

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ANALIZAR LA EXPRESIÓN DEL GEN DE  
RESISTENCIA A NEMATODOS *Mi-1* BAJO  
CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO EN ESPECIES DE  
LA FAMILIA SOLANÁCEA, MEDIANTE LA TÉCNICA  
DE PCR EN TIEMPO REAL**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**CARLA ISABEL FLORES RODRIGUEZ**

**SANGOLQUÍ, 15 de enero de 2013**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO**

## **ELABORADO POR**

---

Srta. Carla Isabel Flores Rodríguez

## **COORDINADOR DE CARRERA**

---

Ing. Tatiana Páez

Sangolquí, 15 de enero de 2013

## CERTIFICACIÓN

Dra. Karina Isabel Proaño Tuma

Ing. Paola Karina Párraga Solórzano

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado **“Analizar la expresión del gen de resistencia a nematodos Mi-1 bajo condiciones de estrés salino en especies de la familia solanácea, mediante la Técnica de PCR en tiempo real”**, realizado por la Srta. Carla Isabel Flores Rodríguez, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas por la Escuela Politécnica del Ejército en el reglamento de estudiantes.

Debido a la relevancia científica expuesta en el presente trabajo de tesis, se recomienda su publicación.

Sangolquí, 15 de enero de 2013

---

Dra. Karina Isabel Proaño Tuma

DIRECTORA

---

Ing. Paola Karina Párraga Solórzano

CODIRECTORA

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, CARLA ISABEL FLORES RODRÍGUEZ, declaro que:

El proyecto de grado denominado **“Analizar la expresión del gen de resistencia a nematodos Mi-1 bajo condiciones de estrés salino en especies de la familia solanácea, mediante la Técnica de PCR en tiempo real”**, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan a lo largo de todo el trabajo y cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, autenticidad y alcance científico del proyecto de grado antes mencionado.

Sangolquí, 15 de enero de 2013

---

**Srta. Carla Isabel Flores Rodríguez**



## AUTORIZACIÓN

Yo, Carla Isabel Flores Rodríguez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación del trabajo **“Analizar la expresión del gen de resistencia a nematodos Mi-1 bajo condiciones de estrés salino en especies de la familia solanácea, mediante la Técnica de PCR en tiempo real”**, en la biblioteca virtual de la institución, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad.

Sangolquí, 15 de enero de 2013

---

**Srta. Carla Isabel Flores Rodríguez**



## **DEDICATORIA**

“...He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada”

Gabriel García Márquez

Dedico a mi Familia.

**Carla Isabel**



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por bendecirme con experiencias que solo han fortalecido y enriquecido mi vida.

A mi Familia, por su apoyo, los amo.

Agradezco a la Dra. Karina Proaño por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A la Ing. Paola Párraga por la atenta lectura de este trabajo, a la Dra. María Emilia por el tiempo y el apoyo otorgado, por último pero no menos importante, al Dr. Ricardo Oliva por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la tesis y sus atinadas correcciones.

Al Blgo. Francisco Jarrín, por su siempre ayuda incondicional.

A la Escuela Politécnica del Ejército y a todo su elenco de investigadores.

A todos, mi mayor reconocimiento y gratitud!

**Carla Isabel**



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO .....	i
CERTIFICACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN .....	v
DEDICATORIA .....	vii
AGRADECIMIENTOS .....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
LISTADO DE TABLAS .....	xiv
LISTADO DE CUADROS .....	xvi
LISTADO DE FIGURAS.....	xvii
LISTADO DE ANEXOS.....	xx
RESUMEN .....	xxi
ABSTRACT .....	xxii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Marco Teórico .....	4
1.4.1 La familia <i>Solanaceae</i> y el género <i>Solanum</i> .....	4
1.4.2 Sección <i>Lycopersicon</i> .....	6
1.4.2.1 <i>Solanum lycopersicum</i> .....	7
1.4.2.2 <i>Solanum pimpinellifolium</i> .....	9
1.4.3 Sección <i>Lasiocarpa</i> .....	10

1.4.3.1	<i>Solanum quitoense</i> .....	10
1.4.3.2	<i>Solanum vestissimum</i> .....	11
1.5	Estrés abiótico en plantas .....	12
1.5.1	La salinidad en la agricultura.....	13
1.5.1.1	Medición de la salinización .....	14
1.5.1.2	Tolerancia a la salinidad en plantas .....	15
1.5.1.3	Ingreso de los iones sodio y cloro a la planta.....	17
1.5.1.4	Respuesta y efectos de las plantas al estrés salino .....	22
1.5.1.5	Mecanismos de adaptación de las plantas al estrés salino .....	25
1.6	Vías de transducción de señales .....	26
1.7	Importancia de las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) .....	29
1.8	Gen <i>Mi-1</i> .....	30
1.9	Técnicas Moleculares.....	32
1.9.1	Extracción de ácidos nucleicos.....	32
1.9.2	PCR convencional .....	34
1.9.3	PCR en tiempo real .....	35
1.10	Análisis de expresión génica.....	38
1.11	Hipótesis .....	40
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>41</b>
2.1	Participantes.....	41
2.2	Zona de estudio.....	41
2.3	Período de inicio de la investigación.....	41
2.4	Diseño Experimental.....	41
2.5	Metodología.....	42
2.5.1	Material vegetal.....	42
2.5.1.1	Condiciones de cultivo .....	42
2.5.1.2	Tratamientos de estrés salino.....	43
2.5.2	Extracción y cuantificación de ADN genómico .....	44
2.5.3	Identificación de la región exónica del gen <i>Mi-1</i> en raíz.....	46
2.5.4	Extracción y cuantificación de ARN total.....	47
2.5.5	Síntesis de ADNc .....	48

2.5.6	Diseño de <i>primers</i> .....	49
2.5.7	PCR en Tiempo Real .....	51
2.5.7.1	Estandarización de las condiciones de amplificación .....	51
2.5.7.2	Cuantificación relativa de la expresión génica .....	53
2.5.8	Análisis estadístico .....	55
<b>CAPITULO 3: RESULTADOS .....</b>		<b>56</b>
3.1	Tratamiento de estrés salino .....	56
3.2	Identificación de la presencia del exón del gen <i>Mi-1</i> en raíz.....	58
3.3	PCR en Tiempo Real .....	60
3.3.1	Estandarización de la condiciones de amplificación.....	60
3.3.2.	Cuantificación relativa de la expresión génica en qRT-PCR.....	69
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....</b>		<b>80</b>
4.1	Efectos morfológicos y fisiológicos del estrés salino en plantas.....	80
4.2	Identificación de la presencia del exón del gen <i>Mi-1</i> en raíz.....	81
4.3	PCR en Tiempo Real .....	82
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....</b>		<b>88</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....</b>		<b>90</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>91</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1. 1</b> Escala de salinidad del extracto de pasta saturada. Tomado de: USDA Salinity Lab, 2010.....	14
<b>Tabla 1. 2</b> Umbral de tolerancia a la salinidad de diferentes cultivos. Tomado de: Mass, 1990. ....	16
<b>Tabla 1. 3</b> Efectos del estrés salino en plantas. Modificado de: Lynch & Launchli, 1984; Sies, 1986; Lichtenthaler H. K. 1996; Bouchereau <i>et al</i> 1999; Munns & Perl-Treves y Perl, 2002; Fricke & Peters, 2002; Hartung <i>et al</i> 2002; Sharp & LeNoble, 2002; Bagni <i>et al</i> 2006; Wasternack, 2007; Tester, 2008; Aleman, 2009. ....	24
<b>Tabla 2. 1</b> Descripción de las entradas de Solanáceas utilizadas en el estudio. ....	42
<b>Tabla 2. 2</b> Cantidad de ADN de acuerdo a la intensidad de banda del marcador Low DNA Mass Ladder Tomado de INVITROGEN, 2002.....	45
<b>Tabla 2. 3</b> Condiciones de la Master mix empleadas para la ampliación del exón gen <i>Mi-1</i> . ...	46
<b>Tabla 2. 4</b> Programa de PCR estandarizado para la ampliación de la región exónica del gen <i>Mi-1</i> .....	47
<b>Tabla 2. 5</b> Número de accesoión de los genes utilizados para el diseño de <i>primers</i> . Datos obtenidos de <i>NCBI, 2012</i> . ....	50
<b>Tabla 2. 6</b> Condiciones generales de Master mix.....	51
<b>Tabla 2. 7</b> Programa de PCR para la ampliación de los genes GAPDH y <i>Mi-1</i> . ....	52
<b>Tabla 2. 8</b> Condiciones de la Master Mix empleadas para la ampliación. ....	53
<b>Tabla 2. 9</b> Programa de PCR en Tiempo Real estandarizado para la ampliación.....	53
<b>Tabla 3. 1</b> Comportamiento de la eficiencia fotosintética ( <i>Fv/Fm</i> ) en función al tiempo de exposición de NaCl a diferentes concentraciones. ....	58
<b>Tabla 3. 2</b> Concentración de ADN de las muestras obtenidas mediante DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, 2006). ....	59
<b>Tabla 3. 3</b> Concentración de ARN de las muestras obtenidas mediante TRIzol® reagent de Invitrogen®.....	61
<b>Tabla 3. 4</b> Descripción de las características de los de los <i>primers</i> diseñados para qRT-PCR. 64	

<b>Tabla 3. 5</b> Valores de Ct promedio, fd y Va de ADNc .....	70
<b>Tabla 3. 6</b> Análisis estadístico ANOVA de la expresión génica de <i>Lemmi9</i> . .....	75
<b>Tabla 3. 7</b> Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de <i>Lemmi9</i> por especie. 75	
<b>Tabla 3. 8</b> Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de <i>Lemmi9</i> por tiempo de exposición .....	76
<b>Tabla 3. 9</b> Análisis estadístico ANOVA de la expresión génica de <i>LE<math>\alpha</math>-DOXI</i> .....	77
<b>Tabla 3. 10</b> Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de <i>LE-<math>\alpha</math>-DOXI</i> por especie .....	77
<b>Tabla 3. 11</b> Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de <i>LE-<math>\alpha</math>-DOXI</i> por tiempo de exposición .....	78

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 2. 1</b> Características de los <i>primers</i> empleados para identificar la región exónica de gen <i>Mi-1</i> en los genotipos de <i>Solanum spp.</i> .....	46
--	----

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1. 1</b> Relación esquemática de los clados del género <i>Solanum</i> .....	5
<b>Figura 1. 2</b> Fotografías de flores y frutos de tres especies de solanáceas. A. <i>Solanum lycopersicum</i> , B. <i>Solanum quitoense</i> y C. <i>Solanum mammosum</i> . Tomado de: Solanacea Surce, 2012.....	6
<b>Figura 1. 3</b> Fotografía de <i>Solanum lycopersicum</i> . A. Hojas, B. Flor y C. Fruto.....	8
<b>Figura 1. 4</b> Fotografía de <i>Solanum pimpinellifolium</i> . A. Frutos y B. Flores.....	9
<b>Figura 1. 5</b> Fotografía de <i>Solanum quitoense</i> . A. Hoja B. Flor C. Fruto.....	11
<b>Figura 1. 6</b> Fotografía de <i>Solanum vestissimum</i> en el Herbario Nacional de US.....	12
<b>Figura 1. 7</b> Categorías de clasificación para cultivos tolerantes a la salinidad. ....	15
<b>Figura 1. 8</b> Comportamiento relativo de varias especies vegetales desde (I) halofitas extremas hasta (IV) verdaderas glicofitas. ....	16
<b>Figura 1. 9</b> Ruta simplástica y apoplástica para la incorporación de Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> a través de la raíz. ....	18
<b>Figura 1. 10</b> Movimiento del Na <sup>+</sup> a través de la membrana mediado por canales y sistemas de alta y baja afinidad de K <sup>+</sup> y de cationes. Modificado de: Yamaguchi & Blumwald, 2005.....	19
<b>Figura 1. 11</b> Mecanismo de ingreso, reconocimiento y compartimentación del Na <sup>+</sup> en la célula. Modificado de: Chinnusamy, 2005.....	19
<b>Figura 1. 12</b> Proceso de Flujo y recirculación del Na <sup>+</sup> en la planta. Modificado de: Epstein, 1998.....	21
<b>Figura 1. 13</b> Síndrome del estrés en plantas. Tomado de: García, 1998.....	22
<b>Figura 1. 14</b> Respuesta bifásica de la tasa de crecimiento en función del tiempo de exposición de sal para plantas que difieren en la tolerancia. Modificado de: Munns, 2005. ....	23
<b>Figura 1. 15</b> Vías de transducción de señales para estrés salino. Tomado de: Xiong <i>et al</i> 2002; Rodríguez <i>et al</i> 2005.....	27
<b>Figura 1. 16</b> Puntos de convergencia de rutas de señalización de estrés abiótico y biótico.....	29
<b>Figura 1. 17</b> Representación esquemática del producto codificado por el gen de resistencia <i>Mi-1</i> .....	30
<b>Figura 1. 18</b> Fases de una curva de amplificación de qRT-PCR. Modificado de: Rodríguez, 2012.....	36

<b>Figura 1. 19</b> Técnicas de detección por fluorescencia. A. Sondas hidrolizadas B. SYBER Green. Tomado de: Biosistemika, 2011.....	37
<b>Figura 1. 20</b> Análisis de disociación de un fragmento con la presencia de dímeros de primers. ....	38
<b>Figura 2. 1</b> Diseño factorial 4X4. Siendo, Tn los tiempos en que se va a analizar la expresión génica TnEn, en cada una de las especies En.....	42
<b>Figura 2. 2</b> Proceso de obtención de material vegetal a partir de semillas de solanáceas. A. Germinación en semilleros, B. Aparecimiento de las primeras hojas verdaderas, C. Trasplante a macetas y adaptación a cultivo hidropónico. ....	43
<b>Figura 3. 1</b> Comportamiento Fenotípico en los genotipos de <i>Solanum spp</i> a diferentes concentraciones de NaCl. S61: <i>Solanum pimpinellifolium</i> ; S60: <i>Solanum lycopersicum var. Syta</i> a: Flacidez foliar; b: Pérdida de la rigidez del tallo; c: Necrosis foliar; d:Clorosis; e:Marchitez y defoliación; f: Muerte. de; Día/s de exposición. N/C: Cambios no observados .....	57
<b>Figura 3. 2</b> Visualización del ADN genómico diluido a 10 ng/uL en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain correspondiente a las especies S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimum</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). 1kb y Low DNA Mass Ladder son los marcadores de peso molecular. La banda de 800 pb denota una concentración de ADN aproximada a 10 ng/uL.....	59
<b>Figura 3. 3</b> Visualización de los fragmentos de PCR amplificados para la región exónica del gen <i>Mi-1</i> , en gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBR® en las especies S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimum</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). High DNA mass ladder y Low DNA mass ladder son los marcadores de peso molecular.....	60
<b>Figura 3. 4</b> Visualización del ARN total en gel de agarosa al 2.5% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. S33 ( <i>Solanum quitoense</i> ), S38 ( <i>Solanum vestisimum</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). Tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. C: Tratamientos Control. T: Tratamientos Salinos. R: Repetición.....	62
<b>Figura 3. 5</b> Visualización del ADN complementario (ADNc) en gel de agarosa al 1.8% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimum</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). Tiempos de recolección 0, 8, 12 y 24 horas de cada especie tratada con 150 mM NaCl. 1Kb DNA Mass Ladder es el marcador de peso molecular.....	63

<b>Figura 3. 6</b> Visualización de los genes <i>Mi-1</i> (Mi) y <i>GAPDH</i> (GP), en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR®. S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular. ....	65
<b>Figura 3. 7.</b> Visualización de los genes <i>Mi-1</i> , <i>GAPDH</i> , <i>Lemmi9</i> y <i>Le-<math>\alpha</math>-DOX</i> en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR® en las especies S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular. ....	66
<b>Figura 3. 8.</b> Verificación de la presencia de los genes <i>Mi-1</i> , <i>GAPDH</i> , <i>Lemmi9</i> y <i>Lea-DOXI</i> en el transcrito (ADNc) en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR®. S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular. ....	67
<b>Figura 3. 9</b> Picos de disociación correspondientes a los genes <i>Mi-1</i> , <i>GAPDH</i> , <i>Lemmi9</i> , y <i>LE-<math>\alpha</math>-DOX</i> a una temperatura de fusión de 55.7 °C en las especies solanáceas S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ....	68
<b>Figura 3. 10</b> Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) vs. Numero de ciclo del gen constitutivo <i>GAPDH</i> . S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ....	69
<b>Figura 3. 11</b> Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen <i>Mi-1</i> relativo al gen constitutivo <i>GAPDH</i> . S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ....	71
<b>Figura 3. 12</b> Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen <i>Lemmi9</i> relativa al gen constitutivo <i>GAPDH</i> , en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ....	72
<b>Figura 3. 13</b> Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen <i>LE-<math>\alpha</math>-DOX</i> relativa al gen constitutivo <i>GAPDH</i> , en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ....	73
<b>Figura 3. 14</b> Expresión relativa del gen <i>Lemmi9</i> en las especies de solanáceas S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). He: horas de exposición con 150 mM de NaCl. ....	74
<b>Figura 3. 15</b> Expresión relativa del gen <i>LE<math>\alpha</math>-DOXI</i> en las especies de solanáceas S33 ( <i>S. quitoense</i> ), S38 ( <i>S. vestisimun</i> ), S60 ( <i>S. lycopersicum var. Syta</i> ) y S61 ( <i>S. pimpinellifolium</i> ). ...	76
<b>Figura 3. 16</b> Relación de la Eficiencia fotosintética (Fv/Fm) con la Expresión Génica. S61 ( <i>Solanum pimpinellifolium</i> ). he: 0, 8, 12 y 24 horas de exposición de 150 mM de NaCl. Medias $\pm$ SD, n=2; p<0.05. ....	79

## LISTADO DE ANEXOS

**ANEXO A** Fórmula de la solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950). ..... **¡Error! Marcador no definido.**

**ANEXO B** Criterio de diseño de primers para PCR en tiempo real usando SYBR-Green. Tomado de: Schmittgen (2006)..... **¡Error! Marcador no definido.**

**ANEXO C** Valores termodinámicos aceptables para el diseño de primers para PCR. Tomado de: Saikia, ( 2008). ..... **¡Error! Marcador no definido.**

**ANEXO D** Características de los primers en estudio obtenidos por el software Primer3. **¡Error! Marcador no definido.**

**ANEXO E** Características termodinámicas de los primers en estudio obtenidos por el software Oligo Analicer 3.1. A. Horquillas; B. Homodimeros y C. Heterodimeros.**¡Error! Marcador no definido.**

**ANEXO F** Identificación de similitudes locales realizada con el algoritmo en línea BLAST. A. GAPDH, B. Mi-1, C. Lemmi9 y D. LE $\alpha$ -DOX1. .... **¡Error! Marcador no definido.**

## RESUMEN

Este proyecto de investigación tuvo como finalidad identificar la expresión del gen *Mi-1* en el mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés. Adicionalmente, se analizó la expresión de los genes *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* involucrados en la adaptación y tolerancia a la salinidad.

Las respuestas fueron analizadas en tejido radicular recolectado de las especies de la familia solanácea "*Solanum lycopersicum var. Syta*" (Genotipo comercial), "*Solanum pimpinellifolium*", "*Solanum quitoense*" y "*Solanum vestisimum*" (genotipos silvestres) bajo condiciones de estrés salino. Las muestras fueron recolectadas a las 0, 8, 12 y 24 horas de exposición de 150 mM NaCl. Los resultados mostraron valores de Ct para los genes *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1*, y para el gen *Mi-1* fueron indeterminados. Estos resultados indicaron que el gen *Mi-1* solo media la resistencia en plantas cuando éstas han sido expuestas a un estrés de tipo biótico. La cuantificación génica relativa de los genes *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* sugiere que la sobre expresión del gen *Lemmi9* está involucrada directamente en la tolerancia a la salinidad en plantas silvestres, y el gen *LE $\alpha$ -DOX1* probablemente incrementa esta capacidad.

Los datos obtenidos suponen el primer paso para la obtención de variedades solanáceas de alto valor comercial, y con alto grado de tolerancia a salinidad en el Ecuador.

## ABSTRACT

The purpose of this research is identifying the roll of the genes *Mi-1*, *Lemmi9* and *LE $\alpha$ -DOX1* on the resistance mechanism of plants that offer resistance to saline environments.

The response of the Solanaceae family (*Solanum lycopersicum* var. *Syta*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum quitoense* and *Solanum vestisimum*), was analyzed for different conditions of saline stress. Samples of the root tissue were collected after 0, 8, 12 and 24 hours of exposure to 150 nM NaCl. Analysis of the Local Genomical Expression over the samples revealed no levels of *Mi-1*, contrasting to an obvious expression of the *Lemmi9* and *LE $\alpha$ -DOX*. This evidence suggests *Mi-1* just measures the plants resistance when they have been exposed to some kind of biotic stress. Additionally, the results of the samples relative genomic quantification implied a direct connection between the *Lemmi9* and the plants tolerance for saline environments. From the results, it is also suspected this plants' tolerance may be enhanced by *LE $\alpha$ -DOX*.

This can be considered as a first step towards creating highly valuable Solaneaceae, capable to tolerate highly saline environments.



# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

Uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola a nivel mundial es la salinización de los suelos, el cual es un problema que se deriva del exceso de pastoreo, la contaminación con agroquímicos, la deforestación de las áreas semihúmedas y semiáridas, y fundamentalmente de las prácticas de regadío (Dajic, 2006). Se estima que de los 230 millones de hectáreas de terreno sometidas a irrigación, cerca de 45 millones (el 19.5 %) tienen problemas de salinidad (Dajic, 2006), y cada año se suman a estas aproximadamente 2 millones de hectáreas más (1% del suelo agrícola a escala mundial) (Tujeda, 2007).

Según estimaciones de la FAO (2002), la tierra de regadío de los países en desarrollo aumentará un 27 por ciento entre los años 1996 y 2030, lo que conllevará a una progresiva degradación del suelo que lo inutilizará para la agricultura, además de ser un peligro para la seguridad alimentaria. Por otro lado, se estima que la población humana, alcance en el año 2050 cerca de 9.300 millones de habitantes, lo que hará necesario el aumento en un 50% de la producción global de alimentos (UNFPA, 2001).

La agricultura es la base fundamental de la estructura geoeconómica de muchos países de América Latina y el Caribe (FAO, 1997). En el Ecuador el 66.8% de los ingresos económicos de la población son generados por las actividades agrícolas (INEC, 2006), pero lamentablemente alrededor del 70,7 % de los productores sufren los efectos de la salinidad de los suelos (INIAP, 2005). Se han planteado diferentes soluciones para tratar de mitigar esta problemática social, económica y ambiental. Entre las prácticas de cultivo e implementación de planes de remediación se encuentran: el uso de aguas de alta calidad, la instalación de lavado y el drenaje de suelos, así como la eliminación del exceso de sodio mediante la adición de óxido o sulfato de calcio. Este tipo de soluciones son costosas y en muchos casos no son suficientemente eficaces (Galvez, 2009).

Una alternativa sostenible y sustentable es la aplicación de biotecnologías para la búsqueda y obtención de nuevas variedades de plantas tolerantes a condiciones adversas como la salinidad. Es de suma importancia establecer genotipos, cuya variabilidad genética sea conocida (Argentel, 2010), ya que los genotipos silvestres constituyen un importante *pool* genético para el fitomejoramiento de las variedades comerciales.

## **1.2 Justificación del problema**

El Ecuador dispone de una superficie de 25'637.000 ha de terreno cultivables, de las cuales 3'136.085 ha están bajo potencial riesgo debido a la alta salinidad (INIAP, 2005). El INIAP estima que en el país, apenas se riegan 572.000 ha de las cuales 295.000 ha corresponden a la Costa y 277.000 ha a la Sierra. El 34.2% de los productores en la costa y el 36.5% en la sierra sufren los efectos de la salinidad de sus suelos (INIAP, 2005).

La mayoría de productores del país se dedican a la siembra de cultivares de *Solanum spp.*, como el tomate de árbol con 14.748 ha (CORPEI, 2009), la naranjilla con 8.000 ha (INEC, 2002), el tomate de riñón con 4.169 ha. (MAG, 2006) y la papa con 49.729 ha (Agroecuador, 2002), ya que representan una fuente continua de ingresos al país debido a ser cultivos de ciclo corto (CIAT, 2006).

El estrés salino limita el rendimiento de los cultivos solanáceos. En el caso del tomate más del 30% de la producción se concentra en regiones secas con clima cálido, las cuales son las más vulnerables a la salinidad (FAO, 1995). En el caso de la producción de tomate en la península de Santa Elena, el riego en campo como en invernadero es una práctica imprescindible que aumenta el contenido de sales (Ungar, 1996; Terán, 2008) y el desequilibrio nutricional, agravando los problemas de tipo fitosanitarios.

Estos son algunos de los motivos por los cuales es prioritario el estudio de la tolerancia o susceptibilidad de las plantas frente al estrés abiótico. En la actualidad, las investigaciones abordan diferentes niveles, que van desde aspectos fisiológicos hasta moleculares, y consigo la búsqueda de nuevas variedades para solventar las necesidades

socio-económicas de la región. La investigación agrobiotecnológica ha enfocado sus estudios en la variabilidad genética de especies silvestres, ya que éstas tienen un gran potencial de resistencia a patógenos y tolerancia a condiciones ambientales adversas. Al mejorar las variedades comerciales se puede conferir tolerancia a factores abióticos, como la salinidad, aumentar la productividad, y además de proporcionar un alto valor nutricional.

El presente proyecto tiene por finalidad analizar la presencia de genes que confieran tolerancia a la salinidad en especies silvestres de la familia Solanácea de importancia económica del Ecuador con fines de fitomejoramiento.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Analizar la expresión del gen de resistencia a nematodos *Mi-1* bajo condiciones de estrés salino en especies de la familia solanácea, mediante la Técnica de PCR en tiempo real.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Implementar las condiciones de invernadero óptimas para el cultivo de las especies a estudiar.
- Estandarizar la extracción y purificación de ARN de las especies solanáceas de interés.
- Estandarizar y optimizar la cuantificación relativa del transcrito mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Analizar el patrón de expresión del gen *Mi-1* mediante PCR en tiempo real.

## 1.4 Marco Teórico

### 1.4.1 La familia *Solanaceae* y el género *Solanum*

La familia *Solanaceae* está compuesta por 147 géneros con más de 3000 especies distribuidas ampliamente en diferentes secciones (Judd *et al.*, 2002).

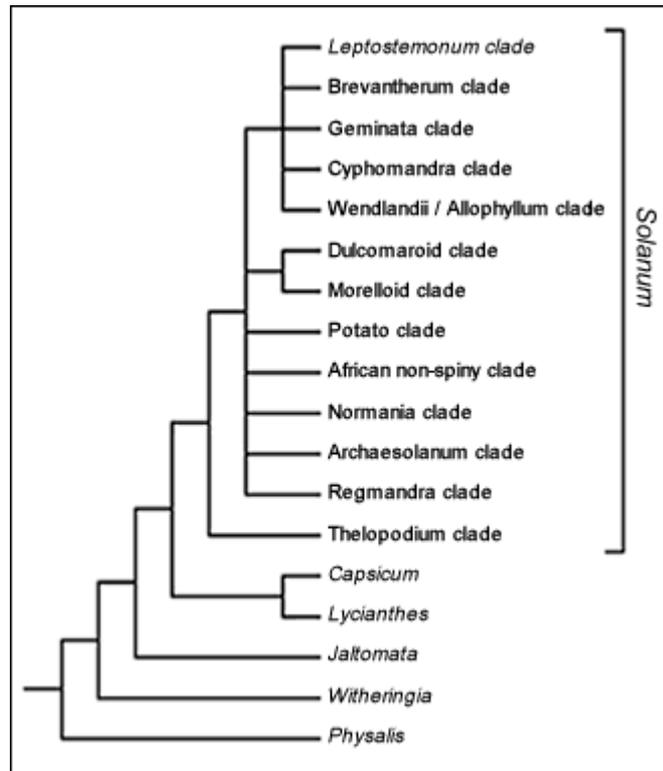
Esta familia tiene una distribución cosmopolita. Sus hábitats varían dramáticamente desde la selva tropical, que recibe más de 3 m de precipitaciones al año, los desiertos, con virtualmente ninguna precipitación, y las montañas, con caída de nieve regular y temperaturas bajo cero (Solgenomics, 2011). La concentración más grande de géneros y especies se encuentra en el Centro y Sur de América (Mueller *et al.*, 2005).

Las solanáceas son el tercer taxa más importante de plantas, económicamente el más valioso y variable en términos de especies cultivables (Solgenomics, 2011). Entre las especies más destacadas se encuentran la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate de riñón (*Solanum lycopersicum*), la berenjena (*Solanum melongena*), el pepino (*Solanum muricatum*), el pimiento (*Capsicum annum*), plantas ornamentales (petunias, *Nicotiana*), plantas con hojas comestibles (*Solanum aethiopicum*, *Solanum macrocarpon*) y plantas medicinales (eg. *Datura*, *Brugmansia*) (Knapp *et al.*, 2004). Adicionalmente, a la familia pertenecen especies exóticas con gran potencial comercial para la región andina como la naranjilla (*Solanum quitoense*), el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), la uchuva (*Physalis peruviana*) y la papa criolla (*Solanum phureja*) (Knapp *et al.*, 2004; Jansky, 2009).

El género *Solanum* es uno de los géneros más grandes de las angiospermas y es el más representativo de la familia *Solanaceae*, con cerca de 1500 especies (Weese & Bohs, 2007).

Este género ha sido dividido en 7 subgéneros de acuerdo sistema de D'Arcy. (D'Arcy, 1991), y se han identificado 13 clados principales mediante el estudio

molecular de secuencias de cloroplastos *ndhF* (Bohs, 2004). Las relaciones de estos clados se presentan en la Figura 1.1.



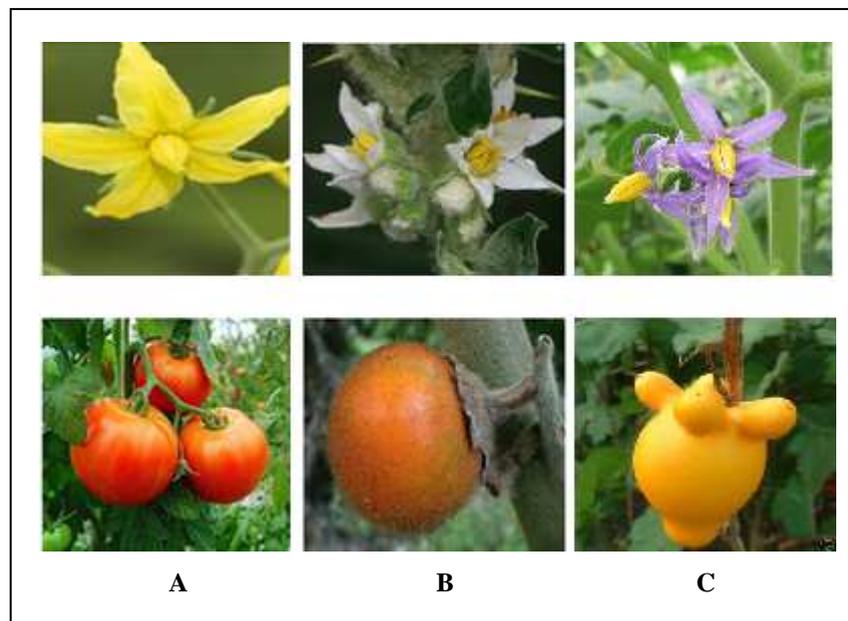
**Figura 1. 1** Relación esquemática de los clados del género *Solanum*.

