izzo F. 1999. Antioxidate defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant physiology* 119, 1091- 1099.
- ✓ Martínez C. y Moreno U. 1992. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 4(1):33-38
- ✓ Medrano H., Bota J., Cifre J., Flexas J., Ribas-Carbó M. y Gulías J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Grup de Biología de las plantas en condiciones mediterráneas. Investigaciones Geográficas*, Nº 43.
- ✓ MINAG 2011. Portal web. Series históricas. Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos.
- ✓ MINAG 2008. Cultivo de papa en Ancash. Año internacional de la papa. Dirección Regional Agraria de Ancash, Perú.

- ✓ Monteith J.L. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal society, London B*, 281: 277-294.
- ✓ Morilla C.A., Boyer J., Hageman R.H. 1973. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (*Zea mays* L) seedlings having low leaf water potentials. *Plant Physiology*, 51: 817-824.
- ✓ Muller B., Stosser M., Tardieu F. 1998. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 21: 149–158.
- ✓ McCue K.F, Hanson A.D 1990. Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Trends Biotech*, 8: 358-362.
- ✓ Navarro, G. 200. *Química Agrícola*. Edit Mundi – Prensa Madrid España
- ✓ Nilsen E.T., Orcutt, D.M. 1996. *Physiology of plants under stress*. Ed. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- ✓ Ordinola, M. 2008. Celebración del año internacional de la papa. *Boletín cultural N° 12 del ministerio de relaciones exteriores*.
- ✓ Ramanjulu S., Sudhakar C. 2000. Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal Plant of Physiology*. 157: 81–85.
- ✓ Ray J.D. y Sinclair T.R. 1997. Stomatal closure of maize hybrids in response to soil drying. *Crop Science* 37, pp. 803-807.
- ✓ Ray J.D. y Sinclair T.R. 1998. The effect of pot on growth and transpiration of maize and soybean during water deficits stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol.49, No. 325, pp. 1381-1386.
- ✓ Rhodes D, Hanson 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol plant Molec, Biol* 44: 357-387.
- ✓ Saab I.N., Sharp R.E. 1989. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. *Planta*, 466-474.

- ✓ Salisbury F.B., Ross C.W. 2000. Fisiología de las plantas. Tomo 2. Bioquímica Vegetal. Editorial Thomson Paraninfo S.A. Madrid, España.
- ✓ Saradhi A., Saradhi P.P. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal Plant of Physiology*. 138: 554–558.
- ✓ Serraj S., Sinclair T.R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25: 333-341.
- ✓ Sinclair T.R. y Ludlow M.M. 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology* 13, 329-341.
- ✓ Singh T.N., Aspinall D., Paleg L.G., Boggess S.F. 1973. Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Australian Journal of Biological Science*, 26: 57–63.
- ✓ Schafleitner R., Gutiérrez R., Espino R., Espino, Amelie G., Pérez J., Martínez M., Domínguez A., Tincopa L., Alvarado T. y Numberto G. 2007. Selección en el campo de variación de la tolerancia a la sequía en *Solanum tuberosum* L. por análisis agronómicos, fisiológicos y genéticos. *Investigación sobre la patata* .Vol. 50: 71-85.
- ✓ Shalhevet J., Shimshi D., Meir T. 1983. Potato Irrigation Requirements in a Hot Climate Using Sprinkler and Drip Methods. *Agronomy Journal*, 75, 13-16.
- ✓ Shaner D.L., Boyer J.S. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low water potential. *Plant Physiology* 58: 505–509.
- ✓ Smirnoff N., Cumbes Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057–1060.
- ✓ Tanner C.B. 1981. Transpiration efficiency of potato. *Agronomy Journal*, 73, 59-61.
- ✓ Tanner C.B. y Sinclair T.R. 1983. Efficient water use crop production: research or research? En : H.M.Taylor, W.R. Jordan y T.S. Sinclair

(Eds), Limitations to efficient water use in crop production. ASA/CSSA/SSSA, Madison, pp. 1-27.

- ✓ Trebejo I., Midmore D.J. 1990. Effect of water stress on potato growth, yield and water use in hot and a cool tropical climate. *Journal of Agricultural Science*, 114: 321-334.
- ✓ Venkamp J.H., Lampe J.E.M., Koot J.T.M. 1989. Organic acids as sources of drought induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *Journal Plant of Physiology*. 133: 654–659.
- ✓ Vos J. Haverkort A.J. 2007. Water availability and potato crop performance. En: Vreugdenhil. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. pp. 333-437.
- ✓ Werner, H. O. 1954. Influence of atmospheric and moisture conditions in diurnal variations in relative turgidity of potato leaves. *Univ. Nebraska, Coll. Agri. Exp. Res. Bull* 176.
- ✓ Weisz R., Kaminski J. y Smilowitz Z. 1994. Water deficit effects on leaf growth and transpiration: Utilizing fraction extractable soil water for comparison with other crops. *American Journal Potato* 71, 829-840.
- ✓ Yancy P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217: 1214–1223.

ANEXOS

DATOS DE INFORMACIÓN METEOROLÓGICA

FECHA	TEMPERATURA PROMEDIO °C	TEMPERATURA MÁXIMA °C	TEMPERATURA MÍNIMA °C	HUMEDAD RELATIVA MÍNIMA %	HUMEDAD RELATIVA MÁXIMA %
02/02/2011	17,3	24,0	10,6	36,8	92,6
03/02/2011	17,3	26,7	7,8	33,8	95,7
04/02/2011	17,3	25,6	9,0	36,3	97,9
05/02/2011	18,9	27,5	10,2	36,8	97,9
06/02/2011	16,9	23,2	10,6	46,4	94,9
07/02/2011	14,8	19,4	10,2	65,1	97,2
08/02/2011	14,2	18,7	9,8	59,9	97,2
09/02/2011	18,3	27,1	9,4	30,9	97,5
10/02/2011	17,9	26,7	9,0	39,8	97,5
11/02/2011	15,2	21,3	9,0	46,4	104,0
12/02/2011	15,4	21,3	9,4	56,3	104,0
13/02/2011	17,1	25,6	8,6	37,8	100,3
14/02/2011	11,4	14,5	8,2	78,0	101,6
15/02/2011	17,5	27,5	7,4	29,5	100,0
16/02/2011	17,5	26,7	8,2	29,5	98,2
17/02/2011	17,5	24,4	10,6	38,3	104,0
18/02/2011	15,7	23,6	7,8	45,4	104,0
19/02/2011	17,9	26,7	9,0	31,4	97,2
20/02/2011	15,6	21,3	9,8	49,5	104,0
21/02/2011	15,0	20,6	9,4	54,2	104,0
22/02/2011	16,3	22,5	10,2	44,9	99,6
23/02/2011	14,6	19,4	9,8	56,3	98,9
24/02/2011	17,3	24,8	9,8	43,9	99,6
25/02/2011	14,4	18,7	10,2	67,1	98,6
26/02/2011	17,5	25,2	9,8	33,8	98,9
27/02/2011	17,9	26,0	9,8	34,8	97,2
28/02/2011	17,1	27,1	7,0	35,8	98,6
01/03/2011	18,3	29,1	7,4	23,9	96,4
02/03/2011	19,1	28,7	9,4	26,2	93,0
03/03/2011	16,4	21,7	11,0	49,0	95,7
04/03/2011	14,8	19,4	10,2	53,2	97,9
05/03/2011	16,3	23,6	9,0	39,8	97,5
06/03/2011	16,9	22,9	11,0	53,7	95,7
07/03/2011	17,5	27,5	7,4	30,9	97,9
08/03/2011	15,8	21,3	10,2	51,1	94,6
09/03/2011	18,3	27,1	9,4	34,8	97,2
10/03/2011	18,5	27,5	9,4	27,1	96,1
11/03/2011	18,1	28,3	7,8	21,3	96,1
12/03/2011	17,5	24,0	11,0	44,9	95,7
13/03/2011	17,5	25,2	9,8	39,3	96,1
14/03/2011	18,1	26,7	9,4	34,3	94,2
15/03/2011	15,2	20,6	9,8	48,0	94,9
16/03/2011	18,9	27,9	9,8	29,5	96,8
17/03/2011	16,7	24,8	8,6	40,3	96,4
18/03/2011	16,9	24,8	9,0	44,4	97,9

19/03/2011	14,4	19,8	9,0	51,1	97,5
20/03/2011	16,7	24,4	9,0	42,3	98,6
21/03/2011	18,9	28,3	9,4	28,1	97,2
22/03/2011	18,5	26,7	10,2	30,9	96,1
23/03/2011	17,9	26,0	9,8	34,8	97,5
24/03/2011	16,9	23,6	10,2	40,3	96,4
25/03/2011	16,2	22,5	9,8	44,9	100,3
26/03/2011	19,7	29,9	9,4	30,4	100,9
27/03/2011	15,0	19,8	10,2	54,2	98,9
28/03/2011	16,1	22,9	9,4	44,9	100,6
29/03/2011	21,1	31,9	10,2	23,9	97,2
30/03/2011	17,1	25,6	8,6	35,8	100,3
31/03/2011	16,5	23,6	9,4	41,8	98,2
01/04/2011	19,9	29,5	10,2	27,6	98,2
02/04/2011	17,5	25,6	9,4	33,3	98,2
03/04/2011	19,1	28,7	9,4	27,6	99,3
04/04/2011	20,7	31,5	9,8	23,0	97,9
05/04/2011	17,9	28,3	7,4	27,1	98,9
06/04/2011	14,2	18,7	9,8	54,2	96,1
07/04/2011	20,3	32,3	8,2	22,1	98,2
08/04/2011	15,8	21,3	10,2	44,9	96,4
09/04/2011	15,9	23,2	8,6	39,3	100,0
10/04/2011	17,5	27,1	7,8	30,0	96,4
11/04/2011	18,3	31,5	5,0	23,0	97,5
12/04/2011	19,9	31,5	8,2	20,0	91,4

CUADROS DE ANALISIS DE VARIANCA DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO

A. Análisis de variancia del contenido relativo de agua.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	0,012	0,003	1,04	ns
A(Genotipos)	9	0,416	0,046	15,97	**
B(Riegos)	1	0,751	0,751	259,39	**
AB	9	0,074	0,008	2,82	ns
Error	76	0,220	0,003		
Total	99	1,473			

S=0,054

$\bar{X}=0,692$

C.V.=7,78%

B. Análisis de variancia de la altura de planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	0,043	0,011	0,34	ns
A(Genotipos)	9	8,836	0,982	31,20	**
B(Riegos)	1	0,279	0,279	8,86	**
AB	9	0,186	0,021	0,66	ns
Error	76	2,391	0,031		
Total	99	11,735			

S=0,177

$\bar{X}=1,247$

C.V.=14,22%

C. Análisis de variancia de la biomasa de hojas en fresco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	3282,279	820,570	0,96	ns
A(Genotipos)	9	35788,250	3976,472	4,64	**
B(Riegos)	1	356637,090	356637,090	416,25	**
AB	9	13448,331	1494,259	1,74	ns
Error	76	65115,274	856,780		
Total	99	474271,225			

S=29,271

$\bar{X}=105,429$

C.V.=27,76%

D. Análisis de variancia de la biomasa de hojas en seco por planta

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	25,542	6,386	0,71	ns
A(Genotipo)	9	601,401	66,822	7,43	**
B(Riego)	1	898,321	898,321	99,90	**
AB	9	23,678	2,631	0,29	ns
Error	76	683,409	8,992		
Total	99	2232,351			

S=2,999

\bar{X} =13,352

C.V.=22,46%

E. Análisis de variancia de la biomasa de tallos en fresco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	518,675	129,669	0,15	ns
A(Genotipos)	9	71976,565	7997,396	9,17	**
B(Riegos)	1	248471,344	248471,344	284,96	**
AB	9	20834,542	2314,949	2,65	*
Error	76	66268,533	871,954		
Total	99	408069,659			

S=29,529

\bar{X} =110,594

C.V.=26,70%

F. Análisis de variancia de la biomasa de tallos en seco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	12,523	3,131	0,36	ns
A(Genotipo)	9	1109,320	123,258	14,14	**
B(Riego)	1	338,681	338,681	38,85	**
AB	9	25,583	2,843	0,33	ns
Error	76	662,542	8,718		
Total	99	2148,651			

S=2,953

\bar{X} =11,459

C.V.=25,77%

G. Análisis de variancia de la biomasa de raíces en fresco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	37,217	9,304	0,12	ns
A(Genotipo)	9	17645,382	1960,598	25,79	**
B(Riego)	1	11935,344	11935,344	156,98	**
AB	9	4325,244	480,583	6,32	ns
Error	76	5778,421	76,032		
Total	99	39721,609			

S=8,720

\bar{X} =27,813

C.V.=31,35%

H. Análisis de variancia de la biomasa de raíces en seco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	3,001	0,750	0,43	ns
A(Genotipos)	9	426,647	47,405	27,06	**
B(Riegos)	1	31,114	31,114	17,76	**
AB	9	64,973	7,219	4,12	**
Error	76	133,146	1,752		
Total	99	658,880			

S=1,324

\bar{X} =4,489

C.V.=29,49%

I. Análisis de variancia de la biomasa de tubérculos en fresco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	10097,796	2524,449	0,76	ns
A(Genotipos)	9	251613,086	27957,010	8,46	**
B(Riegos)	1	411417,051	411417,051	124,52	**
AB	9	46654,352	5183,817	1,57	ns
Error	76	251099,464	3303,940		
Total	99	970881,749			

S=57,480

\bar{X} =162,607

C.V.=35,35%

J. Análisis de variancia de la biomasa de tubérculos en seco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	459,887	114,972	0,71	ns
A(Genotipos)	9	11729,954	1303,328	8,11	**
B(Riegos)	1	11914,235	11914,235	74,09	**
AB	9	1877,700	208,633	1,30	ns
Error	76	12220,907	160,801		
Total	99	38202,684			

S=12,681

\bar{X} =33,838

C.V.=37,47%

K. Análisis de variancia del número de tubérculos.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	264,160	66,040	1,56	ns
A(Genotipos)	9	1870,760	207,862	4,91	**
B(Riegos)	1	750,760	750,760	17,72	**
AB	9	208,440	23,160	0,55	ns
Error	76	3220,640	42,377		
Total	99	6314,760			

S=6,510

\bar{X} =15,180

C.V.=42,88%

L. Análisis de variancia de la biomasa total en fresco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	27702,030	6925,507	0,65	ns
A(Genotipos)	9	691379,946	76819,994	7,16	**
B(Riegos)	1	3408923,391	3408923,391	317,70	**
AB	9	206025,375	22891,708	2,13	*
Error	76	815471,059	10729,882		
Total	99	5149501,800			

S=103,585

\bar{X} =406,443

C.V.=25,49%

M. Análisis de variancia de la biomasa total en seco por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	860,331	215,083	0,70	ns
A(Genotipos)	9	27869,177	3096,575	10,01	**
B(Riegos)	1	23088,696	23088,696	74,63	**
AB	9	2118,658	235,406	0,76	ns
Error	76	23512,326	309,373		
Total	99	77449,187			

S=17,589

\bar{X} =63,138

C.V.=27,86%

N. Análisis de variancia del área foliar de la planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	238629,900	59657,475	0,08	ns
A(Genotipos)	9	195475497,282	21719499,698	27,67	**
B(Riegos)	1	618948987,232	618948987,232	788,50	**
AB	9	35100106,750	3900011,861	4,97	**
Error	76	59657924,074	784972,685		
Total	99	909421145,239			

S=885,987

\bar{X} =5614,762

C.V.=15,78%

O. Análisis de variancia del área específica de la hoja por planta.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	5451,252	1362,813	0,68	ns
A(Genotipos)	9	297402,190	33044,688	16,42	**
B(Riegos)	1	812499,107	812499,107	403,79	**
AB	9	38043,017	4227,002	2,10	*
Error	76	152925,411	2012,176		
Total	99	1306320,977			

S=44,857

\bar{X} =382,543

C.V.=11,73%

P. Análisis de variancia de la eficiencia de transpiración de la biomasa.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	0,422	0,106	0,73	ns
A(Genotipos)	9	17,363	1,929	13,39	**
B(Riegos)	1	4,728	4,728	32,82	**
AB	9	1,433	0,159	1,10	ns
Error	76	10,951	0,144		
Total	99	34,896			

S=0,380

\bar{X} =4,404

C.V.=8,62%

Q. Análisis de variancia de la eficiencia de transpiración del tubérculo.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	4,093	1,023	1,63	ns
A(Genotipos)	9	64,424	7,158	11,40	**
B(Riegos)	1	1,762	1,762	2,80	ns
AB	9	4,933	0,548	0,87	ns
Error	76	47,742	0,628		
Total	99	122,955			

S=0,793

\bar{X} =3,103

C.V.=25,54%

R. Análisis de variancia para el potencial osmótico.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	0,553	0,138	0,90	ns
A(Genotipos)	9	1,782	0,198	1,30	ns
B(Riegos)	1	6,167	6,167	40,37	**
AB	9	1,550	0,172	1,13	ns
Error	76	11,609	0,153		
Total	99	21,661			

S=0,391

\bar{X} =2,336

C.V.=16,73%

S. Análisis de variancia del contenido de prolina.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	1076,934	269,233	0,18	ns
A(Genotipos)	9	100997,761	11221,973	7,38	**
B(Riegos)	1	199464,428	199464,428	131,10	**
AB	9	101762,127	11306,903	7,43	**
Error	76	115630,360	1521,452		
Total	99	518931,611			

S=39,006

\bar{X} =49,722

C.V.=78,45%

T. Análisis de variancia del contenido de nitrato reductasa.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	0,00038	0,00009	0,36	ns
A(Genotipos)	9	0,01264	0,00140	5,35	**
B(Riegos)	1	0,00225	0,00225	8,56	**
AB	9	0,00611	0,00068	2,58	*
Error	76	0,01996	0,00026		
Total	99	0,04100			

S=0,016

\bar{X} =0,033

C.V.=48,62%

U. Análisis de variancia para el contenido de glicina-betaína.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Sig.
Repeticiones	4	223536,906	55884,226	0,80	ns
A(Genotipos)	9	13536960,539	1504106,727	21,52	**
B(Riegos)	1	14072838,402	14072838,402	201,38	**
AB	9	3600832,373	400092,486	5,73	**
Error	76	5310951,085	69880,935		
Total	99	36745119,304			

S=264,350

\bar{X} =2309,942

C.V.=11,44%



Figura 1. Ubicación del experimento



Figura 2. Distribución y plantación de genotipos



Figura 3. Embolsado de macetas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL Y ACADÉMICA
DE AGRONOMÍA



**“MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE TOLERANCIA A SEQUÍA EN
DIEZ GENOTIPOS PROMISORIOS DE *Solanum tuberosum* L., BAJO
CONDICIONES DE ZONA ÁRIDA.”**

Presentado por:

JOHN JORGE PINTO ALARCON

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRONOMO

AREQUIPA– PERU

2012

Dedicatoria

Agradecimientos

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA PAPA	12
2.2. PRODUCCIÓN NACIONAL DE PAPA	13
2.3. GENERALIDADES DEL CULTIVO	15
2.3.1. BIOSISTEMÁTICA DE LA PAPA	15
2.4. POLIPLOIDIZACIÓN PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PAPA.....	20
2.5. REQUERIMIENTOS DE AGUA.....	20
2.6. ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DESFAVORABLES.....	22
2.6.1. DEFINICIONES Y CONCEPTO	22
2.6.2. ESTRÉS.....	22
2.6.3. TOLERANCIA DE LAS PLANTAS FRENTE FACTORES ABIÓTICOS	23
2.6.4. MECANISMO DE RESISTENCIA	24
2.6.5. EL ESTRÉS HÍDRICO POR SEQUIA.....	25
2.6.6. EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA PLANTA	26
2.7. FISIOLÓGÍA DE LA PLANTA EN RESPUESTA AL RIEGO:.....	29
2.7.1. EFICIENCIA DE USO DE AGUA:.....	29
2.8. RELACIONES HÍDRICAS DEL CULTIVO DE PAPA	30
2.8.1. POTENCIAL HÍDRICO.....	30
2.8.2. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA	32
2.8.3. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA.....	33
2.8.4. CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD).....	34
2.8.5. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA:.....	36
2.8.6. REFLECTANCIA.....	36
2.8.7. PROLINA LIBRE EN LA PLANTA.....	37
2.8.8. FOTOSÍNTESIS.....	37
2.8.8.1. CONCEPTO DE RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA	37
2.8.8.2. EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO POR SEQUIA EN LA FOTOSÍNTESIS	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40

3.1. PLAN GENERAL DEL EXPERIMENTO	40
3.2. LUGAR Y UBICACIÓN	40
3.2.1. UBICACIÓN POLÍTICA.....	40
3.2.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA	41
3.3. CLIMA.....	41
3.4. SUELO.....	43
3.5. MATERIALES	45
3.5.1. MATERIAL VEGETAL	45
3.5.2. MATERIALES DE CAMPO	45
3.5.3. MATERIALES DE LABORATORIO.....	46
3.5.4. MATERIALES DE GABINETE	47
3.5.5. EQUIPOS	47
3.5.6. INSUMOS.....	48
3.6. METODOLOGÍA.....	49
3.6.1. CAMPO EXPERIMENTAL	49
3.6.2. LA INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL ENSAYO	49
3.6.3. SIEMBRA	50
3.6.4. RIEGO.....	50
3.6.5. FERTILIZACIÓN	50
3.6.6. LABORES CULTURALES	51
3.6.7. PROTECCIÓN SANITARIA.....	52
3.6.8. COSECHA.....	53
3.7. TRATAMIENTOS:	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.8. EVALUACIONES	57
3.8.1. HUMEDAD DEL SUELO	57
3.8.2. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA)	59
3.8.3. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA (AEH)	60
3.8.4. EL POTENCIAL OSMÓTICO (BAR)	60
3.8.5. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA	61
3.8.6. MEDICIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS	61
3.8.7. EL CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD).....	62
3.8.8. REFLECTANCIA - DIFERENCIA DEL ÍNDICE NORMALIZADO DE VEGETACIÓN (NDVI)	62
3.8.9. NIVELES DE PROLINA	63

3.8.10. BIOMASA TOTAL Y DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BIOMASA	64
3.8.11.- NÚMERO DE TUBÉRCULOS POR GENOTIPO	65
3.8.12. RENDIMIENTO E ÍNDICES DE ESTRÉS.....	65
3.9. DISEÑO EXPERIMENTAL:	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.10. ANALISIS ESTADISTICO	66
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	67
4.1. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA	71
4.2. POTENCIAL OSMÓTICO	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.3. CONTENIDO DE CLOROFILA	72
4.4. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA	72
4.5. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.6. NIVELES DE PROLINA	79
4.7. PRODUCCIÓN DE BIOMASA:	79
4.8. RENDIMIENTO	82
PESO SECO DE TUBÉRCULOS:	85
NÚMERO DE TUBÉRCULOS:	85
PESO SECO DE HOJAS:	85
PESO SECO DE TALLOS:	85
PESO SECO DE RAÍCES:	85
PESO SECO DE BIOMASA TOTAL:	85
4. ÍNDICE DE COSECHA:	85
V. CONCLUSIONES.....	86
VI. RECOMENDACIONES.....	88
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
VIII. ANEXOS	95

ÍNDICE FIGURAS

ÍNDICE ANEXOS

RESUMEN

En el siguiente trabajo de investigación se llevó a cabo en el campo experimental del INIA-Santa Rita de Sigüas, cuyo objetivo fue analizar (*Solanum tuberosum*). Treinta seis plantas de genotipos promisorios de papa fueron cultivados en campo con arreglo.

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de su historia el hombre ha intentado dominar el medio ambiente, ha desarrollado variedades de plantas adaptadas a sus necesidades, desarrollado practicas modernas para utilizar el agua, los fertilizantes y los pesticidas del modo mas eficiente posible con el objeto de aumentar su producción; pero a pesar de tanto avance aun no se a podido contrarrestar los daños causados por los factores ambientales adversos como la sequia y heladas que producen serios daños los cultivos.

El agua es un recurso natural valioso que en la actualidad debido al cambio climático se denota una carestía constituyendo el factor limitante número uno para la producción agrícola. Siendo este un problema mundial en la agricultura y sobre todo para los principales cultivos como la papa que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas con significativas. En el año 2010 se alcanzó una producción nacional fue de 3'814 373 toneladas, en el 2011 de toneladas 4'072 455. En Arequipa los rendimiento del 2010 fueron 32098 kg. ha⁻¹ y en el 2011 de 32778 kg. ha⁻¹.

Si la producción de papa a nivel nacional se ha incrementado la demanda de agua igualmente a sufrido una creciente, como también se da en otros sectores como: el industrial y el urbano, por ende la disponibilidad de agua para la agricultura será cada vez menor y su costo por unidad de volumen será cada vez mayor para el usuario, es por ello que se requiere desarrollar genotipos de plantas tolerantes a condiciones de estrés hídrico por sequia para atenuar de alguna forma los efectos que tendrá la escasez de agua en el planeta sobre el rendimiento y calidad en este cultivo. (Detallar condiciones de Arequipa majes)

Conocer algunas de las características fisiológicas que intervienen en la tolerancia al estrés hídrico por sequia (el potencial osmótico, contenido de clorofila, contenido relativo de agua, fotosíntesis, niveles de prolina etc.), permitirá explicar la compleja dinámica de las respuestas fisiológicas expresadas como adaptaciones fisiológicas y

bioquímicas que ocurren en el cultivo de papa frente al estrés hídrico por sequía y a su vez sean útiles para desarrollar los programas de mejoramiento genético orientados a seleccionar genotipos contra estrés abióticos, siendo disponibles variedades con mayores niveles de tolerancias para los agricultores. Estos aspectos mejorarán la capacidad de adaptación al cambio climático en los sistemas de producción de papa.

En tal sentido este trabajo de investigación ejecutado en el campo experimental del INIA - Santa Rita de Sigüas de Arequipa, permitió evaluar las respuesta fisiológica de diez genotipos de papa promisorios a la tolerancia al estrés hídrico por sequía.

Los objetivos planteados del trabajo de investigación fueron:

- Determinar los cambios de las expresiones fisiológicas en los diez genotipos como respuesta de tolerancia, sometidos a estrés hídrico por sequía y riego normal.
- Identificar los parámetros fisiológicos que actúan como un mecanismo de tolerancia en los genotipos sometidos a estrés hídrico.
- Determinar el efecto en el rendimiento de los diez genotipos en condiciones de sequía y riego normal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE LA PAPA

La papa en la economía global es el cuarto cultivo en importancia luego del maíz, arroz y trigo. En el Perú ocupa actualmente el segundo lugar en superficie de siembra respecto a los cultivos anuales de mayor importancia (Egúsquiza, 2000).

La papa se cultiva en áreas situadas desde en nivel del mar hasta mas de 4000m.s.n.m. y desde el Ecuador hasta mas de 40° de latitud norte y sur, y en el Perú a lo largo de toda la sierra, en condiciones de punas secas, punas húmedas, valles interandinos de la sierra, vertientes orientales húmedas, vertiente occidentales sub áridas y en los valles costeros subdesérticos. Esta área incluye una gran combinación de agroecosistemas y condiciones climáticas. Cada ambiente posee un conjunto específico de condiciones que favorecen o dificultan la producción de papa las cuales se refleja en el manejo del cultivo por los agricultores de cada ambiente (Horton, 1992).

El área siembra de papa ocupado actualmente en Perú según el ministerio de agricultura (2211), en superficie cosechada (el 2'011 296 440 ha) y represente el % ...del PBI agropecuario.

La papa es base de la alimentación de la zona andina y es producido por 600 mil pequeñas unidades agraria. Sin embargo, son muchos los problemas que enfrenta esta especie uno de los cuales es la sensibilidad al estrés hídrico La papa como uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial por su valor nutritivo, en el periodo 2000-2011, la producción nacional de papa se ha incrementado de 3 824 373 en el 2010 a 4072455 toneladas en el 2011.

Cuadro de producción de papa desde 80s....2012

Cuadro de superficie cosechada de papa desde 80s....2012

Cuadro rendimiento de papa desde 80s....2012

2.2. PRODUCCIÓN NACIONAL DE PAPA

El cultivo de la papa en Arequipa en el 2011 (MINAG, 2012) se cultivaron 8037 ha (**Error! Reference source not found.**), obteniéndose una producción de 263,439 toneladas (**Error! Reference source not found.**) con un rendimiento promedio de 32,778 kg/ha (**Error! Reference source not found.**). La producción del cultivo de la papa en el país es estacional porque se siembra mayormente en la región de la Sierra bajo condiciones de secano y en los meses octubre a diciembre.

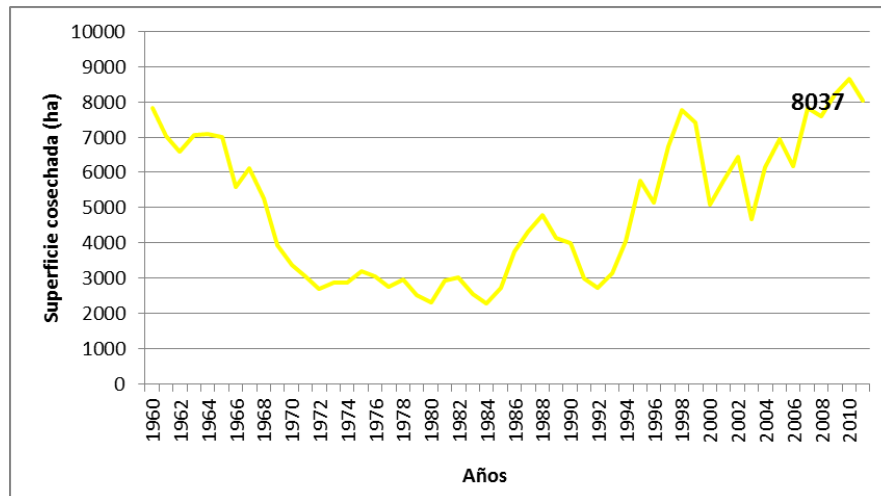


Figura 1. Área sembrada de papa a de la región Arequipa (ha en miles)

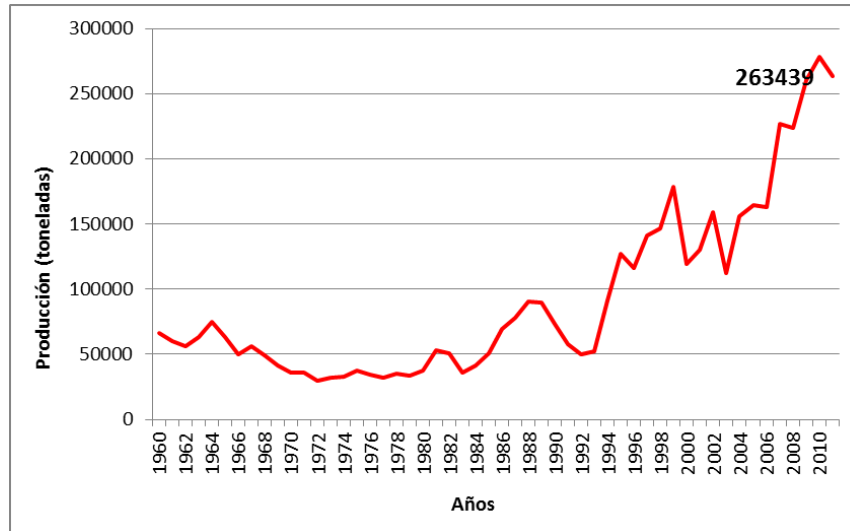


Figura 2. Producción de la región Arequipa (en miles de t)

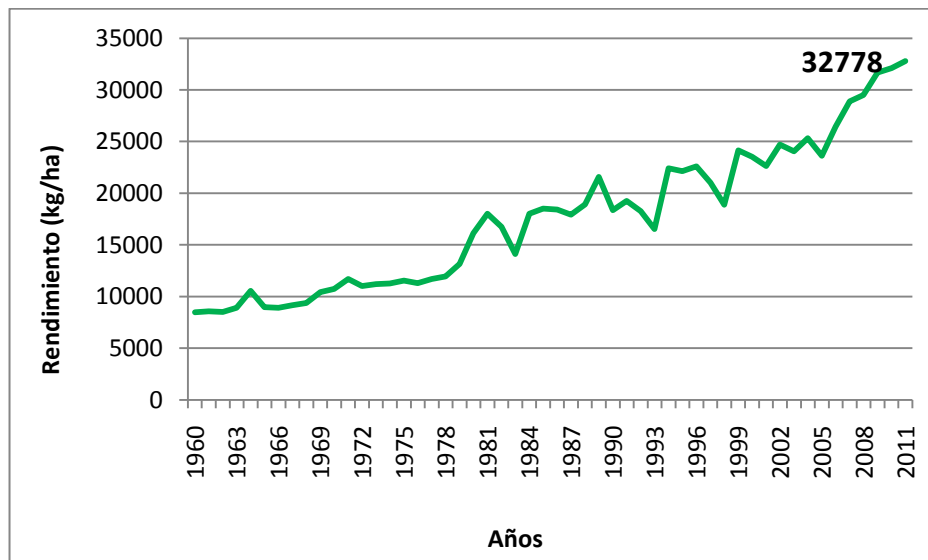


Figura 3. Rendimiento promedio de la Región Arequipa ($t\ ha^{-1}$)

Durante el período 1961-1970 al 2001-2009 el área cosechada (Cuadro 1) se incrementó solo en un 0.6%. Sin embargo la producción creció en 113%, sustentado en el

mayor rendimiento que también aumentó en el mismo porcentaje. Por otro lado, la expansión del área cosechada en los últimos diez años (2000 al 2009) fue de 18%, habiendo un aumento de la producción del 50%, respecto al período anterior (1981-1990) en el que hubo una reducción significativa del área. Asimismo, se incrementó el rendimiento en 30% para ese mismo período.

