

**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**

**\*Flores, C., Párraga, P. & P. Karina.**

**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 vestisimun*" (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.

**Palabras clave**

gen *Mi-1*, estrés salino, Solanáceas.

---

**INTRODUCCIÓN**

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, ya que 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, 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. 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.

El efecto del estrés salino en plantas se traduce en la inhibición del crecimiento y desarrollo, y los efectos son generados a niveles morfológicos, fisiológicos y moleculares (Munns, 2002).

Algunos genes como el *LEA* y  $\alpha$ -*DOX*, han sido ampliamente estudiados, y se encuentran involucrados en la adaptación y tolerancia a la salinidad. 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 durante el estrés salino (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).

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). 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).

En la actualidad, no se encuentra en literatura 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.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El material vegetal se obtuvo a partir de semillas de los genotipos silvestres *Solanum quitoense*, *Solanum vestisimum* y *Solanum pimpinellifolium*, y comerciales de *Solanum lycopersicum* var. *Syta*.

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.

### Tratamientos de estrés salinos

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. 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. 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. 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%.

### Identificación del exón del gen *Mi-1*

Se inició con la extracción de ADN de raíces de cada genotipo, recolectada al tiempo 0 y se empleó el método descrito por DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial Qiagen®. 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 Zárte et al. (2008), los cuales amplifican una región conservada de 1000 pb flanqueante entre los 4678 y los 5676pb del gen *Mi-1*.

### PCR en tiempo real

Se inició con el proceso de extracción de ARN de raíz 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.

Para la síntesis de ADNc, se determinó el volumen necesario para 3 ug de ARN total y se estandarizó las condiciones óptimas de amplificación de los genes GAPDH (Gen constitutivo), *Mi-1*, Lemmi9 y LE $\alpha$ -DOX (Genes Target) 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.

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 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). 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.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Tratamiento de estrés salino

Los resultados de las pruebas de tolerancia a estrés salino mostraron que *S. lycopersicum* var. Syta es una especie sensible (Figura 1 y Tabla 1), 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).

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 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

En cambio, las pruebas de tolerancia en el tomate silvestre *S. pimpinellifolium* no evidenciaron cambios tanto a nivel morfológico como fisiológico (Figura 1 y Tabla 1). 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.

**Tabla 1.** Comportamiento de la eficiencia fotosintética (*Fv/Fm*) 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*

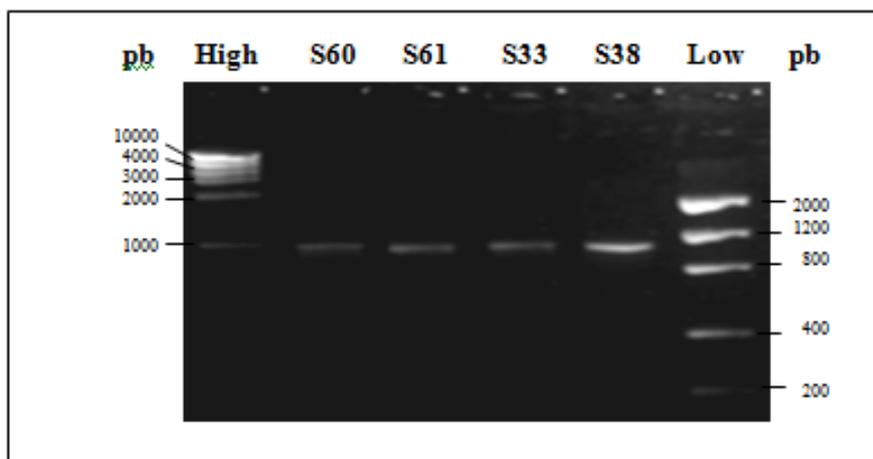
S60: *Solanum lycopersicum var. Syta*

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 radio 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 radio 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.

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.

#### Identificación 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 (Figura 2), 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.