Tomado de: Solanaceae Source, 2012.

Entre los tres clados mayores de *Solanum*, *Leptostemonum*, *Geminata* y *Potato* (Bohs 2005; Weese & Bohs 2007), se concentran cerca de 900 especies. En *Leptostemonum* 450 especies (Bohs 2005; Levin *et al.* 2006), *Potato* de entre 200 a 300 (Bohs 2005) y en *Geminata* se encuentran aproximadamente 140 especies (Knapp 2002; Bohs 2005).

Los clados *Leptostemonum* y *Potato* son los más importantes económicamente. Las especies de *Leptostemonum* presentan una gran variedad de usos desde comestibles, como la naranjilla (sección *Lasiocarpa*), así como citotóxicos, insecticidas y medicinales (secciones *Acanthophora*, *Crinitum* y *Torva*) (Orozco *et al.*, 2008). Las especies de *Potato* constituyen uno de los cultivos alimenticios más extensos e importantes del mundo, ya que incluye la papa (sección *Petota*), el tomate (sección *Lycopersicon*), y el pepino (Tepe, 2005).

Las especies del género *Solanum* se caracterizan por ser plantas leñosas, y presentarse como herbáceas, arbustos o árboles, anuales o perennes. Las plantas exhiben el cáliz y corola de cinco piezas, la corola generalmente esteliforme, con presencia o ausencia de membrana interpetalar y cinco estambres con dehiscencia poricida (Orozco *et al.*, 2008). El fruto en baya es característico de *Solanum* el mismo que puede ser jugoso como el caso de *Dulcamara* (*S. dulcamara*) o seco como el ají (*Capsicum annum*), los frutos además están provistos de colores intensos, algunos cubiertos por vellosidades e incluso presencia de glicoalcaloides, propio de especies del clado *Leptostemonum* (Solanaceae Source, 2008) (Figura 1.2).



**Figura 1. 2** Fotografías de flores y frutos de tres especies de solanáceas. A. *Solanum lycopersicum*, B. *Solanum quitoense* y C. *Solanum mammosum*. Tomado de: Solanacea Surce, 2012.

#### 1.4.2 Sección *Lycopersicon*

La sección *Lycopersicon* del género *Solanum* constituye un clado monofilético de la subfamilia Potato. La sección consiste en 13 especies (Peralta *et al.*, 2006). Agrupa al tomate cultivado, *Solanum lycopersicum*, que incluye a la especie domesticada de tomate cherry (*S. lycopersicum* 'cerasiforme') (Peralta *et al.*, 2008), y a las especies silvestres *Solanum arcanum*, *S. cheesmaniae*, *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. corneliomulleri*, *S. galapaguense*, *S. habrochaites*, *S. huaylasense*, *S. neorickii*, *S.*

*pennelli*, *S. peruvianum* (Peralta *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2005). Todas las especies son diploides con un número cromosómico de  $2n=24$  (Rodríguez *et al.*, 2001).

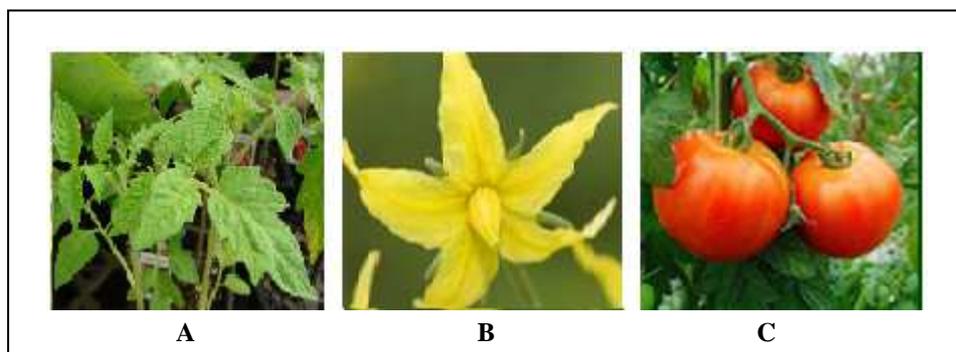
Las especies silvestres de esta sección, *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium*, y *S. lycopersicum* var. *Ceraciforme*, han sido utilizadas para estudios de regulación génica y de rol fisiológico de genes que codifican proteínas con función de señalización, transducción de señales y protección celular (Zhu, 2002), ya que presentan diversos grados de tolerancia a estrés hídrico y salino (FONTAGRO, 2009). La comunidad científica de TGC (Tomato Genome Consortium) ha comparado el genoma del tomate doméstico *Solanum lycopersicum* con el silvestre *Solanum pimpinellifolium*, el pariente vivo más cercano, y han encontrado una divergencia del 0,6%, entre ellos, por lo que a esta especie silvestre la han considerado como un organismo modelo para conocer la evolución de las solanáceas, así como para mejorar la calidad del fruto en valor nutricional y su adaptación frente al estrés biótico y abiótico (TGC, 2012).

#### **1.4.2.1 *Solanum lycopersicum***

*Solanum lycopersicum* (NCBI; Taxonomía ID: 4081) es una de las hortalizas más difundidas en el mundo y de mayor valor económico, debido a su demanda como producto de consumo de alto valor nutricional. A nivel mundial ocupa una superficie cultivada de 5'227.883 ha con una producción de 129'649.883 Tm (FAO, 2008). En el Ecuador las 4.169 ha dedicadas a la extensión de este cultivo, alcanzaron en el 2006 una producción de 87.525 Tm (SICA, 2006).

Es una planta autógama, muy ramificada, rastrera y perenne. El sistema radicular está constituido por una raíz principal o pivotante. Todo el sistema aéreo vegetativo es densamente pubescente y glandular, lo que da a la planta su olor característico. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde, compuestos de dos o más nodos, tres hojas y una inflorescencia. En la axila de cada hoja aparece un tallo secundario. De acuerdo al tipo de crecimiento, estas plantas pueden ser determinadas o indeterminadas. En las plantas de hábito de crecimiento indeterminado, de carácter silvestre de la especie, hay un crecimiento nodal continuo a partir de la primera inflorescencia, entre la séptima y décima hoja verdadera, mientras que las plantas determinadas se caracterizan

porque la primera inflorescencia aparece relativamente pronto. Hay tendencia a que existan no más de dos hojas nodales entre racimos y el tallo principal termina en una inflorescencia. Las hojas son anchas, planas y pinnatisectas, con 7-11 foliolos. Las inflorescencias, de tipo racimo o cima, tienen un número de flores variable, generalmente de 7 a 12. Las flores son hermafroditas, perfectas, hipoginas y regulares. El cáliz tiene cinco o más sépalos lanceolados y fusionados en la base. La corola está formada por cinco o más pétalos de color amarillo, lanceolado y fusionado en la base. Los estambres, cinco o rara vez seis, están fusionados a la corola por sus filamentos. Poseen anteras largas de color amarillo, conniventes, que forman un tubo en forma de botella en cuyo interior queda encerrado el estilo. Cada antera posee una extensión apical generalmente también fusionadas entre ellas. El pistilo está formado por un ovario compuesto. El fruto es una baya, generalmente de color rojo, bi- o multilobulada, con una gruesa placenta en la que se encuentran numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. Están descritas una gran diversidad de formas y tamaños de frutos (Domínguez, 2000). En la Figura 1.3 se puede apreciar visualmente la morfología de este cultivo.



**Figura 1. 3** Fotografía de *Solanum lycopersicum*. A. Hojas, B. Flor y C. Fruto.

Tomado de: SolGenomics, 2012.

En la presente investigación se trabajó con la variedad de tomate comercial Syta. El cultivar *Syta*, es un híbrido indeterminado redondo, levemente achatado, muy uniforme, con racimos bífidos de floración escalonada, de cierre pistilar perfecto y muy prolífico. Es un tomate de descarga rápida y ciclo precoz. La planta se puede cultivar a ciclo corto. Resistente a Virus del Mosaico del Tabaco, *Verticillium*, *Fusarium* 1 y 2, Nemátodos y *Cladosporium* 5 razas (Portaldelcampo, 2012).

#### 1.4.2.2 *Solanum pimpinellifolium*

*Solanum pimpinellifolium* es la especie silvestre más relacionada con el tomate cultivado. Es originaria de los Andes peruanos y ecuatorianos, costa del Perú y nororiente de Ecuador y Galápagos (EuSol, 2006).

Morfológicamente es muy similar a la especie cultivada. Está constituida por plantas anuales o perennes con pubescencia diminuta. Aunque ésta especie es autógama y presenta varios grados de alogamia facultativa (Esquinas-Alcázar, 1981), ésta es una planta herbácea anual postrada ascendente. Sus tallos son ramificados, cilíndricos, pubescentes o raramente algo pilosos o glandulosos. Presenta hojas alternas, pinnati-compuestas, ovadas en su contorno total, folíolos desiguales, generalmente un par de folíolos grandes, asimétricamente cordados, verde pálido y pubescentes en el envés, verde oscuro en el haz, a veces los folíolos pequeños están atrofiados. Flores pedunculadas regularmente distribuidas. Cáliz lobulado, lóbulos lanceolados, glanduloso-pubescentes en ambas caras. Corola amarilla brillante, y dividida. Presenta 5 estambres, con anteras subsésiles, conniventes formando una columna estaminal puntiaguda. Ovario súpero, globoso, bicarpelar, bilocular; estilo largo, glanduloso pubescente en la mitad inferior; baya globosa, de 6 a 10 mm de diámetro, glabra o glabrescente, roja o roja-anaranjada, lustrosa, acompañada de cáliz acrescente. Semillas numerosas, obovadas y glabras (Charcape & Mostacero, 2004) (Figura 1.4). Esta especie cruza en ambos sentidos con el tomate dando lugar a híbridos fértiles. Se trata de la única especie silvestre que ha introgresado genes, de forma natural, en la especie cultivada (Domingos, 2003).



**Figura 1.4** Fotografía de *Solanum pimpinellifolium*. A. Frutos y B. Flores.

Tomado de: SolGenomics, 2012.

### 1.4.3 Sección Lasiocarpa

La sección Lasiocarpa comprende entre 11 y 13 especies (Bohs, 2004), entre las cuales están *Solanum candium*, *Solanum felinum*, *Solanum hirtum*, *Solanum hyporhodium*, *Solanum lasiocarpum*, *Solanum pectinatum*, *Solanum pseudolulo*, *Solanum quitoense*, *Solanum repandum*, *Solanum sessiliflorum*, *Solanum stramonifolium*, *Solanum vestissimum* y *Solanum stagnale* (Whalen *et al.*, 1981). Todas las especies son diploides con un número cromosómico de  $2n=24$  (Benardello *et al.*, 1994).

En el Ecuador, las especies silvestres de la sección Lasiocarpa, como *Solanum hyporhodium*, *Solanum vestissimum* y *Solanum felinum*, han sido utilizadas para incorporar características deseables a la especie cultivada de naranjilla (*S. quitoense*), para evaluar la resistencia a *Fusarium spp.*, y *Meloidogyne spp.*, y generar nuevas variedades (INIAP, 2010).

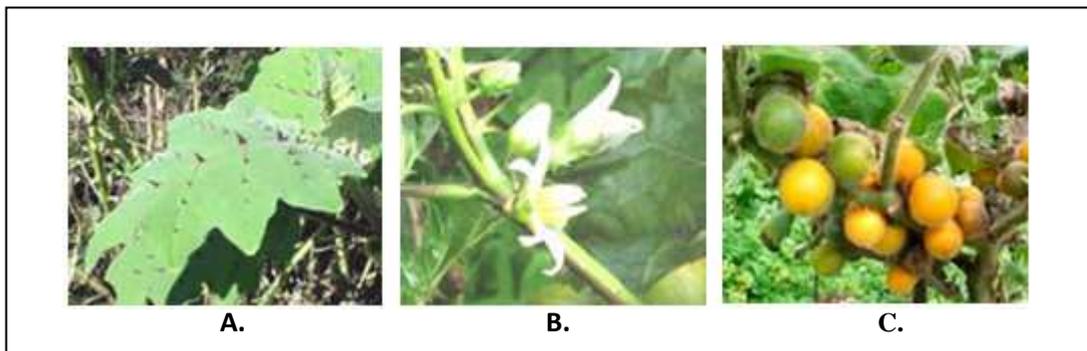
En Colombia, estudios realizados por Fanor *et al.*, (2000) han catalogado a la naranjilla, como una planta que presenta una tolerancia moderada a la salinidad por Cloruro de Sodio.

#### 1.4.3.1 *Solanum quitoense*

*Solanum quitoense* o naranjilla es un fruto exótico de alto valor nutricional muy apetecido en los mercados nacionales e internacionales (Lobo y Medina, 2000). En el Ecuador, según cifras del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el año 2002 se reportó la existencia de 8.000 ha cultivadas con una producción de 24.211 Tm (Monteros *et al.*, 2003).

Los centros primarios de domesticación y diversidad genética del taxón comprenden a Colombia, Ecuador y Perú, sitios que se encuentran entre los 1.200 y 2.300 msnm (Lobo y Medina, 2000). También se encuentra en forma silvestre en Venezuela, Brasil, Costa Rica, Mesoamérica, Polinesia y algunos países asiáticos como China y Borneo (Whalen *et al.*, 1981)

Morfológicamente, presenta una raíz fibrosa y superficial. Su raíz pivotante se parte, para el desarrollo de un sistema radicular profusamente ramificado y poco profundo (Castañeda, 1992; Pacheco, 1996) Todo el sistema aéreo vegetal tiene pubescencia lanosa, y todas sus partes son espinosas con excepción de las flores y el fruto. El tallo es grueso, cilíndrico y succulento en plantas jóvenes y semi-leñoso en adultas. Las hojas son de color verde con nervaduras de color púrpura en el haz. Las flores son de color blanco o lila claro, se agrupan en racimos en un peciolo corto que contiene hasta 10 flores. La flor es pentámera y hermafrodita. El cáliz es gamosépalo, está compuesto por 5 sépalos y alterna con los pétalos. El ápice del cáliz es agudo. El androceo está compuesto por 5 estambres de color amarillo, biselados con dehiscencia poricida. El filamento del estambre y la antera son sésiles. El estigma es de color verde y el pistilo puede ser corto, mediano o largo (Bernal *et al.*, 1998). La morfología de hojas, flores y frutos se muestra en la Figura 1.5.



**Figura 1. 5** Fotografías de *Solanum quitoense*. A. Hoja B. Flor C. Fruto.

Tomado de: Fory, 2005.

#### **1.4.3.2 *Solanum vestissimun***

*Solanum vestissimun* es una especie silvestre andina; conocida como naranjilla de la tierra baja (Heise, 1985). Se distribuye ampliamente desde la cordillera central de Colombia hasta la costa de Venezuela. Las plantas son arbustos grandes o pequeños árboles que habitan entre los 1500 a 2200 m.s.n.m. (Pazmiño, 2008).

Morfológicamente presenta hojas simples y grandes, generalmente de 1 a 1.5 veces más largas que anchas, anchamente ovadas y de textura fina pubescente. Posee

un ápice agudo u obtuso, pecíolos de 4.5 a 15 cm, y espinas de 1.4 a 1.2 de longitud. Las inflorescencias extra axilares, de 1 a 5.5 cm, a menudo se encuentran muy cerca de un par de hojas, y a veces ramificadas con 10 a 30 flores (Solanaceae source, 2012). Esta especie produce muchas flores estaminadas (Whalen *et al.*, 1981) que poseen un cáliz ampliamente campanulado y petaloides. La corolla es estrellada y mide aproximadamente de 3 a 5.5 cm de diámetro, y de 14 a 28 mm de largo. Sus estambres poseen filamento y anteras linear-lanceoladas. Su ovario es estipitado glandular. El estilo de 11-15 x 0,3-1 mm se presentan en las flores hermafroditas, cilíndricas, estrellado-pubescentes y estipitado glandular en la mitad inferior; estigma más o menos capitado (Solanaceae source, 2012). Los frutos son grandes pero se encuentran recubiertos por gran cantidad de tricomas cortos y rígidos (Bernal *et al.*, 1983; Heiser, 1985) (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Fotografía de *Solanum vestissimum* en el Herbario Nacional de US.

Tomado de: EOL, 2012.

## 1.5 Estrés abiótico en plantas

El estrés se define como cualquier factor ambiental que ocasione cambios desfavorables en el metabolismo de los organismos vivos (Larcher, 1995).

Las plantas están expuestas a varios tipos de estrés ambiental que incluyen la poca disposición de agua (sequía), un exceso de sal (salinidad), estrés por luz UV, falta de nutrientes, estrés por metales pesados y temperaturas extremas. Estos provocan una

serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares, que afectan negativamente su crecimiento y productividad (Morales, 2010).

Estos factores en condiciones extremas llegan a representar la primera causa de pérdida de cultivos y cosechas por más del 50% a nivel mundial (Bray *et al.*, 2000), mientras que la pérdida de cultivos por patógenos representa del 10% al 20% (Kreps *et al.*, 2002). Los pronósticos del cambio climático, con el aumento de temperatura, la sequía, y la considerable subida del mar y el nivel freático, agravan los problemas de salinidad (Lannetta y Colonna, 2011).

Actualmente, la sequía y la salinidad se están extendiendo de forma especial en ciertas regiones, y podrían dar lugar a una excesiva salinidad de más del 50% de la tierra arable para el año 2050 (Wang *et al.*, 2003).

### **1.5.1 La salinidad en la agricultura**

La salinidad del suelo o salinización es el resultado de la acumulación de sales en la superficie, proceso creciente que puede conducir a la desertificación. Las principales sales que contribuyen a esta problemática son de los cloruros, sulfatos, carbonato de sodio, calcio y magnesio, siendo el cloruro de sodio la sal más abundante (Aleman, 2009).

La salinización puede ser de dos tipos: salinización natural o primaria, hoy en día agravada por los efectos del cambio climático, y salinización antropogénica o secundaria. La salinización primaria, es el resultado de la subida del nivel freático hasta la superficie del suelo y la deposición de sales oceánicas transportadas por el viento y las lluvias (Lannetta y Colonna, 2011). La salinización antropogénica es provocada por las malas prácticas agrícolas realizadas por el hombre, tales como la irrigación, exceso de pastoreo, deforestación de áreas semihúmedas o semiáridas, la contaminación con agroquímicos, el mal uso de los fertilizantes y sales industriales (Dajic, 2006). Actualmente, las malas prácticas de riego constituyen la principal causa de este problema.

El Servicio de Gestión del Territorio y Nutrición Vegetal de la FAO, estima que aproximadamente el 6 % de los suelos de la Tierra están afectados por la salinidad. De los suelos cultivados, actualmente de los 230 millones ha de las tierras de regadío, el 19,5 % están afectadas y de las 1.500 millones ha bajo agricultura de secano, el 2,1 % están afectadas por la salinidad en distintos grados. En el Ecuador de las 25'637.000 ha cultivables, 3'136.085 ha están bajo potencial riesgo debido a la alta salinidad (INIAP, 2005).

Es importante la medición de sales solubles en el suelo para la evaluación de la relación *rendimiento-vegetal/nutrientes-suelo*, puesto que una deficiencia o exceso afectará al desarrollo del cultivo (Rizzi *et al.*, 1998). Los efectos adversos de una excesiva salinidad se traducen en la disminución del crecimiento de la planta, durante los estadios vegetativo y reproductivo. Por lo que la salinidad se convierte en una de las principales amenazas para la agricultura (Miranda, y Chaves, 2007), tanto en términos económicos como sociales.

### 1.5.1.1 Medición de la salinización

La salinidad del suelo es determinada mediante la medición de la conductividad eléctrica (EC) en  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  es equivalente a 10 mM de NaCl), y un suelo es considerado salino si la conductividad eléctrica del extracto de pasta saturada ( $\text{EC}_c$ ) excede a los  $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (40 mM NaCl) (USDA, 2010). En la Tabla 1.1 se muestran los valores establecidos por la USDA (Salinity Labs) de  $\text{EC}_c$  del extracto de pasta saturada.

**Tabla 1. 1** Escala de salinidad del extracto de pasta saturada. Tomado de: USDA Salinity Lab, 2010.

Conductividad eléctrica ( $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ )	0-2	2-4	4-8	8-16
Nivel	Normal	Ligeramente salino	Medianamente Salino	Fuertemente Salino

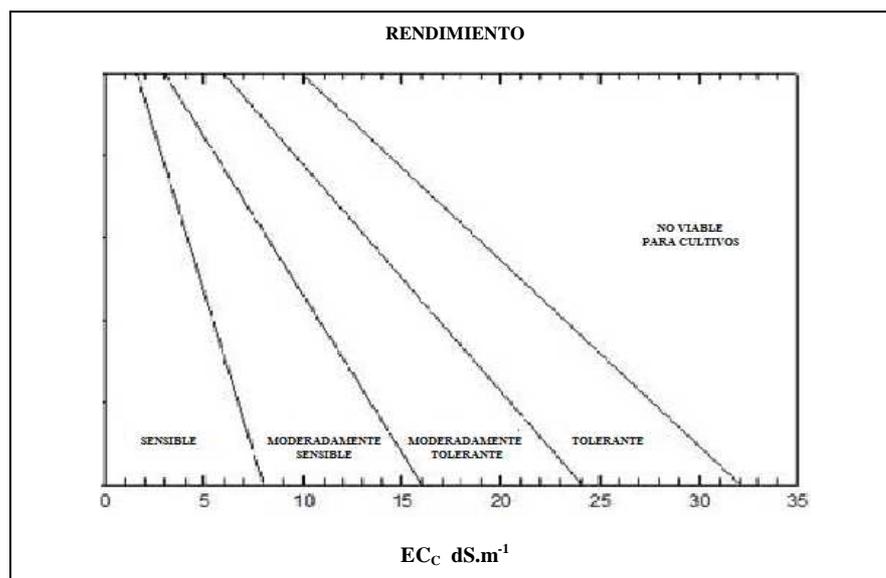
El porcentaje de producción de los cultivos muestran un umbral en respuesta al grado de salinización a la que estén expuestas.

### 1.5.1.2 Tolerancia a la salinidad en plantas

Las diferencias entre el umbral de tolerancia a  $EC_C$  y las tasas de reducción en productividad bajo el umbral de tolerancia a  $EC_C$  (Chinnusamy *et al.*, 2005) indican variación en los mecanismos de tolerancia, ya sea entre grupos de plantas taxonómicamente distintos, así como entre especies estrechamente relacionadas e incluso entre variedades de una misma especie (Tester & Davenport, 2003).

De acuerdo a la tolerancia de las plantas a la salinidad, se las ha clasificado en dos grupos: a) Halofitas (planta salada), plantas que pueden resistir una concentración de sales en el suelo de hasta el 20% (3,5 M), y presentan un desarrollo óptimo a concentraciones de entre 2 y 6% (0,3 y 1 M) de NaCl (Strogonov, 1964); y b) glicofitas (planta dulce), plantas que exhiben daños en diverso grado y un crecimiento fuertemente reducido a una concentración de sales mayor al 0,1% (17,5 mM).

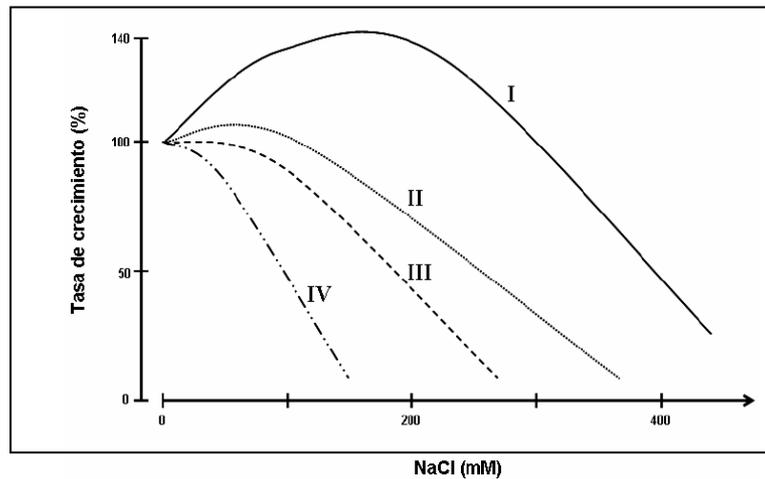
Dentro de cada grupo hay grandes diferencias en el nivel de tolerancia al estrés salino (Figura 1.7). En las halofitas existen especies moderadamente tolerantes y otras muy tolerantes (Ungar, 1991), y en glicofitas muy sensibles y moderadamente sensibles (Dijac, 2006).



**Figura 1. 7** Categorías de clasificación para cultivos tolerantes a la salinidad.

Modificado de: USDA Salinity Lab, 2010.

Las plantas sensibles restringen el ingreso de la sal a la célula y realizan un ajuste osmótico mediante la síntesis de solutos compatibles (Munns & Teste, 2008), y las plantas tolerantes, utilizan los iones para el ajuste osmótico. Estas adaptaciones requieren de un coste energético, que se traduce en la inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta (Glenn *et al.*, 1999) (Figura 1.8).



**Figura 1. 8** Comportamiento relativo de varias especies vegetales desde (I) halofitas extremas hasta (IV) verdaderas glicofitas. Tomado de: Greenway & Munns (1980).

La mayoría de cultivares en el mundo son glicofitas y susceptibles aun cuando la conductividad eléctrica (ECc) es menor a  $3 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  (Mass, 1990). Bajo este umbral de tolerancia ya existe un decremento en la producción de los cultivos. El tomate, por ejemplo tolera hasta  $2,5 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ; sin embargo, su producción ya se ve disminuida en un 9,9%. En la Tabla 1.2 se describen algunos cultivos importantes susceptibles a la salinidad.

**Tabla 1. 2** Umbral de tolerancia a la salinidad de diferentes cultivos. Tomado de: Mass, 1990.

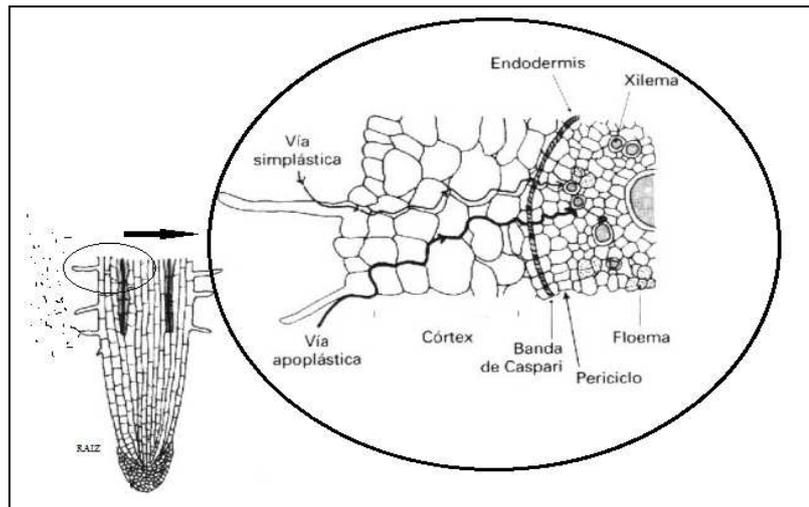
CULTIVO	Umbral de salinidad $\text{dS m}^{-1}$	Decremento en producción % por $\text{dS m}^{-1}$
Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1.0	19.0
Berenjena ( <i>Solanum melongena</i> L.)	1.1	6.9
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> L.)	1.2	16.0
Pimiento ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	1.5	14.0
Maíz ( <i>Zea mays</i> L.)	1.7	12.0

Caña de azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	1.7	5.9
Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	1.7	12.0
Col ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	1.8	9.7
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	2.5	9.9
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	3.0	12.0
Cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	3.2	29.0
Soya [ <i>Glycine max</i> (L.) Merr.]	5.0	20.0
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	6.0	7.1
Betabel ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	7.0	5.9
Algodón ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)	7.7	5.2
Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	8.0	5.0

### 1.5.1.3 Ingreso de los iones sodio y cloro a la planta

En un suelo salino, la elevada concentración de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , impide la absorción de nutrientes ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). La absorción de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana plasmática, vacuolar y otras membranas intracelulares depende de bombas primarias (ATPasas y pirofosfatasa), transportadores secundarios y canales iónicos (Niu *et al.*, 1995).

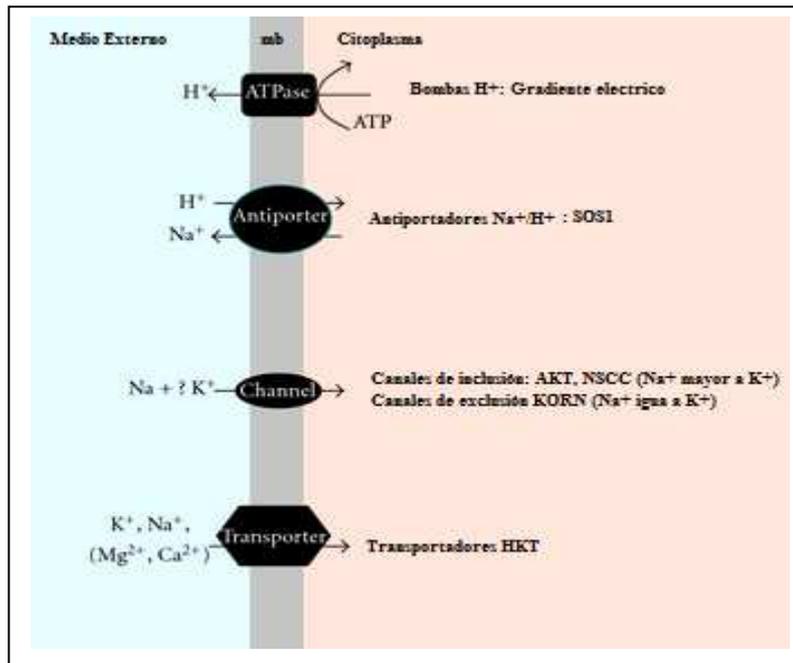
El sodio del suelo entra a la raíz por dos vías: a) la ruta simplástica (dentro de la célula) mediada por los transportadores y canales, y b) la ruta apoplástica (fuera de la célula), donde el  $\text{Na}^+$  entra en la corriente de la transpiración (Figura 1.9). En la primera, los iones son incorporados a través de los pelos radicales o a otras células de la epidermis y transportados célula a célula hasta los elementos conductores del xilema. La vía apoplástica contempla la posibilidad de un transporte extracelular de los iones hasta la endodermis, donde la existencia de una banda impermeable en el apoplasto, la banda de Caspari, obliga al paso a través del plasmalema. Una vez en el periciclo, los iones pueden seguir la vía extracelular hasta los elementos conductores del xilema (UNC, 2012).



**Figura 1. 9** Ruta simplástica y apoplástica para la incorporación de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  a través de la raíz.