Cuadro 1. Estadística de producción del cultivo de papa en Perú

Variable	1961-1970	1971-1980	1981-1990	1991-2000	2001-2010
Área cosechada (mil ha)	261	253	196	223	265
Rendimiento (t ha ⁻¹)	5.8	6.7	8.2	9.5	12.5
Producción (miles de t)	1.53	1.69	1.62	2.18	3.32

Fuente: FAO-STAT, 2012

La superficie agrícola cultivable en la región Sierra es de 1.2 millones de hectáreas (48% del total nacional, MINAG/DGIA, 2008), habiendo un 82% de esta área en condiciones de secano. Se estima que esta región cultiva el 95% del área total de papa a nivel nacional.

2.3. GENERALIDADES DEL CULTIVO

2.3.1. BIOSISTEMÁTICA DE LA PAPA

La papa es una planta herbácea y su hábito de crecimiento cambia entre las especies y dentro de cada especie. Se clasifica taxonómicamente (Huamán, 1986; Hawkes, 1990).

Actualmente este cultivo es muy importante por su temprana domesticación pero las impresiones en el estudio de la sistemática se deben entre otros factores, a la dificultad del análisis citológico (Sevilla, 2004)

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Tipo : Spermatophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Solanales
Familia : Solanaceae
Género : *Solanum*
Subgenero : Potatoe
Sección : Petota
Subsección : Potatoe
Serie : Tuberosa

Especies Agrupadas por el número de cromosomas ($x=12$)

$2x$

S. x ajanhuiri,

S. phureja,

S. stenotomum

$3x$

S. x chaucha,

S. x juzepczukii

$4x$

S. tuberosum subsp. andigena

S. tuberosum subsp. tuberosum

$5x$

S. x curtilobum

Esta clasificación en especies corresponde a la Nomenclatura Internacional de Códigos Botánicos (International Code of Botanical Nomenclature – ICBN) actualizada por Greuter *et al.* (2000). Sin embargo, existen controversias respecto a esta clasificación, y a pesar que lo cual el Centro Internacional la Papa – CIP acepta convencionalmente la propuesta de Hawkes (1990). Posteriormente, Ochoa (1999), Huamán y Spooner (2002) realizaron nuevas propuestas taxonómicas para las especies de papa cultivada, las mismas que son presentadas comparativamente en la Cuadro.

Cuadro. Comparativa clasificación citológica y propuestas taxonómicas

Ploidia	Hawkes (1990)	Ochoa (1999)	Huamán y Spooner (2002)
2x	<i>S. x ajanhuiri</i> <i>S. stenotomum</i> <i>S. phureja</i>	<i>S. x ajanhuiri</i> <i>S. goniocalyx</i> <i>S. stenotomum</i> <i>S. phureja</i>	<i>Solanum tuberosum</i> Grupo Ajanhuiri Grupo Stenotomum Grupo Phureja
3x	<i>S. x chaucha</i> <i>S. x juzepczukii</i>	<i>S. x chaucha</i> <i>S. x juzepczukii</i>	Grupo Chaucha Grupo Juzepczukii
4x	<i>S. tuberosum</i> <i>subsp. Andigenum</i> <i>subsp. Tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i> <i>subsp. Andigenum</i> <i>subsp. Tuberosum</i> <i>S. hygrothermicum</i>	Grupo Andigenum Grupo Chilotanum
5x	<i>S. x curtilobum</i>	<i>S. x curtilobum</i>	Grupo Curtilobum

Fuente: Hawkes (1990), Ochoa (1999), Huamán y Spooner (2002)

Todas las especies que producen tubérculos reciben el nombre genérico de “papa”. Cerca del 70% de las especies de papa son diploides. La mayoría son autoincompatibles. El 15 % son tetraploides. Sevilla 2004

La mayor diversidad se encuentra en el Perú. Se han reconocido 216 especies que producen tubérculos, pertenecientes a más de 100 grupos (taxa: especies, subespecies, variedades y formas). Todavía no es posible tener una clasificación completa de las especies de papa; hay grandes diferencias entre taxónomos. Las especies de papa han sido definidas por caracteres morfológicos principalmente, no por cruzabilidad (Sevilla, 2004).

La papa no solamente es importante por ser la principal fuente de alimentación del poblador rural andino, sino también por la diversidad genética existente en los Andes. Según Hawkes (1990), uno de los principales centros de origen de la papa se encuentra en la región altoandina, en Sudamérica. Habiendo el criterio propuesto por Vavilov (1951), que correlaciona esta denominación con la mayor diversidad encontrada.

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, al igual que el tomate. Es sensible a heladas y crece bien en climas templados, con temperaturas entre 15° y 27°C. Requiere un periodo fenológico de mínimo de 3 a 4 meses, en la cual las temperaturas no sean demasiado altas (> 30°C) ni demasiado bajas (<5°C). En las regiones frías se la cultiva durante el verano y en el invierno en las regiones cálidas. En la zona donde se desea sembrar papa, deben existir por lo menos dos meses en los que las temperaturas promedio diarias deben ser menores de 25°C (Egúsquiza, 2000).

El clima de la zona donde se originó la papa se caracteriza por tener inviernos fríos (con temperaturas por debajo de 0°C), y veranos frescos con alta radiación incidente. El órgano consumido es el tubérculo. Este es un órgano subterráneo de almacenamiento de reservas. La planta en las condiciones climáticas del centro de origen, lo forma cuando percibe del ambiente las señales de que se aproxima el invierno o la estación desfavorable para el crecimiento (fotoperíodo decreciente). Los tubérculos sobreviven en dormancia durante el invierno y en la primavera, cuando las condiciones de temperatura son favorables para el crecimiento, brotan originando una nueva planta.

La papa es una planta perenne, por sus tubérculos, pero que se comporta como anual. Puede llegar a producir frutos con semillas viables, pero la forma de propagación utilizada a nivel de la producción comercial es la vegetativa. A partir de tubérculos o trozos de tubérculos se instala un nuevo cultivo.

Huamán (1986) describe las partes que constituyen la planta de papa como sigue:

En la parte aérea:

- Tallos y hojas, que constituyen los órganos de fotosíntesis de la planta. El tamaño y actividad determinan la capacidad de la planta para la producción diaria y de su duración el tiempo durante el cual crecerán los tubérculos.

- Flores y frutos, que solo tienen importancia en el mejoramiento genético para la creación de nuevas variedades pues en el cultivo comercial se utilizan pequeños tubérculos o trozos de tubérculos más grandes como “semilla”.

Según, Sevilla,(2004) caracteriza la biología floral de la papa como una inflorescencia cimosa, flor tetraciclina, pentámera y hermafrodita. Las flores tienen cáliz con cinco sépalos y corola con cinco pétalos. Gineceo con un solo pistilo; longitud del estilo mayor, igual o menor que los estambres. Ovario supero con 300 a 600 óvulos con cinco o más estambres. Las flores se abren en la mañana y se cierran por la tarde. Formas de reproducción, esta es una planta autógama, la polinización cruzada varía de a 25 %. La asexual o vegetativa por medio de tubérculos, brotes, estolones, esquejes y meristemas. La partenogénesis se da en algunas especies y la reproducción sexual se da en un 20% por los insectos y vientos, y un 80% por autogamia, en tetraploides la alogamia es rara y ocurre por acción de insectos.

Parte subterránea:

Los estolones, que son tallos laterales que se forman en los nudos que crecen debajo del suelo, con un agrandamiento de su extremo terminal, entrenudos largos y cuya punta terminan en un gancho. Cuando se desarrollan los tubérculos, lo hacen desde la región subapical del estolón.

Los tubérculos, que son tallos modificados para el almacenamiento de reservas, principalmente almidón. Tienen entrenudos muy cortos y hojas escasamente desarrolladas. Los entrenudos son mucho más grandes en diámetro que en largo. El “ojo” del tubérculo de papa es una parte de la misma que consta de yema lateral cuyos entrenudos no se han desarrollado.

Las raíces adventicias, que nacen desde la base de los brotes y a nivel de los nudos subterráneos, responsables de la absorción del agua y nutrientes desde el suelo y del anclaje de la planta. En comparación con otros cultivos, la papa tiene un sistema radicular débil. Por eso se necesita un suelo de muy buenas condiciones para el cultivo.

2.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PAPA

Las posibilidades del uso de las especies silvestres para mejorar la adaptabilidad de la papa se han incrementado con la técnica de la poliploidización. La poliploidización o sea modificaciones del número cromosómico ha sido utilizada en la papa con éxito, explotando el vigor híbrido de tetraploides producidos cruzando $4x \times 2x$ y $2x \times 2x$. el método permite integrar germoplasma de diferentes especies. Así el cruzamiento de *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$) \times *S. phureja* ($2n=2x=24$) se puede lograr por la haploidización de gametos de *S. tuberosum*. El cruzamiento de un gameto haploide de *S. tuberosum* por uno de *S. phureja* produce un híbrido interespecífico, también se consigue con *S. andigenum* ($2n=4x=48$) por *S. chacoense* ($2n=2x=24$), produciendo también otro híbrido interespecífico. El cruzamiento de los dos, seguido de tetraploidización produce un híbrido tetraploides.

Los éxitos más notables se han dado en tetraploides ampliamente usados, o donde hay poblaciones mejoradas y adaptadas, como es el caso de las especies de *Solanum tuberosum*, *andigenum* o *neotuberosum*. El progenitor diploide es *S. phureja* que ha sido reportado como poseedor de genes de resistencia a virus y otros patógenos, y de la tolerancia condiciones medioambientales desfavorables.

2.5. REQUERIMIENTOS DE AGUA

El agua es un recurso escaso si tenemos en cuenta que solo cerca del 2.5% de agua dulce que existe en el mundo está disponible, tal como lo afirman Oki y Kanae (2006). Solamente los lagos y los ríos tienen apenas el 0.014% de toda el agua. Por lo tanto, ante una situación de escasez, la amenaza se cierne sobre la producción de alimentos. Es por esto, que la gestión del recurso agua en la agricultura deberá tender al conocimiento de

cultivos que puedan ser ahorradores de agua y que puedan incrementar la producción total por unidad de agua utilizada, evitándose situaciones debidas a la escasez.

El agua es un factor importante en el cultivo de papa. Su correcto manejo proporciona suficiente cantidad para el crecimiento de la papa y evita que se desperdicie o se emplee mal. Comparada con otros cultivos, la papa es muy sensible al estrés hídrico ya que tiene un sistema radicular débil, con bajo poder de succión y relativamente superficial. Además, los estomas de las hojas de la papa se cierran rápidamente ante la falta de humedad, ocasionando la reducción de la transpiración y de la fotosíntesis, el calentamiento de las hojas y en consecuencia la reducción del rendimiento. (Haverkort, 1982).

El período de tuberización desde sus inicios es el más crítico por su mayor demanda de agua, ya que al tener la planta durante ese período una mayor área foliar, la transpiración también es mayor. Las fluctuaciones en la disponibilidad de agua pueden llegar a producir deformaciones en los tubérculos. (Egúsuiza 2000).

La planta de papa tiene una alta demanda de agua, requiriendo de 400 a 600 litros de agua para producir 1 kilogramo de materia seca de tubérculos (Beukema & Van der Zaag, 1979). Bajo condiciones de campo, para una población de 40 000 plantas por hectárea, se utilizan de 100 a 200 litros de agua por planta durante toda la campaña, (Haverkort 1982). Los requerimientos de agua varían entre 350 a 500 mm sobre todo en la temporada de crecimiento, dependiendo del período vegetativo, condiciones medio ambientales, el tipo de suelo y la variedad (Sood & Singh, 2003). Las plantas de papa pueden responder con incrementos de hasta $2t\cdot ha^{-1}$ por cada 2 cm de lámina de agua (Harris, 1978). Se considera que el rendimiento promedio mundial de $20t\cdot ha^{-1}$ podría incrementarse en aproximadamente 50% mediante la optimización del suministro de agua a los cultivos (Kumar et al., 2003). Así, en muchas áreas de cultivos de papas alimentados solo con lluvias, el riego suplementario es necesario para una producción satisfactoria.

2.6. ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A CONDICIONES DESFAVORABLES

2.6.1. DEFINICIONES Y CONCEPTO

Según Sevilla, (2004) se denomina adaptación al conjunto de cambios heredables que se producen en una población de una especie, en respuesta modificaciones del ambiente donde se desarrolla y reproduce. Comprende una serie de cambios heredables que aumentan la probabilidad de un organismo para poder sobrevivir y reproducirse en un ambiente específico. Desde que la adaptación conlleva la alteración de características de la especie, constituye un mecanismo de evolución, todos los cambios adaptativos heredables son cambios evolutivos, en el sentido que modifican irreversiblemente la estructura o función de una especie. La adaptación de un organismo a un ambiente, depende de una combinación óptima de **caracteres**. La adaptación es un fenómeno genético porque los cambios son heredables. Se debe distinguir de la aclimatación que produce modificaciones no heredables causadas por la exposición del organismo a nuevas condiciones climáticas. A la aclimatación se le denomina también adaptación fenotípica no heredable y se define como el resultado de la respuesta del individuo al ambiente, sin ser acompañado de un cambio en el genotipo. La capacidad de aclimatarse en mayor o menor grado y en mayor o menor tiempo es gobernada genéticamente.

El “Hardening” (1) es un proceso similar a la aclimatación, pero ocurre progresivamente. Por ejemplo, plantas que han estado sujetas en su primer estado de desarrollo a un estrés de agua moderado, son menos dañadas por la sequía que aquellas no sujetas al Stres. Stres en términos físicos es la fuerza aplicada por unidad de área.

2.6.2. ESTRÉS

Las plantas están frecuentemente expuestas a estreses medio ambientales. El estrés es usualmente definido como un factor externo que ejerce una influencia negativa en la planta (Taiz, 2002). En la biología, stress se define como cualquier factor que distorsiona el funcionamiento fisiológico normal de un organismo.

El estrés puede ser de origen biótico (proveniente de la acción de organismos vivos) o abiótico (proveniente de las variaciones de las condiciones ambientales) tales como temperaturas altas o bajas, salinidad alta, sequía, etc. Este último es el estrés medioambiental más frecuente y limita la producción de cultivos en muchas partes del mundo.

2.6.3. TOLERANCIA DE LAS PLANTAS FRENTE FACTORES ABIÓTICOS

El estudio de la tolerancia de las plantas a los factores limitantes de clima y suelo es muy complejo por la dificultad de definir la tolerancia y sus componentes. Para sistematizar el estudio de la tolerancia a esos factores, es conveniente adoptar los conceptos y metodologías de J Levitt del Instituto Carnegie. Una planta puede ser resistente a una estrés por dos mecanismos: evasión o por tolerancia. Los mecanismos de evasión, hacen que la planta reduzca o evite el daño, interponiendo una barrera de tipo morfológico o fisiológico que evita que el estrés tome contacto directo con las células del organismo. Si la planta es tolerante al estrés, esta puede entrar en contacto directo con el estrés pero no produce el daño (Sevillano, 2004).

Puede haber entonces, tres clases de resistencia al estrés: evasión del estrés; evasión del daño; y tolerancia al daño. La evasión al estrés o “escape”, no es propiamente resistencia, aunque si es un mecanismo de adaptación a ambientes extremos. El proceso biológico que produce la resistencia tiene tres componentes: 1) un componente externo denominado “stress”, causado por un factor ambiental; 2) la respuesta o reacción de la planta al stress, que puede ser reversible o irreversible; 3) el daño producido en la planta por el estrés.

El estrés no necesariamente produce daño, depende de la reacción de la planta. Lo que produce el estrés son modificaciones (strain) morfológicas o fisiológicas como respuesta o reacción al estrés. Estas modificaciones puede derivar en daño; las modificaciones puede ser reversibles o irreversibles. A las modificaciones reversibles se les denomina elásticas y a las modificaciones irreversibles s les denomina plásticas.

La resistencia al estrés según Sevillano (2004), tiene dos componentes principales:

- Una propiedad interna innata o fuerza de una planta que se opone o resiste a la producción de una modificación, debido a un estrés específico; esta propiedad es parte de la resistencia plástica.
- El sistema de reparación, que le permite recuperarse; este sistema es parte de la resistencia elástica.

2.6.4. MECANISMO DE RESISTENCIA

- **Evasión.**- se denomina evasión al decrecimiento del estrés por la formación de alguna clase de barrera, entre el ambiente que provoca el estrés, y las células vivientes del organismo. Es la habilidad para prevenir que los factores que causan daño, penetren en los tejidos.

- **Escape.**- depende de los atributos de un desarrollo acelerado y que permiten sincronizar los ciclos fenológicos en períodos con las condiciones favorables para el crecimiento, escapando de aquellos que pudieran ser desfavorables.

- **Tolerancia.**- es la habilidad para soportar las modificaciones que produce el estrés, **al estrés pero el organismo sin daños**. En este caso hay una completa exposición de células al estrés pero el organismo puede tolerar el estrés sin sufrir daño.

Las poblaciones van adquiriendo mecanismos de resistencia, ya sea de evasión, o de tolerancia a través de procesos adaptativos, donde la selección natural juega el papel más importante. Algunos de esos mecanismos se fijan muy temprano en la evolución de la especie pero como han demostrado las investigaciones citadas, el cambio adaptativo puede ser muy rápido, puede ocurrir en pocos años si se dan dos **condiciones: una población y la existencia de suficiente variación genética para las características que permitan a algunos miembros de la población, sacar provecho del medio con fines reproductivos.**

En conclusión los mecanismo de tolerancia a la sequía consiste en una combinación de varios rasgos morfológicos, fisiológicos y del desarrollo que permiten a la planta

equilibrar la transpiración y continuar con la formación de fotosintatos, evitando así los déficits internos de agua, o tolerando a través de crecimiento continuo y uso reducido de agua (Loomis y Connor, 2002).

En un marco fisiológico, a menudo la tolerancia a estreses abióticos como la sequía está asociada a la supervivencia de la planta. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico, la tolerancia se entiende más bien en términos del rendimiento (magnitud y estabilidad) de un cultivo en condiciones limitantes a la disponibilidad hídrica (Passioura, 1997).

2.6.5. EL ESTRÉS HÍDRICO POR SEQUÍA

El estrés por sequía se define como cualquier contenido de agua de un tejido o célula que está por debajo del más alto contenido de agua en el estado más hidratado. Cuando el déficit hídrico se desarrolla lo suficientemente lento como para permitir cambios en el proceso de desarrollo, el estrés hídrico tendrá efectos severos en el crecimiento, lo cual es una limitación de la expansión foliar y el área foliar es importante porque la fotosíntesis es proporcional a ella. (Taiz, 2002).

Según Levitt (1972) citado por Guerrero (1993), el estrés por sequía es la disminución de la humedad del suelo hasta un nivel tal que la planta ya no puede absorber agua en forma rápida y suficiente para reemplazar el agua que se pierde por transpiración, causando la deshidratación de sus tejidos y por consiguiente daños en las plantas.

Fageria et. al (2006) definen al estrés por sequía como una situación medio ambiental donde disminuye la humedad del suelo en la zona de raíces del cultivo y su impacto está en función de la duración, de la edad del cultivo, del tipo de cultivo o especie, del tipo de suelo y de las practicas de manejo.

La sequía desde el punto de vista agronómico la podemos definir como la falta de humedad en el suelo, que afecta sensiblemente al normal crecimiento y desarrollo de la planta afectando sus principales funciones y disminuyendo su potencial productivo o

rendimiento de sus órganos; puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del desarrollo. Debido a este déficit de agua las plantas reaccionan de diferente forma para contrarrestar estos afectos y normalmente ocurre la disminución de la producción. Si este déficit es demasiado severo y la planta no cuenta con mecanismos de tolerancia, resistencia o evasión, puede ocurrir la muerte paulatina e irreversible (Jacobsen y Mujica, 1999). El estrés por sequía en papa disminuyó significativamente la producción y la apariencia de tubérculos en todo el material vegetal evaluado en pruebas de campo e invernadero realizadas por Guerrero (1993).

La sequía en términos genéricos puede definirse como una deficiencia de agua que depende de dos factores: las variaciones en el descenso del potencial hídrico en el ambiente y las variaciones en el tiempo o duración de estos descensos (Mamani, 1993). Rodríguez (1988), indica que ésta es una deficiencia ambiental de agua, ya sea en el suelo y/o en la atmósfera y que puede someter a una tensión o esfuerzo a las plantas sobre las cuales incide.

2.6.6. EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA PLANTA

Según Sevillano (2004) la capacidad de las plantas para poder sobrevivir en regiones sujetas a sequia puede clasificarse según Kramer (1980) en escape y tolerancia. Esta a su vez puede ser clasificada siguiendo la terminología de Levitt (1980), en la evasión y tolerancia propiamente dicha. La evasión ocurre por medio de las modificaciones morfológicas o fisiológicas que reducen la transpiración y aumentan la absorción. Algunas modificaciones como cutícula gruesa, hojas enrolladas, estomas que cierran fácilmente, y un sistema radicular profundo. Aumentan la habilidad de la planta para soportar la sequia por periodos prolongados sin deshidratarse.

La tolerancia a la deshidratación varía ampliamente, dependiendo del proceso fisiológico afectado, al estado de desarrollo, la duración del estrés y la especie. La reacción de la planta a la deshidratación afecta la vida de la planta o el rendimiento.

Los mecanismos de evasión a la sequia puede ser de tres tipos:

- Los que aumentan el volumen del suelo explorado por el sistema radicular, incrementando la disponibilidad de agua.
- Los que reducen el uso del agua, a través de varios mecanismos como el cierre estomático, reducciones del área foliar, cambios en el ángulo de la intercepción solar de la hoja, enrollamiento.
- Los cambios en el volumen relativo de biomasa entre partes aéreas y raíces.

Los mecanismos de la tolerancia a la sequia son:

- Los que mantienen los procesos fisiológicos como fotosíntesis, alargamiento celular, transpiración con potenciales hídricos bajos.

-Los que aceleran el proceso de osmo - regulación, o acumulación de solutos en respuesta al estrés hídrico

-Los que aumentan la tolerancia calcular al potencial hídrico bajo y altas temperaturas asociadas con el estrés hídrico.

Los cambios mas permanentes que pueden ser heredables son cambios en la anatomía de la hoja, como la relación entre el área de mesófilo por unidad de área de hoja (Novel, 1980). Esa relación es el único valor clasificado por Wiebe (1980) como una modificación morfológica permanente que puede ser heredable. Muchos cambios que el denomina temporales, como el cambio en el ángulo u orientación de la hoja, son verdaderos mecanismos de evasión. Es muy difícil de evaluar el comportamiento de los estomas por la dinámica del comportamiento de ellos y la variabilidad de los factores ambientales. El cambio en el ángulo de la hoja es un mecanismo eficiente para reducir el monto de radiación en hojas sujetas a estrés de agua. Este cambio puede ser reversible rápidamente cuando desaparece las condiciones del estrés.

El estrés hídrico está íntimamente asociado con ciertas respuestas de las plantas que ayudan a que éstas se adapten o toleren mejor el déficit hídrico. Entre esas respuestas

tenemos la reducción del área foliar, la abscisión foliar, la extensión de raíces, el cierre de estomas, la disminución de la fotosíntesis, el ajuste osmótico, etc. (Taiz, 2002)

Salisbury y Ross (1994) describen la manera en que las plantas responden a un estrés hídrico, esto es, la disminución del potencial hídrico, aumento de la concentración de solutos y la disminución de la presión de turgencia de las células vegetales y señalan además que el agrandamiento de la célula, es decir, el crecimiento de la planta en general, es muy sensible al estrés hídrico y que la disminución de la expansión celular probablemente sucede cuando disminuye la turgencia de la célula.

En la planta de papa, un estrés hídrico moderado restringe la transpiración y la fotosíntesis, y si se da durante la etapa de expansión del follaje frena el crecimiento del follaje y favorece la partición de asimilados hacia el crecimiento de los tubérculos, sobre todo cuando ya existen tubérculos iniciados en la planta. Este efecto del estrés hídrico puede interpretarse como un adelantamiento del fin del crecimiento del follaje que favorece la partición a los tubérculos. Esto puede resultar en un acortamiento del ciclo del cultivo.

El cese del crecimiento foliar, la inducción a la tuberización y la senescencia prematura son efectos severos que finalmente afectan el rendimiento (Burton, 1989). Haverkort (1982) señala que aun un corto período de sequía afecta el rendimiento de la papa, especialmente después del inicio de la formación de los tubérculos. Afirma además, que un suelo seco causa la reducción del número de tallos, aumenta su temperatura lo cual es desfavorable para la iniciación de los tubérculos y sus grietas, al estar el suelo seco, favorecen la infestación de los tubérculos por insectos.

El estrés hídrico es definido como la respuesta a la falta o el exceso de agua en las plantas. Siendo este factor el que limita la productividad de los ecosistemas naturales y agrícolas. La sequía es definida como el déficit o falta de agua en el suelo para los cultivos y la inundación es el exceso de agua en el suelo. En general, se produce sequía o escasez de agua cuando el suministro es restringido por falta de lluvias o deficiencias en el riego, o bien porque la capacidad de almacenamiento del suelo no es buena. El estrés hídrico no

solamente se ve afectado por la falta de agua, sino también por altas temperaturas o por una elevada salinidad (González, 1999).

Según Sevillano (2004), propone haber dos formas de evaluar la resistencia a la sequía:

- a) Siembra del genotipo que se quiere evaluar en condiciones normales y condiciones de estrés, y cálculo de la relación “rendimiento en estrés/rendimiento normal”; y
- b) Evaluación de las características morfológicas y fisiológicas que condicionan la resistencia al estrés.

2.7. FISIOLÓGÍA DE LA PLANTA EN RESPUESTA AL RIEGO:

2.7.1. EFICIENCIA DE USO DE AGUA:

La eficiencia de uso de agua es generalmente considerada como un determinante importante del rendimiento de un cultivo bajo condiciones de estrés e incluso como un componente de la resistencia a la sequía de un cultivo (Blum, 2009).

La eficiencia de uso de agua es generalmente definida como la cantidad total de biomasa producida o acumulada por unidad de agua usada por la planta durante un período de tiempo (Liu et al., 2006; Javanovic et al., 2010; Fageria et al., 2006). Ésta definición fue aplicada primero para investigaciones en riego donde el costo de la aplicación del agua a las plantas era una consideración económica importante.

En términos fisiológicos la eficiencia de uso de agua puede tener diferentes definiciones. Para Tanner (1981), la eficiencia de uso de agua puede ser expresada como el rendimiento por unidad de agua evapotranspirada o transpirada. Para él, el agua perdida por evaporación tiene sólo consecuencias fisiológicas indirectas, tales como la reducción rápida de agua en la zona superior de las raíces y la modificación del microclima local, por lo tanto, el rendimiento por unidad de agua transpirada es una mejor medida del desempeño de la planta.

Para Sinclair et al., (1984), la eficiencia de uso de agua está definida como la relación entre la biomasa acumulada, expresada como asimilación de dióxido de carbono, biomasa total del cultivo o como el rendimiento de grano del cultivo, con respecto al consumo de agua expresado como transpiración, evapotranspiración o como el total de agua que ingresó al sistema; además afirma que el tiempo en el que se define la eficiencia de uso de agua puede ser instantáneo, diario o estacional.

Para Fageria (2006), la eficiencia de uso de agua también puede estar expresada como la relación de C asimilado con respecto al agua transpirada. Menciona además que en investigaciones recientes, la eficiencia de uso de agua es estimada por la técnica de Discriminación Isotópica de C.

Estos investigadores coinciden en que la producción de un cultivo está inevitablemente ligada a la transpiración y que para incrementar la producción de biomasa de un cultivo se debe usar más agua en la transpiración, por lo tanto, la eficiencia de uso de agua expresada en términos de transpiración es un buen indicador de la respuesta de la planta.

2.8. RELACIONES HÍDRICAS DEL CULTIVO DE PAPA

2.8.1. POTENCIAL HÍDRICO

El potencial hídrico representa la energía potencial que posee una masa por efecto del agua contenida, siendo un concepto termodinámico. El potencial hídrico de una célula de la hoja (ψ hídrico), consta según Milthorpe y Moorby (1982), de tres componentes: potencial de turgencia (ψ turgencia), potencial osmótico (ψ osmótico) y el potencial mátrico (ψ mátrico).

$$\psi_{Hídrico} = \psi_{Turgencia} + \psi_{Osmótico} + \psi_{Mátrico} \dots\dots\dots(Ec. 01)$$

La medición del potencial hídrico en la hoja es realizado a través de cámaras de presión (de Schoelander) o de cámaras psicrométricas (Wescor modelo C-52). Las plantas

a través de sus células transportan agua debido a un diferencial de potencial hídrico que se produce desde el suelo, en la zona radicular, hasta las hojas donde el potencial es más negativo. Wiebe (1966) y Boyer (1967) encontraron que para diferentes plantas herbáceas el potencial mátrico es despreciable, por lo que Ledent (2002) solo considera el potencial de turgencia y osmótico para los tejidos de hojas:

$$\psi_{Hídrico} = \psi_{Turgencia} + \psi_{Osmótico} \dots\dots\dots (Ec. 02)$$

El potencial osmótico ($\psi_{osmótico}$), es la presión hidrostática producida por una diferencia entre concentraciones de soluciones. Esta acumulación de solutos se realiza principalmente en las vacuolas, evitando el contacto con el citosol, lo cual estaría protegiéndolo de elevadas concentraciones de iones que inhiben las funciones enzimáticas. En tal sentido, Ledent (2002) afirma que el ajuste osmótico se produce lentamente y tiende a incrementar la tolerancia a la deshidratación. Salisbury y Ross (2000) afirman que el potencial osmótico puede ser medido de manera directa de una solución, siendo el método de presión de vapor el más adecuado para líquidos. Sin embargo para utilizar este método en plantas hay que reducir a cero la presión de las células vegetales, esto se logra mediante congelamiento y descongelamiento rápido, lo que genera cristales de hielo que rompen todas las membranas. Este tratamiento da como resultado una mezcla de citoplasma, savia vacuolar y agua contenida en las paredes celulares.

A medida que la concentración de soluto (es decir, el número de partículas de soluto por unidad de volumen de la disolución) aumenta, el potencial hídrico se hace más negativo. Sin la presencia de otros factores que alteren el potencial hídrico, las moléculas de agua de las disoluciones se moverán desde lugares con poca concentración de solutos a lugares con mayor concentración de soluto. La disminución del potencial osmótico por una activa acumulación de solutos en la célula en respuesta al estrés hídrico, es observada en varias especies de plantas y se les denomina ajuste osmótico (Turner, 1979), existiendo escasa información sobre la naturaleza y contribución relativa de solutos orgánicos e iones y nada sobre la energía del metabolismo involucrada en el ajuste (Martínez, 1988).

El mantenimiento de la turgencia en la planta a través del ajuste osmótico es una adaptación fisiológica importante para minimizar los efectos de un estrés hídrico. El ajuste osmótico resulta de la acumulación de solutos dentro de las células lo cual disminuye el potencial osmótico y ayuda mantener la turgencia tanto en los brotes como en las raíces. (Fageira et al., 2006).

Salisbury y Ross (2002) señalan que si los tejidos de una planta deben absorber agua para sobrevivir, su potencial hídrico debe ser más negativo que el de la solución circundante y una manera que las células tienen para superar este problema es de acumular sales en concentraciones iguales o mayores que las que hay en el exterior de la planta.

Morgan (1984) indica que las sales que se acumulan en el ajuste osmótico en altas concentraciones son iones inorgánicos compatibles, es decir, que en esas concentraciones no reducen las funciones fisiológicas normales de la célula. Señala también que el ajuste osmótico depende del tiempo y que la progresión del estrés hídrico debe ser lo suficientemente lento como para permitir la acumulación de sales que protejan a las células de la planta.

2.8.2. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA

El contenido relativo de agua (CRA), Se trata de una relación para estimar el estado hídrico o el grado de hidratación de la planta. Por lo general este se expresa en términos relativos y mide de manera indirecta la turgidez o turgencia de la hoja. Werner (1954), estudió el CRA en hojas de 6 variedades de papa y encontró que el alto contenido de humedad en el suelo origina solo una ligera variación del CRA en las hojas, pero cuando la humedad del suelo decrecía significativamente, las diferencias del CRA eran más evidentes. Otros estudios señalan que hay diferencias varietales en el CRA de las hojas aun cuando el potencial del agua del suelo es alto (Epstein y Grant, 1973).

El CRA en las hojas es afectado por las condiciones climáticas, es decir cuando la humedad relativa decrece, se incrementa la demanda evaporativa y el gradiente de vapor de agua de las hojas hacia la atmósfera (Guerrero, 1993).

