

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Cuantificación relativa de la expresión de genes candidatos de
tolerancia a salinidad en tomate de árbol (*Solanum betaceum*)
mediante la técnica RT-qPCR**

Proyecto de Investigación

Carlos Alberto Vintimilla Carrasco

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Procesos Biotecnológicos

Quito, 29 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Cuantificación relativa de la expresión de genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) mediante la técnica RT-qPCR

Carlos Alberto Vintimilla Carrasco

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 29 de mayo de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Carlos Alberto Vintimilla Carrasco

Código: 00112180

Cédula de Identidad: 1720480217

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2017

DEDICATORIA

A mí mismo...el fruto y la satisfacción de un trabajado arduo y bien logrado.

A Judith Delgado, una de las mejores maestras que la vida me pudo dar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y a mi hermano por el apoyo y cariño recibido durante toda la carrera.

A María de Lourdes Torres por la confianza y la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

A Andrés Torres por su amistad, paciencia y porque me enseñó como hacer ciencia de la mejor manera.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal por el apoyo, especialmente a Viviana Jaramillo.

A Juan Salazar y Andrea Argudo, los mejores compañeros de este viaje.

A todos mis amigos, por su apoyo incondicional: Caro, Rebe, Bri, Jorge, Majo, Dianita, Migue.

RESUMEN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un cultivo nativo de los Andes muy atractivo debido a sus características organolépticas y alto contenido de antioxidantes. Recientes estudios *in vitro* demostraron la habilidad de esta planta para crecer en altas concentraciones de sal. Los efectos del cambio climático en la agricultura cada vez son mayores y en este contexto el estrés salino ha ganado notoriedad. El tomate de árbol representa un recurso atractivo para estudiar los mecanismos genéticos detrás de la adaptabilidad de este cultivo a suelos marginales. En un estudio realizado previamente en nuestro Laboratorio, se identificó genes candidatos de tolerancia a estrés salino en este cultivo mediante despliegue diferencial. El objetivo de este estudio fue caracterizar y validar el patrón de expresión de 9 de estos genes. Para esto se contrastó, mediante RT-qPCR, la expresión de un genotipo tolerante a la salinidad proveniente de Chaltura (Imbabura, Ecuador) y uno sensible de Quero (Tungurahua, Ecuador). Como es la primera vez que se estudia la expresión génica en esta especie, fue necesario estandarizar la metodología de RT-qPCR mediante la selección apropiada de un control endógeno. Después de un estudio de estabilidad se escogieron a los genes RPL8 y TIP41 como controles internos. Además, se logró cuantificar la expresión génica de 4 genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol. De estos, 3 genes estuvieron relacionados con la pared celular y 1 con fotosíntesis. El perfil de expresión coincidió con el predicho en el despliegue diferencial en 3 de los 4 casos. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo que explica la tolerancia a salinidad en *S. betaceum*.

Palabras clave: *Solanum betaceum*, RT-qPCR, estrés salino, expresión diferencial de genes, cuantificación relativa, genes candidatos.

ABSTRACT

Tree tomato (*S. betaceum*) is a native Andean crop highly attractive because of its flavor and antioxidant content. Recent *in vitro* studies have demonstrated the plant's ability to grow at high salt concentrations. Due to climate change salinity stress has gained relevance in global agriculture. This plant represents an attractive resource to study genetic mechanisms behind crops adaptability to marginal soils. In our laboratory, using differential display we identified candidate genes associated with salt tolerance. The aim of this study was to characterize and validate the expression pattern of 9 of the identified genes. This was achieved using RT-qPCR analysis and comparing between salt tolerant genotype Chaltura (Imbabura, Ecuador) and salt sensitive Quero (Tungurahua, Ecuador). RPL8 and TIP41 genes were used as internal controls for RT-qPCR analysis. Overall, it was possible to determine the expression pattern of 4 candidate genes. Out of this, 3 genes were associate with plant cell wall and 1 with photosynthesis. The expression pattern was consistent with the one observed in RT-qPCR analysis for 3 out of 4 genes. These results suggest that there exist a mechanism underlining salt tolerance in *S. betaceum*.

Key words: *Solanum betaceum*, RT-qPCR, salt stress, differential gene expression, relative quantification, candidate genes.

Tabla de contenido

1. Introducción	12
1.1. Efectos de la salinidad en la agricultura	12
1.2. Efectos fisiológicos de la salinidad en las plantas	13
1.3. Tolerancia a la salinidad en plantas	14
1.3.1. Cómo se define tolerancia a salinidad	15
1.4. Mecanismos moleculares de tolerancia a estrés por salinidad	16
1.5. Especie de estudio: Tomate de Árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	17
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	21
3. Área de estudio	21
4. Justificación	21
5. Materiales	23
5.1. Prueba de primers en PCR convencional	23
5.1.1. Extracción y cuantificación de ARN de hojas de tomate de árbol	23
5.2. Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR	26
5.2.1. Determinación de controles endógenos	26
5.3. Análisis de datos	26
5.3.1. Análisis estadístico	26
6. Métodos	26
6.1. Diseño experimental	26
6.2. Prueba de primers en PCR convencional	27
6.2.1. Extracción y cuantificación de ARN de hojas de tomate de árbol	27
6.2.2. Retrotranscripción de ARN de tomate de árbol	28
6.2.3. Prueba de primers para genes que servirán como controles endógenos de RT-qPCR	28
6.2.4. Diseño de primers para transcritos expresados diferencialmente (<i>Differentially expressed transcripts</i>, DETs)	29
6.2.5. Prueba de primers para genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol	30
6.3. Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR	31
6.3.1. Determinación de controles endógenos	31
6.3.2. Cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad	32
6.4. Análisis de datos	32
6.4.1. Cuantificación relativa de acuerdo al método $2^{-\Delta Ct}$	32

6.4.2. Análisis estadístico	32
7. Resultados	33
7.1. Estandarización por PCR convencional	33
7.1.2. Estandarización de primers para genes candidatos de tolerancia a salinidad. 34	
7.2. Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR	34
7.2.1. Determinación de genes controles endógenos.....	34
7.2.2. Cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad	34
8. Discusión	36
9. Conclusiones	42
10. Recomendaciones	43
11. Bibliografía	44
12. Tablas	50
13. Figuras	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación de los genes que posiblemente van a ser utilizados como controles endógenos.	49
Tabla 2. Lista de DETs estudiados con su homología y perfil de expresión en el despliegue diferencial.	50
Tabla 3. Primers diseñados para la amplificación de genes candidatos de tolerancia a estrés salino en tomate de árbol.	51
Tabla 4. Primers diseñados para la amplificación de los genes candidatos de tolerancia a partir de las secuencias obtenidas en el despliegue diferencial.	52
Tabla 5. Estandarización de los genes candidatos a control endógeno en respuesta a salinidad en tomate de árbol.	53
Tabla 6. Estandarización de los primers para los genes candidatos de tolerancia a la salinidad en tomate de árbol.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluorescencia en el RT-qPCR	55
Figura 2. Amplificación del gen RPL8	56
Figura 3. Análisis de estabilidad de los genes controles endógenos por el software geNorm	57
Figura 4. Perfil de expresión de 4 DETs candidatos de tolerancia a salinidad.....	58

1. Introducción

1.1. Efectos de la salinidad en la agricultura

El estrés abiótico es la principal causa de pérdida de cultivos a nivel mundial, reduciendo en promedio más del 50% del rendimiento de los cultivos más importantes (Wang et al., 2003). El estrés abiótico comprende un amplio rango de factores ambientales que pueden afectar el correcto desarrollo de una planta, incluyendo la sequía, exceso de salinidad, temperaturas extremas, presencia de compuestos tóxicos, estrés oxidativo, entre otros. Los dos factores de mayor importancia dentro de este grupo son la sequía y la salinidad (Munns & Tester, 2008). Estos dos factores se han extendido ampliamente en los últimos años debido al cambio climático y se prevé que para el año 2050 cerca del 50% de la tierra destinada para la agricultura esté afectada por un nivel elevado salinidad (Wang et al., 2003).

La salinidad es una condición del suelo caracterizada por una alta concentración de sales solubles. Un suelo es considerado salino cuando su conductividad eléctrica (EC_e) es de 4 deciSiemens por metro (dS/m) o más, lo cual equivale aproximadamente a 40mM NaCl en el suelo y genera una presión osmótica de 0.2MPa (Munns & Tester, 2008). La mayoría de cereales y vegetales son altamente susceptibles a la salinidad del suelo aun cuando la EC_e es menor a 4 dS/m. No obstante, existen diferentes umbrales de tolerancia y diferentes efectos en la reducción del rendimiento, lo cual indica variaciones en los mecanismos de tolerancia a estrés salino dentro y entre diferentes especies (Chinnusamy et al., 2005).