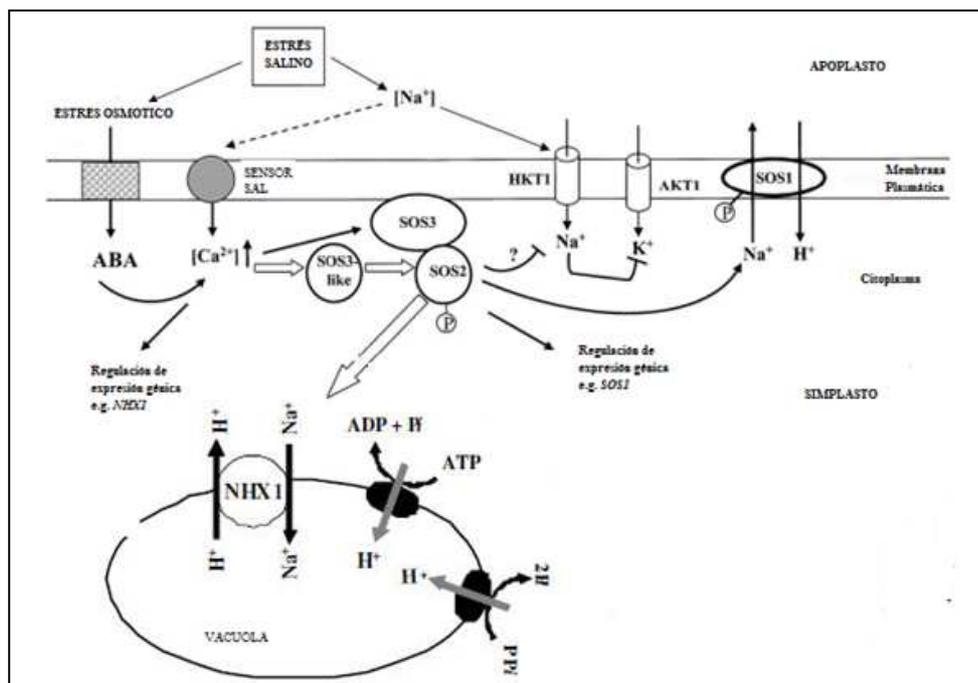
Tomado de: UNC, 2012.

En condiciones normales, la razón del  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en el citosol es alta, con una concentración de  $\text{K}^+$  que oscila entre 100 a 200 mM, en relación con la del  $\text{Na}^+$  que varía de 1 a 10 mM. Una concentración alta de  $\text{Na}^+$  extracelular establecerá un gradiente electroquímico mayor y permitirá el transporte pasivo del ión. El  $\text{Na}^+$  cruza la membrana plasmática debido a la baja permeabilidad de canales y sistemas de transporte de alta afinidad del potasio. Los sistemas de transporte que tiene alta afinidad por el  $\text{K}^+$  pero baja afinidad del  $\text{Na}^+$  incluyen los canales rectificadores de entrada  $\text{K}^+$  (KIRC) como  $\text{AKT1}$ , los canales rectificadores de salida de  $\text{K}^+$  (KORC) y la familia  $\text{KUP/HAK}$  de simportes  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , de los cuales no hay una evidencia directa de su función. Los transportadores de alta afinidad de  $\text{K}^+$  ( $\text{HKT1}$ ), los transportadores de cationes de baja afinidad ( $\text{LCT1}$ ) y los canales de cationes no selectivos (NSCC), son considerados como sistemas de transporte que median el influjo específico del  $\text{Na}^+$  en la célula (Zhu, 2003) (Figura 1.10).



**Figura 1. 10** Movimiento del Na<sup>+</sup> a través de la membrana mediado por canales y sistemas de alta y baja afinidad de K<sup>+</sup> y de cationes. Modificado de: Yamaguchi & Blumwald, 2005.

El eflujo del Na<sup>+</sup> dependiente de energía es crucial para mantener una baja concentración del catión en el citoplasma y es mediado por antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de membrana que utilizan el gradiente electroquímico del H<sup>+</sup> generado por las bombas de ATPasas- H<sup>+</sup> (Vitart *et al.*, 2001) (Figura 1.11).

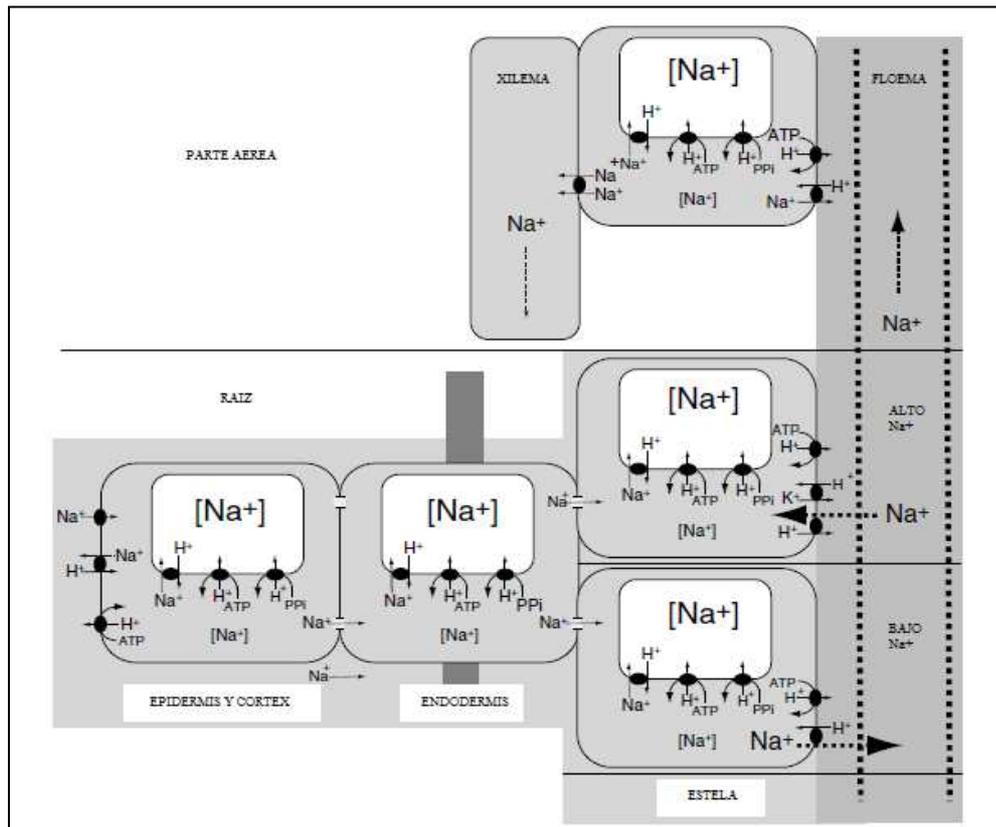


**Figura 1. 11** Mecanismo de ingreso, reconocimiento y compartimentación del Na<sup>+</sup> en la célula. Modificado de: Chinnusamy, 2005.

Posterior al ingreso, se produce la compartimentación del  $\text{Na}^+$  en la vacuola, mediada por antiportadores catión/ $\text{H}^+$ , que incluyen las familias NHX y CHX, ubicadas en los tonoplastos. Estas utilizan el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  generado por las enzimas de traslocación de hidrógeno, ATPasas- $\text{H}^+$  y pirofosfatasas de hidrógeno (Gaxiola *et al.*, 2002) (Figura 1.11).

La entrada de  $\text{Na}^+$  a través de los canales iónicos no específicos causa la despolarización de la membrana y activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  proporciona la acumulación selectiva de  $\text{K}^+$  sobre la de  $\text{Na}^+$  a través de un sistema de transporte de alta afinidad SOS (Salt Overly Sensitive). SOS1, SOS2 y SOS3 son los componentes fundamentales de esta vía. Las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son reconocidas por SOS3 (proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ), ésta proteína activa a los SOS2 (proteína quinasa serina/treonina) y los reclutan a la membrana plasmática donde SOS2 fosforila al antiporte- $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 y lo activa para regular el flujo neto de  $\text{Na}^+$  e inhibir los canales KORC para evitar la salida de  $\text{K}^+$  (Shabala *et al.*, 2005). El complejo SOS3-SOS2, a más de activar al antiportador SOS1, inhibe la actividad HKT restringiendo el flujo del  $\text{Na}^+$  al citosol y activa los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la vacuola NHX, para permitir el eflujo de  $\text{Na}^+$  y su acumulación en la vacuola (Figura 1.8) (Qiu *et al.*, 2004). El transportador de membrana CAX1 (transportador antiporte  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) también es regulado por SOS2 para intercambiar  $\text{H}^+$  vacuolar por  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y restaurar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (Hirschi, 2001; Cheng *et al.*, 2003).

El flujo del  $\text{Na}^+$  de la raíz a la parte aérea de la planta está regulada por antiportadores SOS1 y HKT1. El SOS1 carga el  $\text{Na}^+$  dentro del xilema para ser transportado a la parte aérea y depositado en las células de la hoja, donde es compartimentado dentro de la vacuola por el antiportador NHX, o es transportado por la acción de HKT1 de regreso por floema, hasta la raíz (Epstein, 1998) (Figura 1.12).



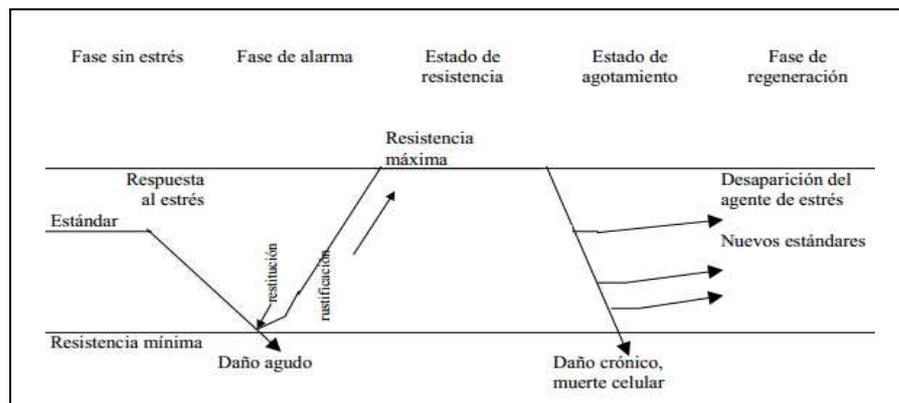
**Figura 1. 12** Proceso de Flujo y recirculación del Na<sup>+</sup> en la planta. Modificado de: Epstein, 1998.

El incremento de ABA endógeno produce la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup>. El incremento del ion en el citosol activa la ruta SOS3 y otras vías de señalización necesarias para la adaptación a la salinidad (Zhu, 2002).

La entrada de Cl<sup>-</sup> a la célula puede ser pasiva, debido a la despolarización de la membrana plasmática generada por el exceso de Na<sup>+</sup> (Roberts, 2006). Su ingreso se da a través de los canales rectificadores de salida de aniones activados por despolarización (OR-DAACs); sin embargo, cuando se restablece el potencial de la membrana, el transporte será activo y mediado por simportadores H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (Felle, 1994). La compartimentación de Cl<sup>-</sup> en la vacuola se transporta por un canal permeable de aniones del tipo VCL o a través de antiportadores Cl<sup>-</sup> / H<sup>+</sup> (White & Broadley, 2001). Finalmente los canales del tipo ARA (canales de salida de aniones) mediarán la salida del Cl<sup>-</sup> hasta cargarlo en el xilema (White & Broadley, 2001).

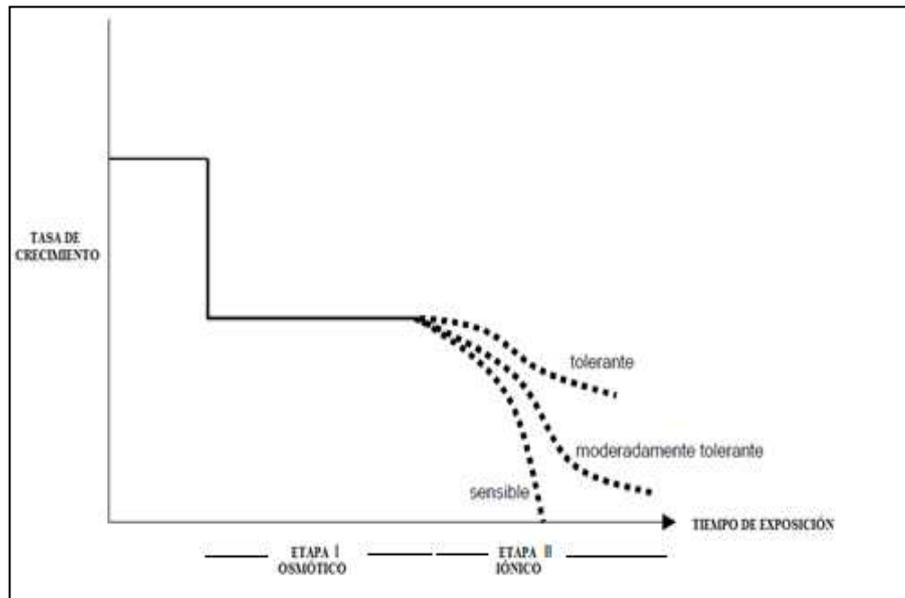
### 1.5.1.4 Respuesta y efectos de las plantas al estrés salino

Los eventos complejos de estrés en plantas tienen tres fases de respuesta y una fase de regeneración después de quitar el agente de estrés si el daño no ha sido demasiado severo (Figura 1.13) (Lichtenthaler, 1996). En la Fase I o de respuesta: se genera una reacción de alarma, que consiste en la disminución de las actividades fisiológicas y la activación de mecanismos de defensa con un coste energético sobre la vitalidad de la planta. La Fase II o de restitución, es un estado de resistencia donde se generan procesos de adaptación, reparación y rusticación de funciones fisiológicas y morfológicas. En la Fase III o estado de agotamiento, la planta ha sido expuesta a exposiciones largas del agente estresor, se genera una sobrecarga de la capacidad de adaptación, y la planta se ve obligada a disminuir su metabolismo, dando lugar a una enfermedad crónica y muerte.



**Figura 1. 13** Síndrome del estrés en plantas. Tomado de: García, 1998.

El efecto del estrés salino en plantas se traduce en la inhibición del crecimiento y desarrollo, respuesta que propone dos etapas de inhibición por la imposición instantánea del estrés (Munn, 2002) (Figura 1.14). Este efecto inicia con una respuesta rápida (etapa osmótica) debido al aumento de la presión osmótica externa que dificulta la adquisición de agua por la planta y seguida de una respuesta lenta (etapa iónica) causado por la acumulación de sales en las células de tallos, hojas, y en el apoplasto de las hojas (genera un efecto osmótico adicional) hasta alcanzar niveles tóxicos.



**Figura 1. 14** Respuesta bifásica de la tasa de crecimiento en función del tiempo de exposición de sal para plantas que difieren en la tolerancia. Modificado de: Munns, 2005.

Las fases de respuesta de las plantas ante un estrés salino y los efectos generados a niveles morfológicos, fisiológicos y moleculares en las diferentes etapas (Munns, 2002) son resumidos en la siguiente tabla:

**Tabla 1. 3** Efectos del estrés salino en plantas. Modificado de: Lynch & Launchli, 1984; Sies, 1986; Lichtenthaler H. K. 1996; Bouchereau *et al* 1999; Munns & Perl-Treves y Perl, 2002; Fricke & Peters, 2002; Hartung *et al* 2002; Sharp & LeNoble, 2002; Bagni *et al* 2006; Wasternack, 2007; Tester, 2008; Aleman, 2009.

FASE	EFECTOS		
I	<p><b>Shock Osmótico:</b> Se generan señales químicas, como el aumento del Ca<sup>2+</sup> libre intracelular, y síntesis de ABA. Señales tempranas de estrés capaces de producir cambios fisiológicos locales y a distancia, como la limitación de la absorción de agua en las células de la raíz y cierre estomático, respectivamente. El déficit de agua es compensado por el agua vacuolar, lo que produce la pérdida de la turgencia celular y la pérdida adicional de agua se evita mediante el cierre estomático.</p>	Disminución del área foliar y pérdida del vigor en el tallo	O S M Ó T
II	Se desencadenan respuestas adaptativas de ajuste osmótico mediante la síntesis de componentes orgánicos compatibles (LEA, P5CS, azúcares,...etc.). La célula recupera el volumen y turgor original, sin embargo se reduce la división celular y ralentiza el metabolismo.	<p><b>Afecta al crecimiento:</b> detiene la aparición de hojas, dejan de crecer hojas, brotes y ramas; genera una floración temprana o reduce el número de botones florales, y frutos inmaduros</p>	I C O
III	<p><b>Shock hiperiónico:</b> el Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> se acumulan en el citoplasma y apoplasto, genera toxicidad, desequilibrio nutricional y estrés oxidativo.</p> <p>La elevada concentración de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, produce una interferencia en la absorción de nutrientes (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, NO<sup>3-</sup>), aumenta la competencia de iones y causa <b>DEFICIENCIAS NUTRITIVAS</b>. El desplazamiento del Ca<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, altera la permeabilidad de la membrana y dificulta la homeostasis iónica. EL Na<sup>+</sup> desplaza los iones de K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> en los sitios de unión de co-factores, necesario para actividades enzimáticas. Todos los procesos metabólicos dependientes del K<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup> se ven afectados.</p> <p>La acumulación iónica en las hojas causa un <b>ESTRÉS OXIDATIVO</b>. Se altera el metabolismo celular y se produce un desequilibrio en la producción de especies oxidantes y antioxidantes. Aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno ERO (radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo), y la disminución de los compuestos detoxificantes enzimáticos (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, dioxigenasas y catalasas) y no enzimáticos (ácido ascórbico, glutatión, carotenos, xantofilas y <math>\alpha</math>-tocoferol). Se genera la oxidación irreversible de poliaminas (putrescina, esperidina y espermina), lípidos, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. La fotosíntesis disminuye y consigo la síntesis de azúcares y clorofilas. Las células activan los procesos de apoptosis y detienen su crecimiento.</p>	<p><b>Afecta aún más al crecimiento:</b></p> <p>Disminución del área foliar. Clorosis y Necrosis progresiva (Brotes, hojas, flores y frutos), Defoliación, Marchitez y eventual muerte de la planta.</p>	I Ó N I C O
<p>En el caso de adaptación: Las plantas cambian la morfología de la hoja, la composición de los pigmentos de los cloroplastos y activan procesos bioquímicos para prevenir el daño oxidativo. El incremento en la capacidad de eliminar las ERO por parte de la planta se considera como síntoma de tolerancia.</p>			

### 1.5.1.5 Mecanismos de adaptación de las plantas al estrés salino

Ante una entrada importante de  $\text{Na}^+$  en el citosol, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del  $\text{Na}^+$ . Los mecanismos que llevan a cabo en las plantas para la tolerar la salinidad incluyen a la acumulación selectiva, exclusión y compartimentación de iones, síntesis de solutos compatibles e inducción de enzimas antioxidantes (Téllez, 2011).

Las plantas evitan concentraciones tóxicas de iones en el citosol mediante la exclusión por las raíces y el floema, y controlan los niveles de sal que ingresa a través de una inclusión o almacenamiento en vacuolas (Nuccio *et al.*, 1999).

La disminución en el potencial eléctrico del medio genera la síntesis de solutos orgánicos compatibles o acumulación de iones ( $\text{K}^+$ ), como una adaptación metabólica, útil para el equilibrio osmótico entre el medio externo, el citosol y la vacuola (Rodas y Hanson, 1993). Los solutos compatibles debido a su carácter hidrofílico actúan como osprotectantes o chaperonas, debido a que sustituyen al agua en la superficie de proteínas y membranas. Algunos de estos compuestos comprenden monosacáridos (fructosa y glucosa), alcoholes (glicerol e inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructosa), polioles, aminoácidos, compuestos de amonio cuaternario y proteínas (prolina, glicina betaina, alanina betaina, prolina betaina y proteínas LEA-Late embryogenesis abundant) (Hasegawa *et al.*, 2000; Nuccio *et al.*, 1999).

En plantas halofitas, la prolina o la glicina betaina se acumulan en grandes cantidades en las vacuolas de las hojas. En las glicofitas, los solutos se acumulan en el citoplasma a concentraciones no mayores de 10 mM (Rhodes *et al.* 2002). Las plantas glicofitas excluyen el  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y mantiene altos niveles de  $\text{K}^+$  (Zhu, 2001). En halofitas los iones de  $\text{Na}^+$  son almacenados conjuntamente con potasio y solutos orgánicos en el citoplasma para mantener el equilibrio osmótico e iónico entre los dos compartimentos (Munns, 2002). Generalmente, estas plantas se caracterizan por sus grandes vacuolas que posibilitan el cúmulo de altas concentraciones de sales (Hajibagheri *et al.*, 1984). Esta característica está relacionada también con la succulencia

de ciertas halofitas, que mantienen baja la concentración de sal en sus tejidos, respecto al incremento de contenido de agua (Parks *et al.*, 2002).

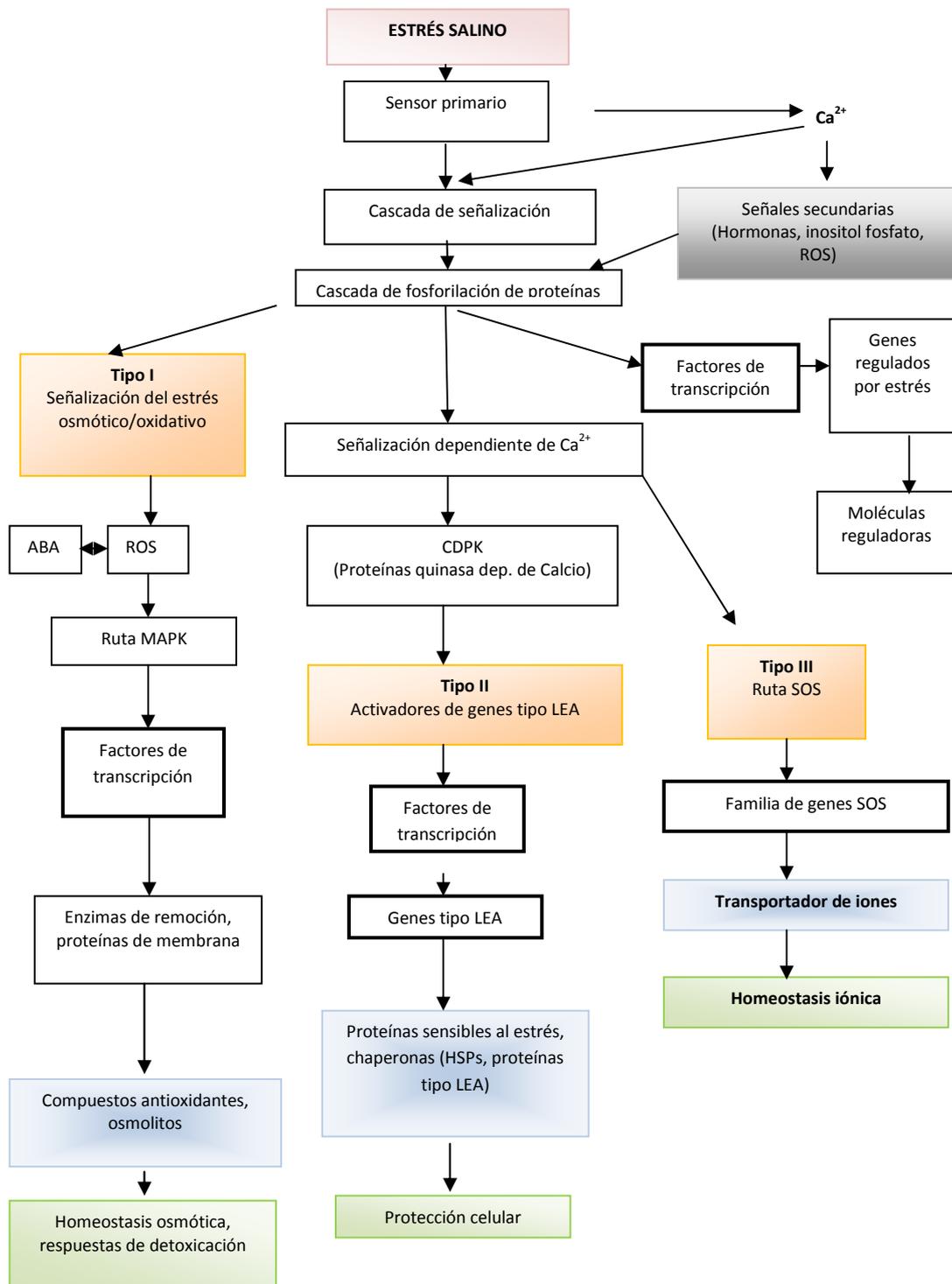
Frente a un estrés severo, se induce la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan la oxidación y degradación de lípidos de membrana, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las plantas emplean compuestos antioxidantes como ascorbato, glutatión, y carotenoides, además de enzimas detoxificantes, tales como la superóxido dismutasa, catalasas y enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato, con el fin de combatir el estrés oxidativo (Apse & Blumwald, 2002).

### **1.6 Vías de transducción de señales**

Las plantas reaccionan a estímulos externos mediante el inicio de una cascada de señales para generar las respuestas adecuadas. Una vez que el estímulo ha sido percibido, se generan inmediatamente moléculas de señalización como segundo mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ , inositol fosfatos, hormonas y especies reactivas de oxígeno). Estos mensajeros activan corriente abajo una cascada de señales que fosforilan los factores de transcripción, que regulan la expresión de un grupo de genes o proteínas involucradas en la adaptación del estrés (Xion *et al.*, 2002).

La red de transducción de señales para estrés salino se puede dividir en tres tipos principales de señalización (Figura 1.15):

- La señalización del estrés osmótico/oxidativo que usa los módulos de las proteínas quinasa activadas por mitogen (MAPK), envueltas en la generación de enzimas remoción de ERO, compuestos antioxidantes, y osmolitos compatibles.
- La señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que conduce a la activación de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA, por sus siglas en inglés).
- La señalización excesivamente sensible a la sal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOS: por sus siglas en inglés), que regula la homeostasis del ión. Este tipo involucra la ruta SOS y es específica del estrés iónico (Xiong *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005).



**Figura 1. 15** Vías de transducción de señales para estrés salino. Tomado de: Xiong *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005.

La salinidad aumenta la biosíntesis y acumulación de Acido Abscisico ABA mediante la activación de genes que codifican para enzimas biosintéticas de ABA, las cuales pueden ser rápidamente catabolizadas, una vez que cese el estrés. Muchos genes de respuesta pueden ser altamente regulados por ABA y pueden estar involucrados en la síntesis de osmoprotectantes y proteínas LEA, en la señalización y regulación transcripcional (Bartels & Sunkar, 2005). En adición, el ABA puede retroalimentar la estimulación de la expresión de genes de biosíntesis de ABA, que puede estar mediada en parte por ERO a través de una cascada de fosforilación de proteínas.

Los genes determinantes de la tolerancia al estrés salino pueden estar categorizados dentro de dos grupos funcionales (Hasegawa *et al* 2000). Los primeros incluyen genes que codifican efectores, los cuales son responsables de los procesos que son necesarios para el alivio de la estrés o adaptación. Los segundos consisten en los genes regulatorios que controlan la expresión de estos efectores (Hasegawa *et al.*, 2000). Los efectores incluyen proteínas que protegen la célula, como transportadores, enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmolitos, proteínas LEA, chaperonas y enzimas detoxificantes. Las moléculas regulatorias incluyen factores de transcripción, e intermediarios de señalización ligados a proteínas quinasas y enzimas envueltos en el metabolismo fosfoinositide (Zhu, 2002).

Algunos genes efectores, como el *LEA* y  *$\alpha$ -DOX*, han sido ampliamente estudiados. Los genes *LEA* codifican para proteínas que son sintetizadas y almacenadas durante la maduración de la semilla (Ingram & Bartels, 1996). Las proteínas se han agrupado en al menos siete grupos basados sobre su homología en la secuencia de aminoácidos. Estas proteínas cumplen la función protectora de estructuras y proteínas celulares durante lapsos de estrés (Ingram & Bartels, 1996). El gen *Lemmi9* de tomate codifica para el grupo 6 de proteínas *LEA* que son de carácter hidrofóbicos. La sobreproducción de estos compuestos tiene un efecto protector, ya que mantienen al mínimo los requerimientos de agua celular e impiden la cristalización de proteínas y otras moléculas importantes (Kim *et al.*, 2005). Los genes de alfa dioxigenasas ( *$\alpha$ -DOX*) codifican la biosíntesis de enzimas que catalizan la oxigenación de ácidos grasos, para dar lugar a la formación de mensajeros químicos como las oxilipinas implicadas en la repuesta defensiva contra el daño oxidativo y muerte celular (Molle *et al.*, 2007; Wasternack, 2007). En tomate están representadas por una pequeña familia de genes

que comprende al menos tres miembros: *LE $\alpha$ -DOX1*, -2, -3, de los cuales solo *LE $\alpha$ -DOX1* es sensible a la sal, y tiene una expresión específica en raíz (Ananchanok *et al.*, 2004).

### 1.7 Importancia de las proteínas quinasa activadas por mitogen (MAPK)

El papel central que juegan las MAPKs en plantas es la regulación de los mecanismos de defensa. Varias rutas de MAPKs son activadas por más de un tipo de estrés biótico y abiótico, y se ha sugerido que las cascadas de MAPKs actúan como puntos de convergencia en la señalización de estrés abiótico como biótico (Figura 1.15). Esta situación pone en manifiesto que diferentes estímulos pueden activar una misma MAP quinasa, así como varias MAPKs pueden ser activadas por el mismo estímulo.



**Figura 1. 16** Puntos de convergencia de rutas de señalización de estrés abiótico y biótico.

Modificado de Fujita *et al.*, 2006.

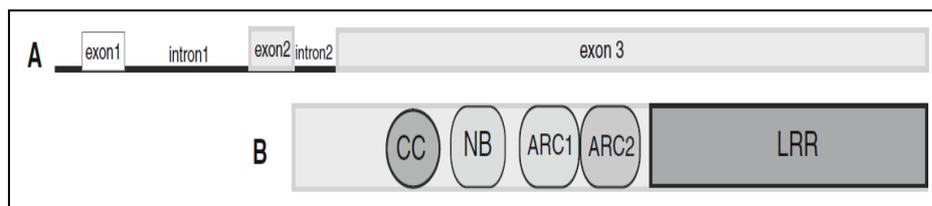
En el estrés biótico, las plantas utilizan proteínas de resistencia (R) junto con otros receptores para detectar la presencia o actividad de los patógenos. Las proteínas R reconocen proteínas virulentas Avr que son segregadas por los patógenos (Martin *et al.*,

2003), o proteínas de la planta (defensoras o guardias) que han sido modificadas por el patógeno para crear un ambiente favorable (McDowell & Woffenden, 2003). Esta interacción produce una explosión oxidativa, que da lugar a la formación de ERO y a la activación de las rutas de MAPKs (Dolores, 2007). Un ejemplo de esta interacción incluye a la proteína Mi-1 del tomate, la cual media la resistencia a los nematodos y está acompañada de una respuesta de hipersensibilidad (HR) (McDowell & Woffenden, 2003).

En la actualidad, no se encuentra en literatura sobre la ruta de señalización del estrés osmótico/oxidativo que usa los módulos de las proteínas quinasa activadas por mitogen (MAPK) en el que la resistencia al estrés salino se desencadene cuando una proteína Mi-1 detecta el estímulo abiótico. Es por ello que en esta investigación se estudia la expresión del gen *Mi-1* bajo condiciones de estrés salino. Esto permitirá determinar y fundamentar si la expresión del gen es únicamente dependiente del estrés biótico.