(Aumentar)

2.8.3. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

Según Ludlow (1980), el grado de apertura de estomas (células guarda o oclusivas) en las hojas es definido como tasa de conductancia, a causa del flujo de CO₂ y vapor de agua, el mismo que es proporcional a dicha conductancia. Asimismo, la conductancia estomática esta referida a toda la superficie de la hoja, sin embargo cuando el haz es evaluado es referida como la superficie adaxial, y cuando es el envez se refiere como abaxial.

Para Lambers *et al.* (2008), la apertura de las estomas tiende a ser regulada, así como la fotosíntesis es regulada por la difusión de CO₂ a través de las estomas y la cadena de transporte de electrones. Las plantas reducen su conductancia estomática en la medida que se presenta un estrés hídrico, habiendo una mayor eficiencia de uso de agua (EUA), debido a que si bien puede reducirse la transpiración, la fotosíntesis no se reduce tan rápido, manteniendo a niveles similares o menores ligeramente durante algún tiempo, y como resultado se incrementa la ganancia de CO₂ por unida de agua pérdida.

La resistencia a la pérdida de vapor de agua en las hojas de las plantas, es medida por equipos llamados porómetros, los mismos que cuantifican esta pérdida a través de los estomas y es utilizado como un indicador del estado fisiológico de la planta. Para Bragg *et al.* (1991), este instrumento trabaja midiendo el tiempo que tarda la hoja en proporcionar vapor de agua en la pequeña cámara, cambiando la humedad relativa hasta una cantidad previamente definida. La resistencia estomática está correlacionada inversamente proporcional a la transpiración y a la conductancia estomática, sin embargo existe una gran variabilidad en los cultivares de papa. Según Levy *et al.* (1989), los cultivares más ahorradores de agua son aquellos que presentan resistencias estomáticas más altas, habiendo un control genético de este factor. Asimismo, encontró que los porómetros son herramientas convenientes para estudios comparativos entre la transpiración y la resistencia estomática, donde halló relaciones consistentes entre los tres cultivares de papa estudiados.

Vos y Groenwold (1989), encontraron una relación inversa entre el EUA y la conductancia estomática.

Porometría:

La porometría es el estudio del flujo o la difusión de gases a través de los poros estomáticos. Permite determinar la conductividad estomática como un índice de la apertura y cierre de estomas de la hoja de la planta.

De la cantidad total de agua que es absorbida del suelo, transportada en el tallo y transpirada hacia la atmósfera, solamente una fracción muy pequeña de 1% se incorpora a la biomasa. Casi toda el agua que se pierde por la hoja pasa a través de los poros del aparato estomático, que son más abundantes en el envés de la hoja. El potencial hídrico de la planta está determinado por dos factores importantes que son la humedad del suelo, que controla el suministro de agua y la transpiración que gobierna la pérdida de agua. Estos factores ejercen su acción a través de la conductancia estomática, que depende tanto del contenido de agua del suelo como de la humedad relativa del aire. (Hernández, 2007).

La pérdida de vapor de agua a través de los estomas de la hoja es uno de los factores críticos que vincula a la transpiración con la temperatura ambiental, presión, humedad y velocidad del viento. Los estomas son sensibles a la luz, humedad relativa, dióxido de carbono, estrés hídrico y agentes patógenos, por lo tanto, la porometría es una herramienta valiosa para cuantificar el efecto de la influencia de éstos factores sobre el comportamiento de los estomas, es decir, la conductancia estomática (Jacobsen y Mujica, 1999).

2.8.4. CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD)

Según Ferri (2004), el análisis de la clorofila permite conocer el desarrollo de la planta y determinar su estado fisiológico, que a su vez servirá para detectar la presencia de algún estrés. Tenga *et al.* (1989), añade que una planta estresada sufre una disminución en su

contenido de clorofila, la misma que perjudicaría el proceso fotosintético ocasionando una reducción del intercambio gaseoso es decir, menor fijación de carbono (González, 2009).

La clorofila es el pigmento que absorbe la luz en las plantas verdes. Capta la energía solar y la acumula en la planta en forma de proteínas y azúcares. Se encuentra dentro de la membrana de los cloroplastos, que son orgánulos pequeños que se encuentran en las células vegetales. La clorofila es una molécula grande compuesta de hidrógeno, carbono, oxígeno y magnesio coordinado con cuatro átomos de nitrógeno central.

La clorofila puede ser estimada de forma no destructiva y muy fácil en las hojas de las plantas, utilizando ciertos dispositivos. La clorofila y el contenido de nitrógeno en la planta están íntimamente relacionados (Evans, 1983), por lo cual hay mucho interés en utilizar su medición rápida y sencilla para el diagnóstico del estado de Nitrógeno en el cultivo.

El análisis de las clorofilas da a conocer el estado de desarrollo de la planta y permite la determinación del estado fisiológico de la planta, con lo cual se puede detectar posibles estreses (Ferri, 2004).

Actualmente, una forma rápida y no destructiva para conocer el contenido de clorofila en las hojas es mediante el uso del clorofilómetro Minolta SPAD 502 (por sus siglas en inglés: soil plant analysis development; SPAD). Este instrumento opera en base a la cantidad de luz absorbida en dos longitudes de onda (660 y 940 nm). Cuanto mayor sea la absorción de luz, mayor será la cantidad de clorofila presente en la hoja (Richardson, 2002). Este tipo de equipo se pone en contacto directo con la hoja al momento de realizar la medición, las unidades de medición son unidades SPAD, que es un contenido relativo de clorofila en relación al equipo.

2.8.5. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA:

El área específica de la hoja es un parámetro vegetal que está muy correlacionado con la tasa de crecimiento del cultivo. Se trata de la razón entre el área foliar y el peso seco de la hoja, siendo entonces un índice del espesor y densidad de la hoja.

2.8.6. REFLECTANCIA

La reflectancia es una medida de la radiación reflejada a diferentes longitudes de onda, sobre una cobertura vegetal o superficie determinada. Para medir la reflectancia es necesario hacerlo con sensores remotos multispectrales por sobre la cobertura de planta del cultivo (Samborski, 2009). Una vez obtenidos los valores de reflectancia a distintas longitudes de onda, es posible calcular índices de vegetación, que permiten caracterizar la cobertura de planta de los cultivos. El más conocido y utilizado es el denominado índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI por sus siglas en inglés: Normalized Difference Vegetation Index). El NDVI combina los valores de reflectancia a dos longitudes de onda (infrarrojo y rojo). Los índices espectrales, como el NDVI, han demostrado ser herramientas útiles para obtener de manera indirecta, eficiencia fotosintética, potencial de productividad y rendimiento potencial de los cultivos (Inman, 2008). Los sensores más difundidos a nivel mundial son, el SpectroSense2+ (Skye Instruments Inc., Llandrindod Wells, UK), el Green Seeker (Ntech industries, Inc., Ukiah, CA.), el crop Circle ACS-210 (Holland Scientific, Lincoln, NE) y el Jaz (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL). La ecuación que representa este NDVI es:

$$NDVI = \frac{R - R}{R + R} \quad (\text{Ec. })$$

Donde:

IR : Radiación reflejada en el infrarrojo

R : Radiación reflejada en el rojo

2.8.7. PROLINA LIBRE EN LA PLANTA

Como resultado del estrés hídrico se producen cambios bioquímicos en las plantas, algunos de los cuales con lleva a la acumulación de solutos de bajo peso molecular, tales como la prolina y betainas (Yancy *et al.*, 1982). Para bajar el potencial hídrico en la planta, se involucra la acumulación de osmolitos compatibles en la osmoregulación que permitan continuar tomando agua adicional desde el ambiente, pues esto tiene un efecto inmediato en el almacenamiento de agua por las plantas. Altos niveles de prolina permiten a la planta mantener un bajo potencial hídrico, adicionalmente actúan como osmoprotectante, donde la prolina sirve como una fuente de energía para regular el potencial de óxido-reducción (redox) (Saradhi y Saradhi, 1991; Blum y Ebercon, 1976), como un protector de radicales hidróxi (Smirnoff y Cumbes, 1989), como un soluto que protege las macromoléculas contra la desnaturalización (Schobert y Tschesche, 1978), como un medio para reducir la acidez en la célula (Venkamp *et al.*, 1989), y como un compuesto de almacenamiento y fuente de nitrógeno para un rápido crecimiento después del estrés (Singh *et al.*, 1973).

La prolina es uno de los mecanismos de adaptación de la planta al déficit hídrico (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). El incremento en los niveles de prolina puede incluso alcanzar de diez a cien veces más de su valor normalmente encontrado en plantas bien regadas (Levy, 1983), no obstante, durante un riego de recuperación estos niveles disminuyen rápidamente. Por otro lado, la prolina también es considerada parte de la respuesta adaptativa a otras condiciones ambientales adversas, tales como bajas temperaturas, metales pesados o deficiencia nutricional (Bellinger *et al.*, 1991; Chiang y Dandekar, 1991, 1995; Delauney y Verma, 1993).

2.8.8. FOTOSÍNTESIS

2.8.8.1. CONCEPTO DE RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA

La radiación fotosintéticamente activa se refiere a la radiación solar en el rango visible, comprendida entre 400 y 700 nm de longitud de onda y que es activa para fotosíntesis (Ccombs y Hall, 1982).

Debido a que la fotosíntesis es un proceso fotoquímico, está influenciado más por el número de fotones incidentes por unidad de área y por unidad de tiempo que por la energía total de los fotones. Para la medición de la densidad del flujo de fotones existen los sensores de cuanta ajustados para diferentes niveles de energía en los extremos rojo y azul del espectro. La densidad del flujo de fotones se expresa en μE o μmol de fotones por m^2 por segundo.

2.8.8.2. EFECTOS DEL ESTRÉS HÍDRICO POR SEQUIA EN LA FOTOSÍNTESIS

Los efectos del estrés hídrico por sequía, sobre la fotosíntesis, ha sido revisado y tratado por diversos investigadores y bajo diferentes enfoques (Hsiao, 1973; Sullivan y Eastin, 1974; Boyer, 1976; Osmond, *et al* 1980; Turner y Begg, 1981). Se ha demostrado que las plantas pierden su actividad fotosintética, conforme el potencial de agua de sus hojas decrece. Estas pérdidas son atribuidas a factores estomatales (cierre de los estomas) y a factores no estomatales (disminución de la actividad fotosintética en los cloroplastos). El cierre de los estomas afecta el intercambio gaseoso entre el tejido fotosintético y la atmósfera, disminuyendo la entrada de CO_2 .

Clarke y Townley – Smith (1984) sostienen que la retención de solutos en las células guardianes, podrían servir para mantener la turgencia celular y la apertura estomatal y permitir que la fotosíntesis continúe aun bajo estrés hídrico por sequía.

A nivel metabólico, los cloroplastos pierden su actividad particularmente en reacciones asociadas a las membranas de los tilacoides. El fotosistema II y la fotofosforilación, son particularmente inhibidas (Keck y Boyer, 1974), mientras que al fotosistema I y las actividades enzimáticas del ciclo de Calvin son algo menos afectadas (Boyer, 1976).

Mediciones del intercambio gaseoso, demostraron que la fotorespiración disminuye durante el estrés hídrico en trigo (Lawlor, 1976) y girasol (Lawlor y Fock, 1975), sugiriendo que los efectos del déficit hídrico sobre la fotosíntesis neta, no son debidos al incremento del flujo del CO_2 fotorespirado, sino a pérdidas en la actividad en las “reacciones luminosas” y “oscuras” de la fotosíntesis (Hanson y Hitz, 1982). La alteración en la capacidad de

carboxilantes en el cloroplasto, ha sido observado por O'toole et al (1976) durante estrés hídrico de varios días de duración.

Según Sevilla, (2004) la temperatura afecta muchos procesos fisiológicos. La fotosíntesis es el proceso mas afectado, también la respiración, la translocación y la permeabilidad de la membrana.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PLAN GENERAL DEL EXPERIMENTO

El ensayo del presente trabajo de investigación se realizó bajo condiciones de campo. Se evaluaron diez genotipos de papa, sometidos a estrés hídrico por sequía, con un sistema de riego por aspersión contándose con sectoriales para controlar el área regada (riego normal) y el área sin dotación de agua (sequía). Se cuantificaron los cambios fisiológicos (potencial osmótico, contenido de clorofila, SPAD, contenido relativo de agua, NDVI, prolina, conductancia estomática, fotosíntesis y reflectancia), y área específica de la hoja, número de tubérculos, biomasa y rendimiento del cultivo.

Para el análisis estadístico, se empleó un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcelas divididas, en cada una de las cuales se distribuyeron las repeticiones al azar y posteriormente se realizó un análisis combinado de los mismos.

Criterio,: se trataron que las genotipos UExp. no estén contiguas

3.2. LUGAR Y UBICACIÓN

El presente ensayo de campo fue realizado en la estación experimental INIA de Santa Rita de Sigua - Arequipa, una zona de clima desértico con lluvias escasas y no significativas. Esta zona tiene una altitud promedio a los 1,400 msnm, con climas apropiados para el desarrollo agrícola de 38,500 nuevas hectáreas con: 9.7 horas sol. día⁻¹.

3.2.1. UBICACIÓN POLÍTICA

Distrito	:	Santa Rita de Sigua
Provincia	:	Arequipa
Departamento	:	Arequipa

3.2.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Latitud : 16° 29' 27'' S
Longitud : 72° 05' 33'' O
Altitud : 1,268 m.s.n.m.

Figura. Ubicación de las parcelas experimentales.

3.3. CLIMA

El clima de Santa Rita de Sigwas se caracteriza por ser desértico teniendo un promedio de 7 mm año⁻¹, una temperatura media anual de 19°C, una radiación solar de 3,397 hr año⁻¹, la humedad relativa de 53 %, y una evaporación media de 2,130 mm año⁻¹. (Según gobierno regional de Arequipa, 2011).

Las condiciones climáticas durante el período experimental, fueron registradas en estación meteorológica modelo HOBO U30 (Onset Corporation, Bourne, EEUU) en la parcela con el tratamiento de sequía, y un sensor HOBO U23 Pro v2 de temperatura y humedad relativa (Onset Corporation, Bourne, Massachusetts, EEUU) parcela con el tratamiento con riego. La estación meteorológica registró cada 30 los datos de temperatura, humedad relativa, radiación y precipitación, los primeros Las temperaturas máximas, mínimas y media registradas por la estación sensor (

Figura) nos muestran

Figura. Temperaturas registradas por la estación meteorológica HOBO U30 y el sensor HOBO U23



Figura. Estación meteorológica HOBO U30 y sensor HOBO U23

3.4. SUELO

Para conocer las propiedades físicas y químicas del suelos se realizo un muestreo con un barreno, dichas muestras embaladas y rotuladas fueron llevadas al laboratorio de análisis de suelos y plantas de la **Universidad Nacional Agraria La Molina (cuadro)**, para en el cual se realizo un análisis de caracterización, se observo en los resultados de análisis que el suelo tiene un pH de 7.56 los que representa un suelo de pH medianamente básico con una presencia media de CaCO₃ (1%). **Villalta (2006)**, los rendimientos óptimos de papa se dan en un rango de pH de 5.0 - 5.8 y un rango de tolerancia para el rendimiento satisfactorio de 4.5 - 7.0, evidentemente este valor en el pH es un factor que podría afectar el rendimiento del cultivo, en cuanto a la C.E., 0.99 dS.m⁻¹ representa un valor que permite clasificar al suelo como no salino no sódico, por lo cual no se tuvieron problemas de salinidad, según Carter (9981), los rendimientos pueden verse afectados por la CE. en determinados niveles y para un cultivo en específico, entonces los valores encontrados de CE para este suelo fueron de 0.99 lo cual no representa ningún problema en el rendimiento del cultivo, ya que el umbral de CE en papa esta en 1.7. Los valores de materia orgánica (1.3%) demuestran que el suelo es bajo en contenidos de la misma lo cual ayuda a la poca retención del agua disponible para la planta y su baja disponibilidad de nitrógeno que esta entre 0.07% aproximadamente. El contenido de P y K es bajo y alto respectivamente, la clase textural del suelo que es franco arenoso confiere al suelo propiedades físicas como la porosidad con valores comprendidos entre 33-42 % que constituye un suelo medianamente aireado por la presencia principalmente de macroporos. La densidad aparente en un rango de 1.7 – 1.5 g.cc⁻¹., lo que reafirma la poca capacidad del suelo en retener el agua estando frente a un suelo árido. **En cuanto a la CIC ...** en cuanto al Ca⁺², Mg⁺² y Na⁺ se encuentran en niveles bajos. En cuanto a sus relaciones: Ca/Mg con 3.83 lo cual no representan una optima relación escapando del rango optimo, igual condición ocurre en Ca/K con 8.48, el optimo es de 14-16 y por ultimo Mg/K con 2.21 lo que representa que es suelo posee una buena relación entre estos dos cationes. (Ver cuadro)

Cuadro 2. Análisis y caracterización del suelo.

Variable medida	Unidades	Campo I (sequía)
pH (1:1)	-	7.56
C.E. e.s., 25°C (1:1)	dS/m	0.99
CaCO ₃	%	1.0
M.O.	%	1.3
P (ppm)	-	2.9
K (ppm)	-	336.0
Arena	%	74.5
Limo	%	18.0
Arcilla	%	7.5
Clase textural		Franco arenoso
CIC		8.6
Ca ⁺²	meq/100g	5.94
Mg ⁺²	meq/100g	1.55
K ⁺	meq/100g	0.7
Na ⁺	meq/100g	0.41
Al ⁺³ + H ⁺	meq/100g	0.00
Suma de cationes		8.6
Suma de bases		8.6
% Sat. de bases	%	100

3.5. MATERIALES

3.5.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizó diez genotipos de papa (cuadro) que se evaluaron con referencia al estrés hídrico (sequía):

Número CIP	Número CIP
380011.12	694474.16
397077.16	392634.52
391180.6	392797.22
6694474.33	393073.197
300056.33	394614.117

La descripción del origen o pedigrí (árbol genealógico) de estos clones se muestran en el Anexo 2.

Cuadro. Características de los clones de papa utilizados en el experimento.

Clon (Número-CIP)	CARACTERÍSTICAS		
	Var.	Origen	Período vegetativo (días)
392797.22	UNICA	CIPHQ	Precoz (90-110)
397077.16	-	CIPHQ	Precoz (90-110)

3.5.2. MATERIALES DE CAMPO

- Trinches, Rastrillo, Gancho, Lampas, Picos para las labores culturales.

- Probetas de 25, 100 y 500ml, para medir la lamina de riego
- Depósitos de un litro para medir la lamina de riego
- Cinta métrica para medir y sectorizar el campo experimental.
- Etiquetas de colores (codificación de las unidades experimentales)
- Tractor con implementos
- Carretilla para transportar materiales e insumos, etc.
- Bidones de agua (trampas para insectos)
- Libreta de apuntes (cuaderno de campo)
- Marcadores indelebles para rotular las muestras de CRA y prolina
- Tuberías de aluminio, codos, gomas para el sistema de riego.
- Aspersores marca VYR de bronce con un radio aspersion de 9 m
- Sectoriales de plástico
- Bisturí para colectar los foliolos de hoja.
- Bandeja de plástico para colocar en remojo los foliolos.
- **Viales criogénicos NALGINE de 1ml.**
- Caja de teknopor de 30cm. Por 20cm para transportar muestras de prolina y CRA.
- Barreno o tornillo muestreado, para determinar la humedad del suelo
- Balón de nitrógeno líquido, para transportar las muestras desde el campo hacia los laboratorios **y realizar el análisis del potencial osmótico.**

3.5.3. MATERIALES DE LABORATORIO

- Balanza para muestreo de porcentaje de humedad y biomasa
- Bandejas de plástico (para realizar CRA)
- Cuchillo, tijeras de podar y tabla de picar (para realizar biomasa)
- Papel toalla recepción de muestras de CRA.
- Plumón indeleble.
- Matraz de 100cc para muestreo de suelo

3.5.4. MATERIALES DE GABINETE

- Laptop CORE i3, marca TOSHIBA.
- Papel boon A4
- Lápiz y lapiceros
- **Programa Compueye LSA (software para la determinación del área de una hoja)**
- **Programa para el análisis estadístico de datos SAS v.9 (SAS Institute, 1990).**

3.5.5. EQUIPOS

Los equipos que se usaron en este experimento fueron los siguientes:

- Reflectómetro SpectroSense2 (Skye Instruments Ltd., Llandrindod Wells, Powys, Reino Unido), para medir la radiación incidente y reflejada en la banda roja y la infrarroja, y determinar la diferencia del índice normalizado de vegetación (NDVI).
- Escaner OneTouch 9520 (Vissioner, Pleasanton, California, EEUU) para determinar el área foliar.
- Cámaras psicrométricas (C52) para determinar el potencial osmótico de la hoja.
- microvoltímetro (HR-33T, Wescor Inc.) para determinar el potencial osmótico de la hoja.
- Medidor de clorofila (SPAD 502, Minolta) para determinar el contenido de clorofila.
- **Espectrofotómetro (Thermo Scientific “Helios Delta”) calibrado a 410 nm de absorbancia.**
- **Porómetro modelo AP-4 marca DELTA T Devices, para medir la conductancia estomática.**
- balanza digital Mettler 400P, y una balanza analítica Mettler AE-50.
- **Balanza digital, para tomar el peso de los tubérculos en la cosecha.**
- **Balanza analítica de precisión, para tomar el peso de folíolos.**
- **Agitador Vortex (L-VM1000)**

- Analizador de fotosíntesis modelo LI-6400XT, marca LI-COR, para medir las fotosíntesis.
- Congeladora con -24C° para conservar muestras de prolina.

3.5.6. INSUMOS

- Estiércol para fertilización de fondo del campo.
- Bolsas de papel kraft para biomasa y rendimientos.
- Yeso para la demarcación del terreno.
- Bolsas de plástico transparente transportar muestras de biomasa.
- Nitrógeno líquido. (Potencial osmótico y prolina)
- Papel servilleta para evaluaciones del CRA
- Plástico film para muestreo del CRA
- Papel aluminio para muestreo de prolina.
- Agua destilada para remojo de folíolos del CRA.

Reactivos

- Nitrato de amonio (NH_4NO_3), con una concentración de 33% de N.
- Superfosfato triple ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), con concentraciones de 46% de P_2O_5 y 20% de Ca.
- Cloruro de potasio (KCl), con una concentración de 60% de K_2O
- Sulfato de potasio (K_2SO_4), 0.34M
- Ácido salicílico ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{COOH}$), al 5%
- Hidróxido de sodio (NaOH), 4N
- Soluciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de nitrato (NO_3^-)

3.6. METODOLOGÍA

La siembra se realizó el día de 26 octubre del 2011. La metodología que se utilizó para evaluar los objetivos fue en base a los métodos cuantitativos. Los parámetros evaluados comenzaron a partir de iniciada la sequia.

3.6.1. CAMPO EXPERIMENTAL

El experimento se llevó a cabo en un área específica 216.0 m² que consta de parcelas divididas con una área de 27.0 m² tanto para riego normal y sequia. Cada bloque consta de cuatro repeticiones, el área de cada repetición o unidad experimental es de 2.7 m². Cada unidad experimental (UE) consistió de dos surcos de 0.9 m por 1.5m, en cada surco se colocaron cinco tubérculos de papa haciendo un total de diez tubérculos por unidad experimental. Para el control contra el efecto de borde se manejaron tres surcos en los extremos, entre bloques se colocaron 7 surcos libres.

3.6.2. LA INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL ENSAYO

a) Preparación del suelo

En el área experimental, anteriormente se había sembrado alfalfa. La preparación del terreno se realizó con tractor, pasando rígido en dos oportunidades en cruz a tracción mecanizada a una profundidad de 40 cm, rastra, nivelado y surcado, se hizo un recojo de piedras y finalmente se hicieron los surcos con un distanciamiento de 0.9m. Se aplicó guano de corral como fertilizante de fondo, en el fondo del surco en una proporción de 20 t ha⁻¹

b) Marcado del campo experimental

Consistió en demarcar los bloques, parcelas y calles utilizando para ello cinta métrica, cordel y yeso.

3.6.3. SIEMBRA

La siembra realizada el 26 de octubre donde los tubérculos-semilla se colocaron de forma manual, colocando 10 tubérculos por unidad experimental, como ya se detallo anteriormente cada unidad consta de dos surcos de 1.5m de largo por 0.9m de ancho aproximadamente. La semilla espaciada a 0.30 m entre planta, donde se aplicó fertilizante entre las semillas, la fertilización se realizo por golpes. Las semillas tubérculos se sembraron a una profundidad aproximada de 8-10 cm. Entre cada semilla de papa se aplicó el 50% del nitrógeno, el 100% de **potasio y fosforo**.

También se aplicó un fungicida preventivo Furadan (ver cuadro de aplicaciones)

3.6.4. RIEGO

El sistema de riego que se utilizó en el experimento fue por aspersión en toda la fase del cultivo se utilizó un volumen aproximado de **6000 m³ ha⁻¹ en riego normal por aspersión**. Los riegos se hicieron como se detalla en el cuadro ()

Estos riegos tuvieron una duración de aproximadamente una dos horas en cada posición. El corte de agua se realizó en dos oportunidades el primero a los **67 DDS hasta los 84 DDS y el segundo 96 DDS hasta la cosecha**. Estos riegos restringidos solo para el tratamiento con sequía. El riego con tratamiento normal fue como se muestra en el cuadro N° y a los 110 días se cosecho en forma manual.

3.6.5. FERTILIZACIÓN

Para la etapa de campo se utilizaron fertilizantes tales como: Nitrato de amonio con 33.5% de nitrógeno(N), Sulfato de potasio con 50% de potasio (K₂O) y superfosfato triple de calcio con 46% de fosforo (P₂O₅). Los niveles de fertilización son de 200 N- 160 P₂O₅- 160 K₂O.

Los fertilizantes usados en el experimento fue: fosfato diamónico, sulfato de potasio y nitrato de amonio en dos fórmulas de fertilización **(0-180-150 y 200-180-150 de N - P₂O₅ - K₂O)**. El fertilizante nitrogenado fue fraccionado en dos mitades, siendo la primera

fertilización a la siembra (día cero), y la segunda a los **41 días después de la siembra (41 DDS) coincidiendo con el aporque**. La aplicación de estos fertilizantes fue de manera localizada, en el fondo del surco entre las semillas-tubérculo (en la siembra), para lo cual se tuvo que pesar los fertilizantes con la dosis recomendada en proporción a cada planta. El pesado de los fertilizantes se realizó utilizando una balanza Mettler 400P y éstas fueron puestas en bolsas de polietileno para ser transportadas para realizar una distribución más uniforme en el campo.

Figura. Fertilización localizada a la siembra.

Cuadro de fertilización

La fertilización bajo la fórmula de 200 – 160 – 160, se realizó en la siembra (0 días), en el pre aporque (40 días), y en el aporque (60 días). Tal como se observa en el cuadro n°6.

CUADRO N° 1: Nivel de fertilización aplicado.

Fuente	Ley (%)	cantidad aplicada		Momento de aplicación		
		Área Exp.	Hectáreas	siembra (o días)	Pre-aporque (42 días)	aporque (50 días)
Nitrato de amonio	33.5%	291.6	0.029			
fosfato di amónico	50%	291.6	0.029			
Sulfato de potasio	46%	291.6	0.029			

3.6.6. LABORES CULTURALES

Deshierbo

Se realizó un desmalezado manual constante con la ayuda de una coreadora. Siendo el control químico para malezas un posible factor de influencia en la fisiología de la planta por tanto no se aplicó ningún herbicida por lo cual el deshierbo fue netamente manual. Las principales malezas encontradas fueron: pata de pájaro (*Cynodon dactylom*), Verdolaga (*Portulaca oleracea*), Liccha (*Chenopodium álbum*), Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), Nabo (*Brassica campestris*), malva Pata de gallina (*Digitaria sanguinalis* o *Eleusine indica*), entre otras.

En el manejo del cultivo se realizó un pre-aporque (a los 45 DDS) y aporque definitivo (50 DDS).

Aporque

Se realizó el pre-aporque a los 40 DDS y el aporque a los 45 DDS utilizando como herramienta de trabajo la lampa para el pre aporque y después se utilizó un tractor para el aporque. Conjuntamente con el aporque se aplicó la segunda fertilización.

3.6.7. PROTECCIÓN SANITARIA

Control etológico.- se usaron feromonas para *Pthorimaea operculella*, *Tuta absoluta*.... Colocadas en un deposito grande y en la parte inferior se colocó agua con detergente

Control químico.- Se aplicaron diferentes pesticidas a lo largo del periodo fenológico del cultivo, para el control preventivo de “mosca minadora”, “pulgón” y la presencia de *Russelliana solanicola*. También para el ataque de enfermedades fungosas como: *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*, observando ciertas plantas que puedan tener tolerancia o susceptibilidad a estas enfermedades. Después aplicaciones preventivas contra la “ranchara” (FITORAZ® PM, y ACROBAT* CT), “pulguilla saltona”, “mosca minadora” y ácaros (VERTIMEC® 018 EC), que son las plagas de mayor incidencia en la zona.

3.6.8. COSECHA

La cosecha final fue manual, se realizó el 18 de febrero del 2012 al 50 % de plantas muertas en la de sequia, extrayendo ocho plantas de papa de cada unidad experimental y se determinó el peso fresco de los tubérculos, como peso fresco de tallos, raíces y hojas.

13. TRATAMIENTOS

Los tratamientos que se evaluaron en el ensayo fueron:

10 genotipos de papa

2 tipos de riego (riego normal y sequía)

CUADRO DE TRATAMIENTOS

Clave	Genotipo	Tipo de riego	Clave	Genotipo	Tipo de riego
T0-R	392797.22	Riego normal	T0-S	392797.22	Sequia
T1-R	397077.16	Riego normal	T1-S	397077.16	Sequia
T2-R	391180.6	Riego normal	T2-S	391180.6	Sequia
T3-R	6694474.33	Riego normal	T3-S	6694474.33	Sequia
T4-R	300056.33	Riego normal	T4-S	300056.33	Sequia
T5-R	694474.16	Riego normal	T5-S	694474.16	Sequia
T6-R	392634.52	Riego normal	T6-S	392634.52	Sequia
T7-R	380011.12	Riego normal	T7-S	380011.12	Sequia
T8-R	393073.197	Riego normal	T8-S	393073.197	Sequia
T9-R	394614.117	Riego normal	T9-S	394614.117	Sequia

14. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental a utilizar será de Parcelas Divididas, adecuado para la características de la evaluación (Montgomery, 1991). La unidad experimental constará de diez plantas. Los factores por analizar serán dos: los genotipos de papa y los tipos de riego. El factor variedades constará de 10 genotipos de papas mejoradas. El factor tipo de riego tendrá dos tratamientos: con riego normal y con riego suspendido o sequía. Las repeticiones serán cuatro. Las unidades serán distribuidas al azar en las parcelas. El modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \rho_j + \gamma_{ij} + \beta_k + \beta_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad \dots\dots\dots (02)$$

Donde:

Y_{ijk} es valor observado con el i-ésima variedad de papa, j-ésimo bloque y k-ésimo tipo de riego.

μ es el efecto de la media general.

α_i es el efecto de la i-ésima variedad de papa.

ρ_j es el efecto del j-ésimo bloque.

γ_{ij} es el efecto del error experimental en parcelas (Error(a)).

β_k es el efecto del k-ésimo tipo de riego.

β_{ik} es el efecto de la interacción en la i-ésima variedad de papa y el k-ésimo tipo de riego.

ε_{ijk} es el efecto del error experimental en subparcelas (Error(b)).

Cuadro El análisis de varianza (ANVA) usado, según el cuadro siguiente:

Fuentes de variación	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios (CM)	Fc
Bloques	r-1	SC(Bloques)	$\frac{SC(\text{Bloques})}{gl(\text{Bloques})}$	
Variedades (V)	p-1	SC(V)	$\frac{SC(V)}{gl(V)}$	$\frac{CM(V)}{Ea}$
Error (a)	(r-1)(p-1)	SC(Error(a))	$\frac{SC(\text{Error(a)})}{gl(\text{Error(a)})}$.
<hr/>				
Total Unidades	pr-1	SC(Total Unid.)		
<hr/>				
Tipo de Riego (I)	q-1	SC(I)	$\frac{SC(I)}{gl(I)}$	$\frac{CM(I)}{Eb}$
V. I	(p-1)(q-1)	SC(VI)	$\frac{SC(V I)}{gl(V I)}$	$\frac{CM(V I)}{Eb}$
Error(b)	p(q-1)(r-1)	SC(Error(b))	$\frac{SC(\text{Error(b)})}{gl(\text{Error(b)})}$	
<hr/>				
Total Subunidades	pqr-1	SC(Total Subunid.)		

Las hipótesis del Modelo I (efectos fijos) son, en términos de los efectos de los niveles de los factores evaluados, las siguientes:

Para el efecto principal de variedades V :

$$H_0: \alpha_i = 0 \quad \forall \text{ i-ésima variedad de papa.}$$

$$H_1: \alpha_i \neq 0 \text{ para la menos algún i-ésima variedad de papa.}$$

Para el efecto principal de tipo de riego I :

$$H_0: \beta_k = 0 \quad \forall \text{ k-ésimo tipo de riego.}$$

$$H_1: \beta_k \neq 0 \text{ para la menos algún k-ésimo tipo de riego.}$$

Para el efecto principal de la interacción V.I :

$H_0: \beta_{ik} = 0 \quad \forall$ i-ésima variedad de papa y el k-ésimo tipo de riego.