Cerca de 800 millones de hectáreas de tierra alrededor del mundo están afectadas por la salinidad. La mayoría de esta sal se ha acumulado por razones naturales a lo largo del tiempo. Sin embargo, una porción significativa de suelos agrícolas a nivel global se han vuelto salinos debido a actividades humanas como el arado y la irrigación. Estas dos actividades generan un aumento en los niveles del agua en el suelo. Este incremento de agua

solubiliza las sales en la superficie del suelo, lavándolas y filtrándolas hasta la zona radicular, donde estas se acumulan (Munns, 2002). De los 1500 millones de hectáreas de tierra cultivada, 32 millones, es decir el 2%, están afectadas por una alta salinidad. Así mismo, cerca de un tercio de la tierra irrigada a nivel mundial está afectada por la salinidad (Connor et al., 2012). La tierra irrigada constituye apenas el 15% del área cultivada pero es el doble de productiva y es la responsable de producir un tercio de los alimentos a nivel mundial (Munns & Tester, 2008).

El impacto de la salinización de los suelos en la agricultura es elevado ya que conlleva una reducción de la salud del suelo, y por tanto del rendimiento de los cultivos. Además, los agricultores deben aumentar los insumos aplicados al campo (incluyendo semillas, agua y fertilizantes) con el fin de contrarrestar los efectos negativos de la salinidad, lo cual implica una menor sostenibilidad ambiental. Otros problemas de la salinización de los suelos incluyen un uso menos eficiente del agua y la migración hacia otros cultivos que tienen mayor tolerancia a la salinidad pero que usualmente son de menor beneficio económico. Todo esto se traduce en menores ganancias para los agricultores y una disminución de su calidad de vida (FAO, 2016).

1.2. Efectos fisiológicos de la salinidad en las plantas

El estrés salino y la sequía afectan virtualmente todos los aspectos de la fisiología y metabolismo de la planta (Zhu, 2002). Los efectos negativos de la salinidad en el crecimiento de las plantas se deben principalmente al estrés osmótico y a la citotoxicidad causada por los iones que componen las sales (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) (Chinnusamy et al., 2005).

Las plantas sienten tanto el estrés iónico como el estrés osmótico causado por altos niveles de Na^+ . El exceso de cationes de sodio en el entorno vegetal se detecta en la superficie de la membrana celular por proteínas transmembranales de canal, o en el

citoplasma por proteínas de membrana o enzimas sensibles a Na^+ . La entrada de sodio por canales transmembranales o por canales no específicos bajo salinidad causan la despolarización de la membrana, lo cual genera oscilaciones de Ca^{2+} y señala estrés salino (Chinnusamy et al., 2005). Esto corresponde a la primera fase efectora, la cual comienza inmediatamente después de que la concentración de sal alrededor de las raíces sobrepasa el umbral de tolerancia. En esta etapa, la capacidad de absorción de agua del sistema radicular disminuye y la pérdida de agua de las hojas se acelera. El cambio fisiológico más dramático en la planta es el cierre de los estomas para regular la pérdida de agua, a cambio de la disminución en la captación de CO_2 . Además existen otros cambios fisiológicos de efecto detrimental para el crecimiento como la desestabilización de las membranas, desbalance de nutrientes, inhabilidad para detoxificar especies reactivas de oxígeno y pérdida de capacidad enzimática (Gupta & Huang, 2014). Durante este periodo el crecimiento de la planta disminuye dramáticamente: la tasa de crecimiento de las hojas se reduce, las hojas nuevas emergen más despacio y las yemas axilares se desarrollan lentamente o se quedan quiescentes (Munns & Tester, 2008).

Una segunda fase de acción de la salinidad en la planta empieza cuando la sal se acumula en niveles tóxicos en las hojas. La citotoxicidad es causada por el reemplazo de K^+ por Na^+ en reacciones bioquímicas y en la estructura de las proteínas. Los iones de Na^+ penetran la estructura de las proteínas e interfieren con las interacciones no-covalentes entre aminoácidos, lo cual causa la muerte sistemática de células foliares y finalmente la muerte de hojas (Zhu, 2002). Si la tasa a la que mueren las hojas es mayor que la tasa a la cual nuevas hojas son producidas, entonces la capacidad fotosintética de la planta no será suficiente para proveer los requerimientos de carbohidratos necesarios para los hojas jóvenes, lo cual termina por frenar el desarrollo de la planta (Munns & Tester, 2008).

1.3. Tolerancia a la salinidad en plantas

1.3.1. Cómo se define tolerancia a salinidad

La tolerancia a la salinidad usualmente se asocia con la habilidad inherente de una planta a soportar los efectos de una alta concentración de sales sin que esta afecte su crecimiento o rendimiento. Lunin y colaboradores (1963) propusieron dos reglas básicas para describir la tolerancia a la salinidad. Primero, la tolerancia de un cultivo a la salinidad va a variar de acuerdo a la etapa de crecimiento y segundo, los valores de tolerancia deben tomar en consideración la parte productiva de la planta: ya sea esta la flor, el fruto o tubérculos.

La tolerancia se mide en unidades de rendimiento en relación al nivel de salinidad del suelo. Este valor va a variar dependiendo no solo de la especie sino también del contexto cultural y económico que rodea a un cultivo. Un término que ayuda a entender esta capacidad es el umbral de tolerancia a salinidad de una planta. Este se define como la concentración de sal a la cual se empieza a observar disminución en el rendimiento productivo de una planta. Las plantas cuyo umbral de tolerancia aparece a mayores concentraciones son plantas capaces de crecer y producir a altas concentraciones de salinidad (Shanon et al., 1998).

La tolerancia a salinidad de un cultivo puede ser descrita graficando su rendimiento como una función continua frente a la salinidad del suelo. El rendimiento de cada planta va a depender de su parte productiva. Así, por ejemplo, hay muchas plantas que a ciertos valores de salinidad no desarrollan frutos por lo que su rendimiento es igual a cero (Tanji & Kielen, 2002). De acuerdo a la FAO, los cultivos altamente tolerantes pueden crecer a concentraciones de sal mayores a 10 g/L. Los moderadamente tolerantes a concentraciones mayores a 5g/L y las sensibles a menores de 2.5g/L (Brouwer et al., 1985).

En el caso del tomate de árbol, Jaramillo et al. (2014) determinaron que el umbral de tolerancia para esta planta es de 100mM NaCl en condiciones de cultivo in vitro. Por ende, las plantas de *S. betaceum* capaces de crecer a esta concentración de sal son consideradas tolerantes a la salinidad.

1.4. Mecanismos moleculares de tolerancia a estrés por salinidad

El mecanismo de tolerancia a la salinidad es un fenómeno complicado que involucra varias vías metabólicas. Muchas moléculas pequeñas como el calcio, glicina, betaína, prolina, especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido abscísico (ABA) están involucradas en la tolerancia a la salinidad. Todas estas moléculas participan en las cascadas de señalización que se encienden cuando la planta es sometida a estrés salino (Tuteja, 2007).

En general, se pueden clasificar a los mecanismos de tolerancia en tres categorías. La primera es la tolerancia a estrés osmótico, la segunda son los mecanismos de exclusión de Na⁺ de las células y por último los mecanismos de tolerancia propios de cada tejido (Munns & Tester, 2008).

El ácido abscísico (ABA) es una importante hormona vegetal que regula el crecimiento y desarrollo de la planta y que también participa en las respuestas a estrés abiótico. De hecho, es una molécula tan importante que las respuestas a estrés se clasifican en respuestas dependientes de ácido abscísico e independientes de ABA (Liu et al., 2013). En el 2001, Xion et al. reportaron que plantas mutantes de *Arabidopsis* deficientes de ABA tenían un menor rendimiento cuando se les exponía a salinidad. El estímulo causado por estrés salino induce la activación de genes que participan en la biosíntesis de ABA (Tuteja, 2007).

Los mutantes deficientes de ABA se han utilizado para delinear los factores de transcripción que componen las vías metabólicas de respuesta a estrés salino. Algunos genes que promueven la respuesta dependiente de ABA son los factores de transcripción bZIP, MYB y MYC. Por ejemplo, el promotor del gen *rd22*, un gen conocido por su papel en la respuesta a estrés salino, contiene motivos para la unión de MYB y MYC. Además de estos

factores de transcripción se conoce que una parte de la respuesta dependiente de ABA involucra cinasas dependientes de calcio (CDPKs) (Hasegawa et al., 2000).

La tolerancia a estrés salino no depende solamente de ABA, también existen vías metabólicas alternas que confieren esta característica. Estas vías están encabezadas por factores de transcripción de unión a elementos de respuesta de deshidratación (DRE). Existen dos familias de genes DRE: DREB1 y DREB2. La sobreexpresión en plantas transgénicas del gen *DREB1A* generó la activación de genes de respuesta a salinidad junto con una mayor tolerancia a estrés salino, deshidratación y congelación. Un efecto similar se alcanzó con la sobreexpresión del gen *DREB1B* en plantas de *Arabidopsis* (Hasegawa et al, 2000).

Todos estos genes controlan la respuesta a estrés salino y activan los diversos mecanismos fisiológicos que tienen las plantas para tolerar altas concentraciones de sal.

1.5. Especie de estudio: Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*)

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es una planta nativa de la región Andina, su centro de origen parece ser el sur de Bolivia, aunque su domesticación se realizó en Ecuador y el norte del Perú. Este frutal se encuentra de forma natural en casi toda América del Sur, aunque su producción se concentra en la región andina y en Nueva Zelanda. En el Ecuador se cultivan más de 15 000 ha de tomate de árbol, la provincia que más produce tomate de árbol es Tungurahua con 8300 ha, seguida por Imbabura que cultiva cerca de 900 ha (Ramírez, 2009).