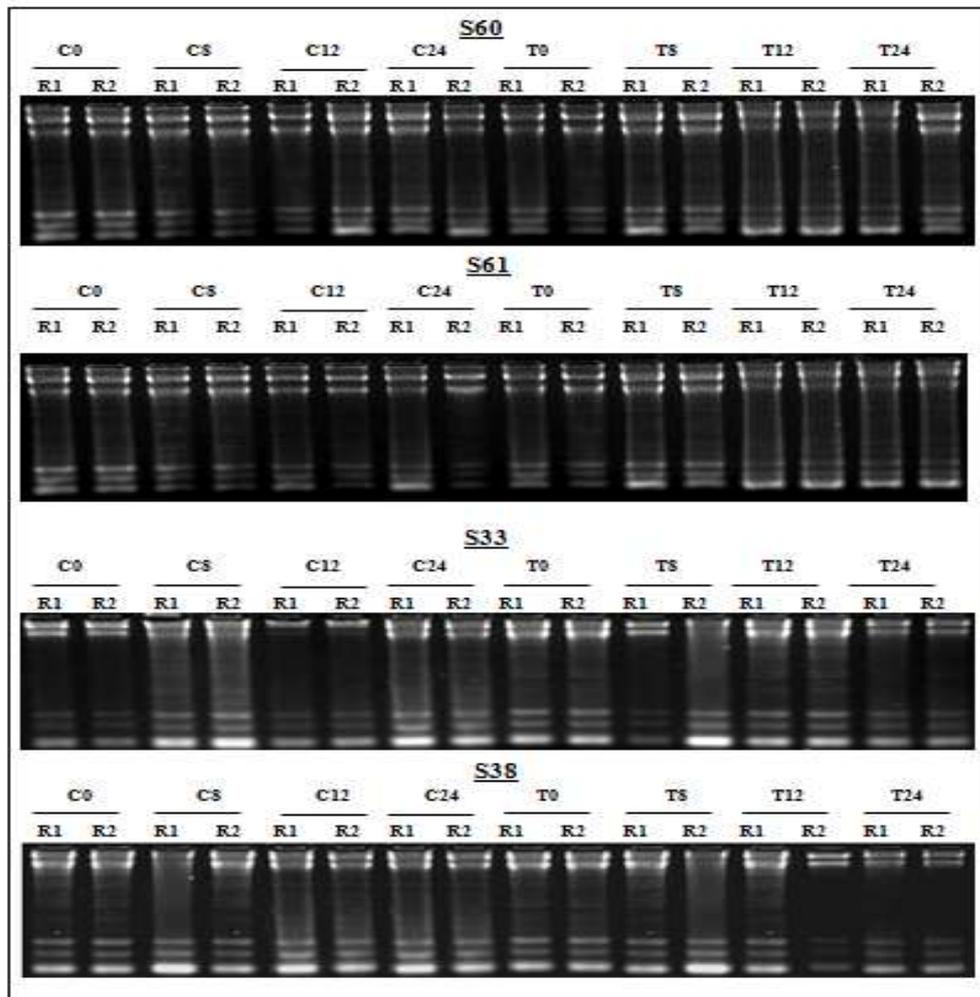


**Figura 2.** Visualización de los fragmentos de PCR amplificados para la región exónica del gen *Mi-1*, en gel de agarosa al 1,5% (p/v) teñido con SYBR® en las especies S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S.*

*lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). High DNA mass ladder y Low DNA mass ladder son los marcadores de peso molecular.