$H_1: \beta_{ik} \neq 0$ para la menos algún i-ésima variedad de papa y el k-ésimo tipo de riego.

El estadístico de la prueba será:

Para el efecto principal de variedades V :

$$F_C = \frac{CM}{E_a} \propto F_{gl} \text{ Error}$$

Para el efecto principal de tipo de riego I :

$$F_C = \frac{CM}{E_b} \propto F_{gl} \text{ Error}$$

Para el efecto principal de la interacción V.I :

$$F_C = \frac{CM}{E_b} \propto F_{gl} \text{ Error}$$

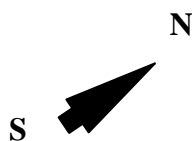
CROQUIS EXPERIMENTAL

Área total específica	:	216.0 m ²
Área por bloque	:	27.0 m ²
Distancia entre surcos	:	0.90 m
Distancia entre plantas	:	0.30 m
Área de la unidad experimental	:	2.7 m ²
Número de repeticiones	:	4
Número de tratamientos de riego:		2
Número de clones	:	10

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD (GL)
Bloques	3
Tipo de riego (I)	1
Error (a)	3
Total Unidades	7
Variedades (V)	9

I. V	9
Error(b)	54
Total Sub-unidades	79

Croquis del campo experimental



Calle	Calle de 1m de ancho	(3s) Capiro	Calle de 1m de ancho	Canchan	Calle de 1m de ancho	Tomasa	Calle de 1m de ancho	UNICA	Calle de 1m de ancho	Sin riego
		380011.12		694471.16		393073.197		397077.16		
380011.12	392634.52	300056.33	392634.52							
397077.16	392797.22	397077.16	694474.16							
391180.6	393073.197	394614.117	380011.12							
694474.33	391180.6	694474.33	300056.33							
300056.33	397077.16	392797.22	394614.117							
694474.16	394614.117	380011.12	393073.197							
392634.52	694474.33	391180.6	392797.22							
392797.22	300056.33	694474.16	694474.33							
393073.197	380011.12	392634.52	391180.6							
394614.117	392634.52	397077.16	397077.16							
(1S) Capiro	Canchan	Tomasa	UNICA							
5 surcos libres, distancia entre surco 0.90m										
Calle	Calle de 1m de ancho	(1S) Capiro	Calle de 1m de ancho	Capiro	Calle de 1m de ancho	Tomasa	Calle de 1m de ancho	UNICA	Calle de 1m de ancho	Con riego
		393073.197		397077.16		694474.16		392634.52		
392797.22	300056.33	694474.33	694474.16							
392634.52	394614.117	391180.16	393073.197							
694474.16	694474.33	380011.12	392797.22							
397077.16	393073.197	394614.117	300056.33							
394614.117	391180.6	392634.52	397077.16							
694474.33	380011.12	392797.22	394614.117							
300056.33	694474.16	393073.197	380011.12							
391180.6	392634.52	300056.33	391180.6							
380011.12	392797.22	397077.16	694474.33							
(3s) Capiro	Canchan	Tomasa	UNICA							

3.8. EVALUACIONES

3.8.1. HUMEDAD DEL SUELO

Fue medida con referencia a la humedad gravimétrica, y determinada en pesos desde el inicio de la fase experimental. Se priorizó la mayor frecuencia de estas mediciones a partir del tratamiento de sequía, de ahí en adelante se tomaron muestras semanales de las

parcelas (con riego y sequía). Para realizar el control de humedad del suelos se realizo una sectorización del campo experimental en dieciséis sectores ocho en riego normal y ocho en sequia (figura) el muestreo de suelo se hizo con un sacabocado a una profundidad de 35 cm, se tomaron cinco submuestras por sector, se extrayendo desde el lado medio de la costilla del surco o camellón. Las muestras de suelos fueron pesadas en fresco con un aproximado de 100cc por muestra, se registro el peso fresco luego fueron colocadas en un horno a 105° C por 24horas, para luego determinar el peso seco. La humedad gravimétrica (Hd_g) se determinó mediante la siguiente formula donde es igual a la diferencia del peso húmedo (PH) y el peso seco (PS) dividido con el peso seco (PS).

$$Hd_g = (PH-PS) / PS \dots\dots\dots ec.$$

Cuadro 2. Cronograma de riegos para el tratamiento de riego normal y sequia

TRAT	N° DE RIEGO	FECHA DE RIEGO
RIEGO NORMAL Y SEQUIA	1	29 de octubre 2011
	2	31 de octubre 2011
	3	2 de noviembre 2011
	4	4 de noviembre 2011
	5	6 de noviembre 2011
	6	8 de noviembre 2011
	7	11 de noviembre 2011
	8	14 de noviembre 2011
	9	16 de noviembre 2011
	10	18 de noviembre 2011
	11	20 de noviembre del 2011
	12	22 de noviembre del 2011
	13	25 de noviembre del 2011
	14	28 de noviembre del 2011
	15	30 de noviembre del 2011
	16	3 de diciembre del 2011
	17	5 de diciembre del 2011
	18	8 de diciembre del 2011
	19	10 de diciembre del 2011
	20	12 de diciembre del 2011
	21	14 de diciembre del 2011

	22	16 de diciembre del 2011
	23	19 de diciembre del 2011
	24	21 de diciembre del 2011
	25	23 de diciembre del 2011
	26	26 de diciembre del 2011
RIEGO NORMAL	27	28 de diciembre del 2011
	28	30 de diciembre del 2011
	29	3 enero del 2012
	30	6 de enero del 2012
	31	8 de enero del 2012
	32	10 d enero del 2012
	33	12 de enero del 2012
	34	14 de enero del 2012
	35	16 de enero del 2012
	36	19 de enero del 2012
	37	21 de enero del 2012
	38	23 de enero del 2012
	39	25 de enero del 2012
	40	27 de enero del 2012
	41	29 de enero del 2012
	42	31 de enero del 2012
	43	2 de febrero del 2012
	44	4 de febrero del 2012
	45	6 de febrero del 2012
	46	8 de febrero del 2012
	47	10 de febrero del 2012
	48	20 de febrero del 2012
	49	22 de febrero del 2012
	50	24 de febrero del 2012

3.8.2. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA)

Para realizar la medición CRA, se realizaron entre 5 am y 7am de la mañana y en la tarde a partir de las 4 pm a 6 pm se seleccionó un foliolo de la tercera hoja extendida desde el ápice de la planta. El foliolo fue cubierto con una lámina fina de plástico (film) para evitar que pierda humedad y papel toalla por fuera con el código de identificación, rápidamente fueron llevadas al laboratorio para ser pesadas. Estos foliolos fueron pesados

en fresco de inmediato y luego hidratados con agua destilada por 12 horas para alcanzar su máxima capacidad de turgencia. Al determinar el peso turgente del foliolo, se usó papel toalla para secar la superficie del mismo y pesarlo en una balanza analítica (Mettler AE-50). Luego estos foliolos fueron escaneados para determinar el área específica del foliolo. Finalmente los foliolos se pusieron en bolsas pequeñas de papel para secarlas en el horno y así determinar el peso seco en una balanza analítica de tres decimales. El contenido relativo de agua se determinó de la diferencia entre el peso fresco y el peso seco, dividido entre la diferencia del peso turgente y el peso seco ($CRA = (PF-PS) / (PT-PS)$). ($g\ g^{-1}$). En total realizaron tres muestreos, a los 70, 84 y 104 DDS.

3.8.3. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA (AEH)

Este parámetro fue realizado con los foliolos de papa después de determinar el peso turgente, se colocó en unas micas transparentes (vistora) para escanearlas y determinar el área del foliolo. El AEH es obtenida de la división del área del foliolo entre el peso seco del mismo.

El AEH se obtuvo con la siguiente relación:

$$AEH = AF/PS\ (cm^2\ g^{-1})$$

ese momento se aprovechó la turgencia de los foliolos para escanearlos utilizando el programa CompuEye, LSA y obtener el área de cada foliolo (AF). Se realizaron evaluaciones para este parámetro a los 71, 85 y 105 DDS.

3.8.4. EL POTENCIAL OSMÓTICO (BAR)

Esta medición se realizó en la mañana entre 5 y 7am, se seleccionó un foliolo de la tercera hoja extendida desde el ápice de la planta y luego utilizando un sacabocado de 5mm de diámetro, se sacó dos discos del mismo foliolo seleccionado para la prueba. Los discos se pusieron en viales criogénicos (NALGINE) de 1.0 ml, e inmediatamente se guardó las muestras en nitrógeno líquido para ser transportado a un congelador de $-80^{\circ}C$ donde fueron guardados, para luego hacer las lecturas del potencial osmótico, utilizando un

microvoltímetro (HR-33T, Wescor Inc.) y dos cámaras psicrométricas (C52), en la cual la muestra permanece por un período de 30 minutos hasta alcanzar el equilibrio del punto de rocío, y es en ese momento donde se procede a realizar la lectura en el microvoltímetro. La cámara psicrométrica es conectada con un cable sensor al microvoltímetro donde se realiza una lectura numérica la cual es transformada después a bares o MPa. siguiendo el procedimiento del manual de operación (mostrado en el Anexo 1), que establece los pasos para determinar el potencial osmótico de una muestra en bar o MPa.

Se obtuvieron muestras en tres ocasiones (una muestra con dos repeticiones por cada unidad experimental), a los DDS y DDS.

3.8.5. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

La medida de la conductancia estomática se hizo mediante un porómetro tipo AP4 de la marca Delta T- Devices cada 7 días aproximadamente durante toda la etapa de aplicación de los tratamientos. El momento en que se realizó la medición dependió del momento en que había mayor intensidad de brillo solar. Antes de realizar la medición se procedió a calibrar el equipo, esto para cada muestreo. Generalmente se hizo entre las 11:30 am – 2:00 pm. Los valores obtenidos y apuntados fueron temperatura, conductancia y radiación. Se etiquetaron las hojas que se midieron y estas se ubicaron siempre en el tercio superior del tallo de la planta, por estar más expuestas a los rayos del sol. Los valores se expresaron como $\text{mmoles.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$. Se realizaron tres muestreos a los 68, 74 y 82 DDS.

3.8.6. MEDICIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis fue realizado con un medidor portátil LI – 64000XT, marca LI-COR este equipo de ultima generación cuentan con baterías recargables, permitiendo ser usado en campo, así mismo esta provisto de fuente de CO₂, secante de aire para regular la humedad relativa del ambiente, radiación y temperatura ajustables. Antes de su uso se procedió con calibración para ajustar la radiación, humedad relativa, niveles de CO y temperatura de acuerdo a las necesidades requeridas. Se procedió a evaluar modificando dos valores: radiación con 1500 lux y 2000 lux y en temperatura de la hojas con 19°C y 30°C, Después

de calibrado el equipo, se anoto el código de la unida experimental a evaluar se coloco el foliolo dentro de la cámara del cabezal del equipo y se procedió con la evaluación. Este equipo cuenta con un cabezal donde se ubican los sensores dentro de una cámara hermética, en esta se coloco un foliolo de hoja. Los datos evaluados por el instrumento son visualizados en una pantalla LCD que permitió en tiempo real conocer los niveles de fotosíntesis, transpiración, conductancia, temperatura de hoja, que se dan bajo condiciones de radiación y temperatura indicadas, lo cual nos permite conocer la variabilidad de la fotosíntesis como respuesta en función del genotipo. Se tomaron 25 datos por genotipo tanto para riego normal y sequia. Antes de aguardar los 25 datos se verifico en la pantalla los gráficos de la fotosíntesis los cuales deberían presentar una curva con poca variación. Se realizaron dos evaluaciones: 95 DDS Y 109 DDS

3.8.7. EL CONTENIDO DE CLOROFILA (SPAD)

Para realizar estas mediciones, se usó el clorofilómetro (SPAD 502, Minolta). Se selecciono una planta al azar de la unidad experimental (10 plantas), siendo los tres últimos foliolos de la tercera hoja extendida desde el ápice de la planta, en la cual se realiza las nueve lecturas (tres en cada foliolo), para luego hacer un promedio de estas lecturas y así se obtuvieron dos medidas por cada unidad experimental. Se procedió tomando una hoja del tercio medio de cada planta de papa y con el clorofilometro se presionó cada hoja un tiempo de 3 a 5 segundos. Las unidades de medición son propias del equipo siendo nombrada en algunos experimentos como unidades “SPAD”, anotándose cada medición en el cuaderno de campo. Para este experimento se tomaron lectura de las mediciones en dos ocasiones, a los 80 y 84 DDS.

3.8.8. REFLECTANCIA - DIFERENCIA DEL ÍNDICE NORMALIZADO DE VEGETACIÓN (NDVI)

Para determinar el NDVI se usó un reflectómetro (Skye Instruments), el cual tiene un sensor que mide la luz infrarroja y roja que incide en el campo y la reflejada por el cultivo. El sensor está conectada a una pequeña computadora (Pocket hp) la cual tiene una pantalla LCD donde se observa los valores de la luz infrarroja y roja incidida y reflejada en

el campo. Sabemos que una planta con las mejores condiciones refleja mayor luz infrarroja y menor luz roja, comparada con una planta sometida a algún estrés. También este NDVI puede medir de manera indirecta el grado de sanidad y vigor de la planta, siendo los valores más altos los que corresponden a plantas desarrolladas y vigorosas y por el contrario, valores bajos de este índice pueden tratarse de plantas con poco desarrollo, poco verdor de las hojas o que sufrieron algún daño ya sea por estrés abiótico o bióticos. En total las mediciones se obtuvieron en tres ocasiones a los 80, 84 y 92 DDS

3.8.9. NIVELES DE PROLINA

La determinación de la prolina libre se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la **Facultad de ...**, en las muestras de 100 mg. De folíolos de hoja, las mismas fueron envueltas en papel aluminio y colocadas dentro de unos tubos de polipropileno en nitrógeno líquido. Los tubos fueron transportadas en una caja de tecnopor con nitrógeno líquido hasta las de la universidad e inmediatamente guardadas un congelador de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, para inactivar cualquier proceso metabólico en la hoja. El protocolo utilizado fue el de Bates (1973).

Se tomaron las muestras congeladas de 100 mg de folíolo, se molieron las hojas y se agregó 10 ml de ácido sulfosalicílico al 3%. Se filtró y se tomó una alícuota de 2 ml y se colocó dentro de un tubo de ensayo, luego se añadió 2 ml de ácido acético glacial y 2 ml de ninhidrina ácida. Los tubos fueron tapados y llevados a baño maría a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Una vez transcurrido este tiempo los tubos se enfriaron en agua con hielo y se agregó a cada tubo 4 ml de tolueno agitando los mismos en un vórtex. Luego de unos minutos se diferencian dos fases, utilizando una pipeta Pasteur se aspiró el tolueno de la fase superior y se colocó en las cubetas para la lectura de la absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro. Se usó tolueno puro para calibrar el blanco de referencia. Los valores de absorbancia obtenidos se transformaron a valores de prolina a través de la curva estándar preparada previamente.

Para la preparación de la ninhidrina se disuelve 1.25 gr de ninhidrina ácida en 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de ácido orto fosfórico 6 M, agitándose hasta q la ninhidrina esté completamente disuelta. Este reactivo debe mantenerse en refrigeración y solamente permanece estable por 24 horas. Las fechas de muestreo se realizaron en dos ocasiones a los 70 y 90 DDS.

3.8.10. BIOMASA TOTAL Y DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BIOMASA

Las mediciones se realizaron en dos momentos de cosecha a los 45 días y al final de cultivo (45 % de plantas muertas en la parte de sequia) se tomo una planta ppor unidad experimental, la tercera planta de cada surco. Para evaluar los parámetros de biomasa fresca y seca de: hojas, tallos, raíz y tubérculos. Las fechas de las cosecha fueron a los a los 91 y 110 días después DDS. Finalmente, quedaron ocho plantas por unidad experimental para el análisis de rendimientos en la cosecha final.

Las plantas extraídas en cada fecha (91 y 110 días después DDS), por cada unidad experimental se dividieron en tallos, hojas, raíces y tubérculos para realizar el peso fresco. Estos a su vez fueron secados en un horno para determinar el peso seco de cada uno y la suma de sus componentes que nos da una referencia de la biomasa seca total producida por cada planta. Al final del experimento de campo cada unidad experimental se quedó con 8 plantas para la cosecha final y evaluar el rendimiento de los tubérculos frescos.

Durante el proceso de cosecha lo primero que se hizo fue pesar los tubérculos, las hojas, los tallos y las raíces de las plantas por separado para obtener el peso fresco de la biomasa total producida por cada planta. Una vez obtenido el peso fresco de la biomasa total se procedió a secar las hojas, tallos, tubérculos y raíces de cada planta en un horno de 80 °C durante unas 24 horas. Luego se pesó y se obtuvo el peso seco de la biomasa total producida por cada planta.

Con los datos obtenidos anteriormente se determinaron los índices de cosecha tanto fresco como seco que para el caso de la papa, representa la proporción del peso de los tubérculos con respecto al peso total de la biomasa total producida por la planta.

3.8.11.- NÚMERO DE TUBÉRCULOS POR GENOTIPO

Se contaron la cantidad de tubérculos por genotipo en los días de la cosecha cuando se iba cosechando genotipo por genotipo se tomaban 10 plantas de un genotipo y se ponían en mallas los tubérculos contados con un papelito que después nosotros apuntamos esos datos para sacar más adelante los rendimientos evaluados a los 110 días después de la siembra.

3.8.12. RENDIMIENTO E ÍNDICES DE ESTRÉS

El rendimiento en peso fresco de tubérculos en la cosecha el 16 de febrero del 2012, fue directamente obtenido de cada unidad experimental, como un promedio de ocho plantas. Los tubérculos fueron pesados con una balanza “Mettler 400P”.

El índice de estrés calculado (Toker y Cagirgan, 1998) nos indica un nivel de tolerancia frente a un estrés ya sea abiótico o biótico. Un clon para ser considerado tolerante no basta que tenga valores bajos del índice de estrés si no también es importante que sus rendimientos sean altos.

$$IE = \frac{\left(\frac{Y_{riego_clon} - Y_{sequía_clon}}{Y_{riego_clon}} \right)}{\left(\frac{\overline{Y_{riego}} - \overline{Y_{sequía}}}{\overline{Y_{riego}}} \right)}$$

Donde:

IE : Índice de estrés por reducción de los rendimientos

Y_{riego_clon} : Rendimiento en condiciones de riego para el clon i

$Y_{sequía_clon}$: Rendimiento en condiciones de sequía para el clon i

$\overline{Y_{riego}}$: Rendimiento promedio de clones en condiciones de riego

$\overline{Y}_{sequía}$: Rendimiento promedio de clones en condiciones de sequía

3.9. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó el Análisis de Varianza (ANVA) para un Diseño Completamente al Azar (DCA) y la Prueba Estadística de Comparación de Medias entre tratamientos. El modelo estadístico que se utilizó fué el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3, \dots, t \quad j = 1, 2, 3, \dots, n$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Respuestas fisiológicas:

4.1. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (G G⁻¹)

Cuadro. Análisis de varianza para en Contenido relativo de agua (g g⁻¹) a 70 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.05557	0.00617	3.05	0.0045
Trat. de riego	1	0.00392	0.00392	1.94	0.1693
Trat x Cult.	9	0.02408	0.00267	1.32	0.2453
Error	60	0.1215	0.00202		
Total	79	0.20507			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 5.99 0.40753 0.75

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.0401	0.00445	2.28	0.0439
Error	39	0.05867	0.00195		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 5.83 0.40598 0.75

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.03955	0.00439	2.1	0.062
Error	30	0.06282	0.00209		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 6.14 0.38634 0.74

Comparación de medias

Genotipo	Riego normal	Sequia	Prueba t
694474.33	0.73 ± 0.05 bc	0.74 ± 0.02 ab	0.6861 ns
391180.6	0.73 ± 0.07 bc	0.70 ± 0.08 b	0.5227 ns
380011.12	0.76 ± 0.01 abc	0.77 ± 0.03 ab	0.3698 ns
394614.117	0.82 ± 0.03 a	0.79 ± 0.04 a	0.3416 ns
397077.16	0.76 ± 0.06 abc	0.75 ± 0.04 ab	0.7371 ns
300056.33	0.71 ± 0.03 c	0.71 ± 0.06 ab	0.8635 ns
392797.22	0.74 ± 0.02 abc	0.77 ± 0.03 ab	0.2322 ns
393073.197	0.74 ± 0.03 abc	0.76 ± 0.05 ab	0.4312 ns
694474.16	0.79 ± 0.05 abc	0.70 ± 0.03 b	0.0178 ns
392634.52	0.80 ± 0.05 ab	0.76 ± 0.02 ab	0.2503 ns
Promedio	0.76 ± 0.04	0.74 ± 0.04	0.3756 ns

El contenido relativo en riego en esta evaluación, se obtuvo un promedio mayor del genotipo 394614.117, 392634.52, 380011.12, 397077.16, 392797.22, 393073.197, y 694474.116, no habiendo diferencias significativas entre ellos. Para el tratamiento en sequia los genotipos 694474.33, 380011.12, 394614.117, 397077.16, 300056.33, 392797.22, 393073.197 y 392634.52, presentaron los promedios mas altos, no habiendo diferencias significativas entre ellos.

Cuadro. Análisis de varianza para Contenido relativo de agua (g g⁻¹) a 84 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.04352	0.00483	0.84	0.5821
Trat. de riego	1	0.17205	0.17205	29.9	<0.0001
Trat x Cult.	9	0.03818	0.00424	0.74	0.6732
Error	60	0.34522	0.00575		
Total	79	0.59898			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 11.04 0.42365 0.68

tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.05199	0.00577	1.34	0.2564
Error	30	0.12885	0.00429		

CV (%) 8.9408 Raíz del cuadrado medio del error 0.28749 Promedio 0.73

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.02972	0.0033	0.46	0.891
Error	30	0.21637	0.00721		

CV (%) 13.26 Raíz del cuadrado medio del error 0.12077 Promedio 0.64

Comparación de medias

Genotipo	Riego		Sequia		Prueba t
694474.33	0.71	± 0.06 a	0.61	± 0.06 a	0.046 *
391180.6	0.72	± 0.11 a	0.64	± 0.05 a	0.238 ns
380011.12	0.73	± 0.06 a	0.66	± 0.12 a	0.295 ns
394614.117	0.70	± 0.06 a	0.69	± 0.06 a	0.787 ns
397077.16	0.74	± 0.09 a	0.60	± 0.13 a	0.117 ns
300056.33	0.68	± 0.09 a	0.62	± 0.05 a	0.281 ns
392797.22	0.74	± 0.04 a	0.62	± 0.04 a	0.004 *
393073.197	0.71	± 0.05 a	0.65	± 0.14 a	0.447 ns
694474.16	0.76	± 0.02 a	0.67	± 0.06 a	0.021 ns
392634.52	0.81	± 0.04 a	0.64	± 0.06 a	0.003 *
Promedio	0.73	0.06	0.64	0.08	0.000

En la evaluación a los 84 DDS del contenido relativo de agua no se presentaron diferencias significativas tanto en el tratamiento de riego normal como en sequia.

Cuadro3. Análisis de varianza para Contenido relativo de agua (g g-1) a 104 DDS

Interacción

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.11301	0.012	2.88	0.0067
Tratamiento	1	0.34453	0.34453	79.12	< 0.0001
Trat x Cult.	9	0.12088	0.01323	3.08	0.0042
Error	60	0.2612	0.00435		
Total	79	0.83969			

CV (%) 10.5393 Raíz del cuadrado medio del error 0.6888 Promedio 0.6261

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.0253	0.00281	1.16	0.3562
Error	30	0.07287	0.00242		

CV (%) 7.1249 Raíz del cuadrado medio del error 0.25772 Promedio 0.69175

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.20859	0.02317667	3.69	0.0033
Error	30	0.1884	0.00628		

CV (%) 14.13 Raíz del cuadrado medio del error 0.525429 Promedio 0.5605

Comparación de medias

Genotipo	Riego		Sequia		Prueba t
694474.33	0.70 ± 0.03	a	0.43 ± 0.10	d	0.002 **
391180.6	0.73 ± 0.04	a	0.62 ± 0.06	abc	0.026 **
380011.12	0.71 ± 0.03	a	0.57 ± 0.09	abc	0.026 **
394614.117	0.69 ± 0.02	a	0.68 ± 0.07	a	0.706 n.s.
397077.16	0.64 ± 0.04	a	0.65 ± 0.11	ab	0.828 n.s.
300056.33	0.69 ± 0.03	a	0.52 ± 0.08	cd	0.007 *
392797.22	0.71 ± 0.10	a	0.54 ± 0.03	cbd	0.013 *
393073.197	0.70 ± 0.02	a	0.51 ± 0.09	cd	0.005 *
694474.16	0.69 ± 0.01	a	0.59 ± 0.05	abc	0.009 *

392634.52	0.66 ± 0.09	a	0.50 ± 0.09	cd	0.045 **
-----------	-------------	---	-------------	----	----------

Promedio	0.69 ± 0.04		0.56 ± 0.08		0.00 **
----------	-------------	--	-------------	--	---------

En esta tercera evaluación que se dio a los 104 DDS el comportamiento en los genotipos en el tratamiento de riego normal no presentaron diferencias significativas, en cambio en el tratamiento de sequia, los genotipos: 394614.117, 397077.16, 391180.6, 380011.12 y 694474.16 presentaron los promedios más altos, no habiendo diferencias significativas entre ellos.

4.2. ÁREA ESPECÍFICA DE LA HOJA ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$)

Cuadro. Análisis de varianza para área específica de la hoja ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a 71 DDS

Cuadro. Análisis de varianza para Conductancia estomática ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a 85 DDS

Cuadro4. Análisis de varianza para Conductancia estomática ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) a 105 DDS

4.3. POTENCIAL OSMÓTICO

4.4. CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA

Cuadro. Análisis de varianza para conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 68 DDS

Cuadro. Análisis de varianza para conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 74 DDS

Cuadro. Análisis de varianza para conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 82 DDS

4.5. FOTOSÍNTESIS

Cuadro. Análisis de varianza para fotosíntesis ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 95 DDS

Cuadro. Análisis de varianza para fotosíntesis ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 101 DDS

4.6. CONTENIDO DE CLOROFILA

Cuadro. Análisis de varianza para contenido de clorofila (SPAD) a 80 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	749.31278	83.25697	9.23	<0.0001
Trat. de riego	1	594.32253	594.32253	65.89	<0.0001
Trat x Cult.	9	345.72903	38.41433	4.26	0.0003
Error	60	541.21062	9.02017		
Total	79	2230.57496			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 6.3236 0.75736 47.49

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	204.07031	22.67447	2.3	0.0422
Error	30	295.88312	9.86277		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 7.01 0.40817 44.76

Tratamiento sequia

Error	60	748.54125	12.47568	
Total	79	2073.64887		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
7.04 0.63902 50.17

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	193.66431	21.51825	1.79	0.1109
Error	30	359.68312	11.98943		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
7.17056 0.34998 48.28

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	847.93881	94.21542	7.27	<0.0001
Error	30	388.85812	12.96193		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
6.91 0.68559 52.05

genotipo	riego normal	sequia	Prueba de t
694474.33	50.1 ± 4.3 ab	59.0 ± 7.0 a	0.0088 *
391180.6	45.2 ± 3.2 b	46.4 ± 2.1 d	0.4122 ns
380011.12	46.1 ± 4.1 ab	53.5 ± 3.4 bc	0.0014 **
394614.117	48.5 ± 2.4 ab	56.4 ± 5.2 ab	0.0017 **
397077.16	47.7 ± 5.1 ab	45.9 ± 3.6 d	0.4442 ns
300056.33	49.3 ± 3.7 ab	49.3 ± 3.4 cd	0.9890 ns
392797.22	49.9 ± 3.7 ab	56.4 ± 5.3 ab	0.0128 ns
393073.197	44.8 ± 2.0 b	45.8 ± 5.5 d	0.6518 ns
694474.16	52.0 ± 6.8 a	54.1 ± 3.9 abc	0.4431 ns
392634.52	49.4 ± 3.7 ab	53.8 ± 4.0 bc	0.0387 *
promedio	48.3 ± 4.5	52.1 ± 6.3	0.0000

En este cuadro se puede observar que a los 84 DDS el contenidos de clorofila en el tratamiento de riego normal los genotipos no presentaron diferencias significativas, siendo

diferente en el tratamiento de sequia donde los genotipos: 694474.33, 394614.117, 392797.22 y 694474.16 presentaron los promedios más altos, no habiendo diferencias significativas entre ellos.

4.7. REFLECTANCIA

Cuadro. Análisis de varianza para reflectancia (NDVI) a 80 dds

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.01696	0.00188	2.87	0.0069
Trat. de riego	1	0.03655	0.03655	55.7	<0.0001
Trat x Cult.	9	0.00116	0.00012	0.2	0.9937
Error	60	0.03937	0.00065		
Total	79	0.09404			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 2.93 0.58133 0.87

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.0086	0.00095	2.35	0.0383
Error	30	0.0122	0.0004		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 2.25 0.41346 0.89

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.00952	0.00105	1.17	0.3498
Error	30	0.02717	0.0009		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 3.53 0.25948 0.85

Comparación de medias

genotipo	riego	sequia	prueba de t
694474.33	0.90 ± 0.0 abc	0.85 ± 0.0 a	0.000 **
391180.6	0.87 ± 0.0 c	0.82 ± 0.0 a	0.015 *
380011.12	0.91 ± 0.0 ab	0.85 ± 0.0 a	0.001 **
394614.117	0.92 ± 0.0 a	0.88 ± 0.0 a	0.000 **
397077.16	0.88 ± 0.0 bc	0.83 ± 0.0 a	0.016 **
300056.33	0.88 ± 0.0 bc	0.85 ± 0.0 a	0.052 *
392797.22	0.90 ± 0.0 abc	0.86 ± 0.0 a	0.005 **
393073.197	0.90 ± 0.0 abc	0.85 ± 0.0 a	0.004 **
694474.16	0.91 ± 0.0 ab	0.88 ± 0.0 a	0.014 *
392634.52	0.90 ± 0.0 abc	0.85 ± 0.0 a	0.002 **

promedio	0.895 ± 0.0	0.852 ± 0.0	0.000 **
----------	-------------	-------------	----------

Como se puede observar en el cuadro las comparaciones de los genotipos en el tratamiento de riego normal, los genotipos que presentaron un índice de NDVI mayor corresponden al: 394614.117, 380011.12, 694474.16, 392797.22, 393073.197, 392634.52 y 694474.33, q a su vez no presentan diferencia significativa entre ellos, en tanto en el tratamiento de sequia los genotipos no presentan diferencia significativas.

Cuadro. Análisis de varianza para reflectancia (NDVI) a 84 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.01747	0.00194	2.69	0.0108
Trat. de riego	1	0.202	0.202	279.59	<0.0001
Trat x Cult.	9	0.00364	0.0004	0.56	0.8237
Error	60	0.04335	0.00072		
Total	79	0.26647			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 3.13 0.83732 0.85

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
---------------------	--------------------	-------------------	--------------------------	---------	--------

Cultivar	9	0.00586	0.00065	4.16	0.0015
Error	30	0.0047	0.00015		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
1.37 0.55492 0.9

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.01526	0.00169	1.32	0.27
Error	30	0.03865	0.00128		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
4.43 0.28306 0.81

Comparación de medias

genotipo	riego	sequia	prueba de t
694474.33	0.9 ± 0.0 abc	0.8 ± 0.0 a	0.0000
391180.6	0.9 ± 0.0 cd	0.8 ± 0.0 a	0.0000
380011.12	0.9 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 a	0.0000
394614.117	0.9 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 a	0.0000
397077.16	0.9 ± 0.0 d	0.8 ± 0.0 a	0.0000
300056.33	0.9 ± 0.0 bcd	0.8 ± 0.0 a	0.0001
392797.22	0.9 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 a	0.0000
393073.197	0.9 ± 0.0 ab	0.8 ± 0.0 a	0.0000
694474.16	0.9 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 a	0.0003
392634.52	0.9 ± 0.0 a	0.8 ± 0.0 a	0.0000
Promedio	0.91 ± 0.02	0.81 ± 0.04	0.0000

A los 84 DDS los valores de NDVI en los genotipos como: 694474.33, 380011.12, 394614.117, 392797.22, 694474.16 y 392634.52. Presentaron los promedios mas altos, no habiendo diferencias significativas entre ellos, para el caso del tratamiento de sequia los genotipos no presentaron diferencias significativas.