### 1.8 Gen *Mi-1*

El gen *Mi-1* es miembro de la familia de genes de resistencia (*R*) perteneciente a la superfamilia de los genes de unión a nucleótidos (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Este gen está conformado por tres exones, de los cuales dos son traducidos a proteína; además, presenta un intrón de 1306pb y otro de 75pb. El gen codifica una proteína de 1257 aminoácidos (Milligan *et al.*, 1998). La proteína NB-LRR sintetizada presenta un dominio amino terminal CC (coiled-coil) y se las conoce como CC-NB-LRR o proteínas CNL (McHale *et al.*, 2006) (Figura 1.17).



**Figura 1. 17** Representación esquemática del producto codificado por el gen de resistencia *Mi-1*.

Tomado de: Sanchez-Puerta & Williams, 2011.

Los dominios ricos en leucinas (LRR) están involucrados con el reconocimiento de los patógenos (McHale *et al* 2006) y pueden facilitar la interacción de los productos del gen *R* con otras proteínas que participan en la trasducción de señales de defensa (Bent, 1996). Este dominio LRR consiste de entre 24 a 28 repeticiones del aminoácido leucina, y contienen una secuencia de 14 residuos con la secuencia consenso LXXLXXLXXXC/NXX (van Ooijen *et al.*, 2008).

Los dominios NBS presentan actividad de unión a ATP o GTP, así como ATP sintetasa, factores de elongación ribosomal, adenilato quinasas, entre otras (Bent, 1996). Esta actividad es esencial para el funcionamiento de las proteínas y la regulación de la apoptosis o muerte celular programada. Además, éste dominio ha mostrado ser el mediador de la oligomerización de estas proteínas regulatorias, que son requeridas para la activación de proteasas apoptóticas (Williamson, 1999).

La proteína Mi-1 no presenta una secuencia de señalamiento transmembrana, lo que sugiere que el reconocimiento del patógeno ocurre en el citoplasma (Kaloshian *et al.*, 1998). La identificación del patógeno sigue un modelo de interacción indirecta, llamado también “Hipotesis de guardia”. Este modelo predice que una proteína R activa la resistencia cuando estas interactúan con otras proteínas de la planta (defensoras o guardias) que han sido modificadas por el patógeno en su hospedero para crear un ambiente favorable (McDowell & Woffenden, 2003).

La proteína inhibe la reproducción de tres especies de nematodos formadores de nudo *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Brown *et al.*, 1997), mediante una reacción de hipersensibilidad, respuesta que difiere para el caso de otros patógenos para los cuales también confiere resistencia (McDowell & Woffenden, 2003), como: el áfido de la papa *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.*, 1998) y los biotipos B y Q de la mosca blanca *Bemisia tabaco* (Nombela *et al.*, 2003). Esta resistencia solo se expresa fenotípicamente cuando la temperatura del suelo es inferior a los 28 °C, caso contrario los nematodos se reproducen de manera similar en cultivos resistentes como en susceptibles (Dropkin, 1969).

## **1.9 Técnicas Moleculares**

Las técnicas moleculares, son todos los métodos de laboratorio utilizados para llevar a cabo el estudio de la estructura y el funcionamiento de los genes a nivel molecular. Estas técnicas basan sus estudios en la detección de una secuencia específica de ADN o ARN. Los métodos más utilizados a nivel molecular son el Southern Blot, PCR, FISH y Secuenciación para ADN, y el Northern Blot, qRT-PCR y Microarray para ARN.

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una de las técnicas que ha revolucionado la Biología Molecular y que ha impulsado enormemente el avance de la investigación de la Biotecnología moderna. Esta técnica ha sido utilizada en Biotecnología Vegetal para el diagnóstico de distintos patógenos (Fitopatología), el estudio de la evolución y desarrollo de las especies (Filogenia) y el diagnóstico cualitativo de una secuencia determinada ADN (Caracterización génica), además de permitir la detección cuantitativa de genes (Expresión génica).

Todas las técnicas basadas en PCR utilizan ADN como secuencia diana. La PCR en tiempo real (qRT-PCR) es un método de estimación de los niveles de expresión génica (Bustin, 2000) que usa ADNc sintetizado a partir de ARN monocatenario que es utilizado como plantilla para su retrotranscripción (Haddad & Baldwin, 2010).

La validación de estas técnicas depende de la alta calidad del ácido nucleico utilizado. Por lo que la extracción del ácido nucleico constituye el primer parámetro en optimizarse para un diagnóstico molecular exitoso.

### **1.9.1 Extracción de ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos conforman el ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). El ADN es la molécula responsable de almacenar la información

genética que es transmitida a través del ARN y traducida a proteínas, un producto funcional expresado en el fenotipo (Roth, 2002).

La extracción de los ácidos nucleicos es el paso inicial y la clave de un análisis genético, cuyo objetivo es conseguir la separación de la molécula del resto de macromoléculas (proteínas, lípidos y polisacáridos) y obtener un ADN o ARN de alta calidad y estabilidad para viabilizar el estudio.

El ADN es una molécula muy estable y sólo se requiere mantener las muestras congeladas antes de su extracción. Para el aislamiento, se utilizan buffers de extracción que contienen detergentes (SDS, sodio dodecilo sulfato) y sales inorgánicas (cloruro de Sodio) que desestabilizan y rompen la membrana por la elevada fuerza iónica generada, una molécula quelante (EDTA) que inhibe a las DNAsas; sales tamponantes (Tris-HCl a pH fisiológico) que forman una capa iónica que protege el ADN y una enzima (proteínasa K) que degrada las proteínas. La adición consecuente de solventes orgánicos (fenol, cloroformo y/o isopropanol) solubiliza y separa las proteínas y lípidos del ADN, el cual es precipitado por la adición de un alcohol (etanol o isopropanol). La ejecución de este método tradicional requiere de tiempos de incubación largos y el ADN aislado puede resultar contaminado por ARN, fenol, cloroformo, sales, etanol, EDTA, proteínas, entre otros compuestos que pueden inhibir la PCR. Por lo que en la actualidad, el uso de kits comerciales resulta el método más efectivo para obtener ADN viable para la PCR, en términos de calidad, rapidez y simplicidad.

El aislamiento de ARN es la base de la cuantificación de transcritos en estudios de expresión génica. A diferencia del ADN, el RNA es muy inestable y se degrada fácilmente por las RNAsas presentes en el ambiente. Para mantener la integridad del transcrito, el proceso se realiza en frío y se utilizan potentes agentes caotrópicos como las soluciones de isocianato de guanidina durante la homogenización o lisis de la muestra, que inactivan las ribonucleasas (Chomczynski, 1993).

Posteriormente, la cuantificación del ácido nucleico resulta importante y necesaria realizar para determinar la cantidad de ácido nucleico que se empleará en los análisis genéticos.

La espectrofotometría es el método de análisis cuantitativo más usado para la cuantificación, debido a que es sencillo, específico y sensible. Este permite identificar y conocer la concentración de ácidos nucleicos por su espectro de absorción en una disolución (Ávila *et al.*, 2011). Un nuevo mecanismo de cuantificación es la espectrofotometría de bajo volumen, la cual elimina la necesidad de cubetas, facilita la lectura de ácidos nucleicos, y asegura una detección precisa (NanovuePlus, 2012).

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa, teñidos con colorantes fluorescentes, lo cual permite no solo evaluar su integridad, sino también estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de bandas de concentración conocida. En la actualidad existen colorantes fluorescentes, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vista Green y Syto60, que han sido desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis (Posso & Ghneim, 2008).

### **1.9.2 PCR convencional**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica molecular desarrollada por Kary Mullis, cuyo objetivo es sintetizar un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular. Es un proceso enzimático repetido en varios ciclos térmicos (Mullis, 1990).

La PCR convencional es un método cualitativo que detecta la presencia de la amplificación al finalizar un número predeterminado de ciclos. El producto de PCR es posteriormente visualizado en un gel de agarosa (Tozzini, 2004).

El proceso se realiza en un tubo que contiene todos los componentes de reacción, y el ADN molde. La mezcla final está constituida por la enzima DNA-polimerasa (Taq polimerasa), los iniciadores (cebadores o *primers*) de la reacción, los nucleótidos o monómeros básicos que construyen los ácidos nucleicos (dNTP), los cofactores de la polimerasa como el ión divalente magnesio, una solución tampón que mantendrá el pH adecuado para la síntesis y el ADN molde (Sambrook & Rusell, 2001).

El ensamblaje y síntesis se lleva a cabo de forma cíclica en un termociclador programable y cada uno de los ciclos consta de tres fases a temperaturas específicas. En la primera fase o fase de desnaturalización a 95° C, se separan las hebras de doble cadena. A continuación, en la fase de acoplamiento la temperatura se reduce la temperatura a 50° C y los cebadores se unen a la hebra complementaria de ADN diana. Finalmente, en la fase de elongación la temperatura aumenta a 72° C, y la enzima ADN polimerasa extiende los *primers* mediante la incorporación de los dNTPs (Sambrook & Rusell, 2001).

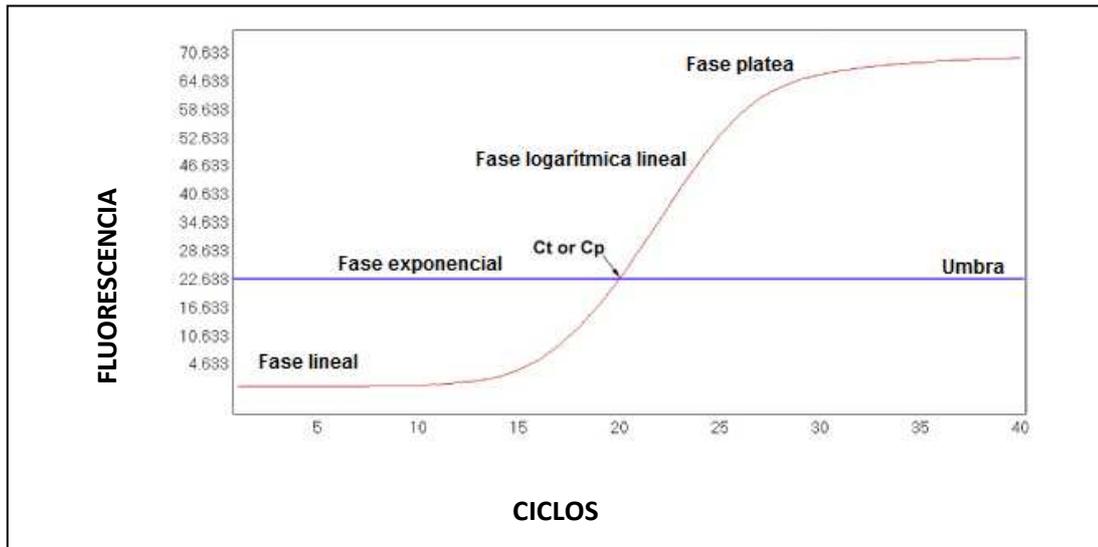
### 1.9.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qRT-PCR) es una variante de la PCR convencional. Es un método cuantitativo que detecta la presencia de uno o varios amplicones al finalizar cada ciclo. Las amplificaciones son analizadas y visualizadas mediante un software informático (Heid *et al.*, 1996). El análisis génico mediante qRT-PCR es altamente específico, sensible y eficiente (Velayudhan *et al.*, 2003).

La técnica de qRT-PCR permite determinar los perfiles de expresión génica mediante el estudio de los transcritos (ARNm) de una muestra. Para el análisis es necesario transcribir el ARNm en ADN copia (ADNc) mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa, puesto que la qRT-PCR, al igual que la PCR convencional, basa sus análisis en ácidos nucleicos de doble cadena. La precisión cuantitativa de ésta técnica depende de la alta calidad del transcrito, en consonancia con el ADNc sintetizado. La contaminación de ADN genómico en las muestras de ADNc afecta tanto a la sensibilidad como a la especificidad del ensayo de PCR, su eliminación de las preparaciones de ARN con DNasa, se recomienda para evitar falsos positivos (Valasek & Repa, 2005).

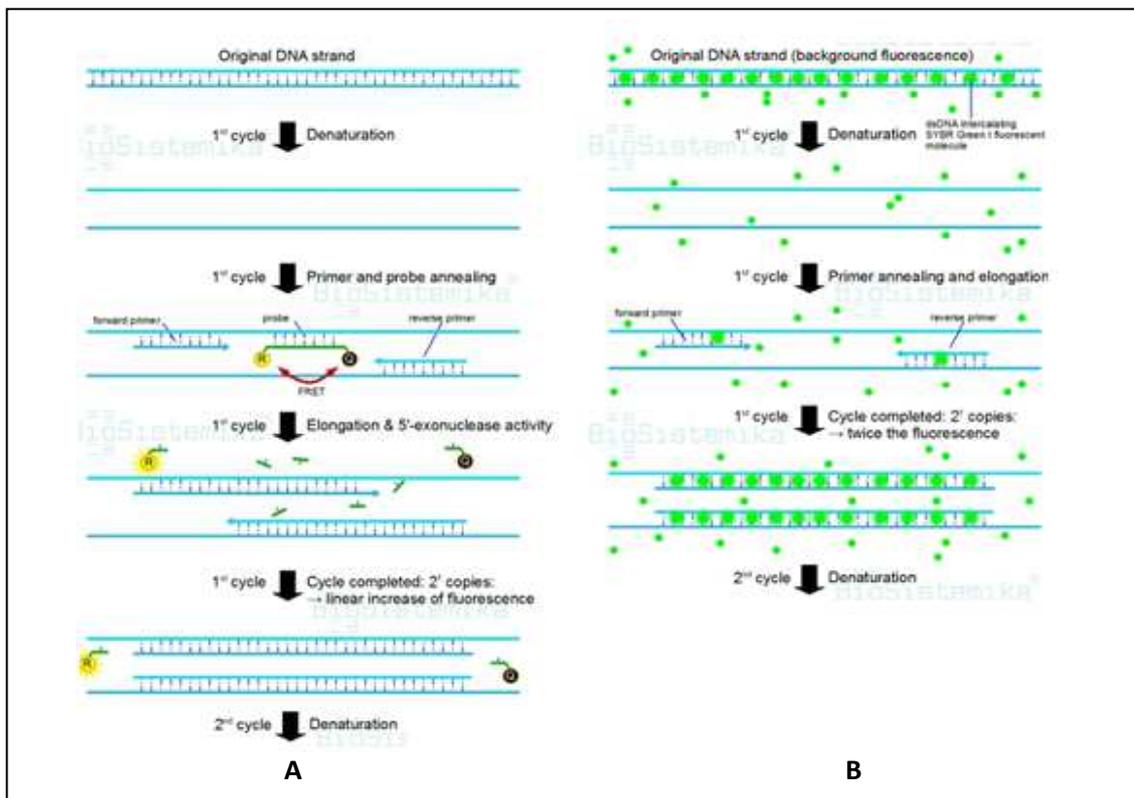
El método utiliza reporteros fluorescentes que en base a la detección de su fluorescencia emitida por cada ciclo, refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de la reacción puede dividirse en 4 fases (Figura 1.18), las cuales son: la fase inicial, la exponencial temprana, la exponencial y la de finalización o plateau. En la fase lineal, es el nivel basal o background de fluorescencia durante los primeros ciclos. En la fase exponencial temprana, la fluorescencia rebasa el umbral y el ciclo en el que se

produce es denominado Ct (curve threshold) o CP (crossing point). Este valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana y es utilizado para realizar los cálculos de cuantificación respectivos. En la fase logarítmica lineal, se duplica exactamente el producto en cada ciclo (óptima amplificación). Finalmente, en la fase de plateau, los reactivos se consumen y la reacción se detiene (Wong & Medrano, 2005).



**Figura 1. 18** Fases de una curva de amplificación de qRT-PCR. Modificado de: Rodríguez, 2012

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados pueden ser sondas específicamente marcadas con fluorocromos y agentes intercalantes de doble cadena (Cortazar y Silva, 2004) (Figura. 1.19).



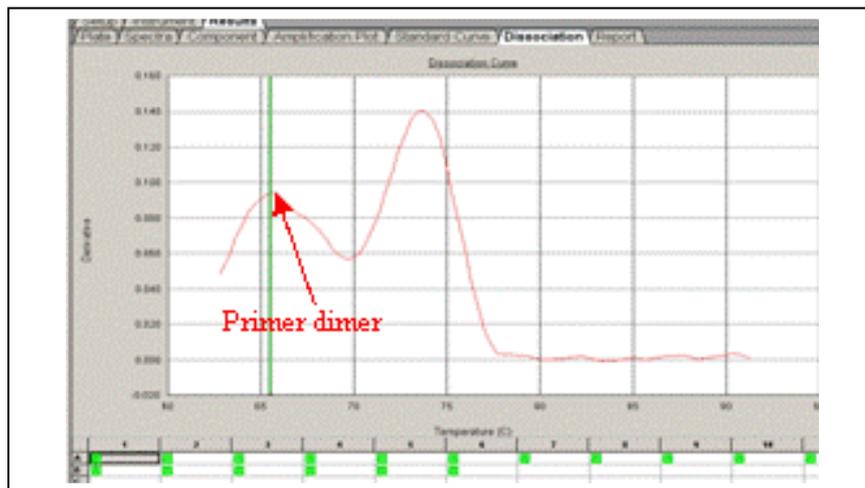
**Figura 1. 19** Técnicas de detección por fluorescencia. A. Sondas hidrolizadas B. SYBER Green. Tomado de: Biosistemika, 2011.

Las sondas de hidrólisis están basadas en la química de TaqMan. Estas son sondas de entre 20 y 30 nucleótidos, la cual está marcada con un reportero fluorescente en el extremo 5' y un amortiguador o “quencher” en el extremo 3' que absorbe la energía de excitación del fluoróforo. La fluorescencia del reportero es reducida por el quencher mediante FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) cuando la sonda se mantiene intacta, pero al momento que la sonda hibrida a una secuencia interna de la molécula blanco, por acción de la 5' exonucleasa de la ADN polimerasa durante la etapa de ampliación de la PCR, se degrada la sonda y se separa el *quencher* del reportero, lo que resulta en la emisión de una mayor fluorescencia (Wong & Medrano, 2005).

El SYBR-Green I es el fluoróforo específico de ADN bicatenario más usado en la RT-PCR. Su detección es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula, así como dímeros de *primers* y otros productos inespecíficos,

resultando en una sobre estimación de la concentración del ADN diana (Cortazar y Silva, 2004).

La amplificación de un producto específico se comprueba mediante un análisis de la curva de disociación. La temperatura de disociación de un producto específico depende del contenido de GC, la longitud y secuencia nucleotídica del amplicón (Ririe *et al.*, 1997), de tal manera que los productos no deseados pueden discriminarse de aquellos que son específicos, ya que estos últimos se disociarán a una temperatura de *melting* ( $T_m$ ) más alta. La presencia de dos o más picos, sugiere que se ha obtenido más de un producto amplificado (dímeros de *primers*), lo que invalidan el ensayo (Kubista *et al* 2006) (Figura 1.20).



**Figura 1. 20** Análisis de disociación de un fragmento con la presencia de dímeros de *primers*.

Tomado de: Applied Biosystem, 2012.

La estandarización y optimización de todos los procedimientos implicados en la reacción se hacen imprescindibles para garantizar la eficiencia y reproducibilidad de la reacción (Bustin, 2005).

### 1.10 Análisis de expresión génica

La expresión génica es un proceso biológico en cual el ADN se transcribe en ARN, y que a su vez este se traduce a proteínas, manifestándose en el fenotipo.

El análisis de la expresión génica proporciona información sobre la funcionalidad de las proteínas y su influencia en el fenotipo (Hernández *et al.*, 1994). La expresión génica puede ser cuantificada mediante PCR en tiempo real, y puede ser del tipo absoluta o relativa (Fonseca *et al.*, 2010).

En la cuantificación absoluta se usa estándares de concentración conocida que han sido diluidos, para generar curvas estándares. Estas curvas producen relaciones lineales entre el Ct y la cantidad inicial de ARN o ADNc, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas mediante el análisis de sus Ct y aplicando la ecuación de la recta. El uso de este método asume que la eficiencia de amplificación es la misma para todas las muestras (Fonseca *et al.*, 2010).

En la cuantificación relativa permite comparar los cambios en los niveles de expresión del gen objetivo (target) respecto a la expresión de un gen constitutivo (control endógeno) cuya expresión no varía en las condiciones experimentales (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008). Se han descrito diversos protocolos que se aplican en la cuantificación relativa, como el método de curva estándar, método comparativo delta Ct, modelo Pfaffl, Q-gene, Liu y Saint, entre otros (Fonseca *et al.*, 2010). El método comparativo ddCt (Livak & Schmittgen, 2001) es el más empleado y es el que se utilizó en la presente investigación.

El método ddCt no requiere la elaboración de una curva estándar, lo que lo hace muy útil para el análisis de una gran cantidad de muestras evitando el uso de los estándares diluidos. Para el cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  se asume que la reacción tiene una eficiencia del 100% y que cada gen tiene la misma pendiente. Con los valores de Ct tanto del gen en estudio como del gen constitutivo, se calcula la expresión génica relativa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Exp} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde, Ct es el número del ciclo umbral y  $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ muestra patrón (desconocida)} - Ct \text{ referencia (desconocida)}] - [Ct \text{ muestra patrón (calibrador)} - Ct \text{ referencia (calibrador)}]$ .

## **1.11 Hipótesis**

La expresión del gen *Mi-1* no se altera bajo estrés salino en ninguna de las especies estudiadas.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

El presente trabajo de investigación fue realizado por la señorita Carla Isabel Flores Rodríguez, egresada de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, en colaboración de los investigadores del proyecto de la Escuela Politécnica del Ejército, la Dra. Karina Proaño, Ing. Paola Karina Párraga Solórzano y Dr. Ricardo Oliva y, por parte del CIP, el Blgo. Francisco Jarrín.

### 2.2 Zona de estudio

La investigación se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) localizados en Sangolquí. Estos se encuentran ubicados a una latitud: S 0°20' / S 0°10' y longitud: W 78°30' / W 78° 15' a 2280msnm (IGM).

### 2.3 Período de inicio de la investigación

La investigación inició en el mes de marzo del año 2013 y culminó en el mes de enero del año 2013.

### 2.4 Diseño Experimental

El diseño experimental aplicado fue un modelo factorial 4X4, en el cual se estudió la influencia de los factores o variables independientes de 4 *Especie* y 4 *Tiempos*, sobre la variable respuesta o variable dependiente: *Expresión génica*. Para afianzar el análisis de los resultados, se realizaron 2 repeticiones para cada caso. La Figura 2.1 esquematiza el diseño experimental aplicado.

FACTOR-IEMPO	FACTOR-ESPECIE			
Niveles	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>
T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	T <sub>1</sub> E <sub>4</sub>
T <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>3</sub>	T <sub>2</sub> E <sub>4</sub>
T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> E <sub>4</sub>
T <sub>4</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>1</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>2</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>3</sub>	T <sub>4</sub> E <sub>4</sub>

**Figura 2. 1** Diseño factorial 4X4. Siendo, T<sub>n</sub> los tiempos en que se va a analizar la expresión génica T<sub>n</sub>E<sub>n</sub>, en cada una de las especies.

## 2.5 Metodología

### 2.5.1 Material vegetal

En la presente investigación se utilizaron genotipos silvestres y comerciales de *Solanum spp.* El material vegetal se obtuvo a partir de semillas suministradas por Centro Internacional de la Papa (CIP) y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la ESPE (BIOVEG). En la Tabla 2.1 se muestra una descripción generalizada del material vegetal empleado en el estudio.

**Tabla 2. 1** Descripción de las entradas de Solanáceas utilizadas en el estudio.

No.	Código	Nombre Científico	Genotipo	Sección	Procedencia
1	S33	<i>Solanum quitoense</i>	Silvestre	Lasciocarpa	CIP
2	S38	<i>Solanum vestisimum</i>	Silvestre	Lasciocarpa	CIP
3	S60	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>Syta</i>	Comercial	Lycopersicon	BIOVEG
4	S61	<i>Solanum</i> <i>pimpinellifolium</i>	Silvestre	Lycopersicon	BIOVEG

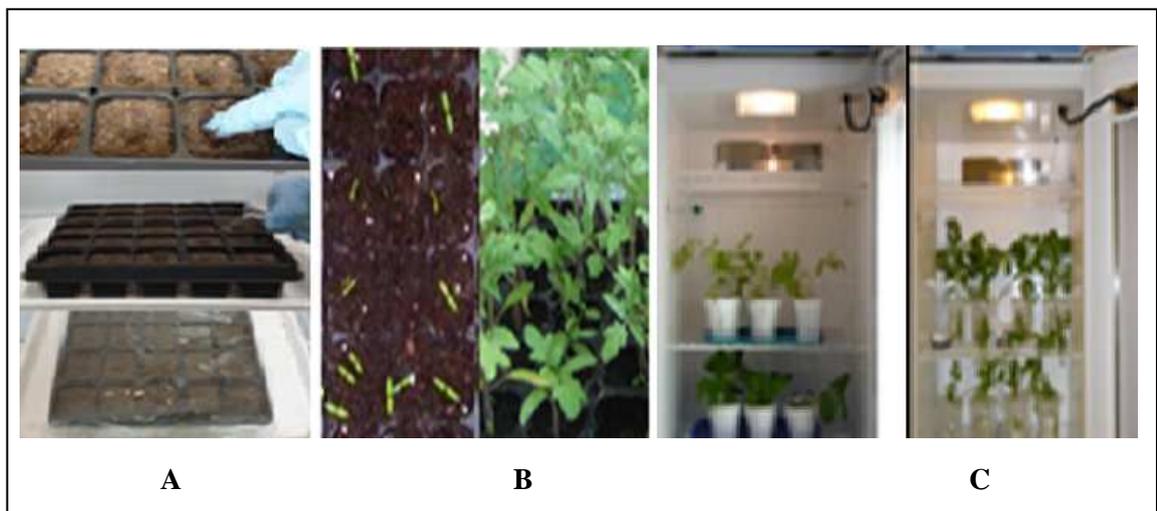
#### 2.5.1.1 Condiciones de cultivo

Las semillas fueron desinfectadas a nivel superficial con cloro comercial al 2,7% y germinadas en semilleros que contenían turba como sustrato. El riego se efectuó con solución nutritiva *Hoagland* (Hoagland y Arnon, 1950) cada 3 días. La fórmula del medio nutritivo se describe en el ANEXO A.

Posteriormente a la germinación, las plántulas de aproximadamente 10 cm de longitud se trasplantaron a macetas con turba, tierra negra y cascajo en proporción 3:1:1.

Antes de iniciar los tratamientos de estrés salino, las plántulas de 6 semanas de edad se aclimataron durante 2 semanas a condiciones de hidroponía, en recipientes que contenían 500 mL de solución nutritiva *Hoagland* como sustrato de crecimiento, la cual fue renovada cada 5 días.

La germinación, desarrollo y aclimatación, se realizaron en una cámara de crecimiento acondicionada a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, humedad relativa de 65% y con un fotoperiodo de 16 h/ luz y 8 h/oscuridad. En la Figura 2.2 se muestra parte del proceso.



**Figura 2. 2** Proceso de obtención de material vegetal a partir de semillas de solanáceas. A. Germinación en semilleros, B. Aparición de las primeras hojas verdaderas, C. Trasplante a macetas y adaptación a cultivo hidropónico.

### 2.5.1.2 Tratamientos de estrés salino

El ensayo se llevó a cabo en dos fases experimentales: la Fase I o Fase de Tolerancia y la Fase II o Fase de Incidencia. Se utilizaron plántulas de 8 semanas de edad. Los ensayos se realizaron bajo condiciones de hidroponía en una cámara de

crecimiento acondicionadas a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, humedad relativa de 65% y con un fotoperiodo de 16 h/ luz y 8 h/oscuridad.

En la *Fase I*, se realizó una prueba de tolerancia a la salinidad durante 31 días, en los genotipos *Solanum lycopersicum* var. *Syta* y *Solanum pimpinellifolium*, con la finalidad de determinar la concentración óptima a la que las plantas responden al estrés. Las concentraciones utilizadas en los tratamientos fueron de 50, 100 y 150 mM de NaCl con su respectivo control en solución nutritiva de *Hoagland*.

En la *Fase II*, se sometieron a los genotipos de *Solanum lycopersicum* var. *Syta*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum quitoense* y *Solanum vestissimum* a la exposición de una dosificación de NaCl durante 0, 8, 12 y 24 horas, con el objeto de evaluar su efecto o incidencia inmediata en la expresión génica. Los ensayos consistieron en un tratamiento control y un tratamiento salino en solución nutritiva de *Hoagland* por cada tiempo de exposición. Adicionalmente, se analizó el comportamiento fotosintético en las especies *Solanum lycopersicum* var. *Syta*, y *Solanum pimpinellifolium* así como su relación con la expresión génica.

Los efectos en la fotosíntesis se determinaron con la medición de la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) en el fluorómetro OS-30p en cada tratamiento.

### **2.5.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico**

En el proceso de extracción de ADN se utilizó dos raíces congeladas de cada genotipo, recolectada al tiempo 0 y se empleó el método descrito por DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial Qiagen®, detallado a continuación:

El material vegetal fue macerado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo blanquecino fino. Se colocaron 100 mg del triturado obtenido en un tubo de 1,5 mL, se le añadieron 400 uL de *buffer* de extracción AP1 y se homogenizó con un pistilo. A continuación se agregaron 4 uL de RNasa, se agitó brevemente en un vórtex y se incubó en baño maría por 10 minutos a 65 °C, con volteo cada 2-3 minutos. Concluida la incubación se adicionaron 130 uL de buffer AP2, se mezcló y se incubó en hielo por 5 minutos. El lisado fue centrifugado a 14.000 rpm por

5 minutos. El sobrenadante se traspasó a la columna QIAshredder y se centrifugó a 14.000 rpm por 2 minutos. El filtrado obtenido se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL sin dañar el pellet, se le adicionaron 1.5 volúmenes de *buffer* AP3/E y se homogenizó por pipeteo. Posteriormente, se transfirieron 650 uL de la mezcla a una columna DNeasy Mini, unida a un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto. El líquido centrifugado fue descartado y se repitió este paso con la mezcla restante. Terminado este proceso se colocó la misma columna en un tubo nuevo de recolección de 2 mL, se añadieron 500 uL de *buffer* AW, se centrifugó la columna a 10.000 rpm por un minuto y se eliminó el filtrado generado. Nuevamente, se agregaron otros 500 uL de *buffer* AW y se centrifugó el tubo a 14.000 rpm por un minuto. A continuación se situó la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL, se adicionaron 50 uL de *buffer* de elución AE, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto. Se repitió el proceso desde la adición de los 50 uL de la *buffer* de elución AE. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

La determinación de la concentración del ADN se realizó por espectrofotometría mediante el equipo NanoVue™ Spectrophotometer.

En base a los resultados de cuantificación obtenidos, se estandarizó la concentración de ADN genómico de las muestras a 10 ng/uL, mediante una disolución con agua DEPC de Invitrogen®. La calidad del ácido nucleído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con SYBR® Safe DNA gel stain (0,15 uL/1 mL de gel) y preparados con TBE 1X. La estimación de la concentración del material genético se constató a través de la comparación visual de la intensidad de las bandas de ADN con el patrón de bandas de los marcadores de peso molecular High DNA Mass Ladder y 1 kb High DNA Mass Ladder de Invitrogen® (Tabla 2.2).