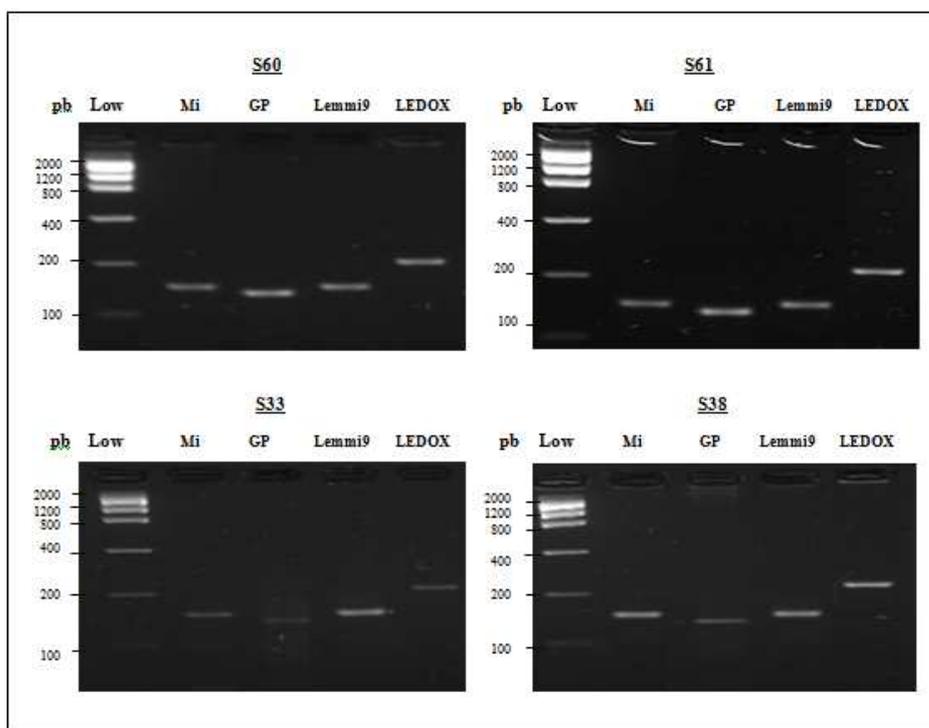
### PCR en Tiempo Real

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 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.



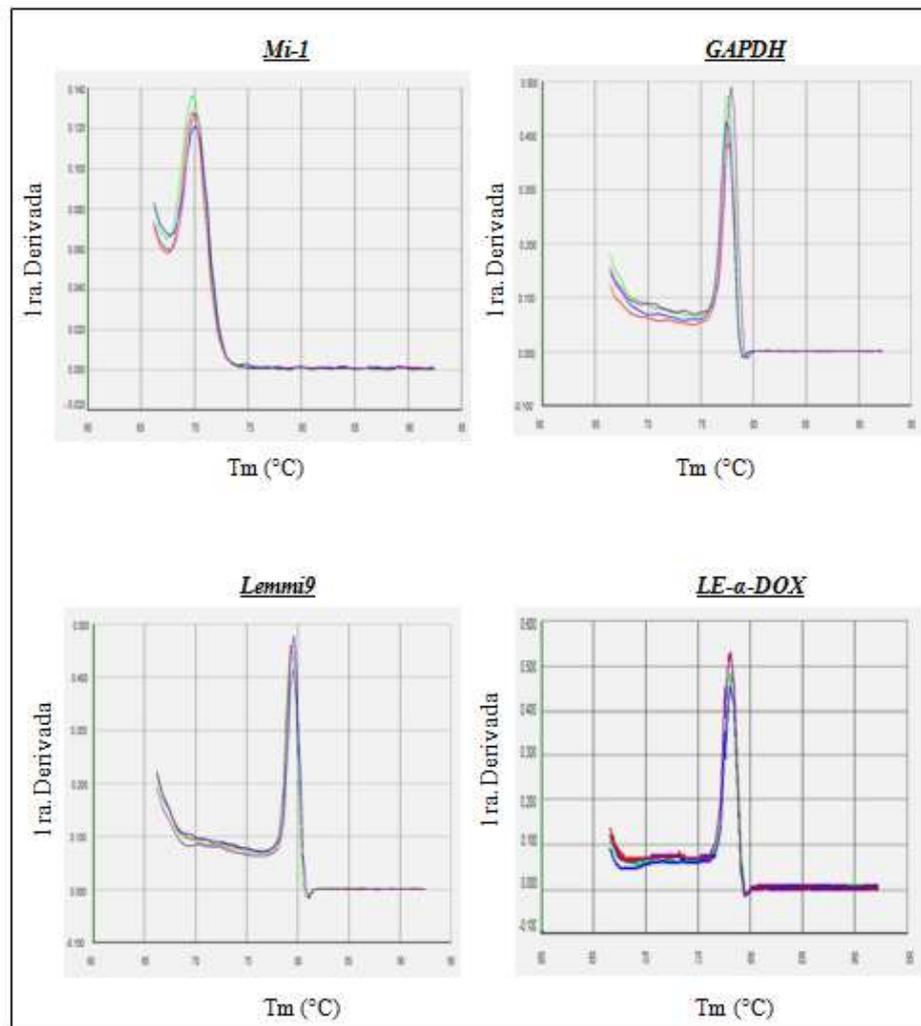
**Figura 3.** Visualización del ARN total en gel de agarosa al 2.5% . S33 (*Solanum quitoense*), S38 (*Solanum vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum var. Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Tiempos de muestreo 0, 8, 12 y 24 horas. C: Tratamientos Control. T: Tratamientos Salinos. R: Repetición.