Cuadro. Análisis de varianza para reflectancia (NVDI) a 92 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.30278	0.03364	10.16	<0.0001
Trat. de riego	1	0.41472	0.41472	125.29	<0.0001
Trat x Cult.	9	0.08898	0.00988	2.99	0.0053
Error	60	0.1986	0.00331		
Total	79	1.00508			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 7.08 0.8024 0.81

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.08236	0.00915	4.92	0.0004
Error	30	0.0558	0.00186		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 4.87 0.59612 0.88

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	0.3094	0.03437	7.22	<0.0001
Error	30	0.1428	0.00476		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 9.32 0.68421 0.74

Comparación de medias

genotipo	riego normal	Sequia	prueba de t
694474.33	0.91 ± 0.02 a	0.7 ± 0.1 c	0.0000 **

391180.6	0.79 ± 0.09	c	0.6 ± 0.1	e	0.0003 **
380011.12	0.91 ± 0.02	a	0.8 ± 0.1	bc	0.0000 **
394614.117	0.92 ± 0.03	a	0.9 ± 0.1	a	0.1348 ns
397077.16	0.81 ± 0.08	c	0.7 ± 0.1	cd	0.0057 *
300056.33	0.85 ± 0.05	bc	0.7 ± 0.0	c	0.0000 **
392797.22	0.90 ± 0.03	ab	0.8 ± 0.1	bc	0.0003 **
393073.197	0.90 ± 0.01	ab	0.6 ± 0.2	de	0.0055 **
694474.16	0.93 ± 0.01	a	0.9 ± 0.1	ab	0.0273 **
392634.52	0.90 ± 0.03	ab	0.8 ± 0.0	c	0.0000 **
promedio	0.88 ± 0.06		0.74 ± 0.13		0.0000 **

Como se observa en el cuadro anterior correspondiente a la última evaluación para reflectancia, los genotipos del tratamiento de riego que presentaron un mayor promedio de NDVI son: 694474.33, 380011.12, 394614.117, 392797.22, 393073.197, 694474.16 y 392634.52. En caso del tratamiento de sequia los genotipos que presentan un mayor valor son: 394614.117 Y 694474.16.

4.8. NIVELES DE PROLINA

Cuadro. Análisis de varianza para contenido de prolina () a 70 DDS

Cuadro. Análisis de varianza para contenido de prolina () a 90 DDS

Medidas agronómicas.-

4.9. PRODUCCIÓN DE BIOMASA:

4.10. NÚMERO DE TUBÉRCULOS

Cuadro. Análisis de varianza para número de tubérculos, a 80 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	639.6125	71.06805	6.73	<0.0001
Trat. de riego	1	738.1125	738.1125	69.94	<0.0001
Trat x Cult.	9	409.5125	45.50138	4.31	0.0002
Error	60	633.25	10.55416		
Total	79	2420.4875			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 22.19 0.73837 14

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	554.025	61.55833	4.82	0.0005
Error	30	382.75	12.75833		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 20.2 0.50141 17

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	495.1	55.01111	6.59	<0.0001
Error	30	250.5	8.35		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 24.91 0.66402 11

genotipo	riego normal	sequia	prueba de t
694474.33	17 ± 1.9 bc	12 ± 2.4 bc	0.0136 ns
391180.6	16 ± 2.4 bc	16 ± 5.7 ab	0.8780 ns
380011.12	16 ± 3.1 bc	7 ± 2.2 de	0.0043 **
394614.117	20 ± 5.0 b	7 ± 1.7 e	0.0022 **
397077.16	19 ± 2.6 b	17 ± 1.0 a	0.2599 ns
300056.33	15 ± 0.8 bc	15 ± 1.3 abc	0.7502 ns
392797.22	18 ± 1.8 b	13 ± 3.4 bc	0.0296 ns
393073.197	17 ± 6.3 bc	11 ± 2.2 cd	0.1244 ns
694474.16	27 ± 3.8 a	13 ± 4.0 abc	0.0026 **
392634.52	12 ± 4.2 c	7 ± 1.3 e	0.0395 *
promedio	18 ± 4.9	12 ± 4	0.0000

Esta evaluación obtenida a los 80 DDS demuestra las diferencias significativas entre los genotipos, en el tratamiento de riego normal el genotipo que presentó un promedio mayor en cuanto al número de tubérculos obtenidos es el 694474.16 y a su vez presenta las diferencias significativas frente a los otros genotipos. Para el tratamiento de sequia los genotipos, 397077.16, 391180.6, 300056.33 y 694474.16 presentaron un mayor promedio y diferencias significativas frente a los demás genotipos no mencionados.

Cuadro. Análisis de varianza para número de tubérculos, a 111 DDS

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	1537.5125	170.83472	10.25	<0.0001
Trat. de riego	1	1288.0125	1288.0125	77.3	<0.0001
Trat x Cult.	9	441.1125	49.0125	2.94	0.0059
Error	60	999.75	16.6625		
Total	75	4266.3875			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
27.05 0.76566 15.0875

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
---------------------	--------------------	-------------------	--------------------------	---------	--------

Cultivar	9	1658.6	184.2888	9.35 <0.0001
Error	30	591	19.7	

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 23.23 0.73728 19

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	320.025	35.55833	2.61	0.0234
Error	30	408.75	13.625		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 33.32 0.43912 11

genotipo	riego normal	Sequia	prueba de t
694474.33	15 ± 3.0 de	8 ± 1.6 bc	0.0061
391180.6	12 ± 2.2 e	11 ± 4.2 abc	0.7444
380011.12	32 ± 4.0 a	14 ± 3.6 ab	0.0005
394614.117	20 ± 6.6 cd	12 ± 3.4 abc	0.0677
397077.16	14 ± 3.3 de	11 ± 2.8 abc	0.1638
300056.33	16 ± 5.1 de	11 ± 2.5 abc	0.1844
392797.22	20 ± 3.7 cd	9 ± 2.3 bc	0.0028
393073.197	23 ± 2.8 bc	13 ± 2.9 ab	0.0032
694474.16	28 ± 6.4 ab	16 ± 7.5 a	0.0628
392634.52	12 ± 4.0 e	6 ± 2.7 c	0.0484
promedio	19 ± 7.5	11 ± 4.3	0.0000

Esta evaluación obtenida a los 111 DDS, permite conocer los genotipos que presentaron un mayor promedio del número de tubérculos, el genotipos 380011.12 y 694474.16 presenta el mayor promedio con diferencias significativas frente a los otros genotipos. Para el tratamiento de sequia la mayoría de los genotipos a excepción del 694474.33, 392797.22 y 392634.52 que presentan los promedios mas bajos, no hubo diferencias significativas entre ellos, que obteniendo los promedios mas altos.

4.11. RENDIMIENTO

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	5030.98705	558.99856	12.81	<0.0001
Trat. de riego	1	14616.2025	14616.2025	334.88	<0.0001
Trat x Cult.	9	2480.76203	275.64023	6.32	<0.0001
Error	60	2618.758	43.64597		
Total	79	24746.7095			

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 25.06 0.89417 26.36

Tratamiento riego normal

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	6767.11122	751.90124	12.57	<0.0001
Error	30	1794.10067	59.80335		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 19.39 0.790438 39.87

Tratamiento sequia

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio del error	F-Valor	Pr > F
Cultivar	9	744.63785	82.73753	3.01	0.01111
Error	30	824.657325	27.48857		

CV (%) Raíz del cuadrado medio del error Promedio
 40.81 0.47451 12.84

Cuadro 5. Resultados de rendimiento (t. ha⁻¹)

Genotipo	Riego normal	Sequia
694474.33	29.8 ± 6.1 de	6.8 ± 2.1 c
391180.6	23.1 ± 5.5 e	12.7 ± 4.1 b c
380011.12	55.5 ± 7.7 B	16.3 ± 6.4 a b
394614.117	37.7 ± 9.4 cd	11.2 ± 4.7 b c
397077.16	31.1 ± 13.2 de	13.9 ± 5.8 a b c
300056.33	43.9 ± 7.7 c	21.8 ± 8.5 a
392797.22	65.9 ± 6.5 A	15.4 ± 4.4 a b
393073.197	39.3 ± 5.0 cd	11.1 ± 1.7 b c
694474.16	47.7 ± 8.0 Bc	13.2 ± 7.1 b c
392634.52	24.7 ± 4.6 e	6.1 ± 3.5 c

Waller-Duncan promedio de 10 mediciones

** Altamente significativo, * Significativo, n.s. No significativo

PR: Porcentaje de incremento con respecto al tratamiento control

CV: Coeficiente de variabilidad CME: Cuadrado medio del error

El rendimiento de tubérculos frescos fue mayor en el genotipo 392797.22 para el tratamiento de riego normal, habiendo diferencias significativas con los demás genotipos. En tanto, para sequia, el mayor rendimiento se produjo en los genotipo en los 300056.33, 380011.12, 392797.22 y 397077.16 (ver), no habiendo diferencias entre si estadísticamente significativas.

PESO SECO DE TUBÉRCULOS:

NÚMERO DE TUBÉRCULOS:

PESO SECO DE HOJAS:

PESO SECO DE TALLOS:

PESO SECO DE RAÍCES:

PESO SECO DE BIOMASA TOTAL:

4. ÍNDICE DE COSECHA:

El índice de cosecha que representa la relación entre biomasa comercial y biomasa total producida muestra diferencias altamente significativas por efecto de los tratamientos de riego. La comparación de medias de cada tratamiento muestra que el índice de cosecha en el RN100 fue mayor, pero no hubo diferencias entre los tratamientos RN060, RN045 y RP060 (Cuadro 6 y Figura 4). Esta respuesta puede deberse a que el llenado del tubérculo no se ve afectado por el riego deficitario leve en comparación con el riego normal, pero que si se ve afectado en los niveles deficitarios más severos. Shahnazari *et al.* (2007), no encontraron diferencias significativas para esta variable con relación al riego parcial.

Cuadro 6: Índice de cosecha

Tratamientos	Índice de cosecha de peso seco tubérculo (g/g) +/- CME	PR	CV
RN100	0,77 ± 0,01 a		1,8%
RN060	0,74 ± 0,02 ab	4%	4,5%
RN045	0,72 ± 0,01 ab	7%	4,3%
RN030	0,65 ± 0,00 cd	16%	1,7%
RP060	0,73 ± 0,01 ab	5%	2,3%

RP045	0,70 ± 0,02	bc	9%	5,8%
RP030	0,62 ± 0,01	d	19%	3,9%
Promedio	0,71 ± 0,01			8,0%
Análisis de varianza				
Tratamientos	**			

Valores con la misma letra no tienen diferencias significativas para la prueba LSD

** Altamente significativo, * Significativo, n.s. No significativo

PR: Porcentaje de reducción con respecto al tratamiento control

CV: Coeficiente de variabilidad CME: Cuadrado medio del error

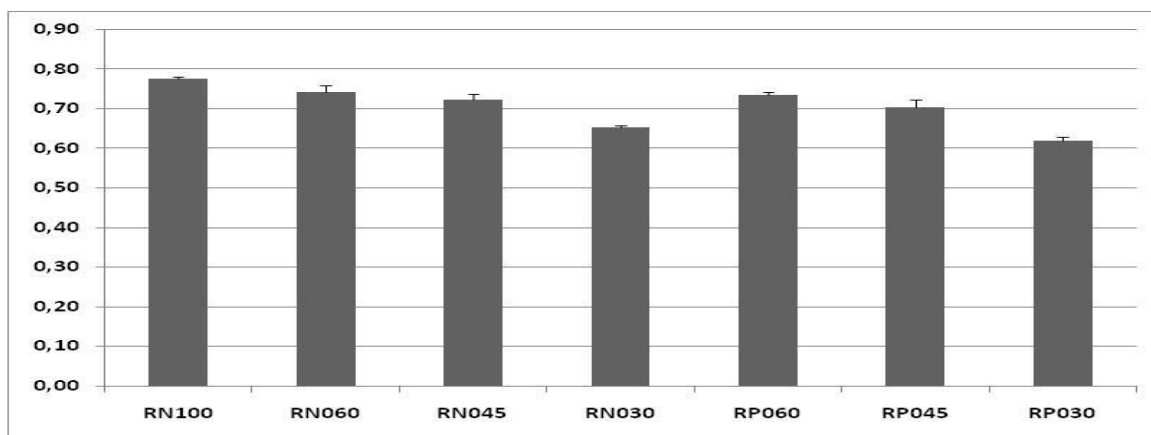


Figura 4: Índice de cosecha (g g⁻¹)

V. CONCLUSIONES

Los principales cambios en las expresiones fisiológicas para los diez genotipos en respuesta a la sequía fueron la fotosíntesis,

Determinar los cambios de las expresiones fisiológicas en los diez genotipos como respuesta de tolerancia sometidos a estrés hídrico por sequia y riego normal.

El principal mecanismos de tolerancia al estrés hídrico es para los genotipos de papa evaluados,

Identificar los parámetros fisiológicos que actúan como un mecanismo de tolerancia en los genotipos sometidos a estrés hídrico.

Determinar el efecto en el rendimiento de los diez genotipos en condiciones de sequia y riego normal.

VI. RECOMENDACIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beukema, HP; Van der Zaag, DE. 1979. Potato Improvement. Some factors and facts. International Agricultural Center. Wageningen. The Netherlands, 224p.
- Burton, WG.1989. The potato. 3 ed. Inglaterra. Longman Scientific & Technical.. 141 p.
- Collins, MJ; Barlow, EW; Kelley, G; Fuentes, S. 2008. Water Use Responses of Shiraz Vines under Partial Root Zone Drying in a Water-Limiting Environment. Proc. Vth IS on Irrigation of Hort. Crops. Acta Hort.792
- Davies, WJ; Wilkinson, S; Loveys, B. 2002. Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. New Phytol 153: 449-460
- De la Hera, ML; Romero, P; Gómez, E; Martínez, A. 2007. Is partial root-zone drying an effective irrigation technique to improve water use efficiency and fruit quality in field-grown wine grapes under semiarid conditions? Agricultural Water Management. 87: 261-274
- Dos Santos, TP; Lopes, CM; Rodríguez, M L; De Souza, CR; Maroco, J P; Pereira, JS; Silva, JR; Chaves, MM. 2003. Partial rootzone drying: effects on growth and fruit quality of field-grown grapevines (*Vitis vinifera*). Funtional Plant Biology. 30: 663-671
- Dry, PR; Loveys, BR; Stoll, M; Stewart, D; McCarthy, M. 2000. Partial root zone drying - an update. The Australian Grapegrower and Winemaker 438a:35-39.
- Egúsqüiza, BR. 2000. La Papa: Producción, Transformación y Comercialización. Primera edición. Lima, Perú, 23 - 108.

- Fageria, NK; Baligar, VC; Clark, RB. 2006. Physiology of Crop production. Primera edición. 153 – 175p
- Goldhamer, DA; Salinas, M; Crisosto, C; Day, KR; Soler, M; Moriana, A. 2002. Effects of Regulated Deficit Irrigation and Partial Root Zone Drying on Late Harvest Peach Tree Performance. Proc. 5th IS on Peach. Acta Hort. 592 ISHS. 343-350.
- Guerrero, JA. 1993. Estudio del efecto del déficit hídrico y de la fertilización potásica en algunas características morfo-fisiológicas y en el rendimiento de plantas de papa provenientes de semilla sexual. Tesis Mag. Sc. Lima – Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina. 125p.
- Gu, S; Du, G; Zoldoske, D; Hakin, A; Cochram, R; Fugelsang, K; Jorgensen, G. 2004. Effect of irrigation amount on water relations, vegetative growth, yield, and fruit composition Sauvignon Blanc grapevines under partial rootzone drying and conventional irrigation in San Joaquin Valley of California, USA. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 79
- Harris, PM. 1978. The potato crop production. The Scientific Basis for Improvement. Ed. Chapman and Hall, London.
- Haverkort, AJ. 1982. Manejo del agua en la producción de papa. Boletín de información técnica 15. Centro internacional de la papa, Lima, Perú. 22p
- Hernández, R. 2007. Botánica (en línea). Mérida, Venezuela. Consultado 9 mar. 2011. Disponible en <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/transpiracion/>
- Huamán, Z. 1986. Botánica sistemática y morfología de la papa. 2da ed. Boletín de información técnica 6. Centro internacional de la papa, Lima, Perú. 22p

- Huiqun, W; Liu, F; Andersen, M; Jensen, C. 2009. Comparative effects of partial root-zone drying and deficit irrigation on nitrogen uptake in potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Irrig Sci* 27:443–448.
- Jones, HG. 1992. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*, 2nd ed.. Cambridge: Cambridge University Press. 384 p.
- Jovanovic, Z; Stikic, R; Vucelic, B; Paukovic, M; Brocic, Z; Matovic, G; Rovcanin, S; Mojevic, M. 2010. Partial root-zone drying increases WUE, N and antioxidant content in field potatoes. *European Journal of Agronomy* 33: 124-131
- Kang, S; Zhang, J. 2004. Controlled alternate partial root-zone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. *J. Exp. Bot.* 55, 2437–2446.
- Kang, S; Zhang, L; Hu, X; Li, Z; Jerie, P. 2001. An improved water use efficiency for hot pepper grown under controlled alternate drip irrigation on partial roots. *Scientia Horticulturae* 89: 257-267.
- Kirda, C; Topcu, S; Kaman, H; Ulger, AC; Yazici, A; Cetin, M; Derici, MR. 2005. Grain yield and N-fertilizer recovery of maize under deficit irrigation. *Field Crops Res.* 93, 132–141.
- Kumar, D; Minhas, JS; Singh, B. 2003. *Abiotic Stress and Potato Production*. In: Khurana, S.M. Paul; J.S. Minhas; S.K. Pandey (eds.). 2003. *The Potato: Production and Utilization in Sub-Tropics*. Mehta Publishers. New Delhi.
- Leib, BG; Caspari, HW; Andrews, PK; Redulla, CA; Jabro, JD; Strausz, D. 2004. Deficit Irrigation and Partial Rootzone Drying Compared in Fuji Apples: Fruit Yield, Fruit Quality and Soil Moisture Trends. *The Canadian Society for*

Engineering in Agricultural, Food, and Biological Systems. An ASAE/CSAE Meeting Presentation. No. 042284.

- Li, F; Liang, J; Kang, S; Zhang, J. 2007. Benefits of alternate partial root-zone irrigation on growth, water and nitrogen use efficiencies modified by fertilization and soil water status in maize. *Plant Soil* 295:279–291.
- Li, F ; Wei, C; Zhang, F; Zhang, J; Nong; M; Kang; S. 2010. Water-use efficiency and physiological responses of maize under partial root-zone irrigation. *Agricultural Water Management* 97:1156–1164.
- Liu, F; Shahnazari, A; Andersen, MN; Jacobsen, SE; Jensen, CR. 2006. Physiological responses of potato (*solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signaling, leaf gas exchange and water use efficiency. *Dinamarca. Journal of Experimental Botany*. 3727-3735.
- Loveys, B; Grant, J; Dry, P; McCarthy, M. 1997. Progress in the development of partial rootzone drying. *Australian Grapegrower and Winemaker*. 402:18-20.
- Marsal, J; Mata, M; Amadeu, J; Vallverdú, X; Girona, J; Olivo, N. 2008. Evaluation of partial root-zone drying for potencial field use as a déficit irrigation technique in comercial vineyards according to two different pipeline layouts. *Irrig Sci*. 26: 347-356.nm’
- Morison, JIL; Baker, NR; Mullineaux, PM; Davies, WJ. 2008. Improving water use in crop production. *Philos. Trans. R. Soc. B*. 363, 639–658.
- Mousavi, SF; Soltani-Gerdefaramarzi, S; Mostafazadeh-Fard, B. 2010. Effects of partial rootzone drying on yield, yield components and irrigation water use efficiency of canola (*Brassica napus* L.). *Paddy Water Environ* 8:157–163.

- Poni, S; Bernizzoni, F; Civardi, S. 2007. Response of “Sangiovese” grapevines to partial root-zone drying: Gas-exchange, growth and grape composition. *Scientia Horticulturae* 114: 96–103
- Sadras, VO. 2009. Does partial root-zone drying improve irrigation water productivity in the field? A meta-analysis. *Irrig Sci.* 27: 183-190
- Salisbury, FB; Ross, CW. 1994. *Fisiología Vegetal*. Cuarta edición. Versión en español. Estados Unidos- California. 641-657 p
- Schachtman, DP; Goodger, JQ. 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science.* 13: N°6.
- Shahnazari, A; Andersen, MN; Jacobsen, SE; Jensen, CR. 2008. Partial Root Zone Drying (PRD) Sustains Yield of Potatoes (*Solanum Tuberosum* L.) at Reduced Water Supply. Dinamarca. *Acta Hort.* 792
- Shahnazari, A; Liu, F; Andersen, MN; Jacobsen, SE; Jensen, CR. 2007. Effects of partial root-zone drying on yield, tuber size and water use efficiency in potato under field conditions. *Field Crops Research* 100: 117-124.
- Shao, GC; Zhang, ZY; Liu, N; Yu, SE; Xing, WG. 2008. Comparative effects of deficit irrigation (DI) and partial rootzone drying (PRD) on soil water distribution, water use, growth and yield in greenhouse grown hot pepper. *Scientia Horticulturae* 119: 11–16.

- Sood, MC; Singh, N. 2003. Water Management. In: Khurana, S.M. Paul; J.S. Minhas; S.K. Pandey (eds.). 2003. The Potato: Production and Utilization in Sub-Tropics. Mehta Publishers. New Delhi.
- Spreer, W; Ongprasert, S; Hegele, M; Wünsche, JN; Müller, J. 2009. Yield and fruit development in mango (*Mangifera indica* L. cv. Chok Anan) under different irrigations regimes. *Agricultural Water Management* 96: 574-584.
- Stikic, R; Popovic, S; Srdic, M; Savic, D; Jovanovic, Z; Prokic, L; Zdravkovic, J.2003. Partial root drying (PRD): A new technique for growing plants that saves water and improves the quality of fruit. *Bulg. Journal Plant Phisiology, Special Issue* 164-171.
- Taiz, L; Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. Tercera edición. Capítulo 25. Pags 591 – 602.
- Tanner, CB. 1981. Transpiration efficiency of potato. *Agronomy Journal*. Vol. 73: 59-64.
- Wahbi, S; Wakrim,R; Aganchich, B; Tahi, H; Serraj, R. 2005. Effects of partial rootzone drying (PRD) on adult olive tree (*Olea europaea*) in field conditions under arid climate I. Physiological and agronomic responses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 289–301.
- Wang, J; Kang, S; Li,F; Zhang, F; Li, Z; Zhang, J. 2008. Effects of alternate partial root-zone irrigation on soil microorganism and maize growth. *Plant Soil* 302:45–52.
- Wang, Y; Liu, F; Andersen, MN; Jensen, CR. 2010. Improved plant nitrogen nutrition contributes to higher water use efficiency in tomatoes under alternate partial root-zone irrigation. *Functional Plant Biology*. 37,175-182

- Zegbe, J; Hossein, MB; Clotier, E. 2006. Respuesta del tomate para proceso al riego parcial de la raíz. Mexico. Terra Latinoamericana 25: 61-67.
- Zegbe, JA; Hossein, BM; Clothier, BE.2007. Respuesta del tomate para proceso al riego parcial de la raíz. Terra *Latinoamericana* 25: 61-67.
- Zhang, J; Tardieu, F. 1996. Relative contribution of apices and mature tissues to ABA synthesis in droughted maize root system. Plant and Cell Physiology. 37:598--605.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Manual de operación del microvoltímetro HR-33T

En primer lugar no es necesario hacer esta calibración con la cámara vacía.

1. Colocar un disco de hoja en la cámara y cerrar, conectar al HR-33T (poner en la posición FUNCTION en SHORT, para conectar y desconectar el cable de la cámara C-52).
2. Esperar unos 30 minutos para que la muestra se equilibre con la atmósfera de la cámara.
3. Determinar la temperatura dentro de la cámara: botón °C/μV hacia la posición °C en el rango de 30, para temperaturas por encima de 30° colocar el rango en 100. La lectura de la temperatura se realiza cuando el botón de FUNCTION está en la posición READ.
4. Corregir el coeficiente de enfriamiento de la cámara π_v (un valor descrito para la cámara a 25°C), para la lectura obtenida en el paso 2. Emplear la fórmula del manual $\pi_v1 = 0.7 (T1 - T0[25^\circ\text{C}]) + \pi_v0$, donde π_v0 es un valor medio medido en la fábrica o escrito en la cámara.
5. Ajustar el π_v1 apretando el botón y ajustando el valor en el botón de π_v SET (valor en la escala superior).
6. Cuando el RANGE tiene un valor no previsto para la temperatura (de 30° hasta 100°) el botón de FUNCTION en READ, debe de ajustarse en cero con los dos botones de ZERO OFFSET (COARSE y FINE).
7. Después de unos 30 minutos de equilibrio y con un ajuste de la temperatura de la cámara (paso 3), la corrección de π_v (paso 4 y 5) y el ajuste hasta cero (paso 6), se puede hacer la lectura en la posición de FUNCTION en COOL por 15 segundos, en muestras húmedas o un poco deshidratadas y hasta 30 segundos en muestras muy secas (la aguja debe estar próxima al final de la escala). Usar el mismo tiempo en todas las muestras.
8. Después de estos 15 o 30 segundos, girar el botón de FUNCTION en DEW POINT, la aguja va a descender hasta que se estabilice, que debe ser el mismo al repetir la operación. Este es el valor del Ψ_h en μ-voltios, se divide por -0.75 y nos da el valor en bar.

“EXPRESIÓN DE GENES DEL TIPO DEHIDRINAS Y ALDEHIDO ABCÍSI
CO OXIDASA, EN DIFERENTES GENOTIPOS DE PAPAS (Desire, Patagonia, R89063-59 y
R877009-28) SOMETIDOS A ESTRÉS HIDRICO A TRAVÉS DE RT-PCR Y q RT-PCR,
PARA IDENTIFICAR DIFERENCIAS EN SU EXPRESIÓN”

Tesis de pregrado para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología.

Karen Lisette Flores Belmar.

Profesor guía: Dra María Teresa Pino.

ABREVIATURAS

AAO aldehído abscísico oxidasa

ABA Ácido abscísico

ABAld aldehído abscísico

ADN ácido desoxirribonucleico

ARN ácido ribonucleico

A260 absorbancia a 260 nanómetros

Cdna ADN complementario

DEPC dietilpirocarbonato

Dhn10 Dehidrina 10

DNA ácido desoxirribonucleico

dNTP's desoxinucleótido trifosfato

EDTA ácido etilendiaminotetracético

EtBr bromuro de etidio

LEA Late Embryogenesis Abundant

MgCl₂ cloruro de magnesio

MoCo cofactor molibdeno

mRNA ARN mensajero

Pb pares de bases

RT-PCR reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (sigla en inglés)

I. INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum*) es el principal alimento no cereal en el mundo (Park et al., 2009a) y es considerado el cuarto cultivo alimenticio, luego del trigo, el arroz y el maíz. Actualmente representa el 50% de toda la producción mundial de raíces y tubérculos (ODEPA, 2010). En los últimos años; para el año 2007 se registró una producción mundial de 325 millones de toneladas aproximadamente (FAO, 2010). Chile es el sexto productor de papa de América Latina. En octubre del 2011 el INE (Instituto Nacional de Estadísticas), señaló que la superficie sembrada con papa fue de 41.534 hectáreas, lo que constituye una disminución de 22,6% respecto al 2010. Si bien la papa se puede cultivar en todo Chile, su producción se concentra en las provincias que están entre Coquimbo, al norte, y Chiloé (incluida la isla de Chiloé, donde ya se cultivaba en la época precolombina) (FAO, 2008).

El déficit hídrico es una de las causas por las cuales se puede ver afectada la producción en Chile, puede afectar de forma directa el rendimiento. Cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés puede llegar a disminuir el número y el tamaño de los tubérculos, lo cual conduce a pérdidas económicas importantes entre los agricultores, quienes tienden a alzar precios de su producción para compensar tales pérdidas, tornándose en un problema tanto para productores y consumidores. Estos estreses abióticos pueden ser consecuencia del cambio climático bajo el cual se encuentra el planeta, debido al calentamiento global que se da por el incremento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera según informes del Panel Gubernamental de Cambio Climático. Se proyecta que el calentamiento global tendrá impactos significativos que afectaran a la agricultura, la temperatura, dióxido de carbono, deshielos, precipitación y la interacción entre estos elementos (IPCC, 2007).

Cuando estamos en presencia de una planta expuesta a estrés abiótico por sequía, van a acumular prolina en su forma libre no solo en respuesta al estrés

hídrico, sino también por efectos de la salinidad y las bajas temperaturas (Cavaliere & Huang, 1979; Aspinall & Paleg, 1981)

En condiciones de sequía se ha determinado que se activan unos 200 genes, con mayor o menor expresión (Pino et al., 2011). En el presente estudio se analizó el papel de los genes *St aldehído abscísico oxidasa* y *Dhn10*, por medio de su expresión.

Las plantas producen ciertas proteínas como parte de una respuesta global frente al estrés, lo cual precede una protección del metabolismo celular (Ingram y Bartels 1996). Gran parte de las investigaciones se enfocan en las proteínas que aumentan durante una condición de estrés, ya que éstas pueden tener una función adaptativa o de protección a dicha condición. La síntesis de proteínas hidrofílicas como son las dehidrinas es un componente común de esta respuesta. Las dehidrinas son proteínas que originalmente fueron identificadas como grupo II de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales se acumulan durante los estados tardíos de la embriogénesis en semillas, en respuesta a la aplicación de la hormona ácido abscísico (ABA). Estas proteínas no sólo se acumulan durante la última etapa en la formación de la semilla, sino que también se encuentran en tejidos vegetativos en respuesta a la deshidratación (Galau et al., 1986).

El gen *St aldehído abscísico oxidasa* codifica para la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del ABA, en donde el aldehído abscísico (ABAld) es convertido a ABA. Esta enzima requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica (Nambara y Marion-Poll, 2005). Cuando una planta se encuentra sometida a estrés hídrico, esta acumula ABA, lo cual provoca la activación de numerosos genes y el cierre estomatal para restringir la transpiración (Schroeder et al., 2001).

El éxito en la obtención de variedades mejor adaptadas depende de la recolección, preservación y diseminación de material genético relevante (CGIAR, 2007). Las especies de papa silvestre desempeñan un papel importante en la

obtención de variedades tolerantes al estrés abiótico. Debido a su gran variabilidad genética hace que estas sean importantes recursos para lograr las características deseadas.

Es por ello que el consorcio INIA Chile, INIA Uruguay y CIP de Perú busca aumentar la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo, a través de la selección y desarrollo de genotipos con mayor tolerancia a la sequía y a altas temperaturas.

Fundamentalmente está orientado a determinar el potencial impacto del cambio climático en estos cultivos, así como, poner a disposición tanto de programas de mejoramiento locales como de productores, genotipos y genes tolerantes a sequía y altas temperaturas que permitan obtener rendimientos competitivos frente al nuevo escenario climático.

La presente investigación busca poder determinar la expresión de genes que confieren tolerancia al déficit hídrico en cuatro genotipos de papa (Patagonia, Desiré, R89063-59 Y R877009-28), 2 de estas son variedades comerciales y las otras son accesiones que están siendo estudiadas, para que en alguna instancia estas puedan ser una nueva variedad.

II OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar si existen diferencias de expresión en genes del tipo Dhns y AAO en diferentes genotipos de papas sometidas a estrés hídrico.

Objetivos específicos.

- Estudiar la expresión de genes del tipo Dehidrinas (Dhns) en cuatro genotipos de papas; Desire, Patagonia, R89063-59 y R877009-28 en respuesta a estrés hídrico por RT-PCR.
- Estudiar la expresión de genes del tipo Aldehído Abcísico Oxidasa (AAO) en cuatro genotipos de papas; Desire, Patagonia, R89063-59 y R877009-28 en respuesta a estrés hídrico por RT-PCR.
- Estudiar la expresión por qRT-PCR., sólo en aquel gen que muestre mayores diferencias entre genotipos.

Hipótesis.

Los genotipos de papas contrastantes; Desire, Patagonia, R89063-59 y R877009-28 en su tolerancia a sequía, muestran diferencias en los niveles de expresión en genes del tipo Dhn y AAO.

III.MARCO TEÓRICO

3.1 Estrés Abiótico por sequía.

Como consecuencia del cambio climático bajo el cual se encuentra el planeta, podemos identificar varios factores que afectan hoy en día a la agricultura, como lo es el déficit hídrico y otro tipo de estreses abióticos, el cual se estaría generando por el incremento de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera según informes del Panel Gubernamental de

Cambio Climático. El cambio climático es probable que aumente la frecuencia de los episodios de sequía en muchas regiones, afectando a los cultivos sensibles a la sequía (E. Simelton *et al.*, 2012). La gravedad y la duración de los períodos de escasez de agua puede variar más de un año a lo que hace difícil para que las plantas se adaptan (WE Easterling *et al.*, 2007). Se espera que las pérdidas de producción de papa en el mundo debido al cambio climático en un rango entre el 18 y el 32% durante. Se proyecta que el calentamiento global tendrá impactos significativos que afectaran a la agricultura, la temperatura, dióxido de carbono, deshielos, precipitación y la interacción entre estos elementos (IPCC, 2007).

La productividad de las plantas es gravemente afectada por estos tipos de estrés: como la sequía, la salinidad, las inundaciones, las altas y bajas temperaturas, la radiación UV, el exceso de ozono y metales pesados. El estrés abiótico es la causa principal de las pérdidas de cosechas en todo el mundo, causando pérdidas de rendimiento promedio de más del 50% de los cultivos principales (Boyer 1982).