En el Ecuador el tomate de árbol se siembra durante todo el año a una altitud de 1500 a 2600 msnm. Normalmente crece a temperaturas entre 13-24°C y con una precipitación anual de 500 a 1500mm (Revelo et al., 2011). En el país no existe una clasificación detallada de los genotipos de tomate de árbol cultivados y los cultivares más reconocidos son “Rojo

Puntón” y el “Negro Silvestre Lojano”. En términos comerciales se toma en cuenta el color de la cascara y de la pulpa para determinar cultivares (Revelo et al., 2005).

La producción de tomate de árbol es bastante atractiva pues su consumo ha aumentado en los últimos años así como su exportación (Ramírez, 2009). Esto se debe a las características físicas, nutricionales y organolépticas que presenta el fruto (Feican et al., 1999). Las más importantes son un alto contenido de vitaminas A y C y antioxidantes en el fruto. Además de estas características, la fruta es económicamente muy rentable pues se la puede utilizar para hacer jugos, mermeladas, dulces y platos típicos (Revelo et al., 2005).

Adicionalmente, la especie parece ser resistente al estrés causado por alta salinidad. *S. betaceum* es cultivado en suelos marginales con altos contenidos piroclásticos (Feican et al., 1999) y recientes estudios *in vitro* demostraron la habilidad de la planta para crecer a una concentración de 100mM de sal (Jaramillo et al., 2014). A medida que el estrés salino gana relevancia en la agricultura mundial, el tomate de árbol representa un recurso atractivo para estudiar los mecanismos genéticos detrás de la adaptabilidad de este cultivo a suelos marginales (Golldack, 2014).

1.6. Técnica molecular utilizada en el estudio: RT-qPCR.

El análisis de la expresión génica es una estrategia cada vez más importante en el entendimiento de rutas metabólicas y procesos complejos de señalización en seres vivos. Una aplicación interesante es el estudio de los patrones de expresión génica frente a diferentes estímulos con la finalidad de descifrar los mecanismos genético-fisiológicos que activan los organismos como respuesta a tales estímulos. Su comprensión viabilizaría su manipulación y ampliaría las posibilidades de dotar a los organismos con opciones de enfrentar de mejor manera los efectos, en muchos casos nocivos, de factores bióticos y abióticos. Por tanto son especialmente útiles para potenciar programas de mejoramiento (Remans et al., 2008).

Se han desarrollado algunas técnicas para analizar la expresión de genes, entre ellas el “Northern Blot”, el ensayo de protección de ribonucleasas, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Real Time PCR*, RT-PCR), microchips de ADN y PCR cuantitativo en tiempo real o RT-qPCR (*Real Time quantitative PCR*) (Narsai et al., 2010). De todas estas técnicas los microchips de ADN y el RT-qPCR son las más aplicables y las mejores para medir la expresión génica pues exhiben resultados más confiables. Además, el RT-qPCR provee una medida simultánea de la expresión de un gen en particular en diferentes muestras. Esta técnica es especialmente útil para evaluar la expresión de un número limitado de genes (Imai et al., 2013).

El RT-qPCR, puede detectar la amplificación del ADN a medida que esta ocurre, es decir, en tiempo real. Esto es posible por la adición de una molécula fluorescente a la reacción, la cual se adhiere a las dobles hebras del ADN o puede actuar como una sonda de hibridación; por tanto el nivel de fluorescencia aumenta conforme se incrementa el producto de la amplificación. La cuantificación de la expresión génica por medio de PCR en tiempo real se basa en la determinación del número de ciclos necesarios para alcanzar un umbral de fluorescencia (Ct), lo cual depende de la cantidad inicial de material genético presente en la mezcla de la reacción (Figura 1). De esta manera, entre mayor número de copias se encuentren al principio, requerirá menor número de ciclos para llegar al umbral de fluorescencia (Guénin et al., 2009).

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. En la cuantificación absoluta el objetivo es determinar de manera precisa el número de copias presentes en una determinada célula. Sin embargo, para este tipo de cuantificación es necesario conocer la cantidad exacta de células o mRNAs que se tiene al inicio de la reacción. Por otro lado, en la cuantificación relativa se cuantifica la expresión de una secuencia particular mediante la comparación entre la muestra de interés y una muestra establecida como control; esto se conoce como

normalización de la reacción. Típicamente la normalización para la cuantificación relativa se consigue al utilizar genes que sirvan como controles endógenos. Estos son genes cuya expresión no varía entre la muestra a estudiarse y el control utilizado (Guénin et al., 2009). Generalmente, los llamados “housekeeping genes” o genes constitutivos eran utilizados como controles endógenos pues se pensaba que su expresión no variaba entre distintas condiciones experimentales. No obstante, se descubrió que la expresión de algunos de estos genes constitutivos sí varía en condiciones experimentales distintas (Expósito-Rodríguez et al., 2008). Por esta razón es fundamental para la correcta normalización del RT-qPCR escoger como controles endógenos a genes cuya expresión varíe lo menos posible en distintas condiciones experimentales (Imai et al., 2013).

El uso de RT-qPCR en plantas es cada vez más generalizado y se puede utilizar para identificar y medir la expresión de genes que participan en la respuesta a estrés abiótico. Esta técnica permite analizar los diferentes patrones de expresión que existen entre variedades. De esta manera, se puede contrastar los niveles de expresión obtenidos para un determinado gen en dos variedades distintas y así determinar su expresión en diferentes condiciones.

En este estudio se identifican genes candidatos de tolerancia a estrés salino en tomate de árbol comparando un genotipo tolerante con uno sensible. Para esto, primero se estandarizó la técnica de RT-qPCR en este cultivo mediante la selección de controles endógenos apropiados. Con esto fue posible identificar y caracterizar el patrón de expresión de genes candidatos de tolerancia a salinidad. Además con los resultados obtenidos se validó el patrón de expresión predicho por Jaramillo (2103) en el despliegue diferencial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Cuantificar la expresión de genes de candidatos de tolerancia a estrés salino en tomate de árbol.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de RT-qPCR en tomate de árbol.
- Identificar genes que sirvan como control endógeno para la cuantificación relativa mediante RT-qPCR, de genes de tolerancia a salinidad en tomate de árbol.
- Cuantificar la expresión de genes candidatos de tolerancia a estrés en tomate de árbol expuesto a estrés salino, previamente determinados por Jaramillo et al., 2014.
- Validar los patrones de expresión obtenidos en la tesis de despliegue diferencial de genes en tomate de árbol en respuesta a estrés salino.

3. Área de estudio

El material vegetal utilizado provino de las localidades de Chaltura en la provincia de Imbabura y de Quero en la provincial de Tunghuragua. Los análisis moleculares de amplificación se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. El análisis por RT-qPCR se realizó en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

4. Justificación

Uno de los campos con mayor desarrollo dentro de la biotecnología de plantas es la identificación de mecanismos genéticos y fisiológicos que confieran a una planta tolerancia al estrés salino. El estrés salino afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas. Cerca del 20% de todas las áreas cultivadas del mundo y la mitad de las tierras irrigadas son afectadas por salinidad. Procesos como la germinación, crecimiento de la semilla y de la plántula,

florecimiento y desarrollo del fruto se ven afectados por altas concentraciones de sal, disminuyendo la calidad de la producción y las ganancias económicas (Sairam & Tyagi, 2004).

En el Ecuador se cultivan 14 748 ha de tomate de árbol, la provincia que más produce tomate de árbol es Tungurahua con 8300 ha, seguida por Imbabura que cultiva 883ha. Este es un cultivo económicamente importante para el país y debido a sus características organolépticas y alto contenido de vitamina C posee un gran potencial de exportación. Como prueba de esto, en el 2008 el Ecuador exportó 1.3 millones de dólares en tomate de árbol a Estados Unidos (Ramírez, 2009).

El tomate de árbol crece en el callejón interandino, zona que se caracteriza porque gran parte de los suelos están afectados por salinidad debido al mal uso del agua de riego y a su naturaleza piroclástica (Barriga, 2013). Algunos cultivos andinos marginales, como el tomate de árbol, tienen el potencial de elucidar nuevos mecanismos de tolerancia al estrés. Sumado a esto el tomate de árbol parece presentar tolerancia a la salinidad y por ende, promete ser de gran utilidad para validar o describir mecanismos de tolerancia..

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito se ha trabajado en la identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés salino en tomate de árbol utilizando la técnica de despliegue diferencial. Como resultado de esta investigación se determinó que el tomate de árbol es una especie potencialmente tolerante a salinidad según los parámetros de la FAO y se encontraron genes candidatos de tolerancia a estrés salino (Jaramillo, 2013).

Una de las primeras metodologías desarrolladas para el estudio de la expresión génica fue el despliegue diferencial. Esta técnica permite la detección rápida y sensible de un gran número de segmentos del transcriptoma que posteriormente podían ser clonados para

estudiarlos según su patrón de expresión. Sin embargo, una de las grandes debilidades de utilizar la técnica de despliegue diferencial es la posibilidad de obtener falsos positivos. Por esta razón se propone utilizar la técnica de RT-qPCR, la cual permitirá validar los resultados obtenidos en la anterior investigación. Además, se podrán caracterizar con mayor detalle algunos de los genes identificados y realizar una cuantificación de su expresión frente a estrés salino y en ausencia de este. De esta manera se confirmará si los genes obtenidos están involucrados en la respuesta de la planta al estrés salino. Los resultados obtenidos permitirán analizar si los genes identificados son de utilidad para realizar programas de mejoramiento genético en esta especie.