**Tabla 2. 2** Cantidad de ADN de acuerdo a la intensidad de banda del marcador Low DNA Mass Ladder  
Tomado de INVITROGEN, 2002.

Tamaño del Fragmento	Low DNA Mass Ladder	
	4 ul	Concentración de ADN (ng/uL) al 1% de agarosa
10 000	200 ng	25
6 000	120 ng	15
4 000	80 ng	10

3 000	60 ng	7,5
2 000	40 ng	5
1 000	20 ng	2,5

En el gel, se cargaron 4 uL de marcador de peso molecular en el primer pocillo, y en los siguientes se adicionaron una mezcla de 2 uL de buffer de carga Blue Juice 10X de Invitrogen® y 8 uL de ADN. La corrida electroforética se realizó a 120 V y 300 mA durante una hora. Finalmente, las bandas se fotodocumentaron en el transiluminador UV.

### 2.5.3 Identificación de la región exónica del gen *Mi-1* en raíz

La identificación de la región exónica del gen *Mi-1* en ADN de raíz procedente de cada genotipo de *Solanum spp* se realizó mediante PCR convencional. Se usaron los *primers* empleados por Zárate *et al.* (2008), los cuales amplifican una región conservada de 1000 pb flanqueante entre los 4678 y los 5676pb del gen *Mi-1*. En el Cuadro 2.1 se muestran la secuencia y características de los *primers* utilizados.

**Cuadro 2. 1** Características de los *primers* empleados para identificar la región exónica de gen *Mi-1* en los genotipos de *Solanum spp*. Tomado de: Zárate *et al* 2008.

Nombre	Secuencia	Longitud (pb)	% CG	Tm (°C) <sup>1</sup>	Ta (°C) <sup>2</sup>
1F	5'-AACTCGAGAAAAGGAAGTGG-3'	20	45	58	54
1R	5'-CAAGATTGATCCTTTGTTAGACAC-3'	24	38	66	62

<sup>1</sup>Calculado mediante:  $T_m = 2(A+T) - 4(C+G)$

<sup>2</sup>Calculado mediante  $T_a = T_m - 4$

El ensamblaje de la reacción se llevó a cabo en el interior de una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120 con reactivos Invitrogen®. Las condiciones estandarizadas de Master mix para la PCR se detallan en la Tabla 2.3.

**Tabla 2. 3** Condiciones de la Master mix empleadas para la ampliación del exón gen *Mi-1*.

Reactivo	Ci	Cf	V final (uL)
Buffer	10x	1x	2.50
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM	1
dNTPs	10mM	150uM	0.375
Primer F	100uM	1uM	0.25
Primer R	100uM	1uM	0.25

Platinum Taq polimerasa	5U/uL	2U	0.40
Agua	-	-	18.225
ADN	10ng/uL	-	2.00
TOTAL			25.00

La amplificación del exón se realizó en el termociclador Techne-TC-512 con las condiciones presentes en la Tabla 2.4.

**Tabla 2. 4** Programa de PCR estandarizado para la amplificación de la región exónica del gen Mi-1

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° Ciclos
Denaturación inicial	94	5.0	1
Denaturación	92	0.45	40
Alineamiento	55	1.0	
Extensión	72	1.0	
Extensión final	72	10.0	1

La presencia del producto de PCR se visualizó mediante geles de agarosa al 1,5% (p/v), teñidos con SYBR® Safe gel stain (0,15 uL/1 mL de gel) y preparados con TBE 1X. Para estimar el tamaño del amplicón deseado (~1000 pb) se utilizaron los marcadores de peso molecular Low DNA Mass Ladder y High DNA Mass Ladder de Invitrogen®. En el gel se cargaron 4 uL de cada marcador de peso molecular, en el primer y último pocillo, y el resto de pocillos fueron cargados con una mezcla de 2 uL de buffer de carga Blue Juice 10X de Invitrogen® y 8uL de ADN. La corrida electroforética se realizó a 120 V y 300 mA durante una hora. Finalmente, el gel se fotodocumentó en el transiluminador bajo luz UV.

#### 2.5.4 Extracción y cuantificación de ARN total

En el proceso de extracción de ARN se utilizó raíz congelada de cada entrada solanácea recolectada en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas de exposición de 150 mM NaCl. Se empleó el método descrito por TRIzol® reagent de la casa comercial Invitrogen®, con modificaciones realizadas para su optimización. El protocolo se detalla a continuación:

El material vegetal fue macerado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo blanquecino fino. Se colocaron 200 mg del triturado obtenido

en un tubo de 1,5 mL, se le añadieron 500 uL de buffer de extracción TRIzol® reagent y se homogenizó con un pistilo. Nuevamente, se agregaron otros 500 uL de buffer de extracción TRIzol® reagent, se agitó brevemente en un vórtex, y se incubó por 10 minutos en hielo. A continuación, se le agregaron 200 uL de cloroformo, se mezcló por volteo y se incubó durante 10 minutos en hielo. El lisado fue centrifugado a 4°C a 12.000 rpm por 25 minutos. A continuación, se transfirieron 600 uL del sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml y se le añadieron 500 uL de isopropanol, se homogenizó ligeramente por pipeteo y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 4°C a 12.000 rpm por 25 minutos, y se descartó el sobrenadante sin dañar el pellet. Consecuentemente, al mismo tubo se le adicionó 1 mL de Etanol al 75%, se agitó por volteo y se centrifugó a 4°C a 9.000 rpm por 30 minutos. Se desechó el alcohol y se seco el pellet invirtiendo el tubo con la tapa abierta sobre papel secante durante 10 minutos. Finalmente, al pellet de ARN se le resuspendió en 30uL de agua DEPC y se almacenó a -80°C.

La determinación de la concentración del ARN se realizó por espectrofotometría mediante el equipo NanoVue™ Spectrophotometer.

La calidad del ARN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (p/v) teñidos con SYBR® Safe DNA gel stain (0,15 uL/1 mL de gel) y preparados con TBE 1X. La integridad del ácido nucleico se estimó por la presencia de las bandas ribosomales. En cada pocillo del gel se cargó una mezcla de 2 uL de buffer de carga Blue Juice 10X de Invitrogen® y 3 uL de ARN. La corrida electroforética se realizó a 120 V y 300 mA durante una hora. Finalmente, el gel se fotodocumentó en el transiluminador UV.

### **2.5.5 Síntesis de ADNc**

El proceso de conversión de ARNm a ADNc se realizó el mismo día del aislamiento de ARN. En base a los resultados de cuantificación de ARN, se determinó el volumen necesario para 3 ug de ARN total y se colocó en un microtubo de 200 uL. Al tubo se le añadieron 1 uL de buffer 10X DNase I, 1 uL de DNase I Amplification Grade, para eliminar el DNA genómico contaminante y se adicionó agua DEPC necesaria para completar un volumen de 10 uL. Se incubó por 15 minutos a temperatura

ambiente. Finalmente, se inactivó la DNasa con 1 uL de EDTA y se incubó en el termociclador a 65°C, durante 10 minutos.

A partir del ARN tratado con DNase I, se sintetizó la hebra de ADN complementario. Para la reacción se colocó en el mismo tubo 1 uL de Oligo dT y 1 uL de dNTPs a una concentración de 0.5uL/uL y 10mM respectivamente, y se aforó a 14 uL con agua DEPC. Se incubó en el termociclador a 65°C por 5 minutos y posteriormente en hielo durante un minuto. Finalmente, se adicionaron 4uL de First Strand Buffer, 1 uL de DTT y 1 uL de Superscript III Reverse transcriptase, en concentraciones de 5X, 0.1 M y 200 U/uL respectivamente, y se incubaron en el termociclador a 50°C por 60 minutos, a 55°C por 15 minutos y a 70°C por 15 minutos. Todas las muestras fueron almacenadas a -20 °C. En este proceso se utilizó el Oligo-dT como iniciador 3' de la reacción y la enzima transcriptasa inversa para catalizar o sintetizar las nuevas moléculas de ADN copia (ADNc).

La presencia de ADNc se visualizó mediante geles de agarosa al 1,8% (p/v), teñidos con SYBR® Safe gel stain (0,15 uL/1 mL de gel) y preparados con TBE 1X. En el gel se cargaron 4uL de marcador de peso molecular de 1Kb, en el primer pocillo, y el resto de pocillos fueron cargados con una mezcla de 2 uL de buffer de carga Blue Juice 10X de Invitrogen® y 8uL de ADNc. La corrida electroforética se realizó a 120 V y 300 mA durante 30 minutos. Finalmente, el gel se fotodocumentó en el transiluminador bajo luz UV

### **2.5.6 Diseño de *primers***

Para el diseño de los oligonucleótidos, se buscaron las secuencias de los genes *Mi-1*, *Lemmi9*, *LE $\alpha$ -DOX1* y *GAPDH* según el número de accesión provista por la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y se documentaron las secuencias en formato FASTA. Los números de accesión de cada gen se describen en la Tabla 2.5.

**Tabla 2. 5** Número de accesión de los genes utilizados para el diseño de *primers*. Datos obtenidos de NCBI, 2012.

GEN	NOMBRE	ACCESION
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	U97257
<i>Mi-1</i>	Gen de resistencia a nematodo Mi1	U65668.1
<i>Lemmi9</i>	Gen de la embriogénesis tardía	Z46654
<i>LE<math>\alpha</math>-DOX1</i>	Alfa Dioxigenasa	AY344539

A continuación, a cada gen se le realizó un alineamiento con todas las secuencias de la base de datos Solgenomic Network (SGN por sus siglas en inglés; <http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>). Sólo las secuencias con hits de *e-value* iguales a 0 se escogieron y se almacenaron en formato FASTA.

Posteriormente, las secuencias documentadas se alinearon en el software BioEdit® (Versión 5.0.9.1) y se buscaron secuencias consenso de 18 a 24 pb como candidatos posibles de *primers*.

Las secuencias consenso fueron probadas en el software Primer 3 (versión 0.4.0; <http://frodo.wi.mit.edu/>) y Oligo Analyzer (versión 3.1; <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para determinar su validez y descartar los *primers* con alta formación de dímeros e hibridaciones inespecíficas. Los criterios de diseño de *primers* utilizados se describen ANEXO B y ANEXO C.

Concluido el proceso de diseño, se procedió a identificar similitudes locales entre otras secuencias mediante un análisis con el algoritmo en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para ello se realizó un BLASTN de la secuencia flanqueada por los *primers* con la colección de secuencias (nr/nt) de la base de datos. Solo los resultados con score  $\geq 200$  fueron escogidos.

La síntesis de los *primers* se encargó a la casa comercial INVITROGEN, a través de su proveedor autorizado en el país. Una vez sintetizados estos se

reconstituyeron a una concentración de 100 uM con agua DEPC, se incubaron a 4°C durante 24 horas y finalmente, se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

## 2.5.7 PCR en Tiempo Real

### 2.5.7.1 Estandarización de las condiciones de amplificación

La estandarización de las condiciones óptimas de amplificación de los genes *GAPDH* (Gen constitutivo), *Mi-1*, *Lemmi9* y *LEa-DOX* (Genes Target) se llevó a cabo mediante PCR convencional. Inicialmente, se determinó la temperatura de alineamiento en ADN genómico, y se verificó la presencia de cada gen en el transcrito (ADNc). La especificidad de los *primers* y expresividad del gen constitutivo se validó en qRT-PCR. Se utilizó el material genético de cada una de las cuatro especies en estudio.

En la optimización de la temperatura de alineamiento de los *primers*, se emplearon las condiciones de *master mix* establecidas para la amplificación del exón del gen *Mi-1* y se varió la concentración de *primers* a 200 nM como recomienda el protocolo propuesto por SYBR GreenER qPCR SuperMix for ABI PRISM de Invitrogen. Las condiciones de Master Mix se detallan en la Tabla 2.6.

**Tabla 2. 6** Condiciones generales de *Master mix*.

Reactivo	Ci	Cf	V final (uL)
Buffer	10x	1x	2.50
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2mM	1
dNTPs	10mM	150uM	0.375
Primer F	100uM	200uM	0.5
Primer R	100uM	200M	0.5
Taq polimerasa	5U/uL	2U	0.4
Agua	-	-	18.425
ADN	10ng/uL	-	2.00
TOTAL			25.00

En función de los valores de temperatura de fusión ( $T_m$ , *melting temperature* por sus siglas en ingles) de los *primers* que amplifican para los genes *GAPDH* y *Mi-1*, se determinó la temperatura de alineamiento de cada *primer* y se realizó un ensayo de PCR en gradiente. En la programación del termociclador, la temperatura de alineamiento se probó en un rango de entre 52.7 a 61.7 °C con intervalos de 3°C, como se especifica en la Tabla 2.7.

**Tabla 2. 7** Programa de PCR para la amplificación de los genes GAPDH y Mi-1.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>N° Ciclos</b>
Denaturación inicial	94	5.0	1
Denaturación	92	0.45	40
Alineamiento	52.7 - 61.7	1.0	
Extensión	72	1.0	
Extensión final	72	10.0	1

Posteriormente, en base a los resultados, se definió una temperatura consenso de hibridación y se realizó la amplificación de los genes *GAPDH*, *Mi-1*, *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOXI* mediante PCR convencional en ADN genómico y en el transcrito (ADNc).

Todos los resultados fueron visualizados en gel de agarosa al 3% (p/v), teñidos con SYBR® Safe gel stain (0,15uL/1mL de gel) y preparados con TBE 1X. Para estimar el tamaño de los productos de PCR se utilizó el marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder de Invitrogen®. La corrida electroforética se realizó a 120V y 300mA durante una hora.

Una vez establecida la temperatura de alineamiento en PCR convencional, se procedió a validar la temperatura de alineamiento en qRT-PCR en ADNc.

La amplificación de los genes *GAPDH*, *Mi-1*, *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOXI* se llevó a cabo en una PCR trifásica en el equipo ABI Prism 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El estudio de la especificidad de los *primers* se evaluó mediante un análisis de los picos de disociación y los niveles de expresión del gen constitutivo se valoraron en base al valor ciclo umbral (Ct), en el Software v1.4 de Applied Biosystem.

Para los ensamblajes de las reacciones de PCR en tiempo real se usaron platos Microamp® Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems). Los platos fueron sellados con adhesivos ópticos Microamp®Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). Cada reacción se ensambló por triplicado y se siguió el protocolo de

propuesto por SYBR GreenER qPCR SuperMix for ABI PRISM de Invitrogen, modificado a un volumen final de reacción de 25ul, como se indica en la Tabla 2.8.

**Tabla 2. 8** Condiciones de la Master Mix empleadas para la amplificación.

Reactivo	Ci	Cf	V final (uL)
SYBER Green	2x	1x	12.50
Primer F	10uM	200nM	0.50
Primer R	10uM	200nM	0.50
Agua	-	-	10.5
ADNc	-	-	1.00
TOTAL			25.00

El programa de qRT-PCR se realizó bajo las mismas condiciones de denaturación, alineamiento y polimerización de la PCR convencional y se adaptó un ciclo para incubación UDG, inactivación UDG y activación de la Polimerasa, como se describe en la Tabla 2.9.

**Tabla 2. 9** Programa de PCR en Tiempo Real estandarizado para la amplificación

Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos	
Incubación UDG	50	2.0 min	1	
Inactivación UDG y activación de la ADN polimerasa	95	10.0 min		
PCR TRIFÁSICA	Desnaturalización	92	0.45 seg.	40
	Alineamiento	55.7	1.0 min	
	Polimerización *	72	1.0 min	
Picos de disociación	95	15 seg.	1	
	60	1 min		
	95	15 seg.		
	60	15 seg.		

\* Recolección de datos

### 2.5.7.2 Cuantificación relativa de la expresión génica

El nivel de expresión génica se midió en base al valor ciclo umbral (Ct) registrado en el Software v1.4 de Applied Biosystem. Los valores de Ct se determinaron para las cuatro especies de solanáceas en los tiempos de experimentación establecidos.

Inicialmente, se ensamblaron 3 reacciones para el gen constitutivo *GAPDH* y se estimaron los valores de Ct. Posteriormente, se calculó el factor de dilución para un Ct específico, a fin de corregir los valores Ct del gen diana y eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción a ADNc. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$fd = 2^{Ct_t - Ct_p}$$

Siendo,  $Ct_t$ : el valor de Ct máximo y  $Ct_p$ : el valor de Ct promedio obtenido. Finalmente, con los valores de  $fd$  obtenido para cada una de las muestras se calculó el volumen de agua DEPC requerida para diluir el ADNc, mediante la fórmula:

$$Va = (Vi \times fd) - Vi$$

Donde,  $Va$ : es el volumen agua DEPC que se debe añadir al ADNc para alcanzar un valor de Ct homogéneo para todas las muestras, y  $Vi$ : es el volumen de ADNc que se quiere diluir.

Una vez diluidos los ADNc, se analizaron los niveles de expresión génica de *Mi-1*, *Lemmi9* y *LEα-DOXI*. Los valores de Ct registrados por el Software v1.4 de Applied Biosystem se exportaron a una hoja de cálculo Excel y se cuantificaron los cambios relativos en la expresión de cada gen, mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  propuesto por Livak y Schmittgen, (2001), la siguiente fórmula fue utilizada:

$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde, Ct es el número del ciclo umbral y  $\Delta\Delta Ct = [Ct_{\text{gen target}} (\text{Trat. experimental}) - Ct_{\text{gen constitutivo}} (\text{Trat. experimental})] - [Ct_{\text{gen target}} (\text{Trat. control}) - Ct_{\text{gen constitutivo}} (\text{Trat. control})]$ .

Para el cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  se asumió que la reacción tuvo una eficiencia del 100% y que cada gen que se comparó tenía la misma pendiente.

### **2.5.8 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó en el software IBM SPSS statics 20. A los datos obtenidos se les sometió a un análisis univariante ANOVA y prueba post-hoc de DHS-Tukey para una probabilidad del 95%.

## CAPITULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Tratamiento de estrés salino

El ensayo se llevó a cabo en dos fases experimentales: la Fase 1 o Fase de Tolerancia y la Fase II o Fase de Incidencia

En la Fase I, se realizó una prueba de tolerancia a la salinidad durante 31 días, y se evaluaron los cambios fenotípicos: morfológicos (flacidez foliar, pérdida de la rigidez del tallo, necrosis foliar, clorosis y marchitez) y fisiológicos (fotosíntesis), en las especies solanáceas *Solanum lycopersicum* var. *Syta* y *Solanum pimpinellifolium* expuestos a 50, 100 y 150 mM de NaCl en solución nutritiva de Hoagland bajo condiciones de hidroponía.

En la Figura 3.1 se visualiza los cambios morfológicos de cada especie bajo el efecto de las cuatro dosis de NaCl.

En las plantas de *Solanum pimpinellifolium* (S61) no se observaron cambios morfológicos durante la experimentación a diferencia de las plantas de *Solanum lycopersicum* var. *Syta* (S60). Las plantas de *Solanum lycopersicum* var. *Syta* (S60) cultivadas a una concentración de 50 mM no mostraron síntomas de estrés en el primer día, en contraste con las plantas expuestas a dosis mayores, que presentaron una disminución en la rigidez del tallo y flacidez en las hojas. A los 15 días, éstas experimentaron un decaimiento significativamente menor que las plantas estresadas con 100 y 150 mM de NaCl, las cuales exhibieron en sus hojas necrosis, clorosis, marchitez y defoliación.

A los 31 días, los individuos expuestos a 50 y 100 mM de la sal presentaron un decaimiento generalizado, mientras que las sometidas a 150 mM murieron.

Tiempo (de)	CAMBIOS FENOTÍPICOS							
	<u>S60</u>				<u>S61</u>			
	C	50Mm	100mM	150mM	C	50Mm	100mM	150mM
1								
			A	ab	N/C			
15								
		ac	abcde	abcde	N/C			
31								
		abcde	abcde	f	N/C			

**Figura 3. 1** Comportamiento Fenotípico en los genotipos de *Solanum spp* a diferentes concentraciones de NaCl. S61: *Solanum pimpinellifolium*; S60: *Solanum lycopersicum var. Syta* a: Flacidez foliar; b: Pérdida de la rigidez del tallo; c: Necrosis foliar; d: Clorosis; e: Marchitez y defoliación; f: Muerte. de; Día/s de exposición. N/C: Cambios no observados

Para determinar los efectos producidos en la fotosíntesis se midió la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) con el fluorómetro OS-30p en cada tratamiento (Tabla 3.1). Los datos obtenidos mostraron una disminución del valor Fv/Fm en las plantas de *Solanum lycopersicum var. Syta* (S61), en contraste con las plantas de *Solanum pimpinellifolium* (S60). En la Tabla se presenta los valores obtenidos de Fv/Fm como medias  $\pm$ SD de 2 cuantificaciones independientes.

**Tabla 3. 1** Comportamiento de la eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$ ) en función al tiempo de exposición de NaCl a diferentes concentraciones.

ESPECIE	NaCl (mM)	TIEMPO (de)			
		Inicio*	1	15	31
		Fv/Fm	Fv/Fm	Fv/Fm	Fv/Fm
<b>S60</b>	0	0,794±0,003	0,791±0,001	0,79±0,004	0,700±0,001
	50	0,790±0,006	0,785±0,007	0,789±0,003	0,755±0,003
	100	0,782±0,003	0,785±0,003	0,771±0,001	0,789±0,006
	150	0,794±0,006	0,79±0,003	0,785±0,001	0,785±0,003
<b>S61</b>	0	0,867±0,001	0,879±0,004	0,851±0,001	0,870±0,007
	50	0,867±0,001	0,797±0,000	0,704±0,003	0,604±0,013
	100	0,871±0,003	0,71±0,006	0,609±0,007	0,42
	150	0,872±0,003	0,599±0,001	0,339±0,003	0

\*Medición tomada al inicio del ensayo  
de: Días de exposición de NaCl  
Fv/Fm: Eficiencia fotosintética  
S61: *Solanum pimpinellifolium*  
S60: *Solanum lycopersicum* var. *Syta*

Los resultados demostraron que la concentración de 150 mM genera un estrés inmediato y creciente a nivel morfológico y fisiológico (fotosíntesis), por tanto se definió a esta concentración como la dosis óptima de estrés y se evaluó su efecto o incidencia inmediata en la expresión del gen *Mi-1* y los genes asociados con la tolerancia a la salinidad: *Lemmi9* y *LEα-DOX1*, para cada tratamiento establecido en la *Fase II*. Los resultados se muestran en el apartado 3.6.3.

### 3.2 Identificación de la presencia del exón del gen *Mi-1* en raíz

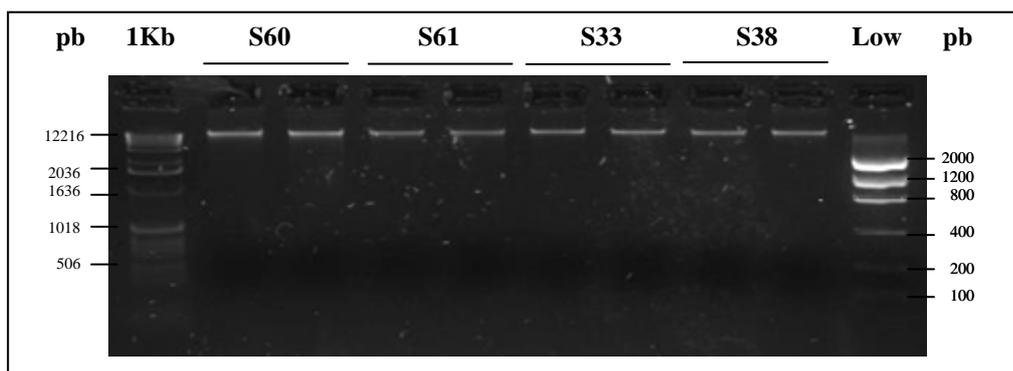
El primer paso para la identificación del exón del gen *Mi-1*, fue aislar y cuantificar el ADN genómico a partir de 100 mg de raíz procedente de las entradas solanáceas estudiada. Para el proceso de extracción se empleó el protocolo de DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial Qiagen®.

La determinación de la concentración del material genético obtenido se realizó mediante espectrofotometría, el cual generó buenos resultados en cuanto a la cantidad de ADN. Los resultados se especifican en la Tabla 3.2.

**Tabla 3. 2** Concentración de ADN de las muestras obtenidas mediante DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, 2006).

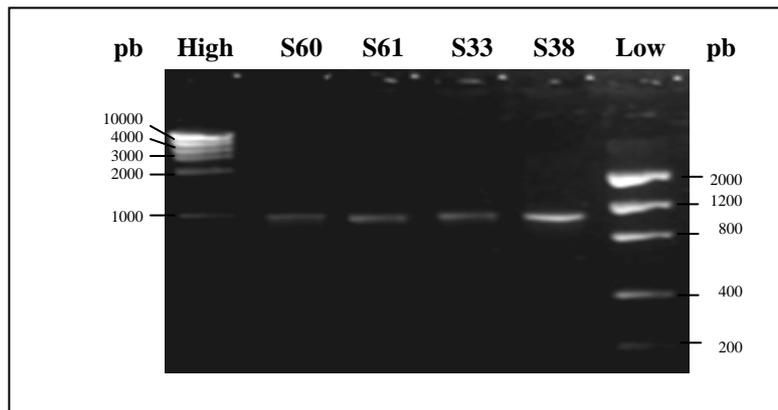
Muestra	Concentración ng/uL
S33	116
S38	136
S60	124
S61	95

El ADN obtenido de cada entrada solanácea fue diluido a 10 ng/uL para su amplificación. En la Figura 3.2 se visualiza para todos los casos, un material genético íntegro, evidenciándose como una sola banda sin degradación. El ADN aislado fue de alto peso molecular y su concentración de 10 ng/uL fue corroborada con los patrones de bandas del marcador Low DNA Mass Ladder de INVITROGEN.



**Figura 3. 2** Visualización del ADN genómico diluido a 10 ng/uL en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain correspondiente a las especies S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). 1kb y Low DNA Mass Ladder son los marcadores de peso molecular. La banda de 800 pb denota una concentración de ADN aproximada a 10 ng/uL.

Luego se realizó la amplificación de la región exónica del gen *Mi-1* mediante PCR convencional, la cual generó en todas las especies un producto específico de ~1000 pb. El fragmento amplificado corresponde a la región exónica funcional flanqueante entre los 4678 y los 5676pb del gen *Mi-1* (Figura 3.3). Estos resultados permitieron la utilización de las cuatro especies para los análisis de la expresión localizada del gen mediante qRT-PCR.



**Figura 3. 3** Visualización de los fragmentos de PCR amplificados para la región exónica del gen *Mi-1*, en gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBR® en las especies S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). High DNA mass ladder y Low DNA mass ladder son los marcadores de peso molecular.

La intensidad de los fragmentos específicos obtenidos para la región exónica del gen *Mi-1* denota una adecuada concentración de los amplicones y una alta eficiencia de los protocolos de amplificación optimizados. Adicionalmente, la igualdad de bandas indica la consistencia de los ensayos.

### 3.3 PCR en Tiempo Real

#### 3.3.1 Estandarización de la condiciones de amplificación

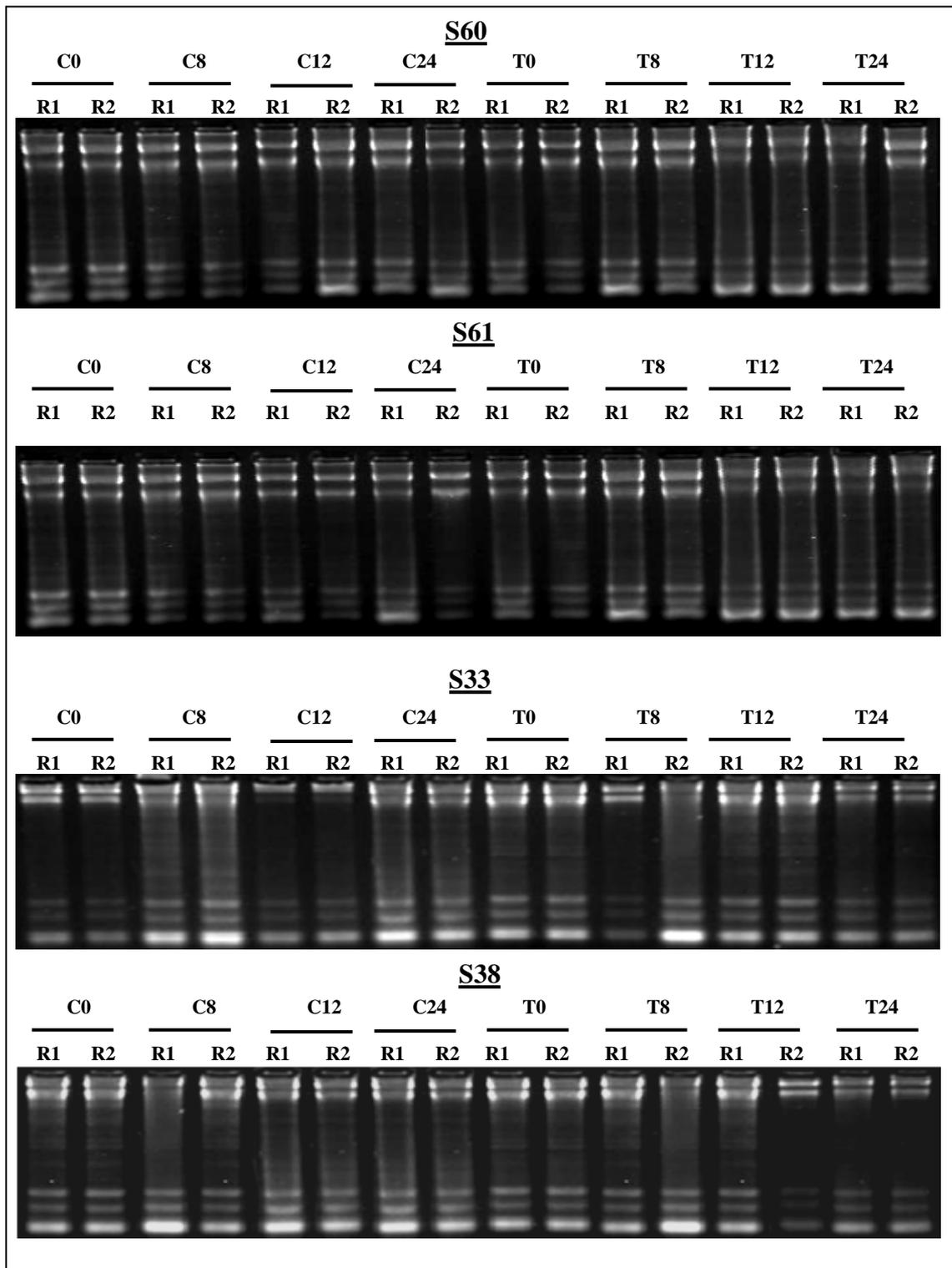
La técnica de qRT-PCR permite determinar los perfiles de expresión génica mediante el estudio de los transcritos (ARNm) de una muestra, por lo que fue necesario aislar ARN total procedente de cada entrada solanácea, en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas de los tratamientos experimentales y sus respectivos controles. Para el análisis fue necesario transcribir el ARNm en ADN copia (ADNc), ya que ésta técnica basa sus estudios en ADN de doble cadena. Tanto la alta integridad del ARN extraído, la calidad del ADNc, así como el diseño óptimo de *primers*, constituyen los principales factores que determinan la especificidad de la amplificación.