Entre los diferentes estreses abióticos, la sequía es uno de los más complejos y devastadores a nivel mundial (Pennisi 2008). Aunque crecen muchos climas diferentes, los cultivos de papa suelen ser sensibles al estrés por sequía. Los bajos niveles de disponibilidad de agua durante el crecimiento del cultivo de papa reducen significativamente el rendimiento, acortando el período de producción y la limitación de la distribución geográfica. La agricultura es uno de los principales usuarios de los recursos hídricos en muchas regiones del mundo y la sequía afecta a la agricultura en un 45% del área geográfica del mundo. La agricultura de secano representa el 80% de la superficie cultivada en el mundo y contribuye con el 60% de la alimentación mundial (Rockstrom 2003). Con el aumento de la aridez y el crecimiento de la población mundial, el agua se convertirá en un producto aún más escaso.

Las especies que sufren un mayor estrés durante la sequía son las que muestran una mayor transpiración y viceversa. Existen rasgos eco fisiológico que están

correlacionados dando lugar a grupos funcionales de especies que responden de forma similar a la sequía. La combinación de raíces profundas, hojas esclerófilas con una conductancia estomática y una transpiración cuticular bajas permite un comportamiento hidroestable, como el que se observa en la encina, mientras que las raíces someras están asociadas con hojas malacófilas o ausentes en verano y dan lugar a un comportamiento ecofisiológico fluctuante. Si bien la resistencia a la cavitación con el incremento del déficit hídrico es importante en la tolerancia de la sequía no siempre determina la supervivencia en condiciones de campo. La sequía disminuye significativamente la capacidad para secuestrar carbono atmosférico, y, contrariamente a un paradigma extendido, disminuye la eficiencia en el uso del agua de ciertos encinares cuando ésta eficiencia se calcula a nivel de ecosistema y no de hoja (Valladares, F. 2004)

Es importante saber que no todas las variedades de papa presentan los mismos índices de tolerancia y que ésta se caracteriza por tener una alta variabilidad genética, presentando caracteres altamente deseables para su introgresión en cultivares comerciales (Mathias *et al.*, 2007). Pero debemos tener en cuenta que frente al estrés hídrico, lo que se va a ver directamente afectado es la tuberización o llenado de tubérculos y la calidad industrial (Hijmans, 2003). Además debemos considerar que el estrés hídrico es especialmente perjudicial durante la formación del tubérculo, lo que afecta el número de tubérculos, el tamaño y la calidad (Ekanayake y Midmore, 1992). La sequía no sólo afecta a la producción de tubérculos, sino también reduce el crecimiento vegetativo, longitud del brote, tamaño de la hoja y el número de hojas (Weisz *et al.*, 1994; Deblonde y Ledent, 2001). Además del cierre de los estomas, la sequía reduce el intercambio de gases a través de reducciones en las tasas de transpiración y fotosíntesis (Ekanayake y Midmore, 1992; Dalla Costa *et al.*, 1997;. Deblonde y Ledent, 2001;. Kiziloglu *et al.*, 2006). La vulnerabilidad de la papa frente a la sequía se atribuye al sistema de raíces poco profundas de este cultivo (50 a 80 cm de profundidad), lo que lo hace la absorción de agua se limite (Ekanayake y Midmore, 1992; Dalla Costa *et al.*, 1997.).

3.1.1 La papa

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo, se cultiva en 19 millones de hectáreas y tiene una producción anual de aproximadamente 325 millones de toneladas (FAO,2012).

La papa (*Solanum tuberosum*) es el principal alimento no cereal en el mundo (Park *et al.*, 2009) y es considerado el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo, se cultiva en 19 millones de hectáreas y tiene una producción anual de aproximadamente 325 millones de toneladas (FAO, 2012).

Actualmente representa el 50% de toda la producción mundial de raíces y tubérculos (ODEPA, 2010).

Su centro de origen está ubicado en las tierras altas de los Andes localizadas entre el centro del Perú y el centro de Bolivia. Con el tiempo, el área de cultivo ha extendido a varios países en América Latina y al resto del mundo, la cual fue introducida a Europa después del descubrimiento de América (Huamán *et al.* 1997).

Algunas de sus variedades y líneas avanzadas son:

Solanum tuberosum cv. Patagonia cv. Desiree y líneas avanzadas R89063-59 y R877009-28.

Desiree

Esta variedad se origina a partir de la cruce de Urgenta Y Despeche, es una planta semi erecta que tiene un desarrollo intermedio, de buen vigor y su follaje tiene color grisáceo oscuro, que presenta abundantes flores de color rosado pálido. En cuanto a la forma del tubérculo es oval alargado, tiene ojos superficiales, su piel es rosada y su pulpa de color amarillo claro como lo indica la figura 1.

Posee un alto rendimiento, su madurez es semi tardía (145-150 días) en plantaciones de octubre en el sur de Chile. Tiene buena resistencia al virus Y de la papa (PVY) y moderada susceptibilidad al virus del enrollamiento de las hojas de la papa (PLRV).

Su almacenamiento comprende de 4-5 meses y en cuanto a su consumo tiene una buena calidad culinaria, muy resistente a la cocción y de sabor neutro. Es utilizada como papa de guarda, y para la elaboración de papa frita, es una papa recomendada para todas las zonas productoras de papa de Chile.

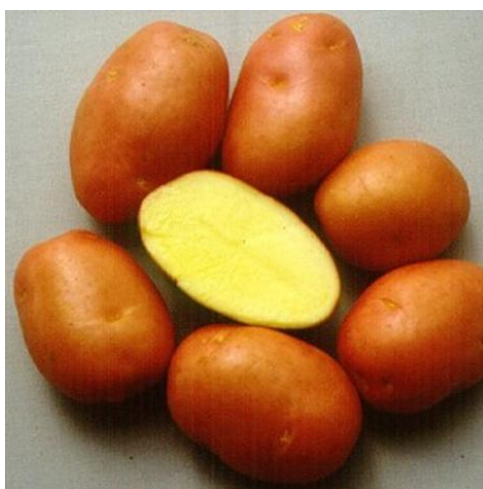


Figura 1. Tubérculos de papa, variedad Desireé (INIA).

Patagonia

Variedad que se da origen a través del programa de mejoramiento Genético de la Papa del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), en el Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno. Inscrita el año 2010.

Es una planta semi erecta que tiene un gran desarrollo del follaje, altura media, hojas de color verde intenso y flores de color violeta. En cuanto a la forma del tubérculo es oval alargado, tiene ojos superficiales, su piel es roja y pulpa de color amarillo claro como se indica en la figura 2.

Posee un rendimiento muy alto, su madurez es semi tardía (145 días) en plantaciones de octubre en el sur de Chile. Tiene buena resistencia al Tizón tardío de la papa, la cual debe manejarse adecuadamente para impedir/dilatar la generación de resistencia en poblaciones al hongo, buena resistencia a la sarna común (*Streptomyces scabies*). Su almacenamiento comprende un periodo de 5 meses en bodega con ventilación en el sur de Chile. En cuanto a su consumo, presenta una buena calidad para el consumo fresco, de muy buen sabor, color y textura suave; resistente al parpadeamiento después de la cocción. Muy resistente a la cocción y de sabor neutro. Es consumida preferentemente fresca y no recomendada para uso agroindustrial en elaboración de pre frito congelado. Recomendable para todas las zonas productoras de papa de Chile, y particularmente apta para la producción de papa temprana.



Figura 2. Tubérculos de papa, variedad Patagonia (INIA).

Líneas avanzadas: R89063-59 y R877009-28

Estas consisten en líneas de selección avanzadas con características agronómicamente destacadas las que han sido parte de un programa de

mejoramiento y están en procesos de evaluación, prontas a ser una variedad comercial. Cada una de estas accesiones puede llegar a ser una variedad definida, pero estas pueden ser estudiadas hasta 15 años previamente.

3.1.2 Taxonomía y morfología de la papa (*Solanum tuberosum*)

La papa pertenece a la familia de las solanáceas y actualmente es conocida bajo el nombre de *Solanum tuberosum* (Spooner y Salas, 2006; Andre *et al.*, 2007). La papa tiene varios niveles de ploidía, la gran mayoría (70%) son diploides ($2n = 2x = 24$), el resto de ellas son tetraploides ($2n = 6x = 72$) y un pequeño porcentaje corresponden a los triploides y pentaploides (Spooner *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2008).

La clasificación taxonómica de la papa cultivada es un tema controversial, esto se debe a que gran parte de sus especies se relacionan entre sí, diferentes autores han reconocido desde 1 hasta 20 especies (Huamán y Spooner, 2002), pero todas forman un mismo pool genético (Spooner *et al.*, 2005). Spooner *et al.*, (2008) clasificaron las papas nativas en cuatro especies: *Solanum ajanhuiri* (diploide), *Solanum juzepczukii* (triploide), y *Solanum curtilobum* (pentaploide) y *Solanum tuberosum*, con dos grupos cultivados: Andigena (Andiegenum) y Chilotanum; en el primero se incluyen todas las papas andinas, tanto diploides como tetraploides, que crecen a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta Argentina, y el segundo está conformado por las papas adaptadas a día largo, que crecen en las tierras bajas del Centro y Sur de Chile, incluyendo las Islas del Archipiélago de los Chonos (Rodríguez, 2009). Es por ello que aún no se han logrado determinar un número real de especies.

La papa es una planta dicotiledónea, herbácea, gracias a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos, puede ser considerada

como perenne potencial. La planta puede medir de 0,40 a 1,4 m de altura, con tallos de 5 a 19 mm de diámetro en la base, erectos, pubescentes o glabros, de color verde a púrpura (Huamán y Spooner, 2002). Posee unos tallos laterales, llamados estolones, que crecen horizontalmente debajo del suelo y que pueden desarrollar tubérculos por un agrandamiento de su extremo distal, o crecer verticalmente desarrollando follaje normal. Las hojas son alternas, las primeras tienen aspecto simple, después vienen las hojas compuestas imparipinadas con tres pares de folíolos laterales y un folíolo terminal (Ríos, 2007).

La flor corresponde a una inflorescencia cimosa, cuyas flores son bisexuales. Poseen las cuatro partes esenciales de una flor: cáliz, corola, estambre y pistilo. Los estambres son el órgano masculino llamado *androceo*, y el pistilo es el órgano femenino llamado *gineceo* (Herrera, 2005).

La planta de papa puede desarrollarse a partir de una semilla o de un tubérculo, cuando crece a partir de una semilla, forma una delicada raíz axonoforma con ramificaciones laterales. Cuando crece de tubérculos, forma raíces adventicias que se desarrollan en la base del tubérculo y las yemas horizontales se alargan dando origen a tallos en forma de estolones. El crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso y muy ramificado. El tubérculo, es un tallo subterráneo modificado, acortado, engrosado y provisto de yemas u ojos en las axilas de sus hojas escamosas los ojos del tubérculo corresponden morfológicamente a los nudos de los tallos. En cada ojo existen normalmente tres yemas, aunque en ocasiones puede presentar más (Herrera, 2005).

El cultivo de papa se encuentra distribuido por toda América, desde sureste de Norteamérica, por toda Centroamérica y Sudamérica. Crece desde el nivel del mar hasta la cordillera, a 4500 m de altitud. La mayor variabilidad genética de las especies de papas, se concentra en el área de la meseta peruano-boliviana, y de las 183 especies de este género el 74,3% es diploide, el 3,8% es triploide, el 14,8% es tetraploide, el 1,6% es pentaploide y el 5,5% es hexaploide (Contreras, 2008).

3.2 Importancia de la papa y su producción.

La papa se cultiva a menudo por los agricultores de escasos recursos en las zonas remotas, a menudo marginal con acceso limitado a los insumos agrícolas (GJ de Scott, 1985). Da cuenta de las grandes cantidades de ingesta diaria de energía de la dieta en comparación con otros cultivos (GJ de Scott *et al.*, 2000) y contribuye a la reducción del hambre y la mejora de la nutrición (G. Thiele *et al.*, 2010). Papa también es ir a buscar progresivamente mayor valor en el mercado contribuyendo así a la reducción de la pobreza (G. Thiele *et al.*, 2010). Una parte cada vez mayor de la producción es transformada por la industria (patatas fritas, chips), en particular en Asia (SH Janski *et al.*, 2009).

La papa ha sido utilizada como fuente de alimentación primaria o secundaria en países con malnutrición (Lutaladio y Castaldi, 2009). Una papa mediana contiene aproximadamente la mitad de los requerimientos de vitamina C de un adulto, contiene apenas un 5% de materia grasa del trigo y un cuarto de calorías del pan. Cocida tiene el doble de proteínas del maíz y cerca del doble de calcio, es una buena fuente de vitaminas B1, B3 y B6 y de minerales como potasio, fósforo y magnesio, además de folato, ácido pantoténico, riovoflavina y antioxidantes necesarios para la dieta (Burlingame *et al.*, 2009; CIP, 2010).

Las papas también son decisivas para la seguridad alimentaria de cientos de millones de personas del mundo en desarrollo, donde el consumo anual ha aumentado de menos de 10 kilogramos per cápita a principios del decenio de 1960, a unos 21 kilogramos. Si bien en Europa ha disminuido la producción de papa, en los países en desarrollo el crecimiento es tan fuerte sobre todo en China y la India, que la producción mundial casi se ha duplicado en los últimos 20 años. Desde principios de los años 60, dice la FAO, el aumento de la superficie dedicada al cultivo de papa en el mundo en desarrollo ha superado la de todos los demás productos alimentarios básicos, y se prevé que para 2020 la demanda de papa duplique la de 1993

La producción de la papa ha aumentado considerablemente en los últimos años; para el año 2007 se registró una producción mundial de 325 millones de toneladas (FAO, 2010). El principal productor es China, con 73 millones de toneladas aproximadamente (Figura 3), lo que representa más de un 20% de la producción mundial.

Producción de papa, 2005 (toneladas)



1. China	73.036.500
2. Federación de Rusia	36.400.000
3. India	25.000.000
4. Ucrania	19.480.000
5. Estados Unidos	19.111.030
6. Alemania	11.157.500
7. Polonia	11.009.390
8. Belarús	8.185.000
9. Países Bajos	6.835.985
10. Francia	6.347.000

Fuente: FAO/ESS

Figura 3. Muestra los 10 principales países productores, la cantidad en toneladas que estos producen, las cuales representan dos terceras partes de la producción mundial de papa.(FAO/ESS)

Producción de papa en Chile

En Chile, en el año 2010, fueron producidas cerca de 920.000 toneladas de papas (ODEPA, 2010). En nuestro país la producción de papa se realiza en todo el país y durante todo el año, debido a sus excelentes condiciones para el cultivo y diversidad climática (Fundación Chile, 2001). La mayor producción de papa se concentra entre las áreas de Coquimbo y Los Lagos ; y existen 156 variedades de papas registradas en el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), de las cuales 31 de ellas se encuentran inscritas en el registro de variedades protegidas con derecho de propiedad intelectual (Kalazich *et al.*, 2006). Las variedades de tubérculos más

vendidas en Chile son Asterix (31,1%), seguida por la Desire (27,3%) y la Karú (16,2%), además de las variedades Cardinal, Pukará, Rosara y Yagana (ODEPA, 2010).

Se cree que para el 2020, el cultivo de papa tendrá una tasa de crecimiento anual mayor que los principales cultivos alimenticios, en países desarrollados, convirtiéndolo en un cultivo clave para alimentar a un mundo en expansión y con gran necesidad de alimentos (Scott *et al.*, 2000).

3.3 Efectos del déficit hídrico sobre los cultivos.

La papa cultivable (*S. tuberosum*) es un cultivo sensible a la sequía (Van Loon, 1981), el cual puede presentar bajos rendimientos y defectos fisiológicos en el tubérculo cuando se encuentra en lugares donde existen bajos niveles de disponibilidad hídrica (Ekanayake, 1994). En relación a la etapa de crecimiento vegetativo, el estrés hídrico afecta directamente en número y tamaño de la hoja, la longitud de las raíces y la altura de la planta (Alsharari *et al.*, 2007; Hinojosa, 2009). En esta misma etapa, al presentarse un estrés de éste tipo, las plantas de papa tienden a producir tubérculos de menor tamaño, como consecuencia de la reducción del follaje, disminución de la tasa fotosintética por unidad foliar y acortamiento del periodo vegetativo (Van Loon, 1981).

El óptimo crecimiento de la papa se da en condiciones relativamente frías, su formación y el aumento de volumen del tubérculo depende principalmente de las temperaturas diurnas y nocturnas, para que los metabolitos producidos durante el día se acumulen en el tubérculo durante la noche (Hooker 1981). Uno de los principales factores que los límites de cultivo de la papa poseen es la susceptibilidad a la sequía y esto se debe principalmente a su bajo crecimiento de la raíz del sistema, con una profundidad que varía de 0.5 a 1.0 metros (Vos y Groenwold, 1986). Alrededor del 85% de la longitud total de la raíz se concentra en la parte superior de 0,3 m del suelo. Gregory y Simmonds ,1992 mostró que el

sistema de raíces de papa muestra relativamente una pequeña longitud de la raíz por unidad de área y esto hace que la planta de la papa sea un mal conductor de agua. Debido a la sequía, se induce la formación de raíces, factor que incrementa la absorción de agua y nutrientes, así como el contenido y la utilización de los carbohidratos por parte de la planta (Ramirez-Palma et al., 2005). Esto se complica aún más por el hecho que la papa extrae menos del agua disponible en el suelo en comparación con otros cultivos (Weisz et al., 1994). Según Marschner (2002), el sistema radicular de las plantas con déficit hídrico continúa creciendo por elongación las raíces existentes y por la formación de nuevas raíces. La zona apical de las raíces y de la estela permanecen vivas, a pesar de estar sometidas a colapsos del córtex en las zonas basales gracias al estrés hídrico. Una vez que se rehidrata el sistema radicular de la planta sometida a estrés, este crece por la elongación de las raíces ya existentes (Stasovski y Peterson, 1991).

Un sistema radicular poco profundo que no permite una extracción eficiente de agua, hace de la papa sea un cultivo altamente vulnerable a déficit hídrico; sus raíces pueden oscilar entre 50 y 80 cm (Ekanayake, 1994; Weisz *et al.*, 1994). Frente a la falta de agua, los estomas de las hojas de la papa se cierran rápidamente reduciendo la transpiración y la tasa fotosintética, aumenta la temperatura foliar, y se afecta el rendimiento.

Los cultivos de papa responden de manera diferenciada a la sequía, dependiendo del estado fenológico en que se encuentre el cultivo (Figura 4). Los periodos de estolonización, formación y desarrollo de tubérculos, son los más sensibles al déficit hídrico. Mientras que la fase inicial de desarrollo y la de maduración son menos sensibles a sequía (Peralta, 2006).

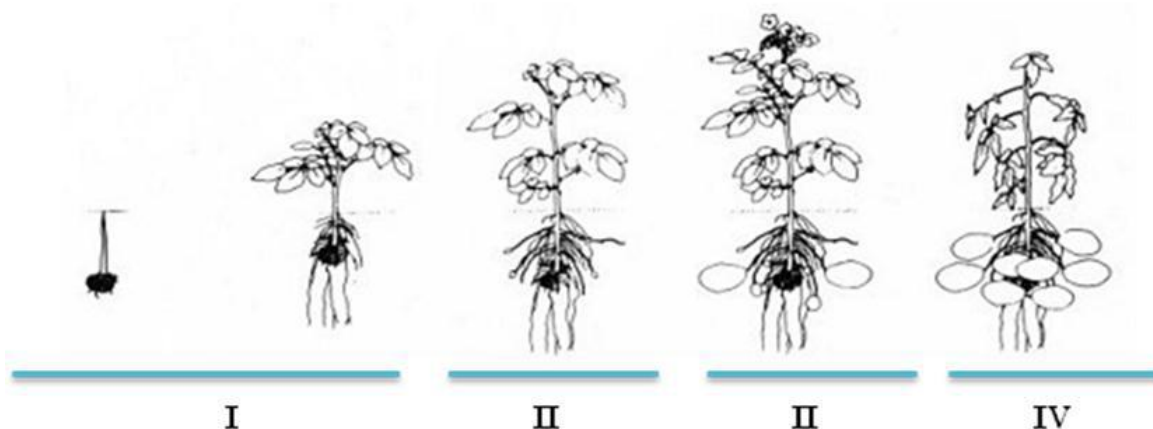


Figura 4. Estados fenológicos de la papa: I. Estado vegetativo: desde emergencia de brotes hasta la formación de las primeras 8 – 12 hojas; II. Iniciación de tuberización: comienzan a formarse los tubérculos en los extremos de los estolones, el follaje sigue desarrollándose; III. Crecimiento del tubérculo: gran parte de la energía de la planta suple el crecimiento del tubérculo; IV. Maduración: senectud del follaje, engrosamiento de la piel del tubérculo alcanza su mayor contenido de materia seca.

3.3.1 Respuesta fisiológica frente a estrés hídrico

Una de las primeras respuestas fisiológicas a la falta de agua es la reducción del crecimiento generalizado de la planta, debido a la inhibición de la expansión celular (Acevedo *et al.*, 1998). También nos enfrentamos al cierre de estomas que está asociado a la síntesis de ácido abscísico (ABA), que altera rápidamente el flujo de iones en las células oclusivas (células epidérmicas especializadas que rodean el estoma) (Leung y Giraudat, 1998). El ABA juega un papel importante en la maduración y germinación de semillas, así como la adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés abiótico, como es el caso del déficit hídrico, alta salinidad y bajas temperaturas (Leung y Giraudat, 1998). Se ha podido observar que muchos genes inducibles por sequía y bajas temperaturas también son inducidos por aplicaciones exógenas de ABA, lo que indica que el ácido abscísico

cumple un importante rol en la regulación de la expresión genética en respuesta al estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Un cultivar que presente sólo una pequeña reducción de su rendimiento bajo condiciones de sequía, puede ser definido como tolerante al déficit hídrico (Valladares *et al.*, 2004). Al hacerse tolerante, se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento. Uno de principal importancia es la limitación específica de la expansión foliar. Aunque el área foliar es importante, pues de ella depende la fotosíntesis, una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua. Una menor área foliar transpira menos agua, por lo que es un efectivo método de conservación de un suministro limitado de agua durante un periodo más largo (Taiz y Zeiger, 2002).

Una baja disponibilidad de agua, provoca que la parte aérea de la planta deje de crecer por causa del estrés, mientras que la raíz continúa su desarrollo y busca abastecerse de agua en zonas más profundas del suelo, ya que las capas superiores normalmente son las primeras en secarse (Moreno, 2009). Los genotipos tolerantes a sequía presentan un mayor desarrollo radicular (Acevedo *et al.* 1998).

El ajuste osmótico es un proceso que también se da como respuesta de tolerancia a la sequía a nivel celular, éste consiste en la acumulación de solutos en respuesta al déficit hídrico y la disminución del potencial hídrico total de hojas, tallos y raíces (Silva *et al.*, 2007). Como resultado, las plantas pueden absorber agua a bajos potenciales hídricos del suelo y mantener el turgor en sus tejidos (Acevedo *et al.*, 1998). La sequía también provoca cambios bioquímicos y moleculares (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). La síntesis de solutos compatibles, tales como prolina, azúcares solubles, y la glicina betaína, juega un papel crucial en los ajustes osmóticos. Bajo estrés osmótico, hay un aumento en la concentración de prolina libre, que actúa como un agente osmótico, la protección de plantas de deshidratación (Kavi Kishor *et al.*, 2005; Szabados y Savoure, 2010). Se ha sugerido que la prolina participa en múltiples funciones en estrés de la planta, la estabilización de proteínas y membranas y proporcionar una fuente de

carbono, nitrógeno y energía durante la rehidratación celular (Kavi Kishor *et al* 2005;. Szabados y Savoure, 2010). La prolina se ha asociado con tolerancia a la sequía y otros estreses abióticos en varias especies de plantas, como el arroz (Su y Wu, 2004) y la patata (Knipp y Honermeier, 2006). Un estudio en diferentes genotipos de papa mostró la acumulación de prolina libre en las hojas bajo estrés por sequía (Bansal y Nagarajan, 1986). Sin embargo, un reciente estudio demostró que la concentración de prolina aumentó a principios de sequía variedades susceptibles que en las variedades tolerantes a la sequía, lo que sugiere que la acumulación de prolina es sólo una característica de la variedad de papa (Schafleitner *et al.*, 2007). Varios genes son ya sea hacia arriba o hacia abajo reguladas en respuesta a estrés osmótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yang *et al*, 2010.). Hay genes que protegen directamente contra tensiones ambientales y los genes que juegan un papel en la regulación de la expresión génica y la transducción de señales (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en la planta, cuando ésta crece en condiciones óptimas, pero en condiciones de estrés, el contenido de prolina aumenta considerablemente, actuando como agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación (Chaman, 2007).

Otro mecanismo adaptativo de las plantas sometidas a estrés abiótico, incluida la sequía, es la acumulación de pigmentos como los flavonoides. Estos tienen múltiples funciones en las plantas, como la protección contra la exposición excesiva a la radiación ultravioleta, pigmentación floral y actividad microbiana. Las antocianinas son un tipo de flavonoides que se han visto involucrados en funciones protectoras contra la fotoinhibición (Prado, 1999) y como mecanismo no enzimático eficaz contra la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mittler, 2002). Las ROS son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Estreses abióticos y bióticos pueden aumentar la concentración de ROS, originando daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN (Bhattacharjee, 2005).

3.3.2 Respuesta a la sequia

Una mejor comprensión de los efectos de la sequía en las plantas es fundamental para mejorar la gestión de las prácticas y los esfuerzos de mejoramiento de la agricultura. Las plantas activan un conjunto diverso de cambios fisiológico, sistemas metabólicos y de defensa para sobrevivir y para sostener el crecimiento. Cualquier cambio condiciones óptimas de crecimiento se perciben por las plantas como el estrés y la traduce en forma de señales que implica la fosforilación de proteínas y / o la desfosforilación, la detección de calcio, proteínas degradación, etc. Esto activa los mecanismos de respuesta de estrés, ya sea porque se lleva directamente a expresión de ciertos genes implicados en los mecanismos de reparación o conduce a la expresión de los factores de transcripción que a su vez regulan otros genes de respuesta al estrés hídrico (Bartels y Sunkar 2005). Transcriptómica, proteómica y estudios de expresión génica han identificado la regulación y activación de varias sequías transcripciones y las proteínas relacionadas con el estrés, que generalmente se clasifican en dos grandes grupos. El primer grupo (proteínas funcionales) incluye proteínas que probablemente funcionan de la tolerancia al estrés. Son factores de protección como chaperonas, las proteínas LEA, y las proteínas de transferencia de lípidos, proteínas implicadas en la reparación y la protección de daños, tales como las proteinasas, enzimas de desintoxicación, inhibidores de proteasa, proteínas relacionadas con la defensa de ferritina y de la planta y de las proteínas implicadas en la síntesis de osmoprotectores (prolina, glicina betaína, azúcares). Este grupo también incluye las proteínas implicadas en los procesos metabólicos celulares, tales como el metabolismo de hidratos de carbono, metabolismo secundario, metabolismo ácidos grasos, la biosíntesis de hormonas vegetales (ABA, etileno, IAA y JA), proteínas regulados por hormonas vegetales (ABA, auxina y JA), proteínas de unión a ARN, estructura celular y de organización relacionados con las proteínas, como las proteínas de arabinogalactano, senescencia relacionados proteínas, el citocromo P450, la alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, la reproducción proteínas relacionadas con el desarrollo, como el polen proteína de

la cubierta-como la respiración y las proteínas relacionadas tales como flavina monooxigenasa. El segundo grupo (proteínas reguladoras) está implicado en la regulación de la transducción de la señal y la transcripción como parte de la respuesta a la sequía. Estos son factores de transcripción de genes múltiples familias como DREB, ERF, zinc dedo, WRKY, MYB, MYC, HD-ZIP, bZIP y NAC . Entre las proteínas reguladoras de proteína quinasas tales como MAPK, MAPKKK, CDPK, S6K y PR. Este grupo también incluye las proteínas fosfatasas tales como PP2C, PI proteínas relacionadas con el volumen de negocios, tales como PLC, PLD, PIP5K, DGK y PAP y calmodulina vinculante +-proteínas de unión a proteínas y Ca². La comprensión de los mecanismos por los que las plantas perciben señales del medio ambiente y transmitir tales señales a la maquinaria celular para activar la respuesta es una cuestión fundamental en la biología de las plantas y también es vital para el continuo desarrollo de la cría racional y estrategias transgénicas para mejorar la tolerancia al estrés en cultivos.

Los estudios de la respuesta molecular ante el déficit hídrico sugieren vías de señalización independientes, que activan genes inducibles por el estrés por sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996), dependientes e independientes de ABA.

3.4 El ácido abscísico en la planta: percepción y traducción de señales

Desde el descubrimiento del ABA a comienzos de los años 60, se ha dedicado mucho esfuerzo en comprender cómo éste es sintetizado. A través de estudios genéticos y bioquímicos, la biosíntesis del ABA en plantas superiores es ahora explicado en detalle.

El ABA regula dos procesos básicos para el desarrollo de las plantas; uno es la maduración y germinación de la semilla, donde está involucrado en los procesos

de adquisición de la dormancia, acumulación de reservas nutritivas y adquisición de la tolerancia a desecación (Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998). De otro lado, está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental como el frío, la salinidad y la deshidratación. Se ha comprobado que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en tejidos vegetativos. Esta relación llevó a proponer que el ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas (Galau *et al.*, 1986; Zeevaart y Creelmen, 1988; Bray, 1991). Así, los niveles de ácido abscísico en una planta serían determinantes de su comportamiento frente a una condición de estrés. Estos niveles son modulados por un balance preciso entre la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona.

La fitohormona ABA es sintetizada a partir del precursor carotenoide C40, por la vía 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP). La primera enzima relacionada directamente con su síntesis es la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), la cual está localizada en los plástidos y rompe un precursor epoxicarotenoide para formar xantosina (C15) y un metabolito (C25). La forma biológicamente activa de ABA se produce a partir de *cis*-xantosina por dos pasos enzimáticos vía aldehído abscísico y es catalizada por AtABA2. La oxidación del aldehído abscísico a ácido carboxílico es el último paso en la biosíntesis del ABA y es catalizado por una abscísico aldehído oxidasa (AAO), la cual requiere un cofactor molibdeno (Moco) para su actividad catalítica (Cutler y Krochko, 1999; Nambara y Marion-Poll, 2005). Además de esta vía, hay evidencia que sugiere la existencia de al menos otra vía alternativa menor (Tabaeizadeh, 1998). Se ha propuesto que la NCED es la principal enzima reguladora debido a que su expresión está correlacionada con los niveles endógenos de ABA (Schwartz *et al.*, 2003).

Adicional a esta regulación, la sobre-expresión de genes que codifican enzimas regulatorias de la vía MEP (1-doxi-Dxylulosa 5-fosfato sintasa), de la biosíntesis de carotenoides (fitoeno sintasa) y del ciclo de las xantofilas (ZEP) causan un aumento en la acumulación de ABA en semillas y plántulas (Marín *et al.*, 1996;

Frey *et al.*, 1999; Estévez *et al.*, 2001). Durante el estrés abiótico varios de estos genes están sobre-expresados. En *N. plumbaginifolia*, *L. esculentum* y *Arabidopsis* la expresión del gen *zep* se induce en raíces por estrés hídrico rápido o progresivo (Audran *et al.*, 1998; Bittner *et al.*, 2001). La inducción de la expresión del gen *nced*, en condiciones de estrés hídrico, se ha observado en raíces y hojas en varias especies incluyendo *P. vulgaris* y *Arabidopsis*. Adicionalmente, la sobre-expresión del gen *Atnced3* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* aumentan los niveles de ABA y la tolerancia a la deshidratación (Tian *et al.*, 2004; Melhorn *et al.*, 2008).

Por vías catabólicas los niveles de ABA activo en las plantas pueden disminuirse por un proceso de degradación y por la conjugación con azúcares. En el proceso de degradación, el ABA es primero hidrolizado a 8'-hidroxi ABA (C-8'), el cual es convertido a ácido faseico. La familia de genes *P450 CYP707* de *Arabidopsis* codifica para las enzimas que catalizan este paso (Kushiro *et al.*, 2004). El análisis de estos genes indica que su expresión está regulada tanto por estrés como por desarrollo. En la otra vía, el ABA es conjugado con la glucosa por una ABA glucosiltransferasa para obtener una forma fisiológicamente inactiva, ABA glucosil ester (Hirayama y Shinozaki, 2007) que es liberada por una β -glucosidasa (BG). En *Arabidopsis* se determinó que la proteína AtBG1 está involucrada en la regulación de los niveles endógenos de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2007). En *Arabidopsis* se induce la expresión de varios genes *cyp70a* en respuesta a deshidratación y más aún durante la rehidratación. Igualmente se ha observado que los tratamientos de estrés activan la AtBG1 a través de polimerización. La liberación del ABA por la AtBG1 es suficiente para inducir la expresión de genes de respuesta a estrés, lo cual sugiere que la AtBG1 contribuye al aumento de los niveles intra y extracelulares de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2007).