En el estudio previo se encontró que plantas de tomate de árbol de la localidad de Chaltura en la provincia de Imbabura son capaces de crecer a una concentración de 100mM de sal lo cual las convierte en moderadamente tolerantes a la salinidad según la clasificación de la FAO (Brouwer et al., 1985) Los resultados de esta investigación permitirían dar un paso más hacia adelante para trabajar con esta población en el desarrollo de cultivares tolerantes a salinidad ya sea por mejoramiento convencional o ingeniería genética. Este proyecto es pionero en esta línea de investigación en nuestro país y es también el primero en estudiar la expresión génica en tomate de árbol.

5. Materiales

5.1. Prueba de primers en PCR convencional

5.1.1. Extracción y cuantificación de ARN de hojas de tomate de árbol

- 200 mg de hojas de tomate de árbol procedentes del cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad San Francisco de Quito

- Dietil Pirocarbonato (DEPC) Sigma AldrichTM al 0.1%
- Trizol Reagent InvitrogenTM
- Cloroformo 37% MerckTM
- Isopropanol MerckTM
- Buffer citrato (0.8M citrato monosódico MerckTM, 1.3M NaCl Fisher ScientificTM, agua tratada con DEPC InvitrogenTM)
- Solución de etanol absoluto J.T. BakerTM al 75%
- Agua tratada con DEPC InvitrogenTM
- Tubos Eppendorf tratados con DEPC
- Morteros lavados con DEPC y autoclavados
- Pinza y bisturí lavados con DEPC y autoclavados
- Microcentrífuga 5415R EppendorfTM

5.1.2. Retrotranscripción de ARN de hojas de tomate de árbol

- 0.2 μ M dNTPs (Invitrogen)
- 0.5 μ M primer Not-ID
- 1 ng/ μ L ARN de hojas de tomate de árbol
- Buffer 1x (Invitrogen)
- DTT 1x (Invitrogen)
- 1uL de Superscript Retrotranscriptasa
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0.2mL

5.1.3. Amplificación de primers para genes que servirán como controles endógenos de RT-qPCR

- 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 1X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 0.2 mM dNTPs (Invitrogen)

- 0.5M Primer F (ATUB, ACT, TIP41, SAND, GADPH, RPL8, UBI, EF1)
(Invitrogen)
- 0.5uM Primer R (ATUB, ACT, TIP41, SAND, GADPH, RPL8, UBI, EF1)
(Invitrogen)
- 1U Taq polimerasa (Invitrogen)
- 20ng cDNA de tomate de árbol
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0.2ml

5.1.4. Diseño de primers para transcritos expresados diferencialmente (*Differentially expressed transcripts, DETs*)

- Software OligoCalc (Kibbe, 2007)
- Software Primer 3 (Untergasser, 2012)

5.1.5. Amplificación de primers para genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol.

- 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 1X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 0.2 mM dNTPs (Invitrogen)
- 0.5M Primer F (ARG, CH4, MEP, ZEP, ADP, OEE1, PSBO, PLPC, TSI 1)
(Invitrogen)
- 0.5uM Primer R (ARG, CH4, MEP, ZEP, ADP, OEE1, PSBO, PLPC, TSI 1)
(Invitrogen)
- 1U Taq polimerasa (Invitrogen)
- 20ng cDNA de hojas de tomate de árbol con y sin exposición a la salinidad procedentes de la localidad de Chaltura y de Quero.
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0.2ml

5.2. Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR

- 1x SsoFast EvaGreen SuperMix (BioRad)
- 0.3uM Primer F (ARG, CH4, MEP, OEE1) (Invitrogen)
- 0.3 uM Primer R (ARG, CH4, MEP, OEE1) (Invitrogen)
- Agua PCR
- 100ng/uL cDNA
- Sistema de PCR Real Time (BioRad)

5.2.1. Determinación de controles endógenos

- 1x SsoFast EvaGreen SuperMix (BioRad)
- 0.3uM Primer F (ACT, ATUB, RPL8, TIP41, UBI) (Invitrogen)
- 0.3 uM Primer R (ACT, ATUB, RPL8, TIP41, UBI) (Invitrogen)
- Agua PCR
- 100ng/uL cDNA
- Sistema de PCR Real Time (BioRad)
- Software geNorm (Vandesompele et al., 2002)

5.3. Análisis de datos

5.3.1. Análisis estadístico

- Software R-Studio (RStudio Team, 2015)

6. Métodos

6.1. Diseño experimental

Se estudiaron 9 genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol identificados mediante despliegue diferencial por Jaramillo (2013). El primer paso consistió en el diseño de primers a partir de las secuencias obtenidas en el despliegue diferencial. A

este paso le siguió uno de estandarización de los primers diseñados mediante PCR convencional. Para la caracterización de los 9 genes candidatos se evaluó su expresión en individuos tolerantes a la salinidad provenientes de Chaltura (Imbabura, Ecuador) e individuos sensibles de Quero (Tungurahua, Ecuador). Estos dos genotipos se utilizaron con la finalidad de contrastar el patrón de expresión en respuesta a la salinidad de los genes candidatos. La expresión se midió a las 3 horas para evaluar la respuesta temprana de la planta a la salinidad. La metodología utilizada para la cuantificación fue el RT-qPCR. Previo a la cuantificación fue necesario estandarizar la técnica y para ello se probaron seis genes que servirían como controles endógenos.

Con el fin de caracterizar el patrón de expresión se utilizó el ARN de las plantas in vitro de tomate de árbol a condiciones de 100mM de NaCl (tratamiento) y sin salinidad (control). El ARN utilizado fue extraído a las 3 horas, ya que se deseaba estudiar la respuesta temprana a la salinidad. A las plantas de ambos genotipos se las sometió a las mismas condiciones de tratamiento y control. El único control experimental utilizado en este estudio fue el de las plantas no sometidas a salinidad. Por esta razón, ninguno de los genotipos estudiados se utilizó como control, puesto que el objetivo del estudio fue encontrar diferencias entre el patrón de expresión de ambas variedades cuando existía exposición a salinidad. Como se describió anteriormente, Jaramillo (2013) encontró que el umbral de tolerancia para el genotipo de Chaltura es 100mM de NaCl. Por ello se utilizó esta concentración para el tratamiento.

Finalmente, el patrón de expresión observado en el RT-qPCR se contrastó con el obtenido en el despliegue diferencial. Los resultados de este estudio fueron validados con una prueba T pareada.

6.2. Prueba de primers en PCR convencional

6.2.1. Extracción y cuantificación de ARN de hojas de tomate de árbol

Para la estandarización de todos los primers se extrajo ARN de hojas de tomate de árbol. Se siguió el protocolo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Jaramillo, 2013). Primero, se colocaron 100mg de material vegetal en un mortero y se molió la muestra con nitrógeno líquido hasta obtener polvo. A esta muestra se le agregó trizol y se incubó en hielo por 20 minutos. El sobrenadante se rescató en un nuevo tubo eppendorf y se colocaron 240uL de cloroformo. Después se volvió a incubar en hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12mil rpm a 4°C. El sobrenadante se volvió a descartar en un nuevo tubo eppendorf y se procedió a colocar buffer citrato a 4°C. Se colocaron 500uL de isopropanol y esto se incubó 10 minutos en hielo. Nuevamente se centrifugó por 15 minutos a 12 mil rpm a 4°C. En este punto se eliminó el sobrenadante con la pipeta y se colocaron 1.2 mL de etanol al 75% para resuspender el pellet. Se volvió a centrifugar, esta vez 5 minutos a 7200 rmp, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 uL de TE.

6.2.2. Retrotranscripción de ARN de tomate de árbol

La retrotranscripción se realizó utilizando el primer no específico Not-ID. Se utilizó dNTPs 0.2 μ M, primer 0,5 μ M y 1ng/ul de RNA en un volumen final de 14 μ L, para una preamplificación a 65°C por 10 minutos. Después se realizó la retrotranscripción añadiendo Buffer 1x, DTT1x y 1u de superscript retrotranscriptasa en un volumen final de 6uL. El ciclado correspondiente es de 37°C por 1 hora y 70°C por 15 minutos.

6.2.3. Prueba de primers para genes que servirán como controles endógenos de RT-qPCR

Ya que este fue un estudio pionero en la expresión genética del tomate de árbol; primero fue necesario determinar genes que funcionaran como controles endógenos para el experimento. Para esto se buscó en la literatura genes que funcionan como controles endógenos en ensayos de estrés abiótico. De la literatura existente sobre estudios de RT-

qPCR en tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) y papa (*Solanum tuberosum*) (Expósito-Rodríguez et al., 2008; Macsía et al., 2010), se eligieron primers para 8 genes constitutivos: gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GADPH), factor de elongación 1-alfa (EF α 1), proteína ribosomal L8 (RPL8), alfa tubulina (α TUB), proteína de la familia TIP4-I (TIP4I), proteína de la familia SAND (SAND), actina (ACT), ubiquitina (UBI) y que han sido usados como controles endógenos en los estudios mencionados. Las secuencias de estos primers se encuentran en la Tabla 1.