La temperatura consenso para la amplificación de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *LE $\alpha$ -DOX1* fue de 55. 7° C (Figura 5). 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.



**Figura 4.** Verificación de la presencia de los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9* y *Le $\alpha$ -DOX1* en el transcrito (ADNc) en gels de agarosa. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum var. syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*). Low DNA mass ladder es el marcadores de peso molecular.

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 (Figura 5), 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.



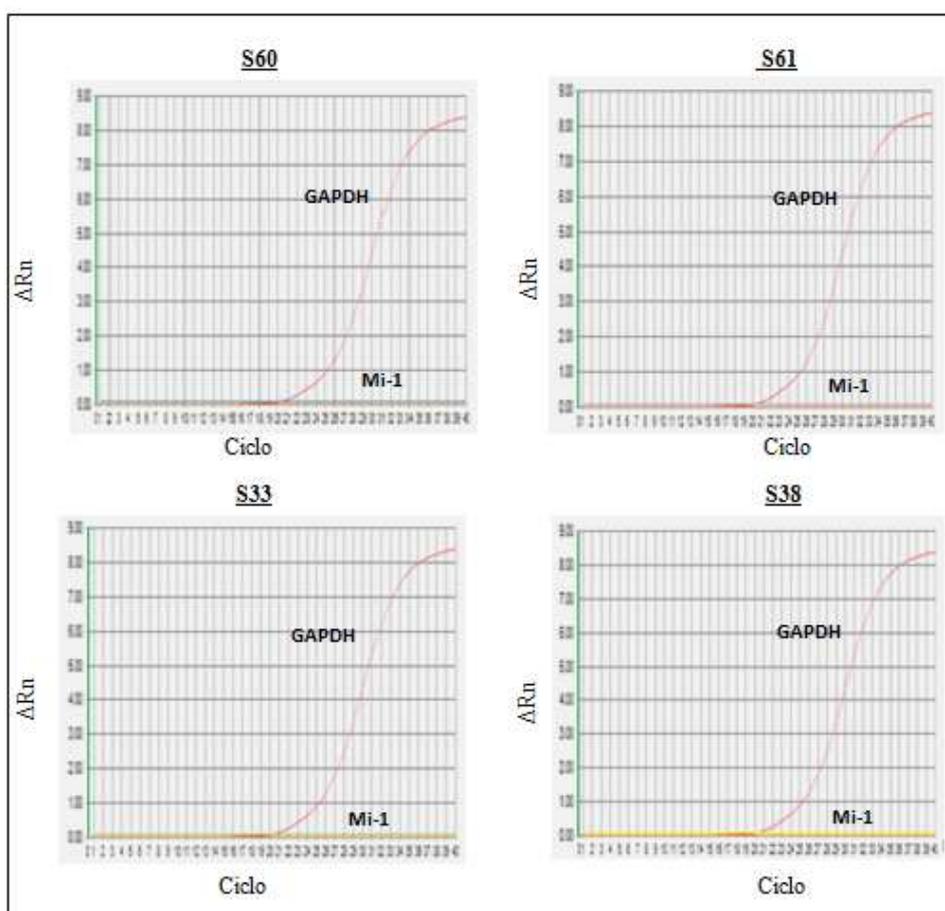
**Figura 5.** Picos de disociación correspondientes a los genes *Mi-1*, *GAPDH*, *Lemmi9*, y *LE-alfa-DOX* a una temperatura de fusión de 55.7 °C en las especies solanáceas S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimun*), S60 (*S. lycopersicum* var. *syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

El análisis 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).