En muchos casos, las mutantes *aba* (con reducidos niveles de ABA endógeno) y *abi* (insensibles al ABA) han sido usadas para apoyar la hipótesis de que el ABA

endógeno regula la expresión génica (Chandler y Robertson, 1994). La mayoría de estas mutantes muestran una excesiva pérdida de agua debido a los defectos en la regulación estomatal, la cual lleva a un incremento en la tendencia a marchitez. Igualmente, genes que se regulan a través del ABA presentan en estas mutantes niveles muy bajos de expresión durante las diferentes condiciones de estrés y durante la embriogénesis (Giraudat *et al.*, 1994)

Recientemente se han descrito varios receptores potenciales de ABA que incluyen una proteína FCA que regula el tiempo de floración (Razem *et al.*, 2006), la subunidad H de una Mg-quelataza (Shen *et al.*, 2006) y la proteína G (GCR2) acoplada a receptor (Liu *et al.*, 2007). Estudios en los que se ha utilizado el ABA conjugado a una proteína o a un compuesto químico han indicado sitios de reconocimiento para el ABA tanto en la superficie celular como en los espacios intracelulares (Bray, 1997; Finkelstein *et al.*, 2002). La identificación de varios receptores parece consistente con estas observaciones; sin embargo, aún no está claro si estos receptores están involucrados en vías de señalización que modifican las respuestas de las plantas a los estreses ambientales. Después de tratamientos con ABA en las células se acumulan segundos mensajeros como Ca^{2+} y ácido fosfatídico (PA). Además se han descrito otros segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Laloi *et al.*, 2004; Pitzschke *et al.*, 2006) el óxido nítrico y componentes relacionados con los fosfolípidos, como el fosfatidil inositol 3-fosfato y el inositol trifosfato (Hirayama y Shinozaki, 2007). Igualmente hay evidencias que revelan la conexión entre los segundos mensajeros y los componentes de las vías de señalización en respuesta al ABA. Se han identificado dos proteínas fosfatasa de la clase 2C serina/treonina (PP2Cs), la ABI1 y la ABI2, que se han colocado en la parte superior de la vía de transducción. Las mutantes en estos genes, *abi1-1* y *abi2-1*, son denominadas marchitas, carecen de dormancia y tienen una sensibilidad reducida a ABA exógeno respecto a la inhibición de la germinación (Koornneef *et al.*, 1984). Estas actúan paralelamente a la vía mediada por la adenosin 5'-difosfato ribosa cíclica (cADPR) y el Ca^{2+} (Himmelbach *et al.*, 1998; Himmelbach *et al.*, 2003). Se ha sugerido que las

fosfatasa (PP2Cs) son parte de un mecanismo de control negativo ejercido por un represor que ejerce su control negativo en forma fosforilada y se inactiva al ser desfosforilado por las fosfatasa. En este contexto, la activación de las fosfatasa (PP2Cs) por un incremento en el pH inducido por ABA, lleva a la inactivación del represor y, por tanto, promueve la señalización de la vía de cADPR (Himmelbach *et al.*, 2003). Igualmente se ha encontrado que las especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂ reducen la actividad PP2C de ABI1 y ABI2 *in vitro*.

Estudios recientes han mostrado una conexión entre la PP2C y una kinasa relacionada a SNF1 (SnRKs), específicamente kinasas tipo SnRK2 y SnRK3. Estudios genéticos y bioquímicos han mostrado la función clave de la SnRK2 en el movimiento de los estomas, la expresión de genes en respuesta a ABA y las respuestas a ABA durante condiciones de estrés y en la germinación (Johnson *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2007). Además, OST 1, una proteína kinasa que media la regulación de la apertura de los estomas en respuesta a ABA en *Arabidopsis*, requiere una función normal de ABI1 para su activación dependiente del ABA. La SnRK2s para su activación necesita la fosforilación en varios residuos Ser/Thr en el lazo P, lo que sugiere que otras kinasas pueden funcionar por encima de la SnRK2s en la vía de señalización de ABA (Kobayashi *et al.*, 2005). Alternativamente estos residuos podrían autofosforilarse, en respuesta a algunos estímulos que activan estas kinasas, y PPC2 podría regular su estado. Debido a la importancia del Ca²⁺ como segundo mensajero en la respuesta a ABA, la función de CDPK en respuesta a ABA ha sido ampliamente estudiada (Cheng *et al.*, 2002). En estudios recientes se identificó la función de CDPK en la respuesta a ABA al comprobarse que AtCPK32 regula factores de transcripción relacionados con el ABA (ABRE BINDING FACTOR) como el 4/ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (AREB) (Choi *et al.*, 2005). ABA también activa cascadas de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y se ha encontrado que la fosforilación en muchos factores de transcripción de respuesta a ABA y a estrés es necesaria para su funcionamiento (Yamaguchi-Shinosaki y

Shinosaki, 2006). Recientemente también se ha acumulado evidencia que sugiere que la respuesta a ABA incluye metabolismo de RNAm. Aunque la vía de señalización que se genera a través de ABA durante el estrés aún no se ha caracterizado completamente, a través de muchos estudios se ha encontrado evidencia de que esta vía interactúa con otras vías de señalización que tampoco han sido descritas. Por ejemplo la expresión del gen *lea cor47* presenta un efecto aditivo en respuesta a tratamientos de ABA y manitol (Chak *et al.*, 2000). Estos investigadores, usando mutantes semi-dominantes *abi1* y *abi2*, encontraron que la expresión génica estaba más dañada en *abi2* en respuesta a estrés inducido por manitol que en la mutante *abi1*. Es probable que en la respuesta a estrés haya vías solapadas o en interacción, las cuales son dependientes e independientes ABA (Bray, 2002).

Expresión de genes durante el estrés dependiente de ABA

Se ha determinado que una parte importante de la respuesta fisiológica a ABA se da a través de la expresión génica *de novo* (Bohnert y Jensen, 1996). Muchos genes que se expresan durante la fase tardía de desarrollo del embrión pueden ser inducidos por el ABA exógeno en embriones y tejido vegetativo (Mundy y Chua, 1988). También se ha determinado que los niveles endógenos de ABA se incrementan en diferentes condiciones de estrés, incluido el déficit hídrico. Estos datos, junto con el estudio de promotores y la caracterización de las mutantes deficientes en ABA de *A. thaliana* y de maíz, apoyan la participación del ABA endógeno en la regulación de la expresión de genes durante estrés. Estos cambios en la expresión génica le pueden conferir a la planta la habilidad para responder apropiadamente al estrés y sobrevivir a dicha condición. Sin embargo, no todos los genes que se inducen bajo estrés tienen una función adaptativa, ya que muchos de estos cambios en la expresión son efectos de daños a nivel celular. Las plantas sometidas a déficit hídrico presentan alteraciones en procesos fisiológicos y metabólicos, como reducción en las tasas de fotosíntesis, disminución de la síntesis de proteínas totales y en las tasas de crecimiento. Estas

alteraciones pueden ocasionar un cambio en el nivel de expresión de genes específicos que indica el daño y que no están involucrados en procesos de adaptación a la condición estresante.

Los genes inducidos durante estrés a través del ABA pueden dividirse en dos grupos. Están los que se inducen por ABA y cuya expresión es independiente de la síntesis de proteínas, es decir, donde no se requiere síntesis de proteínas *de novo* para su inducción. De otro lado, están los genes inducidos por ABA de una manera dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). La disección funcional de los promotores de los genes que responden al ABA, basada principalmente en sistemas de expresión transitoria, ha permitido la identificación de varios elementos en cis involucrados en la expresión de genes por ABA (Bray, 2002; Hirayama y Shinozaki, 2007).

En la regulación transcripcional de genes por el ABA se han identificado factores que actúan tanto en *cis* como en *trans*. La caracterización de los promotores de los genes inducibles por ABA, *Em* de trigo y *rab16A* de arroz, mostró que un elemento en *cis* conocido como ABRE (*Abscisic Acid Response Element*) es importante para la transcripción dependiente de ABA (Guiltinan *et al.*, 1990). Actualmente, más de 20 elementos tipo ABRE funcionales han sido hallados en promotores de genes que responden al ABA. El elemento es definido como una secuencia de 8-10 pares de bases con una secuencia ACGT, que corresponde al núcleo o centro del factor transcripcional en *cis* conocido como caja G. Las secuencias que flanquean el núcleo de ACGT son importantes para el funcionamiento *in vivo* de este elemento. Estudios de expresión indican que la secuencia (C/T) ACGTGG C es un ABRE fuerte; sin embargo, otras secuencias son igualmente funcionales (Busk y Pagés, 1998). En plantas se han clonado varios factores de transcripción en *trans* con dominios básicos, tipo cremalleras de leucina (bZip), que se unen al ABRE como dímeros.

El ABRE no es el único elemento que tiene un núcleo de ACGT; estos elementos ACGT son hallados en muchos promotores y median la inducción por luz, anaerobiosis, luz UV y ácido cumárico. Por tanto, es evidente que, además del núcleo ACGT, otros factores son importantes para determinar su especificidad. Por tal razón, no todas las secuencias que tienen un núcleo de ACGT funcionan como ABRE, aunque estén en un promotor de un gen inducible por ABA. Así, el elemento ABRE es una secuencia que contiene un ACGT y que está definido más por su función, ya que las secuencias que lo flanquean no muestran consenso (Busk y Pagés, 1998).

Para los genes *hva1* y *hva22* se encontró que además de los elementos que contienen núcleos de ACGT se requieren secuencias adicionales denominadas CE (*coupling elements*) para mediar la inducción de estos genes en respuesta a ABA (Shen *et al.*, 1996). A partir del análisis de estos promotores, se determinó el complejo mínimo de respuesta a ABA (ABRC) que consta de un *coupling element* y un ABRE capaces de conferir inducción por ABA a un promotor mínimo (Vasil *et al.*, 1995). Las secuencias de los elementos CE son diferentes pero presentan un alto contenido de citocinas y guaninas. Los ABRC también pueden estar compuestos por dos cajas G, como sucede en el promotor del gen *Em* de trigo. En contraste, otros ABRC constan de un ABRE y de un elemento en *cis* no relacionado con la caja G (Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998).

Entre los elementos que median la respuesta al ABA se han descrito elementos tipo Myb y Myc en el gen *rd22* de *A. thaliana*. Puesto que estos elementos median la respuesta del gen *rd22* a estrés hídrico y parecen regular la inducción de una manera dependiente de la síntesis de proteínas, se ha sugerido que Myb y Myc pueden regular genes cuya inducción por ABA depende de la síntesis de proteínas, lo cual no sucede en la regulación vía ABRE (Iwasaki *et al.*, 1995; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Abe *et al.*, 1997). Sin embargo, los genes *rab16A* y *OsEm* que están regulados a través de ABRE requieren síntesis

de proteínas para su inducción, y esta regulación podría depender de la síntesis *de novo* de una proteína tipo cremallera de leucina (bZip).

Otros elementos en *cis* involucrados en la inducción de la transcripción por ABA incluyen el sph o AS CE que media la inducción del gen C1 en el endospermo de maíz (Hattori *et al.*, 1992), un elemento del promotor del gen *cdet274-45* de *C. plantagineum* y el motivo TT del gen *dc3* de zanahoria (Kim *et al.*, 1997); este último motivo es considerado como un ABRE imperfecto.

Expresión de genes durante el estrés independiente de ABA

Aunque la expresión de muchos genes que se inducen durante estrés hídrico se incrementa considerablemente por aplicaciones de ABA, no hay una correlación consistente entre los niveles de mRNA y los niveles de ABA en estas condiciones. Estas evidencias sugieren fuertemente que la expresión de algunos genes durante deshidratación es total o parcialmente independiente de ABA (Chandler y Robertson, 1994). Se ha planteado que esto podría sugerir la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante estrés. Algunos estudios que involucran aplicaciones exógenas de ABA indican que los niveles de expresión de genes inducidos por ABA pueden ser incrementados por factores adicionales presentes solamente en plantas estresadas (Chandler y Robertson, 1994). De esta manera, las plantas no estresadas carecen de los elementos capaces de interactuar con ABA, y por tanto no alcanzan los niveles adecuados de expresión presentes en la condición de estrés. Estos factores, presentes en las plantas estresadas, podrían interactuar sinérgicamente con los factores inducidos por ABA para generar una respuesta mayor.

Cabe señalar que algunos genes son inducidos por ABA, pero su expresión durante deshidratación es independiente de ABA. Por ejemplo el gen de la kinasa *RPK1*, aislado de *A. thaliana*, es inducido tanto por deshidratación como por tratamiento con ABA (Hong *et al.*, 1997). Al examinar la respuesta a

deshidratación de este gen en las mutantes de *A. thaliana* deficientes en la síntesis de ABA (*aba-1*) y en las mutantes insensibles (*abi-1*, *abi-2* y *abi-3*), se encontraron los mismos niveles de mRNA respecto a las plantas control.

Analizando el promotor del gen *rd29A* de *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) se identificó un elemento en *cis* de 9 pares de bases, de respuesta a deshidratación (DRE). Este elemento DRE es necesario para la inducción por estrés del gen *rd29A*, aun en ausencia de niveles elevados de ABA. La misma secuencia ha sido hallada en promotores de otros genes que responden a ABA (Busk *et al.*, 1997) y en genes regulados por estrés osmótico y baja temperatura en *Arabidopsis* (Iwasaki *et al.*, 1995). Estos genes se inducen por el respectivo estrés en las mutantes de *A. thaliana* *aba* o *abi*, lo cual sugiere que la expresión de estos genes bajo estrés no requiere ABA, aunque respondan a tratamientos con ABA. Estas observaciones prueban que la habilidad de un gen para responder a ABA, en condiciones óptimas de crecimiento, no implica necesariamente que la respuesta de este gen bajo estrés esté regulada a través de ABA. Es posible que ABA participe como modulador de la expresión de este gen en otras condiciones de estrés o de desarrollo. Varios factores de transcripción, que interactúan con la secuencia DRE de 9 pares de bases, han sido detectados en extractos nucleares de plantas de *Arabidopsis* no tratadas y deshidratadas (Nakashima *et al.*, 2000). La sobre-expresión de los genes *rd29A* y *dreb1a* de *Arabidopsis* en plantas de papa produjeron un incremento en la tolerancia al congelamiento (Behnam *et al.*, 2007). Recientemente, en *Arabidopsis*, se descubrieron dos proteínas, DRIP1 y DRIP2, que interactúan con el factor DREB2A y que *in vitro* pueden mediar la ubiquitinización de este factor, funcionando como reguladores negativos en la respuesta de las plantas a estrés hídrico (Qin *et al.*, 2008).

Con base en estos datos, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (1996) plantean la existencia de al menos cuatro vías independientes de regulación génica durante estrés hídrico: dos dependientes de ABA (una dependiente de la síntesis de

proteínas y la otra independiente de la síntesis de proteínas) y dos independientes de ABA, a través del elementos tipo DRE/CTR (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Se ha demostrado que la vía independiente para frío también está regulada por elementos tipo DRE/CTR que responden exclusivamente a frío (Nakashima *et al.*, 2000).

El gen *St aldehído abscísico oxidasa* codifica para la enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del ABA (Figura 7), en donde el aldehído abscísico (ABAld) es convertido a ABA. Esta enzima requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica.

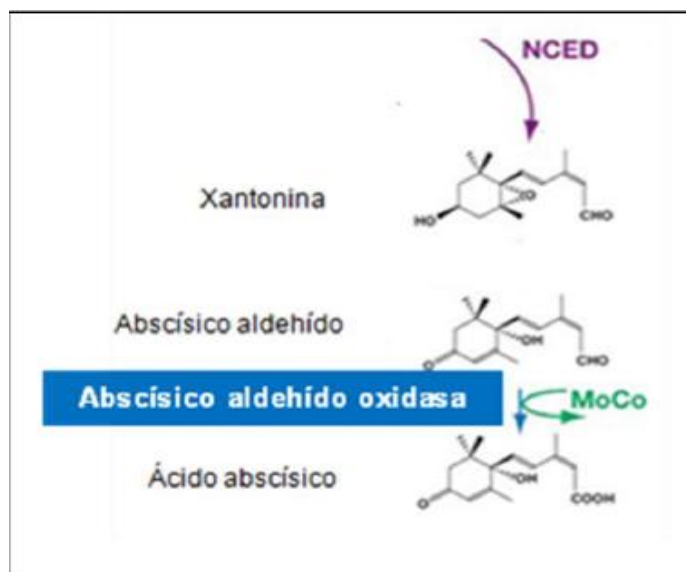


Figura 7. Últimos pasos de la biosíntesis del ABA. La xantonina es oxidada en el citoplasma a ABAld (Abscísico aldehído) mediante una enzima simple SDR1 (Deshidrogenasa/Reductasa de Cadena Corta). Finalmente, el ABAld es convertido a ABA por la enzima aldehído abscísico oxidasa, la cual requiere de un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica. Modificado de Nambara y Marion-Poll, 2005.

IV. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Mejoramiento Molecular Hortícola, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación “La Platina”, Santiago, Chile.

Esta investigación en particular fue financiada por el Proyecto FONTAGRO AT/OC- 11943-RG: Adaptación de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático (2010-2013), bajo guía y supervisión de la Dra. María Teresa Pino Quezada, directora del proyecto y la asesoría técnica y científica de Francisca Aguayo (Ing. en Biotecnología Molecular, Msc).

1. Material Vegetal:

En este estudio se usaron plantas de papa, *Solanum tuberosum*, genotipos:

- R89063-59 (Línea avanzada)
- R877009-28 (Línea avanzada)
- Desireé (variedad)
- Patagonia (variedad INIA)

2. Tratamiento de estrés hídrico

Los distintas variedades de *Solanum tuberosum* (sección 2) utilizadas en este trabajo fueron sometidas de manera previa a tratamientos de estrés hídrico en invernadero, bajo condiciones controladas de temperatura $24^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ y humedad. Las condiciones experimentales del tratamiento de estrés fueron montadas (Salazar, 2012) con las siguientes especificaciones.

Las papas fueron establecidas en maceteros de 7 L de capacidad, utilizando como sustrato la mezcla en proporción 1:1 de turba y perlita. Dicha turba está bajo el nombre comercial de Sunshine N°6 (Sun Gro, Canadá). Cada planta fue regada según los tratamientos descritos a continuación.

Fueron evaluadas tres condiciones hídricas: 100% (sin restricciones de riego), 50% (con la mitad de restricciones de riego) y 25% (con restricciones de riego).

A partir de la tuberización (Día 0) se comenzó a aplicar los distintos niveles de riego a las variedades de papa. El diseño del ensayo fue uno de bloques completos al azar, con 18 tratamientos: 6 variedades/línea de papa y 3 niveles de riego. Se establecieron 4 bloques, constituyendo cada uno una repetición. Los riegos se efectuaron tres veces por semana. Para determinar el volumen a aplicar por día, se pesó una maceta por variedad antes y después de regar a capacidad de campo. El volumen de agua a aplicar quedó determinado como la diferencia entre ambos pesos. Los volúmenes determinados para aplicar fueron constantes a lo largo del ensayo. Para el tratamiento del 100%: 1000 ml, para el 50%: 500 ml y para el 25%: 250 ml.

Para este estudio se tomaron muestras de hojas jóvenes (tomando la hoja completamente extendida) de las cuatro variedades de papa mencionadas, los días: 0, 7, 14 y 28. Una vez recolectadas las muestras fueron transportadas en nitrógeno líquido y luego almacenado a -80°C para su conservación (Salazar, 2012).

3. Extracción de ARN

El ARN total fue aislado de tejidos congelados a -80°C de hojas de plantas jóvenes (sección 3.2) utilizando el protocolo descrito en el manual de los fabricantes de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU). Para lo cual, se pesaron aproximadamente 100 mg de hojas de papa y se homogenizo con

ayuda de nitrógeno líquido, en un mortero frío previamente esterilizado. Se obtuvo un polvo fino al cual se le agregó 1 ml de Trizol[®] Reagent y se trituro la muestra, para luego traspasar a un eppendorf de 1,5 ml. Con ayuda de un vórtex se agito e incubo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó cloroformo (0,2 ml por ml de Trizol utilizado). Se agito con la mano volteando suavemente durante 15 segundos y se incubo 3 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron dos fases, una inferior, de fenolcloroformo y otra acuosa, superior, donde está en RNA. Se recuperó la fase acuosa (superior) en un eppendorf de 1,5 ml.

Luego se agregó Isopropanol puro (0,5 ml por cada ml de Trizol), luego se volteó con la mano e incubo 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugo a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se agito en vórtex por un segundo. Las muestras fueron centrifugadas a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4°C, y desechado el sobrenadante, luego el precipitado se secó con ayuda de un baño seco a 60°C durante 15 minutos aproximadamente hasta que se evaporo todo el etanol. Se mantuvieron los tubos en hielo y fueron resuspendidos en 40 µl de agua DEPC (tratada con dietilpirocarbonato al 0,1 % (v/v)).

3.1 Cuantificación y análisis de calidad mediante espectrofotometría

Todas las extracciones de ARN fueron cuantificadas (A260) y analizadas para constatar su pureza (razones A260/280 y A260/230) utilizando un espectrofotómetro (nanodropNanoVue™ Plus, GE Healthcare). El valor de la relación A260/280 aceptadas para extracciones puras de ARN debe estar cercano a 1.8 y 2.0 respectivamente, y para la relación A260/230 deben estar entre 1.8 y 2.2. Los valores que se encuentren alejados en ambos parámetros, revelan la presencia de solventes orgánicos, sales, proteínas y fenoles.

3.2. Limpieza de RNA

Debido a que algunas muestras de RNA no se encontraban dentro de los parámetros de pureza (sección 4.1), se debió realizar a cada muestra una limpieza para eliminar restos de fenoles que podrían estar presentes.

Para esto se agregó 0,2 volumen de acetato de sodio (3M) y 2 volúmenes de Etanol (100%) con respecto al volumen en que se re suspendió cada muestra. Se incubó a 4°C toda la noche, luego se centrifugó (17.000 rpm durante 15 minutos a 4°C) y lavó 2 veces con 500 µl Etanol (70%). Posteriormente se centrifugó (17.000 rpm durante 5 minutos a 4°C) y se secó con ayuda de un baño seco por 15 minutos aproximadamente a 60°C y se procedió a resuspender las muestras en 20 µl de agua DEPC.

4. Síntesis de cDNA

4.1 Tratamiento con DNasa

Debido a que ningún método de extracción de ARN permite asegurar que las muestras obtenidas se encuentren libres de ADN contaminante, se realizó un tratamiento con DNAsas a cada muestra.

Para realizar el tratamiento se utilizó el ARN extraído (100 ng/µl), el cual se mezcló con 1,5 µl Buffer con MgCl₂ (10X) y 1 µl de DNasa I (1U/ µl; Thermo Scientific #EN0521) y se completó con agua DEPC (dietilpirocarbonato) hasta alcanzar un volumen total de 15 µl.

Se incubó a 37°C por 45 minutos en termociclador Xp Cyclor (Bioer), posteriormente las muestras fueron almacenadas en hielo por un corto tiempo y luego se les agregó 1 µl EDTA (50 µM). Se incubaron en el termociclador a 65°C durante 10 minutos.

4.2 Síntesis de cDNA a partir de mRNA (RT-PCR)

El RNA previamente tratado con DNAsas fue utilizado para sintetizar cDNA mediante transcripción inversa, empleando la retrotranscriptasa (200U/ μ l) M-MLV (Fermentas #EP0441) Para llevar a cabo la síntesis se utilizaron 11,5 μ l (100 ng/ μ l) de RNA, los cuales fueron mezclados con 1 μ l de primer Oligo dT18 (8 μ m), obteniéndose un volumen final de 12,5 μ l. La mezcla se incubó a 65°C durante 5 min en un termociclador Xp Cycler (Bioer). Posteriormente las muestras fueron ubicadas en hielo y se les agregó un 7,5 μ l de un mix el cual contenía: 4 μ l de buffer 1X, 0,5 μ l RiboLock RNAsa, Thermo Scientific (40U/ μ L), 1 μ l de M-MLV Transcriptasa Reversa (200U/ μ L), llegando a un volumen total de 20 μ l. Luego se incubo en el termociclador a 25°C por 10 minutos; 42°C por 60 minutos y finalmente a 70°C por 10 minutos.

5. Análisis por RT-PCR semi-cuantitativo

Para poder realizar el análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo, se utilizaron partidores específicamente diseñados para hibridar con los genes en estudio AAO y Dhn10 (Velasco R, 2012). Cada par de partidores fueron estandarizados con el fin de establecer la temperatura de alineamiento y el número de ciclos óptimos para el análisis de expresión mediante PCR semi-cuantitativo de los genes de interés.

Para el gen *AAO* y *Dhn10* se utilizó una mezcla de reacción, cuyo detalle se describe en tabla 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Describe los reactivos utilizados en la reacción RT-PCR para en gen AAO.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración
Buffer PCR	2.0	10x
MgCl ₂	1.6	25mM
H ₂ O Free	10.4	
Cdna	2.0	50 ng/ μ l
dNTP's	0.8	10 mM
Primer	1.5 c/u	5 μ M)
Taq Polimerasa	0.2	5U/ μ l)
Volumen total	20	

Las secuencias de los primers que fueron utilizados son: para Dhn10 Forward 5'TATTTGGAAAGTTTGCTGG y Reverse: 5'-AAGTGTTTGTCTGGGTCATC-3'. y para AAO el partidor Forward 5'ATCACAAAGATGGAAAAG y Reverse: 5'TCTAATCACTGTCGCTGC--3'.

Tabla 2: Reactivos utilizados en la reacción RT-PCR para en gen *Dhn10*.

Reactivo	Volumen (μl)	Concentración
Buffer PCR	2.0	10x
MgCl ₂	1.6	25mM
H ₂ O Free	12.4	
Cdna	1.0	50 ng/ μ l
dNTP's	0.8	10 mM
Primer	1.0 c/u	5 μ M)
Taq Polimerasa	0.2	5U/ μ l)
Volumen total	20	

Las muestras se amplificaron en un Termociclador Xp Cyler (Bioer) con un programa de 34 ciclos a 94°C por 40s, 48°C por 40s y 72°C por 1 minuto, considerando como inicio un ciclo de 94°C durante 4 minutos y un ciclo final de 72°C durante 10 minutos.

Como control interno se utilizó la proteína ribosómica 60S, gen que ha sido utilizado previamente como gen normalizador en experimentos de análisis de expresión de *Solanum tuberosum* (Carvallo et al., 2011). Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron los partidores Forward: 5'-ACAATGGCGGCTAAGAAGA-3' y Reverse: 5'-TGCCCATAAACCCCTTTTGTG-3', en una mezcla de reacción descrita en Tabla 3.

Las muestras fueron amplificadas en un Termociclador con un programa de 24 y otro de 34 ciclos a 94°C por 40s, 55°C por 40s y 72°C por 1 minuto. Considerando como inicio un ciclo de 94°C durante 4 minutos y un ciclo final de 72°C durante 10 minutos. Para cada reacción se utilizó como control positivo una dilución del DNA genómico de la variedad R89063-59 de *Solanum tuberosum* y como control negativo se reemplazó el volumen de templado por agua libre de nucleasas.

Tabla 3: Reactivos utilizados en la reacción RT-PCR para en gen 60S.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración
Buffer PCR	2.0	10x
MgCl ₂	1.6	25mM
H ₂ O Free	9.4	
Cdna	2.0	50 ng/ µl
dNTP's	0.8	10 mM
Primer	2.0 c/u	5 µM)
Taq Polimerasa	0.2	5U/µl)
Volumen total	20	

7. Electroforesis en geles de agarosa

Se visualizó el DNA amplificado a partir de PCR, en geles de agarosa al 3% que contenía EtBr. Se utilizó el peso molecular GeneRuler DNA Ladder de 50 pb (Fermentas #SM0371, USA) y se cargaron las muestras previamente mezcladas con el buffer de carga DNA Loading Dye 6X (Fermentas, USA). Los geles de agarosa migraron en una diferencia de potencial eléctrico de 80V durante una hora en la cámara de electroforesis (CONSORT NV, HV13, BELGIUM). Las bandas de DNA fueron identificadas en el transiluminador (ULTRA LUM INCV, EACS-20, USA) y fotografiadas para su posterior análisis.

III. RESULTADOS PRELIMINARES (NO COMPLETOS)

1. Determinación de la integridad del ARN extraído en papa (*Solanum tuberosum*).

Para realizar análisis de expresión es fundamental obtener RNAs integros y de buena calidad. Fue considerado un objetivo la obtención de RNAs de buena calidad para los análisis de expresión que se realizaron. Mediante espectrofotometría, se determinó que las muestras de RNA eran de alta pureza y concentración ($A_{260}/A_{280} \sim 2,0$; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las muestras que no cumplían con los parámetros, requeridos fueron tratadas con un protocolo de limpieza (Sección 4.2) para eliminar algún agente contaminante presente, logrando así mejorar la calidad de estos.

Por electroforesis, se observaron las bandas correspondientes a ARN ribosomal 28S y 18S (Chomczynski, 2006) confirmando la integridad del ARN extraído. En Figura 8 es posible observar una imagen representativa de lo observado para

muestras de RNA de calidad apropiada.

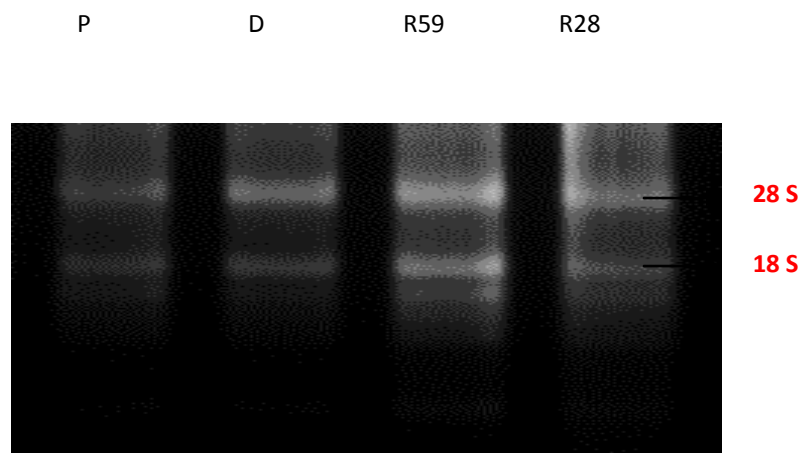


Figura 8: Determinación de la Calidad e integridad de los RNA. Cuatro genotipos de papa, (*Solanum tuberosum*) Patagonia, Desiré, R89063-59 y R877009-28, en una condición de riego (25%). Gel de agarosa (2 %) teñido con bromuro de etidio muestra las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S.

2. Síntesis de cDNA.

Se realizó la síntesis de cDNA, a partir de los RNAs extraídos y se realizó una prueba mediante PCR para confirmar que estos se encontraban en óptimas condiciones para ser utilizados en experimentos posteriores. Las reacciones de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al (3 %) con Bromuro de etidio, evaluando la presencia de una banda de amplificación de 105 pb para el gen DHN10, y 100 pb para el gen de control interno (60S).

Como se observa en la figura 9 (A) se pudo identificar una banda de amplificación que se encontraba alrededor de los 105 pb correspondiente al gen Dhn10 en R89063-59, el cual nos indica que la calidad de la síntesis de cDNA se encontraba en óptimas condiciones. Para la figura 9 (B) se observan las bandas de amplificación (100 pb) utilizando la proteína ribosómica 60S, la cual fue amplificada con 24 ciclos, en donde se encuentra en fase exponencial en la

reacción de PCR, es por esto que las bandas se observan menos intensas en comparación con la figura 9 (C) en donde se aplicaron 34 ciclos en la reacción de PCR, utilizando el gen 60S. Las bandas de amplificación tienen una mayor intensidad debido a que estas se encontraban en condiciones saturantes, que solo se utilizaron para comprobar que la síntesis de Cdna se encontraba en óptimas condiciones.

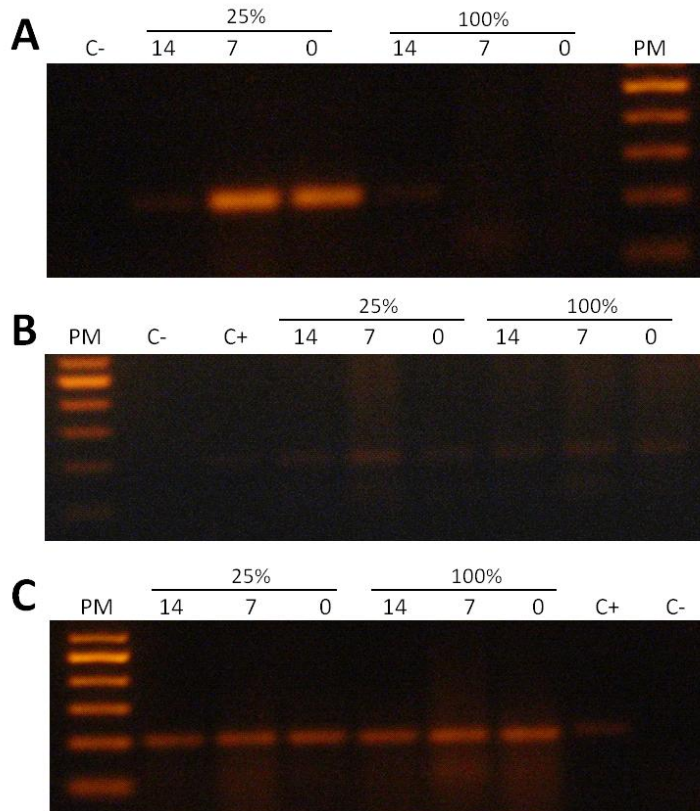


Figura 9: Amplificación para el gen Dhn10 en papa a partir de síntesis de Cdna. Para el genotipo R89063-59 (*Solanum tuberosum*) utilizando como normalizador la proteína ribosómica 60S, en tres días (0,7 Y 14) y dos condiciones de riego (25% y 100%). (A) Amplificación para el gen Dhn10 (105 pb), (B) Amplificación de PCR utilizando 24 ciclos para el gen 60S Y (C) Amplificación de PCR utilizando 34 ciclos para el gen 60S.