Se realizó la amplificación de los 8 genes en un volumen final de reacción de 25 μ L que contenía 1x de Buffer y Cloruro de Magnesio, 0.5 μ M de primer forward y reverse, 0.2 mM de dNTPs y 1U de Taq DNA Polimerasa de Invitrogen. Para esta reacción se utilizó como control positivo ARN de tomate riñón para el cual los primers se habían diseñado originalmente. De los ocho genes, tres no pudieron amplificarse en el tomate de árbol estos fueron GADPH, SAND y EF α 1.

6.2.4. Diseño de primers para transcritos expresados diferencialmente

(Differentially expressed transcripts, DETs).

Del estudio de Jaramillo (2013) se obtuvieron 171 secuencias con expresión diferencial o transcritos expresados diferencialmente (DET s). De ellos se escogieron 9 para realizar el presente estudio, los cuales corresponden a 9 DET s con homología a genes codificantes relacionados con estrés abiótico. En la Tabla 2 se detalla el nombre de los genes, el porcentaje de homología con la secuencia y su accesión correspondiente en el genBank. La selección de los genes se realizó en base a su asociación con estrés salino reportado en la literatura. Para cada uno de los genes se buscaron reportes que los vincularan a la respuesta a salinidad en plantas.

Para el diseño de primers específicos para los genes potencialmente relacionados con tolerancia a estrés por salinidad en el tomate de árbol, se utilizó dos estrategias que se detallan a continuación.

a. Diseño de primers específicos. En la investigación de identificación de genes candidatos de tolerancia a salinidad por despliegue diferencial en el tomate de árbol se encontraron 28 secuencias que presentaban homología con genes que codifican para proteínas (Jaramillo, 2013). De estas 28 secuencias se tomaron las 9 que pertenecían a los genes de interés ya descritos y en base a estas secuencias se diseñaron primers utilizando los programas Primer3, OlygoCalc y OlygoAnalyzer. A estos primers se los llamó “primers específicos” (Tabla 3).

b. Diseño de primers consenso. Para el diseño de los “primers consenso” se tomaron del GenBank las secuencias codificantes de los genes homólogos en tomate riñón y papa de cada uno de los ocho genes de interés identificados en el tomate de árbol y mencionados anteriormente. Las secuencias de papa y tomate riñón se alinearon y se buscaron regiones conservadas en ellas. Los primers sintetizados fueron diseñados para amplificar estas regiones. Para el diseño de los primers se usaron los programas: ClustalW, Primer3, OlygoCalc y OlygoAnalyzer (Tabla 3).

6.2.5. Prueba de primers para genes candidatos de tolerancia a salinidad en tomate de árbol

Se realizó la amplificación de los 9 DETs en un volumen final de reacción de 25 μ L que contenía 1x de Buffer y Cloruro de Magnesio, 0.5 μ M de primer forward y reverse, 0.2 mM de dNTPs y 1U de Taq DNA Polimerasa de Invitrogen. Los resultados de la amplificación se revelaron en un gel de agarosa de 50mL al 1%. La secuencia de los primers para los 9 DETs se encuentra en la Tabla 4. Los primers donde la amplificación dio como resultado una única banda fueron tomados en cuenta para pasar a los ensayos de

cuantificación. Para aquellos donde existió la presencia de más bandas o inespecificidad se realizó un PCR gradiente. Las condiciones del PCR gradiente fueron las mismas excepto por la temperatura la cual se aumentó para conseguir eliminar la inespecificidad.

6.3 Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR

6.3.1 Determinación de controles endógenos

La determinación de los controles endógenos se realizó mediante la cuantificación y posterior análisis de estabilidad de estos genes frente a salinidad. Para esto se utilizó el ARN extraído por Jaramillo (2013) a las tres horas de exposición a la salinidad. Se cuantificó la expresión de cada uno de los genes a las tres horas bajo condiciones normales y de salinidad. Esto se hizo con el ARN de los individuos tolerantes de la localidad de Chaltura (Imbabura) así como con el ARN de los no tolerantes proveniente de la localidad de Quero (Tungurahua).

Los niveles de expresión de mRNA fueron evaluados utilizando un ensayo de EvaGreen con un sistema de PCR Real Time (BioRad). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en una reacción de 10µl que contenía 1x SsoFast™ EvaGreen® SuperMix (BioRad), 0.3µM de cada primer, 3.4µl de PCR agua y 100ng/µl cDNA. Las condiciones de ciclado fueron 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95° por 15 s y la temperatura de annealig por 1 min. Cada reacción se corrió por triplicado para tener reproducibilidad. El valor de threshold (Ct) o se determinó utilizando el software CFX Manager (Biorad).

Para la determinación de los genes con mayor estabilidad y que por lo tanto podían servir como controles endógenos se utilizó el software geNorm. Este software calcula en base al Ct los genes con mayor estabilidad en base a un valor M. Este valor resulta de una comparación pareada entre cada uno de los genes candidatos y revela el gen con la menor

variación en su expresión. El gen con el menor valor M se utiliza como gen control endógeno (Vandesompele et al., 2002).

6.3.2. Cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad

La cuantificación de los DETs se realizó con el mismo protocolo de PCR que para los genes candidatos a controles endógenos. Las reacciones de PCR se corrieron en muestras de los individuos tolerantes y no tolerantes, ambas expuestas a salinidad y en condiciones normales. Además se utilizó un control positivo de cDNA de tomate de árbol con el que se estandarizaron los primers. La cuantificación de cada DET se realizó por triplicado. Para verificar que solo se obtenga el amplicon deseado se realizó una curva de “melting” al final de cada reacción de PCR.

6.4. Análisis de datos

6.4.1. Cuantificación relativa de acuerdo al método $2^{-\Delta Ct}$

La cuantificación relativa de la expresión de los genes candidatos a tolerancia a salinidad se realizó mediante el método de $2^{-\Delta Ct}$ (Vandesompele et al., 2002). Este método consiste en la normalización de los valores de Ct obtenidos con respecto al control previamente establecido. En este caso la normalización se obtiene calculando la diferencia entre el Ct del gen candidato y del gen control endógeno ambos bajo tratamiento de salinidad y comparándola con la diferencia entre el Ct del gen candidato y del gen control endógeno bajo tratamientos normales. Ese valor corresponde a $\Delta\Delta Ct$ y para obtener la expresión del gen es necesario utilizar este valor negativo como exponente. Al realizar de esta forma la cuantificación relativa, se obtiene la expresión de los genes candidatos de tolerancia en relación a las dos variedades. Es decir que se obtiene la expresión de un gen en la variedad tolerante en comparación a como se expresa el mismo gen en la variedad no tolerante.

6.4.2. Análisis estadístico

Finalmente, para confirmar que los resultados obtenidos eran significativos se realizó una prueba T para comparar los Ct promedio obtenidos para cada gen en los individuos tolerantes y en los no tolerantes. De esta manera, se pretendió afirmar si existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la expresión de cada uno de los DETs en los individuos tolerantes y en los sensibles a salinidad. Para el cálculo de la prueba T, se utilizó el paquete estadístico R.

7. Resultados

7.1. Estandarización por PCR convencional

7.1.1. Genes candidatos para controles endógenos

Se probaron 8 genes como candidatos para ser controles endógenos debido a que en la literatura se reporta que estos genes varían mínimamente en su expresión bajo diferentes condiciones de estrés. Los genes probados fueron: gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GADPH), factor de elongación 1-alfa ($EF\alpha 1$), proteína ribosomal L8 (RPL8), alfa tubulina (αTUB), proteína de la familia TIP4-I (TIP4I), proteína de la familia SAND (SAND), actina (ACT) y ubiquitina (UBI). Los primers que se utilizaron para amplificar estos genes se enlistan en la Tabla 1. Estos primers fueron diseñados originalmente para tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) por lo cual se probaron en las dos especies. En el tomate riñón existió amplificación en todos los genes excepto para el gen SAND. Para el tomate de árbol, se observó una sola banda en cinco genes (ACT, Atub, TIP41, RPL8 y UBI), en uno existió la presencia de más de una banda (GADPH) y en dos no se observó amplificación ($EF\alpha 1$ y SAND). El gen GADPH no se tomó en cuenta para los ensayos de cuantificación pues la presencia de dos o más amplicones puede generar falsos positivos. Se realizaron tres replicas por cada gen candidato, de cada una se tomó el valor Ct y se calculó el promedio. Al

finalizar cada corrida se realizó una curva de “melting” para verificar la formación de un solo amplicón.

Con los cinco genes (ACT, Atub, TIP41, RPL8 y UBI) se realizaron gradientes para mejorar la eficiencia de la amplificación y eliminar cualquier inespecificidad. Para cada uno de los genes se escogió la temperatura de “melting” donde se observó la menor cantidad de inespecificidades y mayor claridad de la banda. La temperatura de “melting” establecida para cada gen se detalla en la Tabla 5.