Para la extracción de ARN total, se empleó el método descrito por TRIzol® reagent de la casa comercial Invitrogen®. El proceso generó buenos resultados en cuanto a la cantidad con un promedio de 2.669 ug/uL, lo cual indica una alta eficiencia el protocolo de extracción. En la Tabla 3.3 se detallan las concentraciones de ARN total obtenidas.

**Tabla 3.3** Concentración de ARN de las muestras obtenidas mediante TRIzol® reagent de Invitrogen®

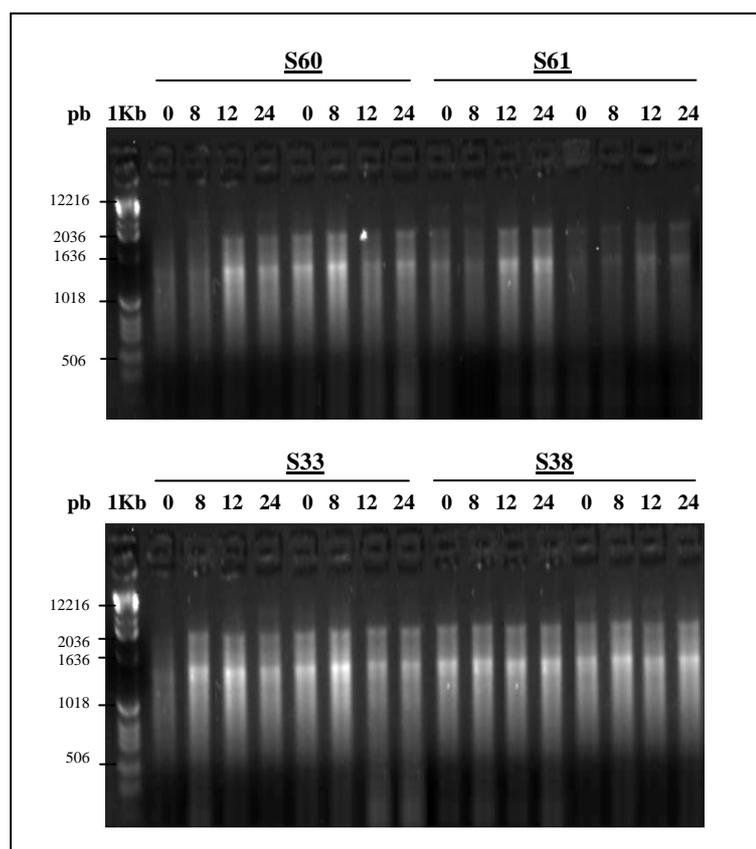
Muestra	Tiempo	Repetición	Tratamientos Control	Tratamientos Experimentales
			Concentración ug/uL	Concentración ug/uL
S33	0	R1	1.793	4.910
		R2	1.168	4.601
	8	R1	2.564	2.182
		R2	2.704	2.914
	12	R1	1.911	2.384
		R2	1.554	2.242
	24	R1	2.114	2.566
		R2	1.810	2.435
S38	0	R1	1.619	3.313
		R2	1.705	2.641
	8	R1	4.219	3.282
		R2	3.225	2.84
	12	R1	1.611	1.184
		R2	1.672	3.053
	24	R1	2.912	2.546
		R2	2.377	1.415
S60	0	R1	2.639	1.910
		R2	2.182	1.601
	8	R1	2.546	4.182
		R2	2.714	3.714
	12	R1	1.901	2.714
		R2	1.551	2.352
	24	R1	2.114	2.546
		R2	1.810	2.415
S61	0	R1	3.139	2.813
		R2	2.252	2.641
	8	R1	1.546	3.182
		R2	1.871	2.804
	12	R1	1.631	1.184
		R2	1.532	3.053
	24	R1	2.014	2.546
		R2	1.710	1.415

La calidad e integridad del ARN se evaluó por la presencia de bandas de ARN ribosomal en geles de agarosa. Como se aprecia en la Figura 3.4 todas las muestras presentaron bandas de ARN ribosomal 28S y 18S de alto peso molecular y bandas de ARN pequeños de bajos peso molecular bien definidas. Estos resultados denotan una alta calidad del ácido nucleico y un adecuado proceso de extracción. Además la homogeneidad de las bandas en todas las muestras indica que el proceso fue optimizado, es reproducible y viable para realizar procesos de síntesis de ADNc y análisis de expresión en qRT-PCR.



**Figura 3. 4** Visualización del ARN total en gel de agarosa al 2.5% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. S33 (*Solanum quitoense*), S38 (*Solanum vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. C: Tratamientos Control. T: Tratamientos Salinos. R: Repetición.

El ADNc se sintetizó a partir de 3 ug de ARN total. En la Figura 3.5 se observa que el ADNc obtenido no presenta bandas sobre los 2036 pb, lo que indica que no existe ADN contaminante que pueda interferir en los análisis de expresión de PCR en tiempo real.



**Figura 3.5** Visualización del ADN complementario (ADNc) en gel de agarosa al 1.8% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum var. Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Tiempos de recolección 0, 8, 12 y 24 horas de cada especie tratada con 150 mM NaCl. 1Kb DNA Mass Ladder es el marcador de peso molecular.

Los *primers* se diseñaron en función a las recomendaciones de Schmittgen, (2007) y Saikia, (2008). La especificidad de todos los *primers* fue evaluada en el software Primer3. Los valores de “any” generados fueron menores a 4 y los valores de 3’ en todos los casos fueron igual a 0 (ANEXO D). Los valores de DeltaG de cada *primer* analizado en el software en línea Oligo Analicer 3.1, generó valores mayores a -2 Kcal.mol<sup>-1</sup> para horquillas y valores mayores a -5 Kcal.mol<sup>-1</sup> para dímeros de *primers* (ANEXO E). Estos resultados demuestran una tendencia de *formación de horquillas* y

generación de dímeros mínima, característica de diseño que viabiliza el uso de los *primers* para procesos de PCR. Las secuencias y características generales de los *primers* se muestran en la Tabla 3.4

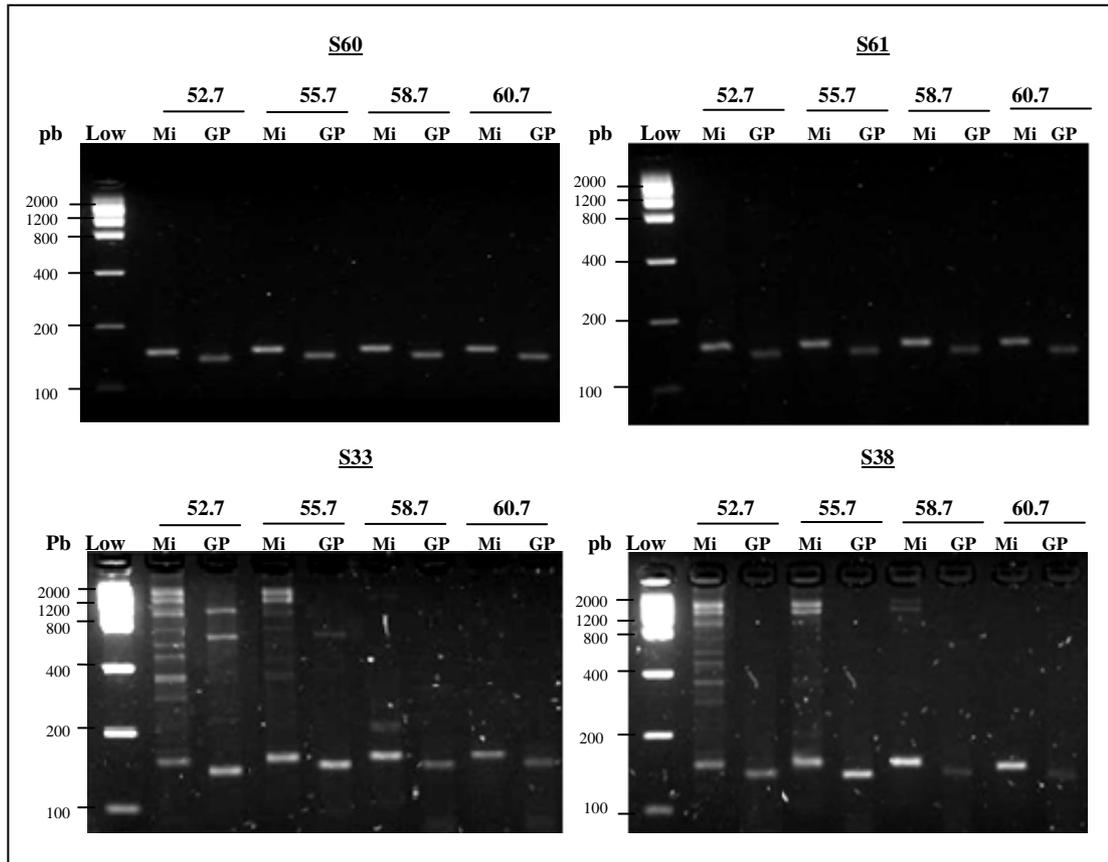
**Tabla 3. 4** Descripción de las características de los de los *primers* diseñados para qRT-PCR.

Gen	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Prod.
<i>GAPDH</i>	GP F	TCAAGGATGAGAAGACACT	50.08	139
	GP R	TTGTCCTTGTTCAGTGAAGA	52.21	
<i>Mi-1</i>	Mi F	TGGTGTCTGTAGGTGTTGGT	42.86	147
	Mi R	CACATCCAACACTGACTGAAC	40.00	
<i>Lemmi9</i>	LEA F	AGGAGGTTAGAGGCAGATAG	54.03	147
	LEA R	TGAGGAACACGAAAATAGAG	58.39	
<i>LEα-DOX1</i>	LDX F	AGGAGGTTAGAGGCAGATAG	52.86	224
	LDX R	TGAGGAACACGAAAATAGAG	53.00	

Las similitudes locales entre las secuencias flanqueadas por los *primers* y la colección de secuencias (nr/nt) del NCBI generó un score mayor a 200 (ANEXO F) entre especies del género *Solanum*. Estos resultados aseguraron una amplificación específica para el organismo y el gen en estudio.

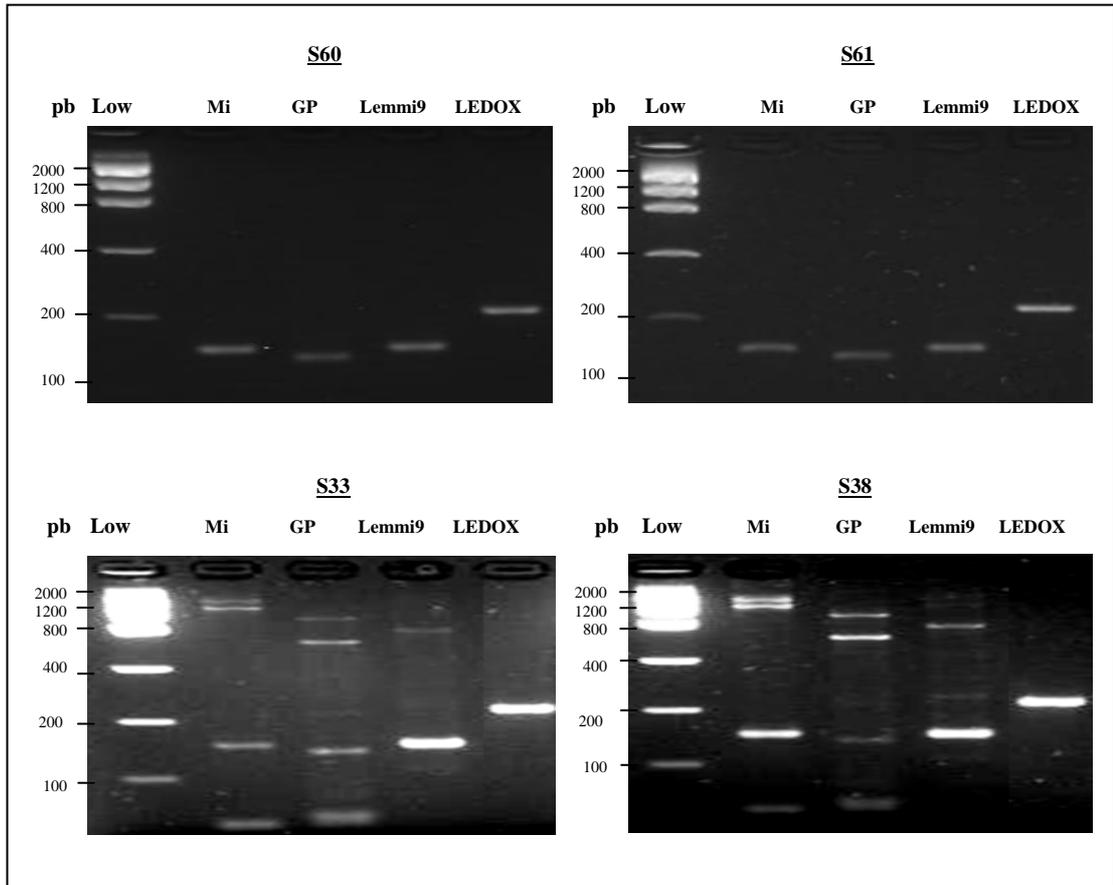
Una vez sintetizado el ADNc y diseñado los *primers*, se procedió a determinar la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores.

Inicialmente se realizó la amplificación de los genes *GAPDH* y *Mi-1* mediante PCR convencional de gradiente, y se determinó la temperatura óptima de alineamiento en 55.7°C, donde se generaron los productos esperados. Los genes amplificados en ADN genómico de las especies *S. lycopersicum var. Syta* y *S. pimpinellifolium* fueron específicos, a diferencia de las especies *S. quitoense* y *S. vestisimun* que presentaron fragmentos inespecíficos adicionales. En la Figura 3.6 se visualizan los productos de amplificación para cada especie de solanácea estudiada.



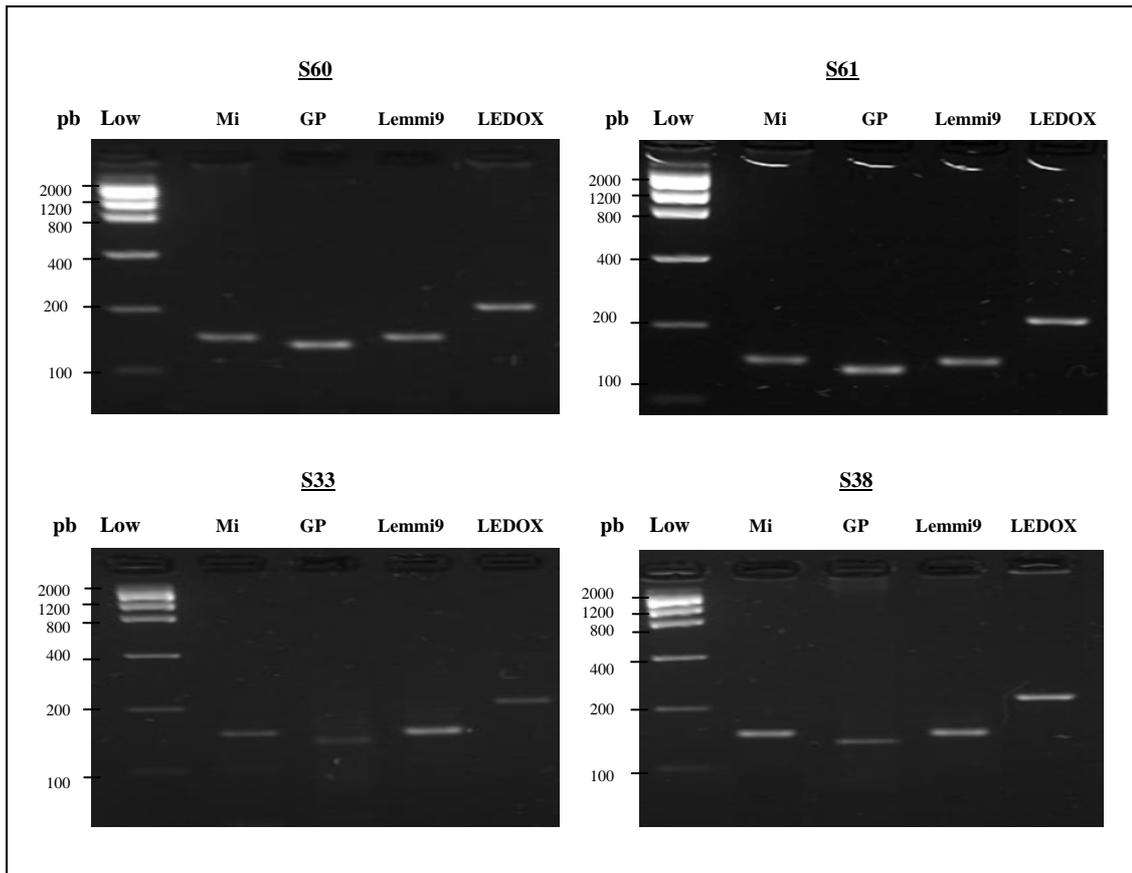
**Figura 3. 6** Visualización de los genes *Mi-1* (Mi) y *GAPDH* (GP), en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR®. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestissimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular.

La temperatura de 55.7°C también fue óptima para la amplificación de los genes *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX*. En la Figura 3.7 se visualizan los productos de PCR en ADN procedente de *Solanum lycopersicum* var. *Syta* (S61), *Solanum pimpinellifolium* (S60), *Solanum quitoense* (S33) y *Solanum vestissimun* (S38).



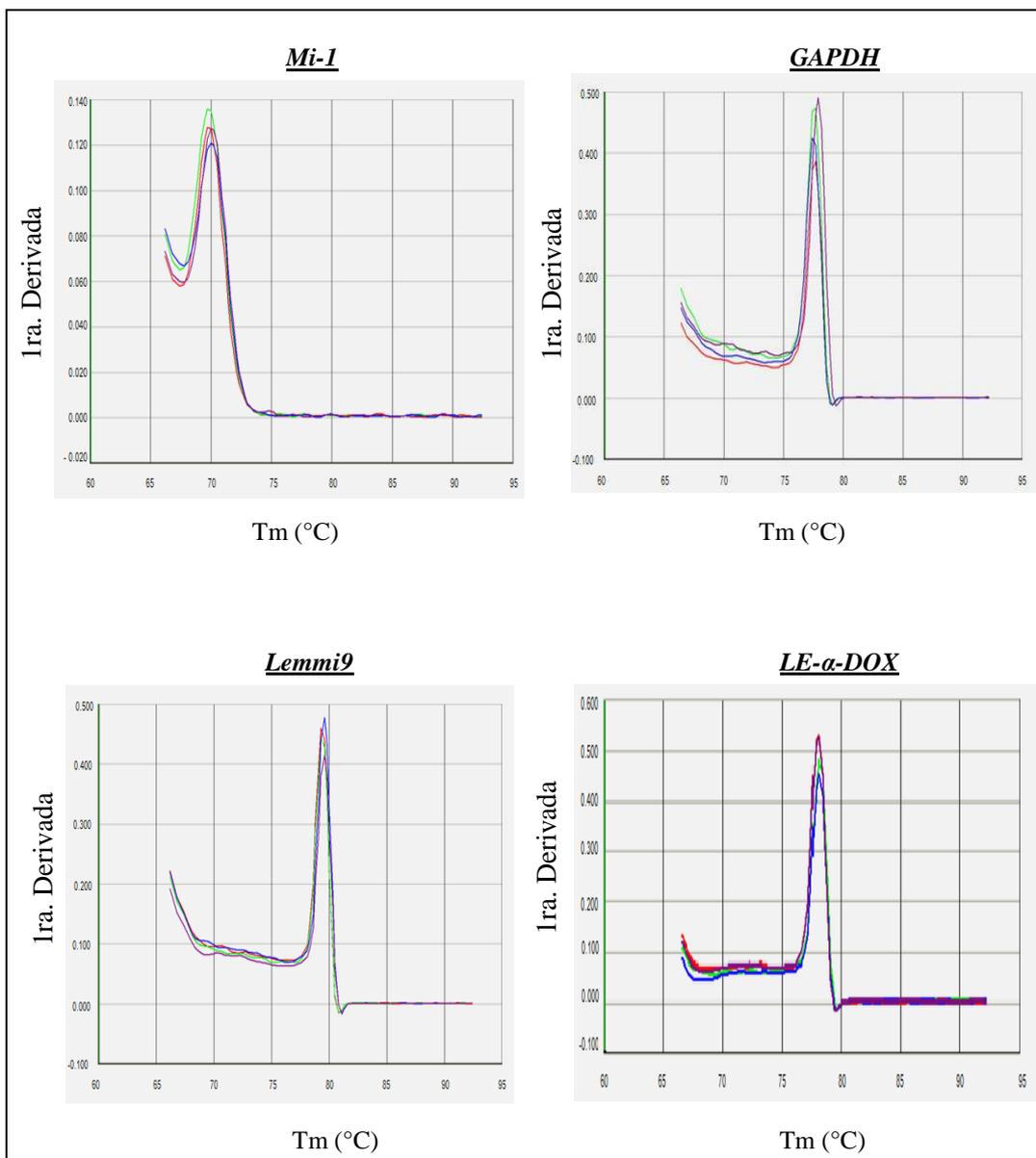
**Figura 3. 7.** Visualización de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *Le- $\alpha$ -DOX* en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR® en las especies S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular.

La presencia de los productos de amplificación también se visualizó en el transcrito (ADNc), como se observa en la Figura 3.8. La amplificación para cada gen fue específica en todos los genotipos de *Solanum spp.*



**Figura 3. 8.** Verificación de la presencia de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *Lea-DOX1* en el transcrito (ADNc) en geles de agarosa al 3% (p/v) teñido con SYBR®. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular.

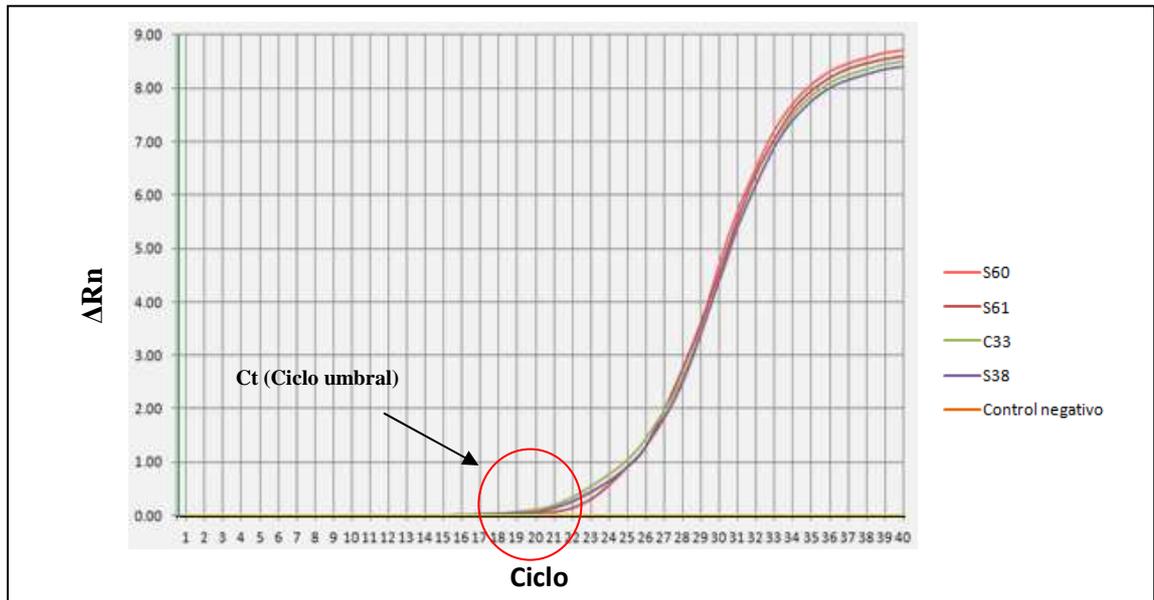
Para la validación de la temperatura de alineamiento mediante qRT-PCR, se amplificaron los genes *GAPDH* (Control interno), *Mi-1*, *Lemmi9* y *LE α-DOX1* (*Genes Target*) mediante una PCR trifásica y se comprobó la especificidad de los *primers* mediante un análisis de los picos de disociación. En la Figura 3.9 se muestra la presencia de un pico de disociación para cada gen en todas especies de solanácea estudiada. Estos resultados indican que a una temperatura de hibridación de 55.7°C se amplifica un solo fragmento.



**Figura 3.9** Picos de disociación correspondientes a los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9*, y *LE-alfa-DOX* a una temperatura de fusión de 55.7 °C en las especies solanáceas S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

El análisis del nivel de expresión ( $\Delta Rn$ ) del gen constitutivo *GAPDH* registrado en el Software v1.4 de Applied Biosystem generó valores de Ct iguales a 23 en las especies solanáceas *S. quitoense*, *S. vestisimun*, *S. lycopersicum* var. *Syta* y *S. pimpinellifolium* (Figura 3.10). Este resultado pone en manifiesto que la cantidad de templado inicial es igual en todas las especies y que a la temperatura de 55, 7°C se amplifican los fragmentos esperados. Además, el valor de Ct obtenido demuestra que la

cantidad de ARNm es alta, resultado que confirma la eficacia del proceso de extracción de ARN. La cinética de la reacción generó una curva exponencial creciente, lo que refleja un incremento de la fluorescencia proporcional al aumento de ADN amplificado en cada ciclo.



**Figura 3. 10** Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) vs. Numero de ciclo del gen constitutivo *GAPDH*. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

Todas las muestras presentaron la misma fase final de amplificación ( $\Delta Rn=9$ ), lo que indica que los reactivos se consumieron en aproximadamente la misma cantidad, resultado que denota una óptima amplificación.

### 3.3.2. Cuantificación relativa de la expresión génica en qRT-PCR

El análisis de cuantificación se realizó en las cuatro especies de solanáceas recolectadas en los tiempos 0, 8, 12 y 24 horas.

Se determinó el valor Ct promedio de 3 reacciones para el gen constitutivo *GAPDH* y se calculó el factor de dilución para un Ct de 23, a fin de corregir los valores Ct del gen diana y eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción a ADNc. EL análisis de

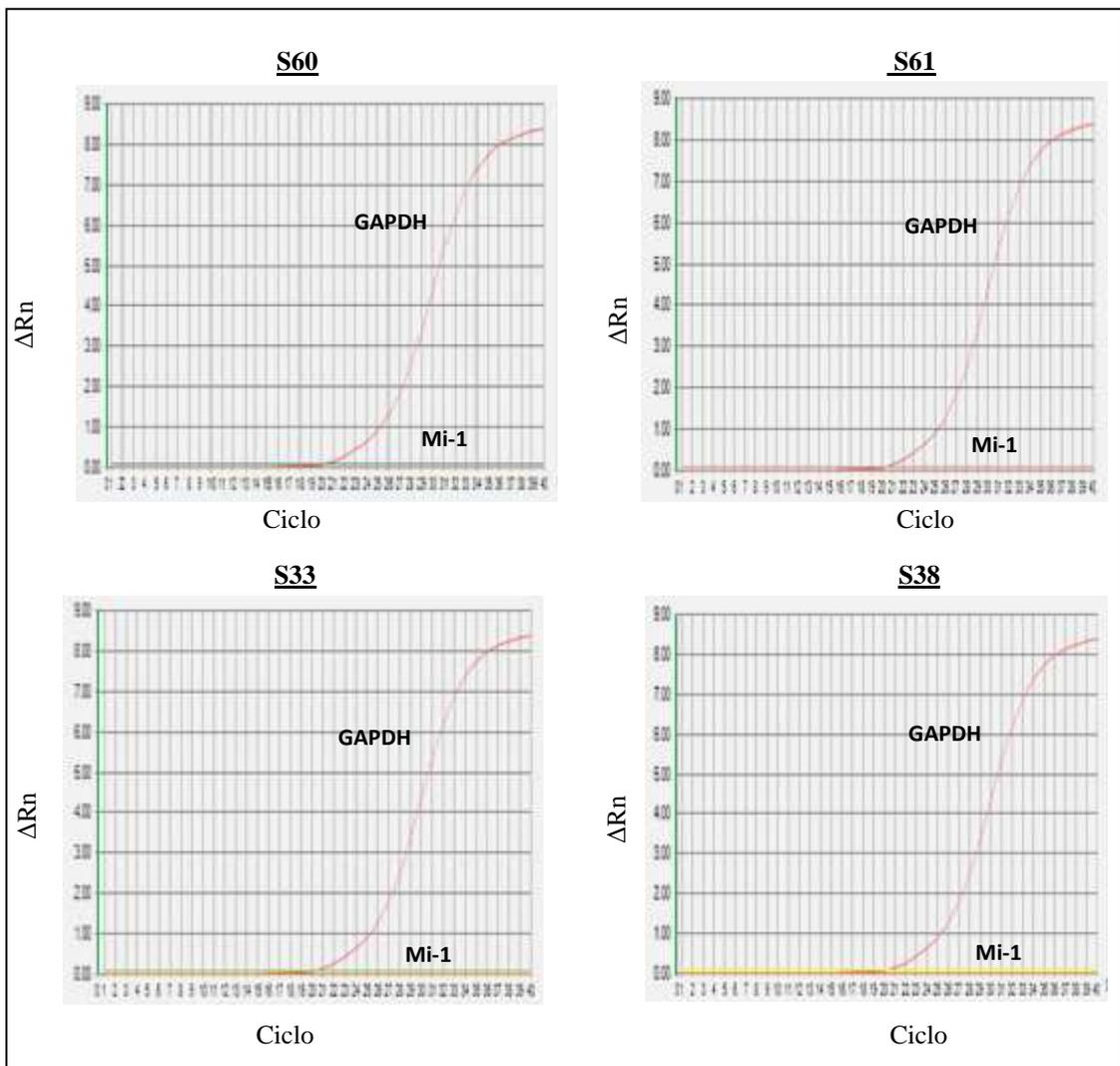
expresión no evidenció cambios significativos, lo que corrobora su uso como control interno de la reacción de PCR. Estos resultados permitieron iniciar los análisis bajo un mismo nivel de referencia. Los volúmenes finales de las muestras de ADNc se detallan en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5** Valores de Ct promedio, fd y Va de ADNc

Variedad	Tiempo (Horas)	Ct (promedio)	Factor/dilución	Va + 15 ul ADNc
<b>S60</b>	0	22,74	1,2	2,96
	8	22,35	1,6	8,54
	12	20,81	4,6	53,45
	24	21,08	3,8	41,76
<b>S61</b>	0	22,65	1,3	4,12
	8	20,9	4,3	49,31
	12	22,76	1,2	2,71
	24	22,61	1,3	4,66
<b>S33</b>	0	22,51	1,4	6,07
	8	21,52	2,8	26,84
	12	22,31	1,6	9,20
	24	21,68	2,5	22,45
<b>S38</b>	0	22,69	1,2	3,60
	8	22,72	1,2	3,21
	12	21,07	3,8	42,16
	24	22,69	1,2	3,60

Una vez diluido el ADNc, se midió el nivel de expresión génica de *Mi-1* y los genes relacionados con la tolerancia a la salinidad *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* en relación al gen constitutivo *GAPDH* de cada entrada solanácea. El nivel de expresión se evaluó en base al valor ciclo umbral (Ct) registrado en el Software v1.4 de Applied Biosystem.