Hasta la fecha se ha llevado a cabo el análisis de solo la variedad (R89063-59), lo cual fue considerado como prueba de que la síntesis de cDNA como la metodología ha sido bien ejecutada

3. Expresión relativa del gen *Dhn10*

Se analizó la expresión relativa del gen *Dhn10* utilizando como control interno la proteína ribosómica 60S. Para esto se realizó el análisis de los datos a través de un programa (Image J). Este programa es ideal para comparar bandas de la misma calidad digital. Está basado en el hecho de que la densidad óptica (OD) es una función logarítmica del brillo. Se analizó la densidad de cada banda, tomando como referencia una de las bandas del peso molecular. Una vez obtenidos todos los valores de las bandas de los genes de interés del estudio, se procedió a normalizarlos con respecto a los valores de 60S y se graficó la expresión relativa de dichos genes, con respecto a cada tratamiento y periodos de tiempo (días).

4. Estandarización del número de ciclos para el gen normalizador 60s.

Se procedió a realizar la estandarización del número de ciclo para la amplificación por RT-PCR utilizando el gen normalizador 60s, el cual fue analizado a partir de los valores obtenidos en el programa Image J.

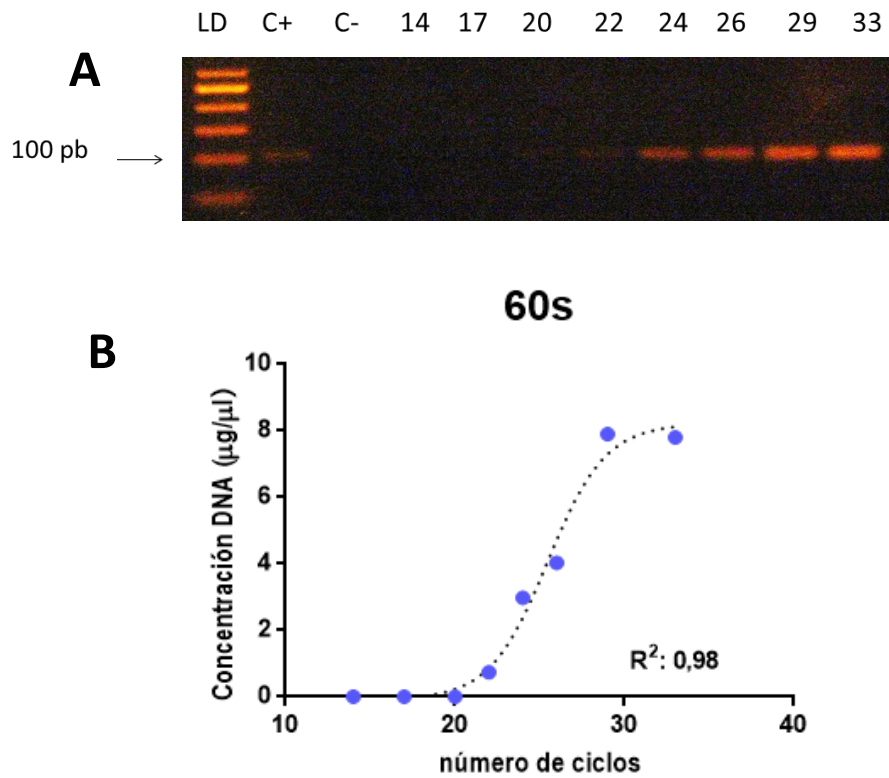


Figura 10: Estandarización del número de ciclos para el análisis de expresión del gen de control interno 60S. En (A) Se observa un gel de agarosa con bromuro de etidio, en donde se observa el producto de amplificación esperado de 100 pb correspondientes al gen normalizador 60S a diferentes números de ciclos (14-33 ciclos). En (B) se observa la gráfica obtenida de la cuantificación de cada banda (panel A) utilizando el programa Image J. Los datos fueron ajustados a una curva de tipo sigmoideal, con una regresión cuadrática de 0,98 utilizando el programa Graphpad. Como control positivo de reacción de PCR (C+) se usó DNA genómico de *S. Tuberosum* y como control negativo (C-), se reemplazó el DNA templado por agua libre de nucleasas. LD: estándar de peso molecular.

IV.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Carvallo, M.; Pino, M.T.; Jeknić, Z.; Zou, C.; Doherty, C.; Shiu, S.; Chen, T. and Thomashow, M. (2011) A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance—*Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* (Epub ahead of print).

Cavalieri & Huang, 1979; Aspinall & Paleg, 1981. Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo.

CGIAR. (2007). Global Climate Change: Can Agriculture Cope. Consulta en línea: 2012-06-10, <http://www.cgiar.org/impact/global/climate.html>

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159

FAO. (2010). FAO statistics database on the World Wide Web. Consulta en línea: 2012-06-06 <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>.

Galau, G.A., Hughes, D.W., y Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (LEA) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* Vol. 7, Págs. 155-170.

- Ingram, J., y Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 47, Págs. 277-403.

- IPCC. (2007). Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza. Consulta en línea: 2012-04-24 http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_sp.pdf

- Nambara, E., Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism, *Annu. Rev. Plant Biol.* Vol. 56, Págs. 165-185

- ODEPA. (2009). El mercado de la papa 2008 – 2009. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Chile. Consulta en línea: 2012-06-06, <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2237.pdf>

- ODEPA. (2010). El mercado de la papa 2009 – 2010. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura. Chile. Consulta en línea: 2012-06-06, <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2385.pdf>

- Park, T.-H., Vleeshouwers, V.G.A.A., Jacobsen, E., van der Vossen, E. y Visser, R.G.F. (2009). Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breed.* Vol. 128, Págs. 109-117.

- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*. Vol. 410, Págs. 327-33

INVITACIÓN

Francisco Salazar S. Director del Centro Regional de Investigación INIA Remehue, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, tiene el agrado de invitar a usted al Seminario – ***Adaptación de los sistemas productivos de papa y trigo al cambio climático, proyectos FONTAGRO ATN/OC-11943 y Cambio Climático 501364-70.***

Este seminario tendrá lugar el Jueves 29 de agosto de 2013, a las 9:00 hrs. en el auditorium de INIA Remehue, ubicado 8 km, al norte de Osorno.

Agradecemos confirmar asistencia a con la Secretaria Yasna Agoni M.
Teléfono (64) 2334872 e-mail: yagoni@inia.cl



PROGRAMA

Horario	Tema	Expositores
09:00-09:30	Inscripción y acreditación de participantes.	
09:30-10:00	Bienvenida y Saludo Institucional.	Dr. Francisco Salazar S., Director INIA Remehue
10:00-10:20	Presentación proyecto Adaptación de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático (Chile, Perú y Uruguay).	Dra. María Teresa Pino (INIA La Platina)
10:20-10:40	Trigo: diversidad genética y búsqueda de variedades tolerantes a sequía.	Dr. Iván Matus (INIA Quilamapu)
10:40-11:00	Técnicas de caracterización en trigo para tolerancia a sequía y altas temperaturas en Chile y Uruguay: variedades y líneas tolerantes a sequía.	Dr. Luis Inostroza (INIA Quilamapu)
11:00-11:30	Café.	
11:30-12:00	Papas: diversidad genética y búsqueda de variedades tolerantes a sequía.	Dr. Julio Kalazich (INIA Remehue)
12:00-12:20	Técnicas de caracterización en papas para tolerancia a sequía y altas temperaturas en Chile y Perú.	Dr. Patricio Sandaña (INIA Remehue)
12:20-12:40	Plan de Adaptación al Cambio Climático, MINAGRI.	Daniel Barrera Pedraza. Especialista en Cambio Climático Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA
12:40- 13:00	Mesa redonda y principales conclusiones.	Expositores
	COCTEL.	



**Evento:Seminario Adaptación de los sistemas productivos de papa y trigo al cambio climático, proyecto FONTAGRO ATN/OC-119
INIA REMEHUE, 29 DE AGOSTO DE 2013**

N°	Rut	Apellidos	Nombre	Dirección	Comuna	Télefono	E-mail	Institución/Predio
1	08760698-8	ACUÑA BRAVO	IVETTE	ruta 5 norte km. 8	OSORNO	334800	iacuna@inia.cl	INIA
2	13554441-8	BARRERA	DANIEL	TEATINOS 40 PISO 6	SANTIAGO CENTRO		dbarrera@odepa.cl	ODEPA
3	12593104-9	BRANDT	ARACELY	BOLIVIA 498	SAN PABLO	87722007	chelybrandt@hotmail.com	PRODESAL SAN PABLO
4	10864741-8	BRAVO H.	RODRIGO	INIA REMEHUE	OSORNO	334800	rbravo@inia.cl	INIA REMEHUE
5	09887060-1	CARCAMO	MARCELO	QUILMAHUE KM. 21	SAN PABLO	78860208	marcarpar_63@hotmail.com	I. MUNICIPALIDAD SAN PABLO
6	16111637-8	CASAS PINOL	GUISELA	Chillán 938, Rahue bajo	OSORNO	76246278	guiselacasaspinol@gmail.com	UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
7	14542544-1	CASTRO URRUTIA	INGRID	Freire 980	OSORNO	64 -254288	labnirs@cooprinsem.cl	COOPRINSEM
8	19675169-6	CHAVEZ	FRANCO	poblacion anahuac	PUERTO MONTT	86109317		liceo bosque nativo
9	14101667-9	DAMIAN	ERWIN	SECTOR QUILEN	SAN PABLO	79448940		PRODESAL SAN PABLO
10	10131622-K	DEL RIO	ROSIEL	CASILLA 180	PURRANQUE	83413170	rdelrio@inia.cl	INIA LA PAMPA
11	09190783-6	FAJARDO	JUAN	JUAN RENOUS 1310	OSORNO	53967208	jff11@live.cl	Particular
12	12838954-7	FOLCH PAIVA	CAROLINA	RUTA 5 SUR, KM. 8	OSORNO	64-2334800	cfolch@inia.cl	INIA
13	12745385-3	FRANCO T.	JAIME	JUAN PABLO II N°80 2º PISO	PANGUIPULL I	87495079	jfrancot@gmail.com	PRODESAL
14	07076830-5	GAETE CASTAÑEDA	NELBA	KM. 10 CAMINO CAJON A VILCUN	VILCUN	45-2297100	ngaete@inia.cl	INIA
15	06910112-7	GAJARDO RODRIGUEZ	PEDRO	BAQUEDANO 049	EL CARMEN	042-2661076/ 93133758	pgajardorodriguez@gmail.com	AGRICOLA EL CARMEN LIMITADA
16	13057298-7	GALLARDO	MARCOS		PANGUIPULL I	88750864	marcog06@gmail.com	PRODESAL Modulo Pocura
17	12161150-3	GALLARDO WOMPE	HARNO	Freire 980	OSORNO	64 -254288	serviciomuestreo@cooprinsem.cl	COOPRINSEM
18	15271348-7	GARCIA	CAROLA	BOLIVIA 498	SAN PABLO	79210344	carog4@hotmail.com	PRODESAL SAN PABLO
19	13955300-4	INOSTROZA	LUIS	avda. vicente mendez 515	CHILLAN		linostroza@inia.cl	INIA
20	06747565-8	KALAZICH B.	JULIO	ruta 5 norte km. 8	OSORNO	334800	jkalazic@inia.cl	INIA
21	22080736-3	LAGOS MARTINEZ	JOSUE	RUTA 5 SUR KM. 8 SECTOR REMEHUE	OSORNO	64-2334800	josue.lagos@inia.cl	inia
22	06626024-0	LOPEZ	MARIA ELITA		OSORNO	64-333452	melopez@ulagos.cl	UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS
23	08325090-9	MATUS	IVAN	AVDA. VICENTE MENDEZ 515	CHILLAN		imatus@inia.cl	INIA

**Evento:Seminario Adaptación de los sistemas productivos de papa y trigo al cambio climático, proyecto FONTAGRO ATN/OC-119
INIA REMEHUE, 29 DE AGOSTO DE 2013**

N°	Rut	Apellidos	Nombre	Dirección	Comuna	Télefono	E-mail	Institución/Predio
24	12706724-4	MENDEZ ARIAS	CRISTIAN	ANTONIO VARAS 99	CALBUCO	65-2461213	cmendeza@indap.cl	INDAP
25	06229056-0	MENESES	GUSTAVO	RUTA 5 SUR KM. 8	OSORNO	64-2334800	gmenezes@inia.cl	INIA
26	13293243-3	MUÑOZ DAVID	MANUEL	Campus Isla Teja, Valdivia	OSORNO	90520376	manuelmun@gmail.com	Universidad Austral de Chile
27	12164291-3	MUÑOZ REYES	ALICIA	ANTONIO VARAS 99	CALBUCO	98176858	amunozr@indap.cl	INDAP CALBUCO
28	11503346-8	ORENA ALVARADO	SANDRA	RUTA 5 NORTE KM 8	OSORNO	334800	sorena@inia.cl	INIA
29	07036307-0	ORTEGA KLOSE	FERNANDO	KM 10 CAMINO CAJON A VILCUN	TEMUCO		fortega@inia.cl	INIA
30	06998350-2	PALMA	JUAN CARLOS	CARRERA 61	TEMUCO	235688	juancarlos.palma@biosemillas.cl	BIOSEMILLAS
31	13710159-9	PASTENE	ISAIAS	SECTOR HUELECO	SAN PABLO	78164334	impa25@hotmail.com	PARTICULAR
32	09647265-K	PINO	MARIA TERESA		SANTIAGO SUR	2 577 9100	mtpino@inia.cl	INIA
33	15651950-2	RIOS ALVIAL	PAOLA ANDREA	Camino Cajón Vilcún	TEMUCO	045 297100	prios@inia.cl	INIA
34	15278229-2	ROGEL	LISBETTE ROGEL	CASILLA 165	RIO BUENO	77485136	lizbethrogel@gmail.com	Prodesal San Pablo
35	04517422-0	ROJAS	JOSE SANTOS		OSORNO	334800	josesantosrojas@hotmail.com	particular proyecto fondecyt
36	14276394-K	SAEZ	VERONICA	HUELECO	SAN PABLO	83792491	vesa5690@hotmail.com	PRODESAL SAN PABLO
37	07459227-9	SAEZ VASQUEZ	CARLOS	Ruta 215 km. 12 s/n	OSORNO	77645126	saezvas@gmail.com	Particular
38	07368800-0	SANDAÑA	PATRICIO	ruta 5 sur, km. 8	OSORNO	64-2334800	patricio.sandana@inia.cl	INIA
39	16206700-1	SANDOVAL	CAMILA	ruta 5 norte km. 8	OSORNO	334800	camila.sandoval@inia.cl	INIA
40	15273342-9	SCHOBITZ	RICARDO	MANUEL RODRIGUEZ 1040	OSORNO	254223	rschoebitz@cooprinsem.cl	COOPRINSEM
41	12193230-K	SOTOMAYOR TORRES	LORENA	Camino Cajón Vilcún	TEMUCO	95408949 / 045-297100	lsotomay@inia.cl	INIA Carillanca
42	13811838-K	TORO	PEDRO	KM. 10 CAMINO CAJON A VILCUN	VILCUN	45-2297100	pedro.toro@inia.cl	INIA
43	08831003-9	URIBE G.	MARCO	RUTA 5 NORTE KM. 8	OSORNO	334800	muribe@inia.cl	INIA
44	06828872-K	VALDEBENITO BURGOS	ALDO	RUTA 5 SUR, KM. 8 SECTOR REMEHUE	OSORNO	64-2334800	avaldebe@inia.cl	INIA
45	16047013-5	VARGAS CARDENAS	RODRIGO		OSORNO	92 30 25 43	rodrigovargas.inia@gmail.com	
46	12753756-9	VARGAS OJEDA	MINCY	ruta 5 norte km. 8	OSORNO	334800	mincy5@gmail.com	INIA

43 y Cambio Climático.

Cargo/Actividad	Rubro	Asi sti
ing. agronomo ph.d. fitopatologa	Papa	
INGENIERO FORESTAL		
EXPERTO AGRARIO	Leche,Papa	
ING. AGRONOMO MSc.	Praderas	
AGRICULTOR	Papa	
TESISTA AGRONOMIA	Carne,Leche,Pa pa	
Ing. Agrónomo	Praderas	
estudiante		
agricultor	Papa,Praderas	
TECNICO CARNE	Carne,Frutales, Leche	
Ingeniero Agrónomo	Papa	
Ing. Agronomo, JEFE TECNICO MOD. POCURA	Papa	
ingeniero agronomo		
INGENIERO AGRONOMO	Papa	
	Papa,Praderas	
TECNICO AGRICOLA	Praderas	
TECNICO AGRICOLA	Papa	
	Papa,Praderas	
investigador	Papa	
	Medio Ambiente,Prad	
INGENIERO AGRONOMO		

43 y Cambio Climático.

Cargo/Actividad	Rubro	Asi sti
EJECUTIVO INTEGRAL		
Ingeniero Agronomo, Doctor en Ciencias Agrarias	Medio Ambiente,Papa	
INGENIERO AGRONOMO		
ing. agronomo	Papa	
INVESTIGADOR	Praderas	
GERENTE TECNICO	Praderas	
AGRICULTOR		
INGENIERO AGRONOMO	Papa	
ING. AGRONOMO	Papa	
JEFE TECNICO UNIDAD OPERATIVA N° 3	Papa	
ing. agronomo	Papa	
agricultora	Papa,Praderas	
Ingeniero Ejecución	Papa	
	Papa	
BIOTECNOLOGO	Papa	
ING. AGRONOMO	Papa	
Tecnico en Adm Agropecuaria. CTE Borde Costero	Papa	
	Papa	
tecnico agricola	Papa	
	Medio Ambiente,Papa	
BIOLOGO MOLECULAR	Papa	
tecnico forestal	Papa	

Adaptación al cambio climático

Fotografías El Austral
cronica@australosorno.cl

En Inia Remehue se realizó un seminario de adaptación al cambio climático de los sistemas productivos de trigo y papa. La actividad consideró la participación de especialistas de distintas zonas de Chile y contó con el apoyo de profesionales de Uruguay y del Centro Internacional de la Papa, con sede en Perú.



Luis Hinostroza, María Teresa Pino, Patricio Sandaña e Iván Matus.



Guisela Casas, Annelore Winckler y Mincy Vargas.



José Santos Rojas, Pedro Gajardo y Julio Kalazich.



Gustavo Meneses, Luis Opazo y Aldo Valdebenito.



Marco Uribe, María Elita López y Sandra Orena.



Rodrigo Vargas y Manuel Muñoz.



María Teresa Mundaca, Ivette Acuña y Fernando Ortega.



Pedro Toro, Lorena Sotomayor y Paola Ríos.

Gota de Leche

● Invita a una misa en memoria de las socias fallecidas, a efectuarse el martes 3 de septiembre, a las 12 horas, en la parroquia San Francisco. ☞

Magallánicos en Osorno

● Cita a reunión el jueves 5 a las 19.30 horas, en las oficinas de la Creo, en calle Justo Geisse 851. Se invita a los magallánicos residentes en Osorno a incorporarse a nuestro grupo. ☞

Guías turísticos adultos mayores

● Se cita a asamblea mensual a los socios del grupo de guías turísticos adultos mayores en dependencias de UCAM, el día 5 de septiembre, a las 10 horas. La presidenta. ☞

Hogar de la Madre Campesina

● Cita a su reunión mensual el miércoles 4, a las 15.30 horas, en el lugar de costumbre. ☞

Hogar Alemán

● La Corporación Alemana de Beneficencia Osorno cita a reunión de directorio para hoy martes 3, a las 15.30 horas, en calle Buenos Aires 814. La presidenta. ☞

Parroquia Lourdes

● Invita a la comunidad a celebrar el primer jueves de cada mes la Adoración al Santísimo, entre las 19 y 20 horas en su templo de calle República. ☞



SEMINARIO
 "Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"
 Auditorium INIA-Quilamapu
 Chillán, Octubre 09 de 2013

certificados

N°	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
1	Ampaño Guíñez	Prodesal, Quillón		amparoguinez@yahoo.es	
2	Carol Ricciardi	INIA Quilamapu		carol.ricciardi@inia.cl	
3	Cecilia Santelices S.	INIA Quilamapu	92007317	csanteli@inia.cl	
4	Claudia Sánchez Ocares	Universidad de Concepción		claudiafersanch@udec.cl	
5	Cristian Villa	Prodesal 5, San Carlos	87841714	cristiandocvet@gmail.com	
6	Daniel Barrera Pedraza	Expositor			
7	Eliecer González	Prodesal 4, San Carlos		eligob@live.com	
8	Esteban Pedreros	Prodesal, Coelemu			
9	Evelyn Sandoval	Prodesal 2, San Carlos	8855 3730	evemart@gmail.com	
10	Fabián Iturra	Prodesal 1, San Carlos		iturra.04@gmail.com	
11	Francisco Zambrano	INIA Quilamapu		francisco.zambrano@inia.cl	
12	Francois Gilbert	INIA Quilamapu		franris.gilc@gmail.com	
13	Fredy Garrido V.	Prodesal Chillán	88422394	fredy-garrido@hotmail.com	
14	Geraldine Martínez V.	Universidad de Concepción		gemartinez@udec.cl	
15	Gonzalo Salazar	Prodesal II, El Carmen		gonzalosalazarcasanova@gmail.com	



SEMINARIO

"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"

Auditorio INIA-Quilamapu

Chillán, Octubre 09 de 2013

Nº	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
16	Iván Matus T.	Expositor			
17	Jabín Herrera Mora	SAT, El Carmen	77692506	jabinh@hotmail.com	
18	Jans Rivas Goudet	Prodesal, Coihueco		jansrivas@gmail.com	
19	Jessica Riquelme Sánchez	Prodesal Ñiquén		jeriquelc@gmail.com	
20	Jorge Carrasco Fernández	INIA Quilamapu		Jorggcf@hotmail.es	
21	Jorge Fuentealba	Prodesal 1, Coelemu		prodesalcoelemu@yahoo.es	
22	Jorge González	Expositor			
23	Jorge Rubilar	Prodesal 4, El Carmen		jo.r.g@live.cl	
24	José Mercado	Prodesal 5, San Carlos		inspepo@hotmail.com	
25	Juan Montecinos	Prodesal, El Carmen	94867005	juanmontecinos@hotmail.com	
26	Juan Sáez	Prodesal Yumbel	93767553	jeduardosaez@hotmail.com	
27	Juio Kalazich	Expositor			
28	Lorena Uribe	Prodesal Yumbel		lorenauribe07@yahoo.es	
29	Luis Fuentealba M.	Prodesal 1, Coelemu		prodesalcoelemu@yahoo.es	
30	Luis Inostroza	Expositor			

certificado

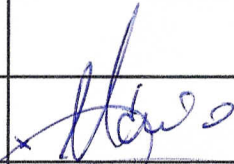
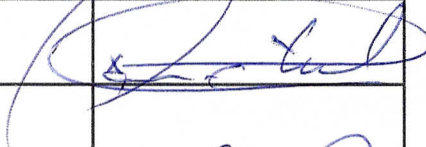
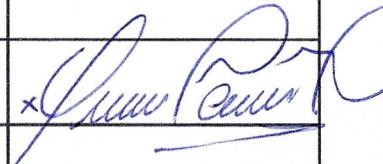



SEMINARIO

"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"

Auditorio INIA-Quilamapu

Chillán, Octubre 09 de 2013

N°	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
31	Luis Llanos	INIA Quilamapu			
32	María Camila Salvo	Prodesal 4, El Carmen		mariacamilasalvo@gmail.com	
33	María Teresa Pino	Expositor			
34	Mario Meza	Prodesal 1, San Carlos		mmeza17@hotmail.com	
35	Michel Chopa	Prodesal San Carlos	94698720	michelchopa@gmail.com	
36	Natalia Bengoa F.	Prodesal 4, El Carmen		nnatjul@gmail.com	
37	Oscar Acuña Aguilera	Prodesal 2, Quillón	83207514	tprodesal2@quillon.cl	
38	Oscar Acuña Guíñez	Prodesal 4, Quillón		oscar.acunez@gmail.com	
39	Oscar Cofré S.	Prodesal 2, Coelemu		o.cofresanhueza@yahoo.es	
40	Pablo Novoa B.	Universidad de Concepción	97892917	panovoa@udec.cl	
41	Patricio del Campo	Prodesal 4, Coelemu	81290759	prodesalcoelemu4@yahoo.es	
42	Patricio Saldaña	Expositor			
43	Pedro Gajardo <i>2.</i>	Agrícola El Carmen	93133758	pgajardo.rodriguez@gmail.com	
44	René Vidal	Prodesal 4, San Carlos	99783855	renevidal73@gmail.com	
45	Roberto Vaccaro Cisternas	Agrícola El Carmen	67278889	revaccif@gmail.com	



SEMINARIO

"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"

Auditorio INIA-Quilamapu

Chillán, Octubre 09 de 2013

Nº	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
46	Rodrigo Alarcón	Prodesal 4, San Carlos		rodalar@gmail.com	
47	Rodrigo Avilés	INIA Quilamapu			
48	Samuel Urzúa				
49	Pablo Romero	Southbeef	96968923	mromloz@yahoo.com.au	
50	Herman ^{Aarón} Pérez	Imia Quilamapu		hacuno@inia.cl	
51	Catalina Vazquez	Imia Quilamapu		catavarez@votec.cl	
52	Gaston Lopez	Prodesal San Carlos	91655472	gastalopez@gmail.com	
53	Edgardo Mundaca	Particular	89717771	edgardo_mundaca@yahoo.es	
54	Pablo Grau Allende		94428828	pablograuallende@gmail.com	
55	Pablo Jimenez	Ni queen	81499659	pjimenezqna@gmail.com	
56	Sergio Uribe	Municipalidad San Ignacio	98686634	sproductivo@muni.sanignacio.cl	
57	Pablo Amigado	Particular	99934018	pabloamigado1960@gmail.com	
58	Alvaro Villalobos	votec	89990862	agricola.villalobos@gmail.com	
59	Celso Quezada	votec	208927	cequezad@votec.cl	
60	Alejandro Peña	Imia Quilamapu	66710686	alejandropena1960@gmail.com	



SEMINARIO

"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"

Auditorium INIA-Quilamapu

Chillán, Octubre 09 de 2013

Nº	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
61	Dalma Costello	Inia Quilamapu	79663532	dalmacostello@iniao.cl	
62	Rosana Simelcal <i>Instituto 1%</i>	Particular	96003328	rosanamatuw@gmail.com	
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					



SEMINARIO
 "Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"
 Auditorium INIA-Quilamapu
 Chillán, Octubre 09 de 2013

N°	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
1	Ampaño Guíñez	Prodesal, Quillón		amparoguinez@yahoo.es	
2	Carol Ricciardi	INIA Quilamapu		carol.ricciardi@inia.cl	
3	Cecilia Santelices S.	INIA Quilamapu		csanteli@inia.cl	
4	Claudia Sánchez Ocares	Universidad de Concepción		claudiafersanch@udec.cl	
5	Cristian Villa	Prodesal 5, San Carlos		cristiandocvet@gmail.com	
6	Daniel Barrera Pedraza	Expositor			
7	Eliecer González	Prodesal 4, San Carlos	88075964	eligob@live.com	
8	Esteban Pedreros	Prodesal, Coelemu			
9	Evelyn Sandoval	Prodesal 2, San Carlos		evemart@gmail.com	
10	Fabián Iturra	Prodesal 1, San Carlos	76258146	iturra.04@gmail.com	
11	Francisco Zambrano	INIA Quilamapu		francisco.zambrano@inia.cl	
12	Francois Gilbert	INIA Quilamapu			
13	Fredy Garrido V.	Prodesal Chillán		fredy-garrido@hotmail.com	
14	Geraldine Martínez V.	Universidad de Concepción		gemartinez@udec.cl	
15	Gonzalo Salazar	Prodesal II, El Carmen		gonzalosalazarcasanova@gmail.com	



SEMINARIO
 "Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"
 Auditorium INIA-Quilamapu
 Chillán, Octubre 09 de 2013

N°	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
16	Iván Matus T.	Expositor	✓		
17	Jabín Herrera Mora	SAT, El Carmen			
18	Jans Rivas Goudet	Prodesal, Coihueco		jansrivas@gmail.com	
19	Jessica Riquelme Sánchez	Prodesal Ñiquén	78454361	jeriquelc@gmail.com	
20	Jorge Carrasco Fernández	INIA Quilamapu			
21	Jorge Fuentealba	Prodesal 1, Coelemu		prodesalcoelemu@yahoo.es	
22	Jorge González	Expositor	✓		
23	Jorge Rubilar	Prodesal 4, El Carmen		jo.r.g@live.cl	
24	José Mercado	Prodesal 5, San Carlos	9400 9242	inspepo@hotmail.com	
25	Juan Montecinos	Prodesal, El Carmen		juanmontecinos@hotmail.com	
26	Juan Sáez	Prodesal Yumbel		jeduardosaez@hotmail.com	
27	Juio Kalazich	Expositor			
28	Lorena Uribe	Prodesal Yumbel	89919564	lorenauribe07@yahoo.es	
29	Luis Fuentealba M.	Prodesal 1, Coelemu		prodesalcoelemu@yahoo.es	
30	Luis Inostroza	Expositor	✓		



SEMINARIO
"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"
Auditorium INIA-Quilamapu
Chillán, Octubre 09 de 2013

Nº	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
31	Luis Llanos	INIA Quilamapu			
32	María Camila Salvo	Prodesal 4, El Carmen		mariacamilasalvo@gmail.com	
33	María Teresa Pino	Expositor			
34	Mario Meza	Prodesal 1, San Carlos		mmeza17@hotmail.com	
35	Michel Chopa	Prodesal San Carlos		michelchopa@gmail.com	
36	Natalia Bengoa F.	Prodesal 4, El Carmen		nnatjul@gmail.com	
37	Oscar Acuña Aguilera	Prodesal 2, Quillón		tprodesal2@quillon.cl	
38	Oscar Acuña Guíñez	Prodesal 4, Quillón		oscar.acunez@gmail.com	
39	Oscar Cofré S.	Prodesal 2, Coelemu		o.cofresanhueza@yahoo.es	
40	Pablo Novoa B.	Universidad de Concepción		panovoa@udec.cl	
41	Patricio del Campo	Prodesal 4, Coelemu		prodesalcoelemu4@yahoo.es	
42	Patricio Saldaña	Expositor			
43	Pedro Gajardo	Agrícola El Carmen			
44	René Vidal	Prodesal 4, San Carlos		renevidal73@gmail.com	
45	Roberto Vaccaro Cisternas	Agrícola El Carmen		revaccif@gmail.com	




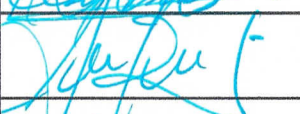
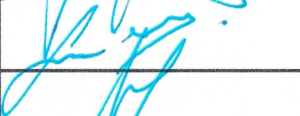
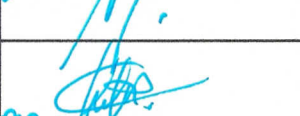
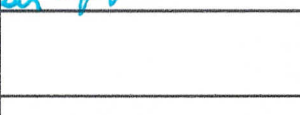


SEMINARIO

"Adopción de los Sistemas Productivos de Papa y Trigo al Cambio Climático"

Auditorio INIA-Quilamapu

Chillán, Octubre 09 de 2013

Nº	Nombre	Empresa	Fono	Correo Electrónico	Firma
46	Rodrigo Alarcón	Prodesal 4, San Carlos		rodalar@gmail.com	
47	Rodrigo Avilés	INIA Quilamapu			
48	Samuel Urzúa				
49	Roberto Ramírez	MyV. - Stgo.	9-56394869	rramirez@myv.cl	
50	Wilson Yáñez	Inia	62959324	wilson.yanez@inia.cl	
51	Fernando Cortés	Indep.	42 28 3041	fcortes@indep.cl	
52	Cesar Flores	Niquén	90545694	florsquiroy@hotmail.com	
53	Angel Garay	Munic. San Ignacio	56637248	angelgm73@gmail.com	
54	Fco. Garay	✓	74980225	garay003@hotmail.com	
55	Mario Huilaco				
56	Conila Sáez	Estudiante	97530136	conila_saez16@hotmail.com	
57					
58					
59					
60					