7.1.2. Estandarización de primers para genes candidatos de tolerancia a salinidad.

Se diseñaron primers en base a las secuencias del despliegue diferencial para los DETs enlistados en la Tabla 2. La Tabla 6 resume la eficacia de las parejas de primers probadas, la temperatura de melting a la cual se determinó la mejor amplificación y si fueron seleccionados o no para el ensayo de cuantificación.

7.2. Ensayos de cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad por RT-qPCR

7.2.1. Determinación de genes controles endógenos.

La Figura 2 muestra los resultados de estabilidad de los cinco genes probados según el programa geNorm v.3. Los genes que presentaron la mayor estabilidad fueron RPL8 y TIP41, pues fueron los genes con el menor valor de M. El gen que presentó la menor estabilidad, en cambio, fue el de la α -tubulina (Figura 3). Para normalizar la cuantificación de los genes candidatos de tolerancia entonces se escogieron los genes RPL8 y TIP41.

7.2.2. Cuantificación de genes candidatos de tolerancia a la salinidad

Los DETs cuya expresión se cuantificó fueron DET#1, DET#2, DET#3 y DET#6. Para los DET #4, DET #5, DET #7, DET #8 y DET #9 no fue posible sintetizar primers que amplifiquen las secuencias deseadas. El perfil de expresión obtenido al normalizar con el control RPL8 se muestra en la Figura 4. El gráfico detalla los patrones de expresión del gen bajo análisis en condiciones control y condiciones de estrés en ambos individuos analizados, según el método de $2^{-\Delta Ct}$. A los datos se les aplicó una transformación logarítmica para apreciar de mejor manera el perfil de expresión. Al finalizar esta transformación se realizó una prueba *t*, para comprobar si las diferencias entre los patrones de expresión obtenidos en el control y el tratamiento eran estadísticamente significativas.

7.3. Validación de los resultados frente al despliegue diferencial

Finalmente, se comparó el perfil de expresión obtenido en el RT-qPCR con los resultados del despliegue diferencial para verificar los resultados obtenidos por Jaramillo (2013). En general, solo fue posible validar la expresión de 4 de los 8 DETs seleccionados pues solo para estas cuatro secuencias se consiguió diseñar primers cuya amplificación fue exitosa. Para los 4 genes candidatos la homología encontrada se presenta en la Tabla 2 y los patrones de expresión son los siguientes:

En el despliegue diferencial, DET #1, se identificó como sobreexpresado en plantas expuestas a la salinidad del genotipo potencialmente tolerante después de 3 horas de tratamiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en el RT-qPCR no mostraron diferencias significativas en la expresión de este gen para plantas expuestas a salinidad y control en ninguno de los genotipos (Figura 4).

DET #2 también mostró sobreexpresión en el despliegue diferencial, en plantas expuestas a la salinidad del genotipo potencialmente tolerante después de 3 horas de tratamiento. El patrón de expresión obtenido para este gen en el RT-qPCR no concordó con

lo observado en el despliegue diferencial. En el análisis por RT-qPCR se encontró que el transcrito estaba sub expresado en las plantas expuestas a estrés y en el control para el genotipo tolerante. Pero las plantas control mostraron una disminución aún más marcada en la expresión. Para el genotipo sensible a salinidad, DET #2 también estaba subexpresado en ambas condiciones pero en este caso no existió diferencia significativa entre tratamiento y control.

DET#3 en el despliegue diferencial estuvo subexpresado en el genotipo tolerante después de 3 horas de exposición a la salinidad. Este resultado fue confirmado por el RT-qPCR.

Finalmente, en el despliegue diferencial DET #21 mostró subexpresión en las plantas expuestas a salinidad de ambos genotipos después de 24 horas de tratamiento. Los análisis en RT-qPCR confirmaron esta tendencia en el genotipo tolerante, pero no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento y el control en el genotipo sensible a la salinidad.

8. Discusión

El tomate de árbol es un fruto andino que ha demostrado capacidad para crecer en suelos con condiciones marginales (Feican, 1999; Jaramillo 2013). Esto lo convierte en un cultivo muy interesante para el estudio de los mecanismos responsables de su adaptabilidad a ambientes marginales. El entendimiento de estos mecanismos, especialmente de la tolerancia a salinidad, puede ayudar a mejorar la productividad de este cultivo así como a encontrar nuevos alelos de interés. Este estudio consistió en una exploración inicial de los genes involucrados en la tolerancia a la salinidad en tomate de árbol.

Con este objeto se seleccionaron dos genotipos con capacidades contrastantes para tolerar altos niveles de salinidad de acuerdo a los criterios establecidos por la FAO (Brouwer et al.,

1985). El genotipo tolerante mostró crecimiento a una concentración de 100mM NaCl. En ambos, sus perfiles de expresión genética fueron comparados, mediante despliegue diferencial, en condiciones control (sin salinidad) y bajo tratamientos de salinidad (100 mM NaCl). Para validar los resultados del despliegue diferencial se utilizó RT-qPCR. Los resultados del PCR cuantitativo en tiempo real confirman el uso efectivo del despliegue diferencial como una técnica exploratoria para la identificación de genes candidatos en cultivos huérfanos (Jayaraman et al., 2008).

No se debe dejar de lado la importancia que tiene estudiar los mecanismos de tolerancia que existen en cultivos marginales como el tomate de árbol. A pesar de que este no es un cultivo de interés económico fuera de la región andina. Al haberse originado en esta región y al estar cercanamente emparentado con cultivos de interés mundial como el tomate y la papa, cualquier avance que se logre en este tipo de cultivos marginales puede ser utilizado en el desarrollo de programas de mejoramiento de cultivos más importantes.

Uno de los pasos en el estudio de cultivos huérfanos es la estandarización de técnicas que permitan elucidar los mecanismos responsables de su adaptabilidad a condiciones marginales. Por esta razón, una parte muy importante de este estudio fue la estandarización de la técnica de RT-qPCR en tomate de árbol mediante la elección de genes que funcionen efectivamente como controles endógenos. Un control endógeno confiable debe presentar cambios mínimos en su expresión. Anteriormente se pensaba que los genes conocidos como “house keeping” eran los mejores controles endógenos (Dekkers et al., 2012). Sin embargo, en este estudio los genes “house keeping” de actina, tubulina y ubiquitina fueron los que presentaron una expresión menos estable, es decir que su expresión entre tratamientos tuvo la mayor variabilidad. Estos resultados coinciden con los de muchos otros estudios que han demostrado que, en plantas expuestas a condiciones de estrés, la expresión de estos genes varía ampliamente (Mascia et al., 2010; Dekkers et al., 2012; Hruz et al., 2011). Por esta

razón, en este estudio se seleccionaron tanto genes candidatos “house keeping” así como tres nuevas opciones: SAND, TIP41 y RPL8. La selección de estos genes se basó en los resultados obtenidos por Esposito-Rodriguez et al., (2008) y Mascia et al., (2010) quienes reportaron resultados exitosos en otras especies de *Solanum*.

Para la normalización de la expresión de genes en respuesta a salinidad en tomate de árbol se escogieron a los genes TIP41 y RPL8 como controles endógenos por presentar el menor valor M. Esto coincide con lo reportado en tomate riñón por Exposito-Rodriguez et al. (2011) y en *Arabidopsis* por Czechowski et al. (2005). Por el contrario, Remans et al. (2008) reporta que frente a altas concentraciones de metales en *Arabidopsis* el gen TIP41 muestra grandes variaciones en su expresión y que no debe ser usado como control endógeno. Por último, en un estudio realizado en viñedos, Reid et al. (2006) encontró que TIP41 se expresaba constantemente en muestras de pericarpio durante la primera temporada pero su expresión varió significativamente la siguiente temporada. Debido a esto, es ampliamente sugerido que para la cuantificación de la expresión genética primero se determinen los genes que servirán como controles endógenos. En el presente estudio, esto se realizó examinando la variación en la expresión cuando la planta era expuesta a estrés salino así como con el control. Sin embargo, para un mejor análisis se deben probar los genes en una mayor cantidad de tejidos y de tratamientos.

Para analizar el gen con la expresión más estable se utilizó el software geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Este algoritmo se basa en comparaciones pareadas entre todos los genes. Así la tasa de variación que existe para una pareja refleja que al menos uno de los genes no está constantemente expresado. Como resultado se obtiene un valor M, el cual refleja la variabilidad en la expresión de un determinado gen. La ventaja principal de este método es que permite controlar variaciones en la cantidad de cDNA inicial, porque oscilaciones de este tipo van a afectar a los dos genes por igual. Ya que este método

se basa en una comparación pareada existe una relación proporcional entre el número de genes candidatos a ser validados y el valor M de los genes más estables (Vandesompele et al., 2002).

Para la validación de los resultados del despliegue diferencial se seleccionaron 9 genes candidatos, buscando entre todo el set de DETs aquellos que presentaban homología con genes relacionados con fotosíntesis, metabolismo de la pared celular y respuesta a estrés. Se conoce que la tolerancia a salinidad se da por dos mecanismos principales: primero, los mecanismos de respuesta al estrés dependientes e independientes de ácido abscísico (ABA) y segundo, por modificaciones en la estructura de la pared celular para poder hacer frente a la pérdida de turgor que genera la alta concentración de sal (Munns & Tester, 2008). Un tercer componente importante de la tolerancia es el rendimiento de la planta que se traduce en su capacidad de hacer fotosíntesis (Gupta et al., 2013).