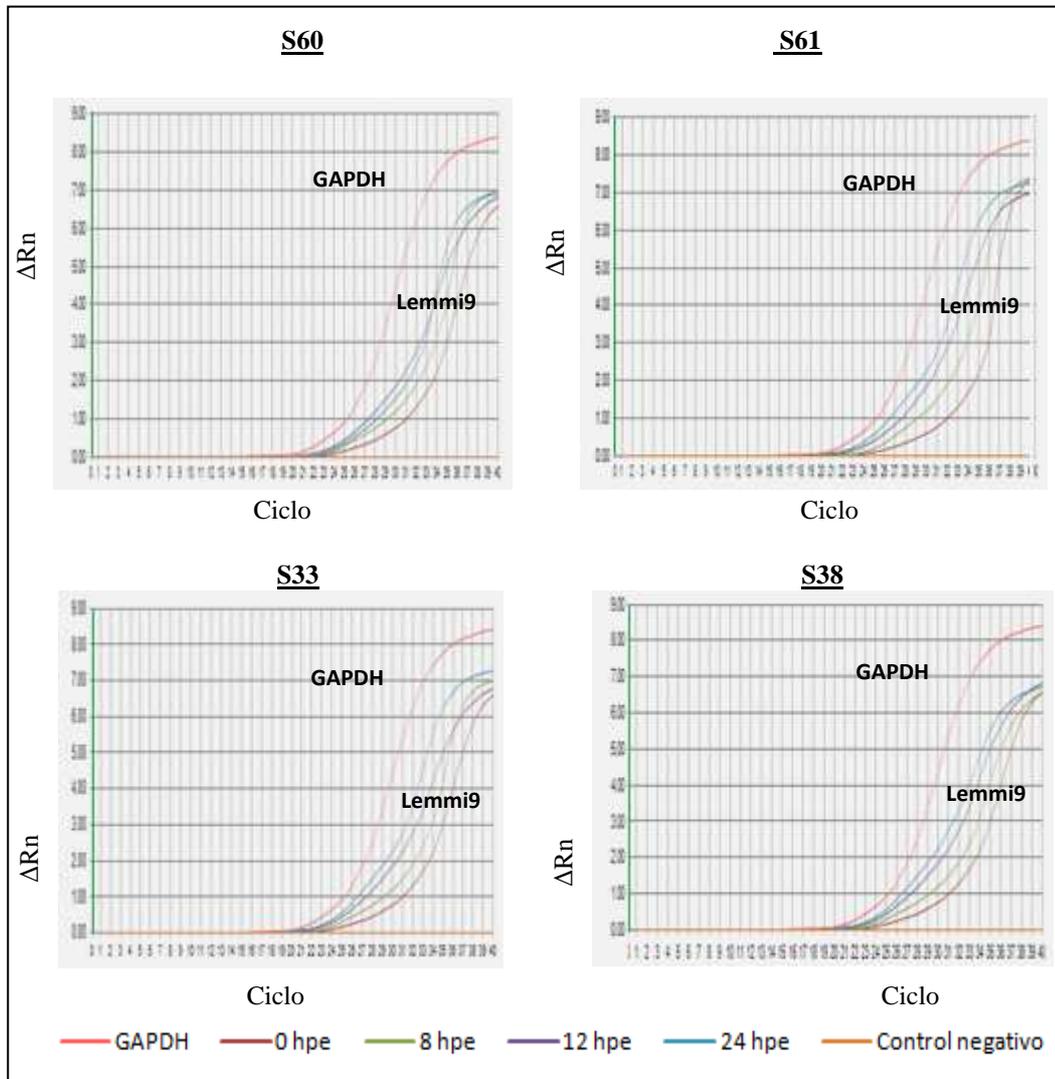
En las Figuras 3.11, se pueden observar los niveles de fluorescencia del gen *Mi-1* en relación al control interno *GAPDH* en las especies *S. quitoense*, *S. vestisimum*, *S. lycopersicum var. Syta* y *S. pimpinellifolium*. El Software no registró valores de Ct, datos que son necesarios para el cálculo de cuantificación relativa. La cinética de la reacción fue lineal, lo que indica que el nivel de expresión es basal y no se induce por estrés salino.



**Figura 3. 11** Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen *Mi-1* relativo al gen constitutivo *GAPDH*. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum var. Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

El análisis de la expresión del gen *Lemmi9* si registró valores de Ct, resultados que posibilitaron su posterior cuantificación (Figura 3.12). Los valores de Ct disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de exposición de 150 mM de NaCl en todas las especies de solanáceas estudiadas. El valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de templado inicial presente en la muestra, lo que manifiesta que la expresión del gen *Lemmi9* es altamente regulado por NaCl a medida que incrementa el tiempo de exposición a la sal. La cinética de la reacción presentó una curva exponencial creciente y la misma fase final de amplificación en todos los tiempos, lo que indica que

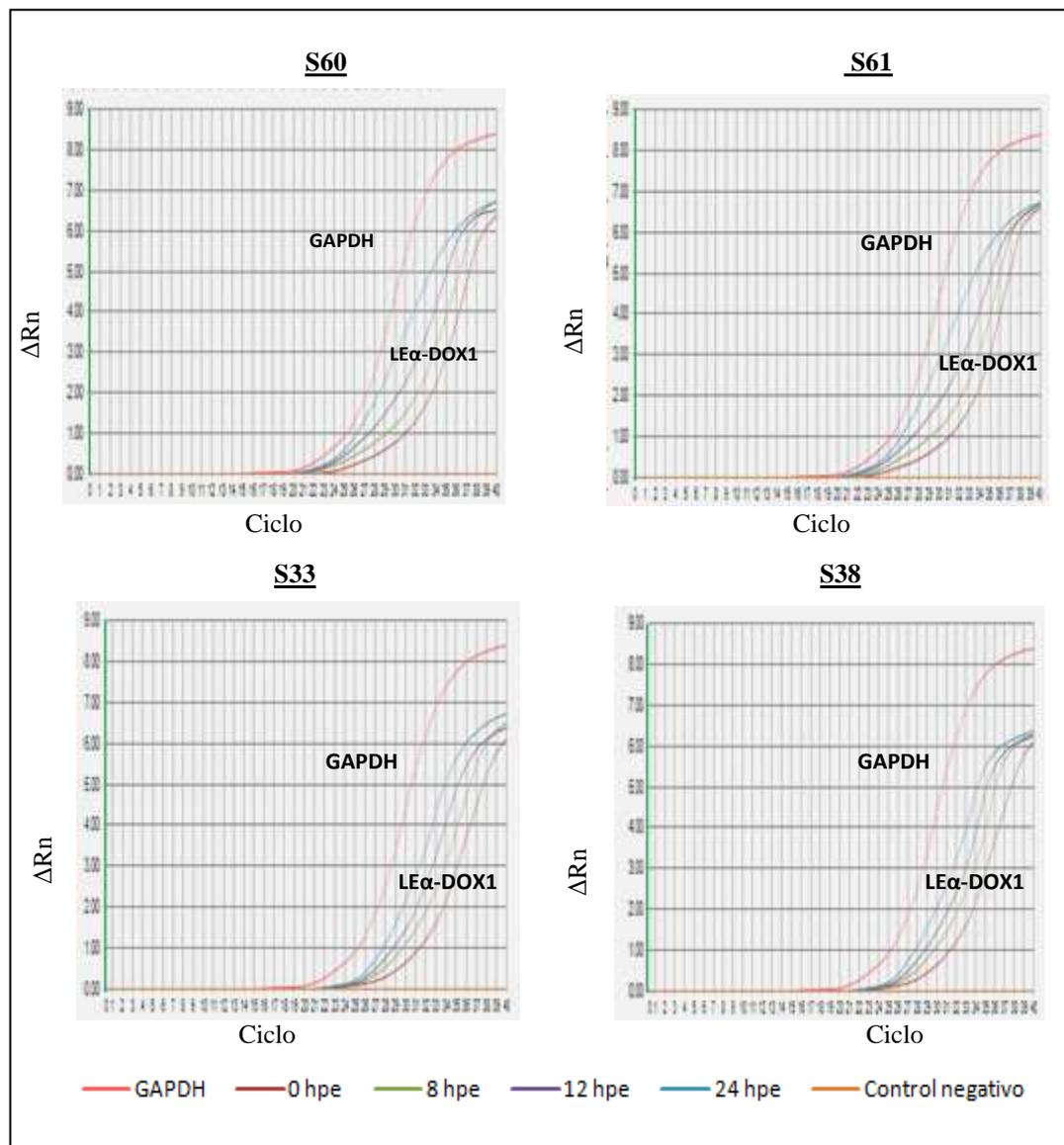
la amplificación fue óptima. El gen constitutivo *GAPDH* no evidenció un cambio en su expresión validando los resultados del análisis de cuantificación relativa del gen.



**Figura 3. 12** Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen *Lemmi9* relativa al gen constitutivo *GAPDH*, en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

El análisis de la expresión del gen *LE $\alpha$ -DOXI* si registró valores de Ct, resultados que permitieron los cálculos de cuantificación (Figura 3.13). Los valores de Ct disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de exposición de 150 mM de NaCl. Este resultado manifiesta que la cantidad de templado inicial aumenta a medida que incrementa el tiempo de exposición de NaCl, lo que demuestra que este gen es

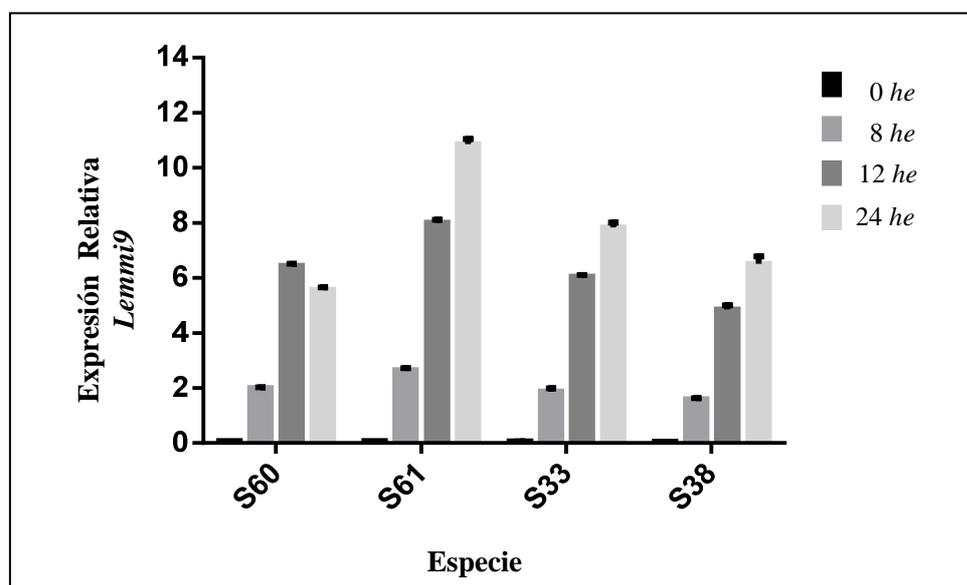
altamente regulado por la sal. La cinética de la reacción presentó una curva exponencial creciente y la misma Fase final de amplificación en todos los tiempos, lo que indica que la amplificación fue óptima. El gen constitutivo *GAPDH* no evidenció un cambio en su expresión lo que afianza los resultados del análisis.



**Figura 3. 13** Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen *LE- $\alpha$ -DOX1* relativa al gen constitutivo *GAPDH*, en los tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

Posterior al análisis de los niveles de expresión de los genes *Lemmi9* y *LEα-DOX1*, se realizó la cuantificación relativa de cada uno mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  propuesto por Livak y Schmittgen (2001).

Los resultados demuestran que la expresión del gen *Lemmi9* se ve incrementada a medida que aumenta el tiempo de exposición con la sal en *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimun*, y se ve disminuida en *Solanum lycopersicum* var. *Syta* a las 12 y 24 horas (Figura 3.14). Estos resultados demuestran que las especies silvestres de *Solanum* presentan un alto grado de tolerancia a la salinidad.



**Figura 3. 14** Expresión relativa del gen *Lemmi9* en las especies de solanáceas S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). He: horas de exposición con 150 mM de NaCl.

El análisis estadístico ANOVA demostró que existen diferencias significativas ( $p$ -valor  $<0,05$ ) en la expresión de *Lemmi9* de todas las especies estudiadas a medida que aumenta el tiempo de exposición de 150 mM de NaCl, como se muestra en la Tabla 3.6. Estos resultados evidencian que la expresión del gen *Lemmi9* varía de acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas de cada especie.

**Tabla 3. 6** Análisis estadístico ANOVA de la expresión génica de *Lemmi9*.

Variable	N	R <sup>2</sup>	CV		
Expresión Génica	32	1,00	3,9		
F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor ****
Tiempo	307,99	3	102,66	4141,68	<0,0001
Especie	21,85	3	7,28	203,85	<0,0001
Tiempo_Especie	21,37	9	2,37	95,78	<0,0001
Error	0,40	16	0,02		
Total	351,60	31			

\*\*\*\*Altamente significativo

Para determinar la diferencia de la expresión génica de *Lemmi9* entre cada variable, se efectuó un análisis de DHS-Tukey para diferenciar subconjuntos homogéneos. En la Tabla 3.7 se observa que el nivel de expresión génica es diferente en todas las especies. Siendo *Solanum pimpinellifolium* la especie que más expresa el gen bajo condiciones de estrés salino, respecto a las demás especies. Este resultado demuestra que los mecanismos de protección de *Solanum pimpinellifolium* son eficientes y suficientes para contrarrestar los efectos del estrés para su supervivencia.

**Tabla 3. 7** Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de *Lemmi9* por especie

ESPECIE		N	SUBCONJUNTO			
			1	2	3	4
DHS de Tukey a,b	<i>Solaum vestisimun</i>	8	3,2565			
	<i>Solanum lycopersicum var. Syta</i>	8		3,5263		
	<i>Solanum quitoense</i>	8			3,9529	
	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	8				5,3988
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000

b. Alfa = 0,05.

El análisis con la variable *Tiempo*, demostró que el nivel de expresión génica entre cada intervalo es diferente significativamente e incrementa a medida que aumenta el tiempo de exposición de la sal en todas las especies (Tabla 3.8). Siendo las 24 horas el tiempo donde hay mayor expresión del transcrito, lo que indica que las plantas frente a largos periodos de estrés incrementan la síntesis de la proteína para neutralizar los efectos de la sal.

**Tabla 3. 8** Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de *Lemmi9* por tiempo de exposición

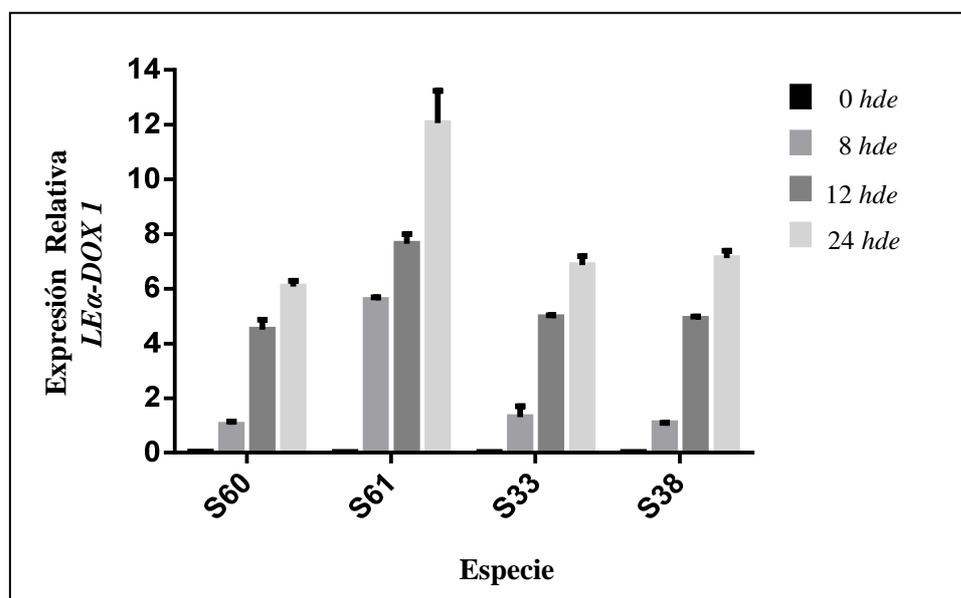
TIEMPO (hpe)	N	SUBCONJUNTO				
		1	2	3	4	
DHS de Tukey <sup>a,b</sup>	0	8	1,0648			
	8	8		2,0317		
	12	8			6,3424	
	24	8				7,6954
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000

b. Alfa = 0,05.

hpe: horas posteriores a la exposición de 150mM NaCl.

En los resultados de los cálculos de cuantificación relativa del gen *LE $\alpha$ -DOXI*, se demostró que la expresión en todas las especies presenta un incremento a medida que aumenta el tiempo de exposición con la sal. En la Figura 3.15 se muestra la expresión relativa del gen *LE- $\alpha$ -DOXI* en las especies estudiadas, expresados como medias  $\pm$ SD de dos cuantificaciones independientes. Estos resultados demuestran que la especie silvestre de *Solanum pimpinellifolium* presentan un mayor grado de tolerancia a la salinidad en comparación con las especies *S. quitoense*, *S. vestisimun* y *S. lycopersicum* var. *Syta*.



**Figura 3. 15** Expresión relativa del gen *LE $\alpha$ -DOXI* en las especies de solanáceas S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

Los resultados del análisis estadístico ANOVA demostraron que existen diferencias significativas ( $p$ -valor  $<0,05$ ) en la expresión de *LE $\alpha$ -DOX1* de todas las especies estudiadas a medida que aumenta el tiempo de exposición de la sal, como se demuestra en la Tabla 3.9. Resultados que pueden derivarse de las diferentes características morfológicas y fisiológicas de cada especie.

**Tabla 3. 9** Análisis estadístico ANOVA de la expresión génica de *LE $\alpha$ -DOX1*

Variable	N	R <sup>2</sup>	CV		
Expresión Génica	32	0,99	13,39		
F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor ****
Tiempo	189,36	3	63,12	358,26	<0,0001
Especie	112,79	3	37,60	213,39	<0,0001
Tiempo_Especie	47,11	9	5,23	29,71	<0,0001
Error	2,82	16	0,18		
Total	352,09	31			

\*\*\*\*Altamente significativo

El análisis de DHS-Tukey para diferenciar subconjuntos homogéneos, demostró que el nivel de expresión génica entre *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimun* es similar e iguales estadísticamente ( $p$ -valor  $>0,05$ ). Similar comportamiento presentó el subgrupo conformado por *Solanum lycopersicum* var. *Syta* y *Solanum vestisimun*. La expresión en *Solanum pimpinellifolium* es diferente en todas las especies, y es el genotipo que más expresa el gen bajo condiciones de estrés salino, respecto a las demás especies. Estos resultados corroboran una vez más que la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium* presenta un alto grado de tolerancia a la salinidad.

**Tabla 3. 10** Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de *LE- $\alpha$ -DOX1* por especie

ESPECIE		N	SUBCONJUNTO		
			1	2	3
DHS de Tukey a,b	<i>Solaum vestisimun</i>	8	1,5825		
	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>Syta</i>	8	2,0825	2,0825	
	<i>Solanum quitoense</i>	8		2,5375	
	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	8			6,3325
	Sig.		,121	,175	1,000

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000

b. Alfa = 0,05.

El análisis con la variable *Tiempo*, demostró que el nivel de expresión génica entre cada intervalo es diferente significativamente ( $p\text{-valor} > 0,05$ ) e incrementa a medida que aumenta el tiempo de exposición de la sal, en todas las especies. Siendo a las 24 horas donde hay mayor expresión del transcrito. La Tabla 3.11 muestra el análisis para la variable tiempo.

**Tabla 3. 11** Análisis de comparación múltiple de la expresión génica de *LE- $\alpha$ -DOXI* por tiempo de exposición

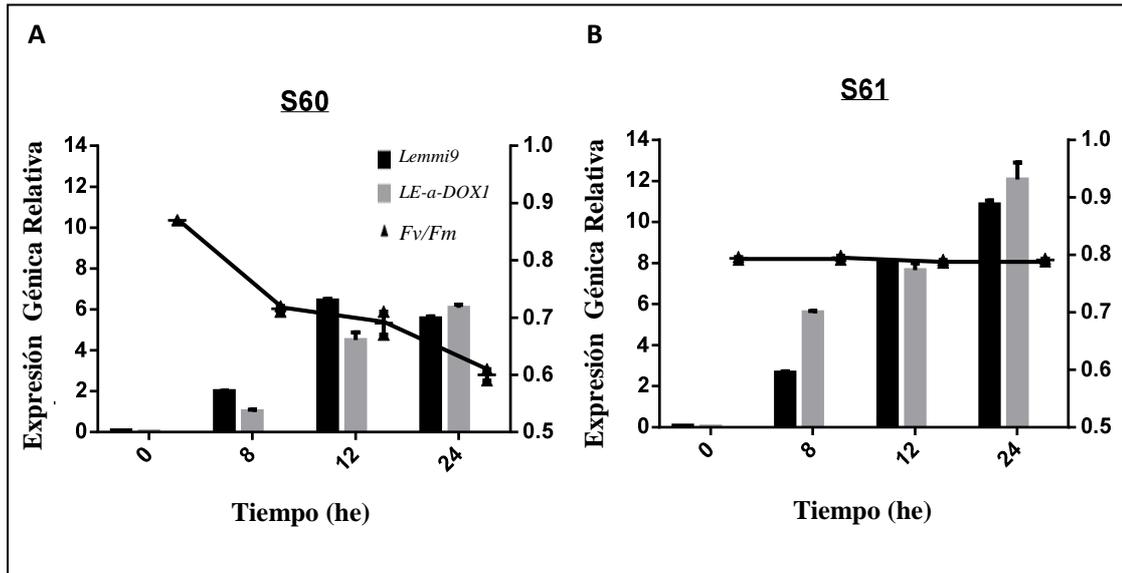
TIEMPO (hpe)	N	SUBCONJUNTO				
		1	2	3	4	
<b>DHS de Tukey</b> <sup>a,b</sup>	0	8	,0475			
	8	8		1,9025		
	12	8			4,0063	
	24	8				6,5788
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8,000

b. Alfa = 0,05.

Finalmente, se realizó un estudio para determinar si existe una relación en la eficiencia del proceso fotosintético con la expresión génica.

La eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$ ) de *Solanum lycopersicum* var. *Syta* se vio afectada a medida que aumentó el tiempo de exposición con la sal, al contrario de *Solanum pimpinellifolium* en la que se mantuvo constante como se puede apreciar en la Figura 3.16.



**Figura 3. 16** Relación de la Eficiencia fotosintética ( $Fv/Fm$ ) con la Expresión Génica. S61 (*Solanum pimpinellifolium*). he: 0, 8, 12 y 24 horas de exposición de 150 mM de NaCl. Medias  $\pm$  SD,  $n=2$ ;  $p<0.05$ .

Adicionalmente en la Figura 3.16 se puede observar que la expresión de *Lemmi9* disminuyó entre las 12 y 24 horas de exposición en la especie comercial Syta al contrario del incremento en la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium*. Estos resultados se relacionan con los obtenidos de eficiencia fotosintética, lo que da un indicio de que probablemente el gen esté relacionado con la protección del cloroplasto y la tolerancia a la salinidad. Además, la sobreexpresión del gen *LE $\alpha$ -DOX1* en *Solanum pimpinellifolium* respecto a la expresión en *Solanum lycopersicum* var. Syta que fue menor entre las 12 y 24 horas, lo que manifiesta que posiblemente el gen incremente la capacidad de protección.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

### 4.1 Efectos morfológicos y fisiológicos del estrés salino en plantas

La salinidad es el mayor problema en la producción agrícola. El cloruro sódico es la sal más frecuente en los suelos salinos, su alta concentración ocasiona en la planta un efecto osmótico y un efecto iónico tóxico que altera a la fisiología y su metabolismo (Carvajal *et al.*, 2000).

El efecto osmótico empieza a ser visible aproximadamente a una concentración de 40 mM (Fricke y Peters, 2002), razón por la cual en el presente estudio se realizó una prueba de tolerancia a 50, 100 y 150 mM de NaCl para determinar los efectos del estrés salino. En este ensayo se utilizó la variedad comercial Syta de *S. lycopersicum* y la especie silvestre *S. pimpinellifolium*, especies que presentan distintos grados de tolerancia a la salinidad desde bajos a altos niveles de tolerancia (Nuez *et al.*, 1995; Goykovic y Saavedra del Real, 2007).

Los resultados de las pruebas de tolerancia a estrés salino mostraron que *S. lycopersicum* var. Syta es una especie sensible, ya que a concentraciones 50,100, 150mM de NaCl se observaron síntomas característicos de estrés como flacidez en las hojas y disminución del vigor del tallo en respuesta al efecto osmótico. Durante periodos prolongados las hojas exhibieron clorosis, necrosis y un decremento progresivo de la fotosíntesis, además de una defoliación severa como respuesta al efecto hiperiónico en el medio celular. Al finalizar los ensayos, los individuos expuestos tanto a 50 como a 100 mM presentaron un decaimiento generalizado, siendo letal para los individuos sometidos a una dosis de 150 mM. Según Chinnusamy *et al.*, (2005), *S. lycopersicum* es una especie glicofita que puede tolerar conductividades eléctricas (ECc) menores o iguales a 2,5 dS.m<sup>-1</sup> (20.5 mM NaCl) y por encima de este umbral de tolerancia puede resultar tóxica e incluso letal cuanto mayor es el tiempo de exposición (Goykovic y Saavedra del Real, 2007).

En cambio, las pruebas de tolerancia en el tomate silvestre *S. pimpinellifolium* no evidenciaron cambios tanto a nivel morfológico como fisiológico. Según el INIA (2009) y Cuartero *et al.* (1992), *S. pimpinellifolium* es una especie tolerante a la salinidad que incrementa la succulencia y la compartimentación del Na<sup>+</sup> lo que posiblemente le permite contrarrestar la toxicidad iónica de la sal.

La diferencia de la tolerancia entre las especies *S. lycopersicum var Syta* y *S. pimpinellifolium* podría deberse a la cantidad de Na<sup>+</sup> acumulado en el sistema aéreo de la planta. Según experiencias realizadas por Olias *et al.* (2009) con *S. pimpinellifolium* y la variedad de tomate comercial Moneymarker, muestran que el ratio de acumulación [Na<sup>+</sup>]<sub>sist-aerea</sub>/[Na<sup>+</sup>]<sub>raíz</sub> en la especie silvestre es mucho menor en relación al ratio de acumulación de la especie comercial. Adicionalmente, Olias *et al.* (2009) corrobora sus estudios con los datos de microarray, los cuales reportaron la sobreexpresión del gen *SOS1* de tomate. Este gen que está envuelto en la distribución del Na<sup>+</sup> entre los órganos de la planta, reteniendo el ión en el tallo para prevenir su ingreso en las hojas. Por lo que posiblemente en este estudio *S. pimpinellifolium* restrinja la acumulación del Na<sup>+</sup> en las hojas de una manera más eficiente que *S. lycopersicum var Syta* para evitar los efectos tóxicos del ion.

#### **4.2 Identificación de la presencia del exón del gen *Mi-1* en raíz**

La identificación del exón del gen *Mi-1* en raíz se inició con la extracción de ADN del material vegetal mediante el DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial Qiagen®. El protocolo fue eficiente ya que se obtuvieron concentraciones superiores a los 90ng/uL de ADN. La presencia de una sola banda sin degradación facilitó el uso de este ADN como plantilla para la amplificación del exón del gen *Mi-1*.

El ADN de raíz de cada uno de los cuatro genotipos de *Solanum spp* presentó un solo fragmento amplificado de ~1000 pb, el cual corresponde a la región exónica del gen *Mi-1*, resultado que se corrobora con los obtenidos en ADN de hoja en investigaciones realizadas por Carrera *et al.*, (2012). La presencia de la región exónica del gen *Mi-1* viabilizó el análisis de la expresión localizada del gen mediante qRT-PCR.

### 4.3 PCR en Tiempo Real

Una de las técnicas aplicadas en biología molecular para el análisis de la expresión génica es la PCR en tiempo real. Técnica que depende de la alta integridad del ARN extraído, de la calidad del ADNc sintetizado y del diseño de *primers*, ya que son factores que determinan la especificidad de la amplificación.

La extracción de ARN de alta calidad es el primer parámetro en optimizarse para un diagnóstico molecular exitoso. En el presente estudio el ARN se obtuvo de cada una de las entradas solanáceas a diferentes tiempos de muestreo (0, 8, 12 y 24 horas). La extracción del ARN se realizó con el reactivo TRIzol®, el cual fue un método eficiente, con el que se obtuvieron concentraciones de aproximadamente 1.3 a 4 ug/uL. Estas concentraciones fueron suficientes para facilitar el manejo de volúmenes en la síntesis de ADNc (Chomeznski & Sacchi, 1987). La calidad del ARN se evaluó en base a dos parámetros básicos: La pureza en relación de absorbancia A260/280 y A260/230 y la integridad del ARN por la visualización de las bandas de ARN ribosómico, 28S y 18S en geles de agarosa como sugieren Farrell (2010) y UPV/EHU (2012).

La técnica de qRT-PCR permite determinar los perfiles de expresión génica mediante el estudio de los transcriptos de una muestra. Para el análisis es necesario transcribir el ARNm en ADN copia (ADNc), ya que la técnica basa sus análisis en ADN de doble cadena (Valasek & Repa, 2005). En la presente investigación, antes de realizar la síntesis de ADNc, fue preciso tratar las muestras de ARN con la enzima ADNasa para eliminar ADN genómico residual, ya que la técnica de PCR en tiempo real es extremadamente sensible y detecta ADN genómico contaminante en las muestra de ADNc, lo cual afectaría de forma significativa a la especificidad del resultado de expresión génica (Valasek & Repa, 2005).

En la síntesis de ADNc se puede utilizar la cantidad de 10 pg a 5 ug de ARN total y para ensayos en qPCR-RT se requiere por lo menos de 1 ug (Invitrogen, 2004; Invitrogen, 2011). En base a estos datos, en el presente proyecto se normalizó la cantidad de ARN a 3 ug en todas las muestras de *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium*, *S. quitoense* y *S. vestissimum*. La normalización de la concentración de ARN total de las muestras es requerida para evitar cambios en la expresión del gen constitutivo, ya que si

la expresión varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA y no a cambios en su expresión (UPV/EHU, 2012). Además, cantidades mayores a 2 ug afianzan la amplificación de secuencias de individuos que se conoce poco o nada de su genoma y cuyos *primers* han sido diseñados a partir de secuencias de individuos con un grado de parentesco muy cercano.

La síntesis de ADNc se realizó el mismo día del aislamiento del ARN, ya que el almacenamiento del ARN puede implicar su degradación, y cantidades diferentes de ARN entre cada una de las muestras podría afectar la precisión cuantitativa de la expresión (Bustin, 2002; Valasek & Repa, 2005).

El diseño de *primers* se realizó en función a los criterios propuestos por Schmittgen, (2007), quien recomienda que la longitud del *primer* debería de estar entre 18 a 24 nt, la longitud del amplicón sea menor a 250, la temperatura de fusión de entre 50 a 60 °C y el porcentaje de GC entre el 35% a 65%.