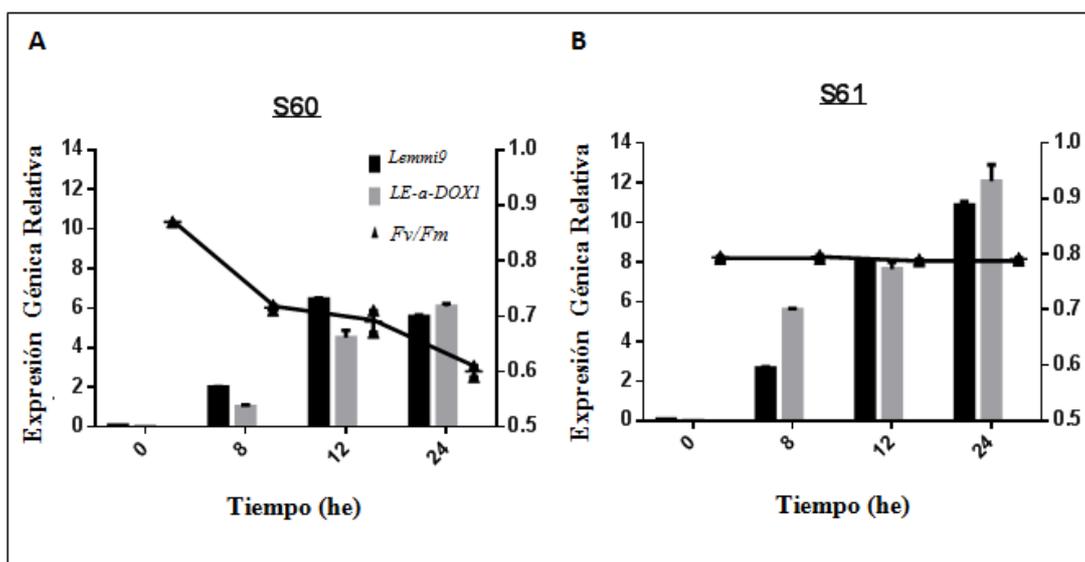
El Software v1.4 de Applied Biosystem no registró valores de Ct para el gen *Mi-1*, lo que imposibilitó los cálculos de cuantificación (Figura 6). La ausencia de la expresión del gen *Mi-1* demostró que la expresión de este gen no se induce por estrés abiótico, como la salinidad, lo que sugiere que el 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).



**Figura 6.** Nivel de Fluorescencia ( $\Delta Rn$ ) del gen *Mi-1* relativo al gen constitutivo *GAPDH*. S33 (*S. quitoense*), S38 (*S. vestisimum*), S60 (*S. lycopersicum* var. *Syta*) y S61 (*S. pimpinellifolium*).

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 (Figura 7). Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Tirajoh *et al.* (2004), donde se observa que la expresión de *LE $\alpha$ -DOX1en* 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 vestisimun*, 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.



**Figura 7.** 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.

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 (Figura 7). 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 repuesta defensiva contra el daño oxidativo y muerte celular (Molle *et al.*, 2007; Wasternack, 2007).

En las especies silvestres de *Solanum quitoense* y *Solanum vestisimun*, 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.

## 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 nucléico..
- 3) 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.
- 4) 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 $\alpha$ -DOX1 fue de 55.7 ° C.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) La expresión de los genes Lemmi9 y LE $\alpha$ -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.
- 9) Los resultados encontrados en los genotipos silvestres de *Solanum pimpinellifolium* muestran que los genes Lemmi9 y LE $\alpha$ -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.

## BIBLIOGRAFÍA

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\\_formation.htm](http://www3.appliedbiosystems.com/WebTroubleshooting/NTCPositiveAmplification/Primer_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. & Martinez, V. (2000). The response of plants to salinity involves root water channels. NewYork: 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 *populus 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 Ratha, 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 maritima* (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://agronegociosecuador.ning.com/notes/Manual%3A\\_cultivo\\_ecol%C3%B3gico\\_de\\_naranjilla](http://agronegociosecuador.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.fcs.unl.pt/lucinda/booklets/B3\\_Booklet\\_Final\\_PT.pdf](http://geografia.fcs.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 aniversario 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. Martinez, 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. & Diggie, 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=SOP17>
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, P.J. & Broadley, M.R. (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.