En los análisis de expresión relativa se compara entre la cantidad de ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo, cuya expresión no varía en las condiciones experimentales. Los genes constitutivos comúnmente usados en estudios de defensa y mecanismos de estrés en plantas son la actina, el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, los genes ribosomales y el factor 1 de elongación (Stürzenbaum & Kille, 2001; Bezier *et al.*, 2002; Deanet *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). En este estudio el gen *GAPDH* fue escogido como control interno, ya que ha evidenciado niveles de expresión constantes con muy pocos cambios bajo condiciones experimentales en plantas de tomate (Bustin, 2005; Expósito, *et al* 2008; Rivas *et al.*, 2008).

La especificidad de todos los *primers* fue evaluada en Primer3. Los valores de “*any*” generados fueron menores a 4 y los valores de 3’ en todos los casos fueron iguales a 0. Estos resultados reflejan que la tendencia de los *primers* a hibridar entre ellos es mínima y la probabilidad de generación de dímeros de *primers* durante la reacción de PCR es nula. Adicionalmente, la energía libre de Gibbs o Delta G de cada primer fue analizado en el software en línea Oligo Analicer 3.1. El programa generó valores mayores a -2 Kcal.mol<sup>-1</sup> para horquillas y valores mayores a -5Kcal.mol<sup>-1</sup> para

dímeros de *primers* (homodímeros/heterodímeros), lo que indicó que los *primers* son viables para el análisis de qRT-PCR (Saikia, 2008; Gil, 2012).

Se evaluó las similitudes locales entre las secuencias flanqueadas por los *primers* mediante un análisis con el algoritmo en línea BLAST, con el objeto de asegurar una amplificación específica para el organismo y el gen en estudio, como sugiere Anderson y Brass (1998). El análisis generó un score  $\geq 200$  entre secuencias de especies del género *Solanum*, lo que indicó que el grado de conservación de la secuencias es muy alto y por lo tanto están relacionadas biológicamente (Anderson & Brass, 1998). Estos resultados dieron un indicio de que probablemente estas secuencias también se encuentren conservadas en especies de la sección Lasiocarpa.

La PCR convencional de gradiente ha sido usada para múltiples aplicaciones en PCR (Prezioso & Jahns, 2000). En esta investigación se utilizó para determinar la temperatura de alineamiento de los *primers* con el fin de minimizar y optimizar el uso de reactivos de la PCR en tiempo real, ya que el alto costo de sus reactivos limitó significativamente su aplicación.

La temperatura consenso para la amplificación de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* fue de 55. 7 °C. La amplificación inicialmente se realizó en ADN genómico y fue específica en las especies de la sección Lycopersicon, a diferencia de las especies de la sección Lasiocarpa que presentaron fragmentos inespecíficos adicionales; sin embargo, la amplificación en ADNc fue específica en todas las especies. La presencia conservada de los genes en el transcrito de las cuatro especies demuestra que las especies están relacionadas biológicamente, resultado que viabilizó la amplificación de todas las muestras en qRT-PCR bajo las mismas condiciones.

La validación de la temperatura de alineamiento y la especificidad de los *primers* en qRT-PCR se realizó mediante un análisis de disociación. El análisis generó un solo pico para todas las muestras, lo cual indica la presencia de un solo fragmento de amplificación en la reacción (Dorak, 2007). Estos resultados demuestran que el diseño de *primers* y la concentración de los mismos fueron los óptimos.

El análisis de la expresión del gen constitutivo en qRT-PCR permitió reducir los posibles errores generados al comparar los niveles de expresión en las muestras analizadas del gen de interés (Kubista *et al.*, 2006). En esta investigación, la cinética de la amplificación del gen constitutivo GAPDH registrado en el Software v1.4 de Applied Biosystem, generó valores de Ct promedio iguales a 23 en todas las especies. Los valores de Ct en cada tratamiento presentaron mínimas variaciones unos con otros, lo cual indica que todas las muestras presentaron aproximadamente la misma cantidad inicial de ARNm del gen en las células estudiadas (Rivas *et al.*, 2009). Según Pfaffl, en el 2004, la estabilidad de la expresión del gen constitutivo permite que el cálculo de cuantificación relativa de un gen diana sea eficiente y reproducible.

En qRT-PCR la cuantificación relativa se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). La cuantificación se basa en la comparación de los valores Ct del gen diana con el gen de referencia. En este estudio se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ , modelo que supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la reacción de PCR tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak & Schmittgen, 2001).

El Software v1.4 de Applied Biosystem no registró valores de Ct para el gen *Mi-1*, lo que imposibilitó los cálculos de cuantificación. La ausencia de la expresión del gen *Mi-1* demostró que la expresión de este gen no se induce por estrés abiótico, como la salinidad, lo que sugiere que el gen activa su resistencia cuando la proteína Mi-1 (Proteína R) interactúa específicamente con otras proteínas de la planta que han sido modificadas o secretadas por un agente biótico (McDowell & Woffenden, 2003).

El Software v1.4 de Applied Biosystem si registró valores de Ct para los genes *Lemmi9* y *LEa-DOXI*. Todos los valores de Ct registrados fueron menores a 33. La cinética de la reacción presentó una curva exponencial creciente con un patrón clásico sigmoideo. Estos resultados viabilizaron y afianzaron los análisis de cuantificación. Según Godoy , en el 2008, los valores de Ct mayores a 33 con amplificaciones de curvas sin un patrón clásico demuestra un valor no concluyente (descartable) que pudo derivarse por la presencia de un contaminante, amplificaciones inespecíficas o

demasiados ciclos (>40) y cuando los valores de Ct son menores a 33 con amplificaciones de curvas sin un patrón clásico, generalmente se deben a errores de pipeteo, degradación de la muestra o variabilidad en la concentración de *primers*, lo que amerita un ensayo de confirmación.

El nivel de expresión del gen *LE $\alpha$ -DOX1* en todas las especies fue significativamente diferente. La expresión del gen se incrementó a medida que aumentó el tiempo de exposición de la sal. En todas las especies, el incremento de la expresión inició a las 8 horas, alcanzando un máximo a las 24 horas. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Tirajoh *et al.* (2004), donde se observa que la expresión de *LE $\alpha$ -DOX1* en raíz es altamente regulado por tratamientos salinos entre las 8 y 24 hora. Resultados similares se obtuvieron con la expresión del gen *Lemmi9* en *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimum*, al contrario de *Solanum lycopersicum* var. *Syta* que alcanzó su máximo hasta las 12 horas. Esta diferencia evidencia que la expresión del gen varía de acuerdo a las características morfológicas y fisiológicas de cada especie.

Los resultados de la expresión génica de *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* y su correlación con los estudios de tolerancia y medición de la eficiencia fotosintética entre los genotipos silvestres y comerciales de tomate demuestran que las proteínas LEA sintetizadas por *Lemmi9* cumplen una función importante en la tolerancia a estrés salino. Ingram y Bartels, en el 1996, manifiestan que las proteínas LEA estabilizan las membranas y protegen las estructuras y proteínas celulares. Además en estudios realizados por Kim *et al.*, en el 2005, demuestran que la eficiencia del proceso fotosintético también está relacionada con la expresión del gen, ya que la proteína LEA retarda el decremento de la clorofila en la hoja, estabilizando la membrana tilacoidal. En el cultivar *Syta* de la presente investigación, la disminución de la expresión del gen *Lemmi9* y la consecuente disminución de la proteína, probablemente condujo al daño celular, evidenciándose como efectos degradativos en el fenotipo, tanto morfológicos (necrosis, clorosis, entre otros), como fisiológicos (fotosíntesis).

En *Solanum pimpinellifolium* los genes *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* fueron altamente regulados por la salinidad. La sobreexpresión de *LE $\alpha$ -DOX1* en esta especie respecto a la expresión en el tomate comercial *Syta*, indica un posible incremento en la capacidad

tolerancia ante largos periodos de estrés, ya que este gen codifica para una enzima que cataliza la oxigenación de ácidos grasos para dar lugar a la formación de oxilipinas, mensajeros químicos implicados en la respuesta defensiva contra el daño oxidativo y muerte celular (Molle *et al.*, 2007; Wasternack, 2007).

En las especies silvestres de *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimum*, el nivel de la expresión de ambos genes fue menor al de *Solanum pimpinellifolium*; sin embargo no se descarta su tolerancia, ya que en estudios agronómicos realizados por Fanor *et al.*, en el 2000, han catalogado a la naranjilla y sus especies silvestres, como plantas que presenta una tolerancia moderada a la salinidad por NaCl.

A partir de estos resultados se puede concluir que la técnica de PCR en tiempo real utilizada en análisis de expresión génica es muy útil y eficiente para procesos de selección de especies idóneas como fuentes importantes de genes para el mejoramiento genético de variedades comerciales. Gracias a esta técnica en la presente investigación se ha podido correlacionar la respuesta de plantas silvestres ante un estrés salino a nivel molecular, fisiológico y morfológico y ha permitido definir caracteres propios involucrados con la tolerancia. Los datos obtenidos suponen el primer paso para la obtención de variedades solanáceas de alto valor comercial y alto grado de tolerancia a salinidad en el Ecuador.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Las pruebas de tolerancia a la salinidad mostraron que la concentración y la duración a la exposición de las sales en el suelo, son factores determinantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas.
2. El método de TRIZOL® reagent empleado para la extracción de ARN, fue óptimo para el aislamiento en tejido radicular, ya que se obtuvieron concentraciones entre 1.3 a 4 ug/uL de éste ácido nucleico.
3. El análisis de especificidad de los *primers* realizado mediante los software en línea Primer3 y Oligo Analicer 3.1 mostraron valores de formación de horquillas y homodímeros/heterodímeros mínimos, los cuales confirmaron el correcto diseño de los primers para el análisis de qRT-PCR.
4. El análisis de similitudes locales de las secuencias flanqueadas por los *primers*, se realizó con el algoritmo en línea BLAST y generó un score  $\geq 200$  entre secuencias de especies del género *Solanum*, lo que indica un alto grado de conservación de la secuencias.
5. La estandarización de las condiciones de amplificación en PCR convencional, permitieron la optimización de reactivos para la PCR cuantitativa reduciendo el tiempo y los costos para lograr una amplificación exitosa.
6. Se estableció que la temperatura de alineamiento óptima para la amplificación en PCR en tiempo real de un solo fragmento de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOXI* fue de 55.7 ° C.
7. En esta investigación, se logró determinar que el gen *Mi-1* no se induce por estrés salino, lo que sugiere que la expresión de este gen está altamente regulada

por otro tipo de estímulos como el estrés biótico provocado por la infección del nematodo *Meloidogyne spp.*

8. Se determinó que la expresión de *Lemmi9* en *Solanum lycopersicum var. Syta* se encuentra relacionada con el comportamiento fisiológico y morfológico de la planta, ya que se observó una disminución de la eficiencia fotosintética y un decaimiento generalizado cuando disminuía la expresión del gen.
9. En *Solanum pimpinellifolium*, al contrario, no se evidenciaron cambios en el fenotipo relacionado a la expresión del gen, ya que el incremento de la expresión durante el ensayo no afectó el comportamiento fisiológico y morfológico de la planta. Esto demuestra que las proteínas LEA sintetizadas por el gen cumplen una función importante en la tolerancia al estrés salino.
10. La expresión de los genes *Lemmi9* y *LEa-DOX1* en *Solanum pimpinellifolium* fue mayor que en las especies silvestres *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimum* y a la especie comercial *Solanum lycopersicum var. Syta*, lo que confirma la relación entre estos genes de resistencia y las condiciones de estrés salino a la que *Solanum pimpinellifolium* está expuesta en su hábitat natural.
11. Los resultados encontrados en los genotipos silvestres de *Solanum pimpinellifolium* muestran que los genes *Lemmi9* y *LEa-DOX1* se encuentran involucrados en la tolerancia al estrés salino de la planta, por lo podrían constituir una fuente potencial de genes para el mejoramiento genético de variedades comerciales.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. Se recomienda investigar nuevos protocolos de extracción de RNA de tejidos con un alto contenido de polisacáridos, proteínas y lípidos para mejorar la calidad de las muestras.
2. Es importante realizar en un futuro un estudio más profundo de identificación de genes que confieran tolerancia a la salinidad y sequía, así como determinar la expresión de los mismos en las distintas especies de solanáceas con el fin seleccionar especies idóneas para cada sección y poder implementarlos en futuros procesos de fitomejoramiento.
3. Se debería realizar un análisis de expresión génica en diferentes órganos de la planta para correlacionar su expresión con los efectos morfológicos y fisiológicos generados durante el estrés.
4. Se sugiere implementar una Fast-PCR (PCR bifásica) y diseñar *primers* específicos para este tipo de amplificación con el objeto de optimizar el tiempo de la reacción y poder analizar un mayor número de muestras.

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFIA

1. Accerbi, M Schmidt, S De Paoli, E Park, S Jeong, DH. & Green. P. (2010). Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. Methods in Molecular Biology, 592, 31-50.
2. Agroecuador. (2002). Análisis e interpretación del III censo agropecuario. Extraído el 10 de agosto, 2012, de [www.agroecuador.com](http://www.agroecuador.com).
3. Anderson, I. y A. Brass (1998): Searching DNA databases for similarities to DNA sequences: when is a match significant? Bioinformatics, 14(4), 349-356.
4. Appliedbiosystem. (2012). Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems Chemistry Guide. Extraído el 14 de agosto, 2012, de [http://www3.appliedbiosystems.com/WebTroubleshooting/NTCPositiveAmplification/Primer\\_dimer\\_formation.htm](http://www3.appliedbiosystems.com/WebTroubleshooting/NTCPositiveAmplification/Primer_dimer_formation.htm)
5. Apse, M. & Blumwald, E. (2002). Engineering salt tolerance in plants. Current Opinion in Biotechnology, 13, 146–150.
6. Argentel, L López, R. D González, L. M López, R. C Gómez, E y Fonseca, I. (2010). Evaluación de la tolerancia a la salinidad en estadios tempranos y finales del desarrollo en Triticales (X Triticum secale). Cultivos Tropicales, 31(1), 48-53
7. Ávila, M Bustillo, L Charris H Mayorga, E. y Narváez, L. (2011). Espectrofotometría. Corporación Universitaria de La Costa, Departamento de Ciencias Básicas Facultad de Ingeniería, Barranquilla. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.slideshare.net/meliaviladavila/espectrofotometria>

8. Bagni N, Ruiz-Carrasco K, Franceschetti M, Fornale S, Fornasiero RB & Tassoni A. 2006. Polyamine metabolism and biosynthetic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 44, 776-786.
9. Bernal, J Cordoba, O Franco, G Londoño, M Rodriguez, J y Guevara N. (1996). Cultivo de Lulo (*Solanum quitoense*). En: Memorias Seminario de Frutales de Clima frío moderado. Manizales.
10. Bernal, J Lobo, M y Londoño, M. 1998. Documento de presentación del material “Lulo La Selva”. Corpoica. Rionegro.
11. Bernardello, L Heiser, C & Piazzano, M. (1994). Karyotypic studies in *Solanum* section of *Lasiocarpa* (Solanaceae). American Journal Botany, 81, 95-105.
12. Biosistemika, 2011. qPCR Basics. Extraído el 14 de agosto, 2012, de <http://www.biosistemika.com/workshops/qpcr-basics>
13. Bohs, L. (2004). Achloroplast DNA phylogeny of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. Systematic Botany. 29(1), 177-187.
14. Bustin, S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trend and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29, 23-39.
15. Carvajal, M Martínez, M. & Martínez, V. (2000). The response of plants to salinity involves root water channels. New York: Hohmann and Nielsen, Kluwer Academic Plenum Publishers.
16. Castañeda, H. (1992). El lulo, su cultivo y su conservación. Ediciones Tecnológicas. S.A. Pereira, CO. s.p.
17. Chen, S, Li, J, Wang, S, Fritz, E, Huttermann, A. & Altman A. (2003). Effects of NaCl on shoot growth, transpiration, ion compartmentation, and transport in

regenerated plants of *Populus euphratica* and *populous tomentosa*. Canadian Journal of Forest Research, 33, 967-975.

18. Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. BioTechniques, 15, 532-537.
19. CIAT. (2006). Centro Internacional de Agricultura Tropical. En Productores de lulo y de mora competitivos mediante selección participativa de clones élite, manejo integrado de cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor. González, A (Autor). Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.fontagro.org/sites/default/files/19%20Proyecto%200616-06.pdf>
20. CORPEI. (2009). Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones. En. Perfil de tomate de árbol. Ramírez, T. (Autor). Extraído el 10 de agosto, 2012, de [www.pucesi.edu.ec/pdf/tomate.pdf](http://www.pucesi.edu.ec/pdf/tomate.pdf).
21. Cortazar, M. y Silva, E. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, México. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
22. Dajic, Z. (2006). Salt stress. En Madhava, K.V Ragha, A.S. & K. Janardhan (Eds), Physiology and Molecular Biology of stress tolerance. (pp. 41-101). Dordrech: Springer
23. Dolores, M. (2007). Caracterización Funcional de Map Quinasas Del Subgrupo C1 De Plantas. Universidad de Valencia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Extraído el 13 de agosto, 2012, de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9540/ortiz.pdf?sequence=1>
24. Domingos, J. (2003). Análisis de la variabilidad en las especies del subgénero *Eulycopersicon* más relacionadas con el tomate cultivado. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos,

Departamento de Biotecnología, Valencia. Extraído el 13 de agosto, 2012, de <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10914/tesisUPV1679.pdf>

25. Epstein, E Norlyn, J Rush, D Kingsbury, R Kelly, D. & Wrana, A. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. Science, 210, 399–404.
26. Expósito, M Borges, A Borges, A. y Pérez, J. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato developing process. BMC Plant Biology, 8, 1-12.
27. Esquinas, T. 1981. Genetic Resources of tomatoes and wild relatives. A global resport. Rome: International Board for Plant Genetic Resources.
28. EuSol. 2006. *Solanum pimpinellifolium*. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.eu-sol.net/es/public/biodiversity/tomatoes/solanum-pimpinellifolium>
29. Fanor Casierra, F Eberf, G. y Lüdders, P. (2000). Efecto de la salinidad por cloruro de sodio sobre el balance de nutrientes en plantas de lulo (*Solanum quitoense* L.). Agronomía Colombiana, 17, 85-90.
30. FAO. (2002). Organización de las Naciones unidas para la agricultura y la alimentación. La sal de la tierra: peligro para la producción de alimentos. Extraído el 10 de agosto, 2012, de <http://www.fao.org/worldfoodsummit/spanish/newsroom/focus/focus1.htm>
31. FAO. (1995). Production Yearbook 1995, vol. 48.
32. FAO. (1997). Organización de las Naciones unidas para la agricultura y la alimentación. La agricultura en América latina. Extraído el 10 de agosto, 2012, de <http://www.fao.org/DOCREP/004/W7451S/W7451S00.HTM>
33. Felle, HH. (1994). The H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter it root har cells of *Sinapsis alba*. Plant Physiology, 106, 1131-1136.

34. Fonseca, D Mateus, H. y Contreras, N. (2010). Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética Básica. Bogotá: Editorial Universidad del Rosario.
35. Fontagro. (2009). Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria. Desarrollo y valoración de recursos genéticos de *Lycopersicon* spp. para su utilización en mejoramiento genético de Solanáceas frente a estrés biótico y abiótico. Extraído el 10 de agosto, 2012, de [http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/2009\\_POA\\_08\\_71.pdf](http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/2009_POA_08_71.pdf)
36. Fory, P. (2005). Caracterización y análisis molecular de la diversidad genética de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* LAM) y seis especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Posgrados, Palmira. Extraído el 12 de agosto, 2012, de [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos\\_ciat/tesis%2031%2007%2005.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/tesis%2031%2007%2005.pdf)
37. Galvez, F. (2009). Caracterización de la familia de antiportadores MeNHX de tomate. Universidad de Granada, Estación experimental del Zaidín CSIC, Departamento de Bioquímica, Biología celular y molecular de plantas, Granada. Extraído el 10 de agosto, 2012, de <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/18318976.pdf>
38. García, M. (1998). Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Extraído el 13 de agosto, 2012, de <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r49210.PDF>
39. Gaxiola, R Fink, G. & Hirschi, K. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*, 129, 967–973.
40. Gil, S. (2012). Macetes em Experimentos. Extraído el 31 de agosto, 2012, de <http://labsynapse.com/blog/tag/laboratorio/>

41. Hajibagheri, M.A Hall, J.L. y Flowers, T.J. 1984. Stereological analysis of leaf cell of the halophyte Suaeda maritime (L.) Dum. Journal of Experimental Botany, 35, 1547-1557.
42. Hasegawa, P. M Bressan, R. A Zhu, J.-K. & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51, 463–499.
43. Hasegawa, P Bressan, R Zhu, J-K. y Bohnert, HJ. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology, 51, 463-499
44. Heid,C Stevens,J Livak, J. & Williams,P. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research, 6, 986-994.
45. Heiser, C. (1985). Ethnobotany of the Naranjilla (Solanum quitoense) and its relatives. Economic Botany, 39, 4-11.
46. Hernández, A Martín, P Torres, A Salido, E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. Nefrología, 14, 156-169.
47. Hirschi K.D. (2001). Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transport: Who's directing the traffic? Trends in Plant Science, 6, 100-104.
48. INEC. (2002). Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. III Censo Nacional Agropecuario, Resultados Nacionales y provinciales. Cultivos Permanentes, 1, 110. Quito: INEC.
49. Ingram, J & D. Bartels. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology, 47, 377-403.
50. INIA. (2009). Desarrollo y valoración de recursos genéticos de Lycopersicon spp. para su utilización en mejoramiento genético de Solanáceas frente a estrés

biótico y abiótico. Extraído el 13 de agosto, 2012, de [http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/2009\\_POA\\_08\\_71.pdf](http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/2009_POA_08_71.pdf)

51. INIAP. (2010). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. En Manual de Cultivo ecológico de naranjilla. Revelo, J Viteri, P Vásquez, W León, J. y Gallegos, P. (Autores). Extraído el 12 de agosto, 2012, de [http://agronegocioecuador.ning.com/notes/Manual%3A\\_cultivo\\_ecol%C3%B3gico\\_de\\_naranjilla](http://agronegocioecuador.ning.com/notes/Manual%3A_cultivo_ecol%C3%B3gico_de_naranjilla)
52. ISG. (2004). The International Solanaceae Genome Project. About the Solanaceae Family. Extraído el 10 de agosto, 2012, de [http://solgenomics.net/about/about\\_solanaceae.pl](http://solgenomics.net/about/about_solanaceae.pl)
53. Jansky, S. (2009). Breeding, Genetics, and Cultivar Development. In: Singh, J. & Kaur L. (Eds). Advances in Potato Chemistry and Technology, (pp. 27-61). San Diego: Academic Press.
54. Kim H-S, Lee JH, Kim JJ, Kim C-H, Jun S-S, Hong Y-N (2005) Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for hydrophobic LEA protein *Capsicum annum*. Gene, 344, 115-123
55. Kim, H-S Lee, JH Kim, JJ Kim, C-H Jun, S-S & Hong, Y-N. (2005). Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annum*. Gene, 344, 115-123.
56. Knapp, S Bohs, L Nee, M. & Spooner D. (2004). Solnaceae a model for linking genomics with biodiversity. Comparative and Funcional, 5, 285-291.
57. Kubista, M Andrade, J Bengsston, M Foorotan, M Jonák, J Lind, K Sindelka, R Sjöback, R Sjögreen, B Strömbom, L Sthåhlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine, 27, 95-125.

58. Lannetta, M. & Colonna, N. (2011). Salinização. In: PROJETO LUCINDA, Land Care. Desertification Affected Areas. Extraído el 12 de agosto, 2012, de [http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/booklets/B3\\_Booklet\\_Final\\_PT.pdf](http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/booklets/B3_Booklet_Final_PT.pdf).
59. Livak, K Schmittgen, T 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. Methods, 25, 405-408.
60. Lobo, M. 1991. Perspectivas de siembra del lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira. Boletín Técnico, 2(2), 125-130.
61. Lobo, M. y Medina, C. (2000). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). En: Caracterização de frutas nativas de América Latina. Serie: Frutas nativas de América Latina. Edição Comemorativa do 30º aniversário da Sociedade Brasileira de Fruticultura. 41-43.
62. López, C García, C. & Carvajal, M. (2006). Are root hydraulic conductivity response to salinity controlled by aquaporins in broccoli plants? Plant and Soil, 279, 13–23.
63. MAG. (2006). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Tomate de mesa (riñón). Extraído el 10 de agosto, 2012, de [www.sica.gov.ec](http://www.sica.gov.ec).
64. Martínez, MC Silva, C López, C Cabañero, FJ. & Carvajal, M. (2006). Plants aquaporins: New perspectives on water and nutrient uptake in saline environment. Plant Biology, 8, 535-546.
65. Miller, J. & Diggle, P. (2003). Diversification of Andromonoecy in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): The roles of phenotypic plasticity and architecture. American Journal of Botany. 90, 707-715.

66. Miranda, D. y Chaves, D. 2007. Evaluación de concentraciones de sal (NaCl) en el agua de riego sobre el crecimiento de lechuga 'Batavia' (*Lactuca sativa* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 1(2).
67. Monteros, A Muñoz, L Revelo, J Tapia, C Zambrano, E & Fiallos, J. (2003). Nematode Resistance Through Mutation Induction in a Local Variety of Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) in Ecuador. IAEA-TECDOC,1426, 87-90.
68. Mullis BK. (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. Sci Am, 262, 56-65.
69. Munns, R. & James, R. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. Plant Soil, 253, 201-218.
70. National Center of Biotechnological Information (NCBI). Taxonomy Browser, Taxonomy ID: 4081. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4081&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f>
71. Nuccio, M Rhodes, D McNeil, S. & Hanson, A. (1999). Metabolic engineering of plantas for osmotic stress resistance. Current Opinion in Plant Biology, 2, 128-134.
72. Pacheco, R. 1996. El cultivo de la naranjilla en el Ecuador. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria. Quito.
73. Parks, G Dietrich, M & Schumaker, K. (2002). Increased vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. In response to NaCl. Journal of Experimental Botany, 53, 1055-1065.
74. Peralta, I. E Spooner, D. M. & Knapp, S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, and sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). Systematic Botany Monographs, 84, 1-186.

75. Portal del campo. (2012). Semillas tomate Syta. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.portaldelcampo.cl/verAnuncio/407/semillas-tomate-syta.html>
76. Posso, D. y Ghneim, T. (2008). Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. Ediciones IVIC.
77. Qiu, QS Guo, Y Quintero, FJ Pardo, JM Schumaker, KS. & Zhu, JK. (2004). Regulation of vascular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange in Arabidopsis thaliana by the salt-overly sensitive (SOS) pathway. Journal of Biological Chemistry, 279, 207-215.
78. Rhodes, D McNeil, S. y Hanson, A. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. Annual Review Plant Physiologu. Planta Molecular Biology, 44, 357-384.
79. Roberts, SK. (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. New Phytologist, 169, 647-666.
80. Rodes D, Nadolska A. & Rich PJ. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: Lauchli A, Luttge U. (Eds.), Salinity; enviroment-plant-molecules (pp. 1981-204). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer.
81. Rodríguez, D. (2012). Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications. Spain: Caister Academic Press
82. Rodríguez, M Canales, E. y Hidalgo, O. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotechnología Aplicada, 22, 1-10.
83. Rodríguez, R Tabares, J. y Medina, J. (2001). Cultivo moderno del Tomate. Madrid: Mundi-Prensa.
84. Saikia, R. (2008). Microbial Biotechnology. Bioinformatics Tool for PCR Primer Designing. India: New India Publishing Agency.

85. Sambrook J y Rusell, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 2. Washington: CSHL Press.
86. Sharp, RE. & LeNoble, ME. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under wáter stress. Journal of Experimental Botany, 53, 33-37
87. SICA. (2006). Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Extraído el 12 de agosto, 2012, de [http://www.sica.gov.ec/agro/docs/sup\\_prod.htm](http://www.sica.gov.ec/agro/docs/sup_prod.htm)
88. Schmittgen. (2006). Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete Protocol. In Dorak, M. (Ed.), Real-Time PCR (pp. 131-132). New York: Taylor & Francis Group.
89. TGC. (2012). Consorcio del Genoma del Tomate. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature, 485, 635–641.
90. Tirajoh, A Aung, T McKay, A. & Plant, A. (2004). Stress-responsive a-dioxygenase expression in tomato roots. Journal of Experimental Botany, 56 (412), 713–723.
91. Tozzini, A. (2004). Detección de OGM en la cadena alimentaria. En: Echenique, V Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal (pp. 409-424). Buenos Aires: Ediciones INTA.
92. Tuteja N. (2007). Mechanism of high salinity tolerance in plants. Methods in Enzymology: Osmosensing and Osmosignaling, 428, 419-438.
93. UNC. (2012). Universidad Nacional de Colombia. Mecanismos de absorción de iones por las células de la raíz. Extraído el 13 de agosto, 2012, de [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap03/01\\_03.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap03/01_03.htm)

94. UNFPA. (2001). Fondo Poblacional de las Naciones Unidas. Extraído el 10 de agosto, 2012, de <http://www.unfpa.org/swp/2001/>
95. Ungar, I. (1996). Effect of salinity on seed germination growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 83, 604-607.
96. USDA. (2010). United States Department of Agriculture. Extraído el 13 de agosto, 2012, de [http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?q=electrical+conductivity&x=0&y=0&navid=SEARCH&Go\\_button.x=21&Go\\_button.y=11&site=usda](http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?q=electrical+conductivity&x=0&y=0&navid=SEARCH&Go_button.x=21&Go_button.y=11&site=usda)
97. USDA. (2009). United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation plants Database. National Germoplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>
98. USDA/NRCS. (2012). United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Solanum pimpinellifolium* Jusl. Extraído el 12 de agosto, 2012, de <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SOPI7>
99. Valasek, M. & Repa, J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 151-159.
102. Velayudhan, B Shin, H Lopez, V Hooper, T Halvorson, D. & Nagaraja, K. (2003). A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the diagnosis of turkey coronavirus infection Transcription Reverse-PCR (RT-PCR). *Vet Diagn Invest*, 15, 592–596.
103. Vitart, V Baxter, I Doerner, P. & Harper, J. (2001). Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root endodermis. *Plant Journal*, 27, 191–201.

104. Warnock, S. (1988). A Review of Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Lycopersicon*. HortScience, 23(4).
105. Whalen, M. Costich, D. & Heiser, C. (1981). Taxonomy of *Solanum* Section *Lasiocarpa*. Gentes Herbarun, 12, 41-129.
106. White, PJ. & Broadley, MR. (2001). Chloride in soil and its uptake and movement within the plant: a review. Annals of Botany, 88, 967-988.
107. Wong, M. & Medrano, J. (2005). Review: Real-Time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39, 1-11.
108. Xiong, L K.S. Schumaker, y J.K. Zhu. (2002). Cella signaling during cold, drought, an salt stress. The Plant Cell, 14, 165-183.
109. Zhu J-K. (2001). Plants salt tolerance. Trends in Plant Sciences, 6, 66-71.
110. Zhu, J. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 53, 247-273.
111. Zhu, J. K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. Current Opinion in Plant Biology, 6, 441-445.