Así los genes AGP (DET #1), CH4 (DET #2), MEP (DET #3), PLPC (DET #8) se seleccionaron por su relación con la pared celular. Los genes PSBO (DET #5) y OEE1 (DET #6) por su papel en el reclutamiento de especies reactivas de oxígeno (ROS) como mecanismo de respuesta a estrés independiente de ABA. Los genes ZEP (DET #4) y TSI-1 (DET #7) por su relación con mecanismos de respuesta a estrés dependientes de ABA. Finalmente, el gen ADP (DET #9) por su relación con la fotosíntesis. Hay que mencionar, que uno de los principales mecanismos que mantiene la fotosíntesis estable durante el estrés salino es la captura de ROS y debido a que ambos genes OEE1 y PSBO se encuentran en los fotosistemas entonces estos genes también están relacionados con la fotosíntesis.

Debido a la falta de un genoma de referencia no fue posible diseñar primers eficaces para la amplificación de los genes candidatos: PLPC, PSBO, ZEP, ADP y TSI-1 y por ende tampoco fue posible realizar su cuantificación. De los cuatro genes para los cuales se pudo

realizar la cuantificación de su expresión: tres estaban relacionados con pared celular (CH4, MEP, AGP) y uno con fotosíntesis (OEE1). De estos el único gen cuyo patrón de expresión no coincidió con el obtenido en el despliegue diferencial fue el CH4. Para este gen en RT-qPCR se obtuvo que existe subexpresión mientras que el resultado del despliegue diferencial fue sobreexpresión. Sin embargo, como se observa en la Figura 4, este gen tiene una mayor expresión en comparación con el control sin sal. El gen CH4 codifica la enzima cinamato 4-hidroxilasa, la cual participa en el segundo paso de la producción de lignina en la vía de los fenilpropanoides. No obstante, no se ha podido encontrar una relación clara entre su expresión y la tolerancia a salinidad. Aunque en algunos estudios se especula que puede servir como precursor del ABA (Saito et al., 2004).

Los otros dos genes relacionados con pared celular fueron MEP (metil esterasa de pectina) y AGP (proteína arabino galactan). La función de MEP ha sido relacionada con pared celular pero tampoco se le ha podido encontrar una relación con su función y la tolerancia a salinidad. Se conoce bien que las pectinas son un componente importante de la pared celular secundaria de la planta y que funcionan como uno de los últimos componentes de unión de esta matriz. En un estudio realizado en Arroz por Walia et al. (2005), se encontró que un inhibidor de pectinas estaba siendo inducido bajo presencia de salinidad en una variedad tolerante. Por lo que podemos especular que el metabolismo de pectinas se detiene bajo salinidad. Por otro lado, Lamport et al. (2005) reportaron que en presencia de estrés salino las proteínas arabinogalactan periplásmicas se sobreexpresan, de esta manera confirmando los resultados obtenidos. Se cree que estas proteínas participan en el crecimiento celular mediante la elongación de la pared celular (Lamport et al., 2005).

Como se observa no existe una tendencia en cuanto a la expresión de los genes relacionados con pared celular. Esto se debe a que la pared celular es uno de los componentes celulares de mayor complejidad donde existen familias de genes que se sobreexpresan

mientras otras dejan de expresarse (Walia et al., 2005). Una de las pocas tendencias que existe en relación con la pared celular de plantas es la sobreexpresión de la vía de los fenilpropanoides. Esto debido a que mediante esta vía se genera los flavonoides, metabolitos secundarios que participan en la defensa frente al estrés. Esto coincide con el hecho de que frente a salinidad el gen CH4 aumenta su expresión con respecto al control sin salinidad. Se ha reportado que frente a condiciones de estrés osmótico y relacionado con frío, aumenta la deposición de lignina en la pared celular (Akula et al., 2011). Así también, se ha observado que existe un incremento en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de lignina durante las fases intermedias y finales de la exposición a estrés (Moura et al., 2010).

La participación de la pared celular en la respuesta a estrés salino ha sido demostrada en *Arabidopsis* (Golldack et al. 2014). Se especula que las modificaciones estructurales y en la composición de la pared celular están asociadas con mantener el turgor de la célula. Así la tolerancia a salinidad en distintos niveles se relaciona con la capacidad de la pared celular para mantener el turgor (Tenhaken, 2015). De igual manera, es de recalcar que las interacciones que se encuentran en la pared celular aún no han sido descritas en detalle debido a la elevada complejidad encontrada en este componente celular.

Debido a que ninguno de los genes analizados constituye un factor de transcripción, se sugiere no concentrarse en su patrón ni en la magnitud de su expresión individual sino en el hecho de que en los individuos del genotipo tolerante 3 de los 4 genes presentan diferencias en su expresión relativa al control sin sal. Mientras tanto en los individuos susceptibles a salinidad, ninguno de los genes presenta diferencias significativas entre el tratamiento con sal y el control sin sal. Este hecho junto con las diferencias ambientales en las cuales crece cada una de las plantas, sugiere que los individuos de Chaltura posiblemente tienen algún mecanismo que le confiere una mayor tolerancia a la salinidad.

Los resultados obtenidos en cuanto al patrón de expresión no concuerdan en todos los casos con lo observado en el despliegue diferencial. Esta técnica se basa en la amplificación mediante primers arbitrarios de segmentos del transcriptoma y su posterior identificación en geles de poliacrilamida. Una de las mayores limitaciones de esta técnica es la alta tasa de falsos positivos. Esto se debe a que las bandas identificadas muchas veces corresponden a una mezcla de productos de PCR del mismo tamaño y esto interfiere con el análisis de expresión génica, ya que muchas veces no se está comparando la expresión del mismo transcrito (Lievens et al., 2001). Lo más probable es que las diferencias encontradas entre lo observado en el despliegue diferencial y el RT-qPCR se deban a que en el primero no siempre se estaban comparando los mismos productos debido a la naturaleza de la técnica.

Estos resultados preliminares también brindan una pauta del camino que se debe seguir en programas de mejoramiento vegetal cuando se están tratando características poligénicas como lo son la tolerancia a estrés abiótico. Como se describió anteriormente, la tolerancia a salinidad abarca tres componentes principales: rutas metabólicas dependientes e independientes de ABA, la pared celular y el mantenimiento de la fotosíntesis. Esto involucra una cantidad enorme de genes que muy probablemente contribuyen muy poco individualmente al rasgo de interés. De este modo, si se quiere intentar un enfoque de ingeniería genética se debe buscar los genes con mayor contribución, por ejemplo factores de transcripción de la familia DREB (Liu et al., 2013). No obstante, los resultados obtenidos no solo en esta investigación sino en otros estudios sugieren que la mejor forma de realizar un programa de mejoramiento sería mediante cruzamientos convencionales ayudados por técnicas genéticas como marcadores moleculares y análisis de QTLs.

9. Conclusiones

De los 9 DETs que se propuso estudiar como objetivo de este estudio, se logró caracterizar el perfil de expresión de 4 genes. De estos, el perfil de expresión coincidió con el predicho en el despliegue diferencial en 3 de los 4 casos. Tres de los cuatro genes caracterizados estaban relacionados con el metabolismo de la pared celular en plantas. Su expresión coincidió con aquella reportada en la literatura.

Para tomate de árbol expuesto a 100mM de NaCl en tejido foliar y a las 3 horas, se determinó que la expresión de los genes TIP41 y RPL8 es la más estable entre todos los genes candidatos y por ello fueron utilizados como controles endógenos.

Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que en los individuos del genotipo tolerante de Chaltura existe un mecanismo de tolerancia a la salinidad.

10. Recomendaciones

- Realizar un análisis de RNA-seq en diferentes tejidos de la planta y por un periodo de tiempo más largo para analizar diferencias entre ambos individuos y así ampliar el entendimiento del posible mecanismo de tolerancia a la salinidad.
- Establecer una línea de cultivo in vitro, así como en el invernadero proveniente de la población con los individuos tolerantes para facilitar otros estudios en el ámbito bioquímico y agronómico.
- Realizar estudios de campo y en invernadero para fenotipar los cambios observados debido a la salinidad y así pensar en desarrollar un programa de mapeo por QTLs.
- Comparar el patrón de expresión de genes reportados en la literatura asociados con tolerancia a estrés abiótico como factores de transcripción DREB.

11. Bibliografía

- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Barriga, Sandra. (2003). *Diagnóstico de la Salinidad de los Suelos Cultivados en las Principales Áreas Bajo Riego en el Ecuador*. Universidad Central del Ecuador. Tesis de Pregado. Quito.
- Brouwer, C., Goffeau A. y Heibloem M. (1985). Irrigation water management: Training Manual No. 1- Introduction to Irrigation. FAO Corporate Document Repository
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2), 437-448.
- Connor, J. D., Schwabe, K., King, D., & Knapp, K. (2012). Irrigated agriculture and climate change: the influence of water supply variability and salinity on adaptation. *Ecological Economics*, 77, 149-157.
- Crelier, S., Robert, M. C., Claude, J., & Juillerat, M. A. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5566-5575.
- Dekkers, B. J., Willems, L., Bassel, G. W., van Bolderen-Veldkamp, R. M., Ligterink, W., Hilhorst, H. W., & Bentsink, L. (2012). Identification of reference genes for RT-qPCR expression analysis in Arabidopsis and tomato seeds. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 28-37.

- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC plant biology*, 8(1), 1.
- FAO. 2016. Impacts of Salinization, sodication and waterlogging. FAO. Recuperado de: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>
- Feicán C, Encalada C, Larriva W. 1999. El cultivo del tomate de árbol. Estación Chuquipata Granja Experimental Bullcay. INIAP. Cuenca.
- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N. 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5(121).
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., & Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*, 60(2), 487-493.
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*, 2014.
- 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 biology*, 51(1), 463-499.
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M. W., Masanetz, S., Borghi, L., ... & Descombes, P. (2011). RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC genomics*, 12(1), 1.
- Imai, T., Ubi, B., Saito, T. y Moriguchi, T. (2013). *Evaluation of Reference Genes for Accurate Normalization of Gene Expression for Real Time- Quantitative PCR in*

Pyrus pyrifolia Using Different Tissue Samples and Seasonal Conditions. PLOS One 9:1.

Jaramillo, P. V. (2013). *Identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés por salinidad en tomate de árbol (solanum betaceum) mediante la técnica de despliegue diferencial de genes*. USFQ. Tesis de Pregrado. Quito

Jaramillo, V., Arahana, V., & de Lourdes Torres, M. (2014). Determination of the level of tolerance to salinity in in vitro conditions of the plants of tomate de árbol (Solanum betaceum) from different localities of the ecuatorian highlands. *Conexiones*. USFQ. Quito

Lamport, D. T., Kieliszewski, M. J., & Showalter, A. M. (2006). Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist*, 169(3), 479-492.

Lamport, D. T., Kieliszewski, M. J., & Showalter, A. M. (2006). Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist*, 169(3), 479-492.

Liang, S., Zhou, R., Dong, S., & Shi, S. (2008). Adaptation to salinity in mangroves: Implication on the evolution of salt-tolerance. *Chinese Science Bulletin*, 53(11), 1708-1715.

Lievens, S., Goormachtig, S., & Holsters, M. (2001). A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research*, 29(17), 3459-3468.

- Liu, S., Wang, X., Wang, H., Xin, H., Yang, X., Yan, J., ... & Qin, F. (2013). Genome-wide analysis of ZmDREB genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS Genet*, 9(9), e1003790.
- Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D., & Cillo, F. (2010). Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular plant pathology*, 11(6), 805-816.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., De Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., & Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of integrative plant biology*, 52(4), 360-376.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Narsai, R., Ivanova, A., Ng, S., y Whelan, J. (2010). *Defining reference genes in Oryza sativa sing organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets*. *BMC Plant Biology* 10:56.
- Ramírez, T. (2009). Perfil de tomate de árbol. *CORPEI (Ed.)*.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC plant biology*, 6(1), 1.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in

- Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227(6), 1343-1349.
- Revelo, J., Pérez, E., & Maila, M. (2011). El cultivo de tomate de árbol. *INIAP*.
- RStudio Team (2015). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA
URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sadeghi, M., Dehghan, S., Fischer, R., Wenzel, U., Vilcinskis, A., Kavousi, H. R., & Rahnamaeian, M. (2013). Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius*. *Plant signaling & behavior*, 8(11), e27335.
- Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE-*, 86(3), 407-421.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, 134(4), 1439-1449.
- Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78(1), 5-38.
- Shi, H., Lee, B. H., Wu, S. J., & Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 21(1), 81-85.
- Tanji, K. K., & Kielen, N. C. (2002). Agricultural drainage water management in arid and semi-arid areas. *FAO*.

- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 5, 771.
- Tuteja, N. (2007). Chapter Twenty-four-mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in enzymology*, 428, 419-438.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., Zeng, L., ... & Close, T. J. (2005). Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant physiology*, 139(2), 822-835.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., & Zhu, J. K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress–and osmotic stress–responsive gene expression. *The Plant Cell*, 13(9), 2063-2083.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247.

12. Tablas

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación de los genes que posiblemente van a ser utilizados como controles endógenos.

Nombre del gen	Símbolo	Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón
Actin ¹	ACT	F	5'AGGCAGGATTTGCTGGTGTGATGATGCT 3'	107
		R	5'-ATACGCATCCTTCTGTCCCATTCCGA 3'	
Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ²	GADPH	F	5'GGCTGCAATCAAGGAGGAA 3'	207
		R	5'AAATCAATCACACGGGAACTG 3'	
Elongation factor α ¹	EF1 α	F	5'TACTGGTGGTTTTGAAGCTG 3'	166
		R	5'AACTTCCTTCACGATTCATCATA 3'	
A-Tubulin ²	ATUB	F	5'AGCTCATTAGCGGCAAAGAA 3'	163
		R	5'AGTACCCCCACCAACAGCA 3'	
TIP41 protein ²	TIP41	F	5'ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC 3'	235
		R	5'GCTGCGTTTCTGGCTTAGG 3'	
Ribosomal protein L8 ²	RPL8	F	5'CCGAAGGAGCTGTTGTTTGTA 3'	184
		R	5'ACCTGACCAATCATAGCACGA 3'	
SAND family gene ²	SAND	F	5'TTGCTTGGAGGAACAGACG 3'	164
		R	5'GCAAACAGAACCCCTGAATC 3'	
Ubiquitin ¹	UBI	F	5'TCGTAAGGAGTGCCCTAATGCTGA 3'	119
		R	5'CAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTAA 3'	

¹ Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D., & Cillo, F. (2010). Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular plant pathology*, 11(6), 805-816.

² Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8(1), 131.

Tabla 2. Lista de DETs estudiados con su homología y perfil de expresión en el despliegue diferencial.

#	ID	Accesión en Genbank	Homología	Valor e	Porcentaje de homología	Patrón de expression en el despliegue diferencial
DET #1	ARG	NM001247514.1	Arabinogalactan protein (AGP-1), <i>Solanum lycopersicum</i>	4e-73	95%	Sobreexpresado en Chaltura
DET #2	CH4	AF212318.1	Cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), <i>Capsicum annum</i>	1e-22	78%	Sobreexpresado em Chaltura
DET #3	MEP	NM001288040.1	Pectin Methyl Esterase (Pest2), <i>Solanum tuberosum</i>	4e-24	76%	Subexpresado en Chaltura
DET #4	ZEP	HM013964.1	Epoxidasa de zeaxantina (ZEP), <i>Solanum tuberosum</i>	1e-38	79%	Sobreexpresado en Quero
DET #5	PSBO	XM004233367.1	33kDa precursor protein of oxygen-evolving complex (PSBO), <i>Solanum lycopersicum</i>	3e-62	85%	Subexpresado en Chaltura y Quero
DET #6	OEE1	NM001309365.1	Oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1), <i>Solanum lycopersicum</i>	1e-68	88%	Subexpresado en Chaltura y Quero
DET #7	TSI-1	XM006340829.1	Pathogenesis-related protein STH-2-like, <i>Solanum tuberosum</i>	6e-24	89%	Sobreexpresado en Chaltura
DET #8	PLPC	NM001247259.1	Proteína de Lignificación de Pared Celular secundaria, <i>Solanum lycopersicum</i>	3e-33	80%	Sobreexpresado en Chaltura
DET #9	ADP	DO228333.1	Factor de ribosilación del ADP, <i>Solanum tubeerosum</i>	3e-12	90%	Sobreexpresado en Chaltura

Jaramillo, P. V. (2013). *Identificación de genes candidatos de tolerancia a estrés por salinidad en tomate de árbol (solanum betaceum) mediante la técnica de despliegue diferencial de genes*. USFQ. Tesis de Pregrado. Quito

Tabla 3. Primers diseñados para la amplificación de genes candidatos de tolerancia a estrés salino en tomate de árbol.

Gen	Estrategia para el diseño de primers	Primer	Secuencia	Tamaño del producto esperado
TSI-1	Primers específicos	TS1 F	CCCAAGGGGTGATTATGTTG	212 pb
		TS1 R	TGAACTCAGTCGTCGTCTCG	
	Primers consenso	TS1r F	AACCACAATTTCCCAACAA	158 pb
		TS1r R	CTTCCAACACCACCATCTCC	
ARG	Primers específicos	ARG F	CCACATTGGCTCCCTTTTA	100 pb
		ARG R	TAGAGGAAAGCGCAAGTCCA	
	Primers consenso	ARGr F	CCACTACCCCTGTTGTTGCT	232 pb
		ARGr R	CCCTTTCCTTTTCCTTTGCT	
PLPC	Primers específicos	PLPC F	CGGTGAAATTGGATAACGAGA	78 pb
		PLPC R	TGCCGTAGCCCTTTTGTAG	
	Primers consenso	PLPCr F	TGAGGTTGCAGCTAGGGAGT	113 pb
		PLPCr R	TCTTACGTTTGCCATAGCCC	

Tabla 4. Primers diseñados para la amplificación de los genes candidatos de tolerancia a partir de las secuencias obtenidas en el despliegue diferencial.

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño del producto esperado
TSI-1	TSI F	CCCAAGGGGTGATTATGTTG	212 pb
	TSI R	TGAACTCAGTCGTCGCTCG	
ARG	ARG F	CCACATTGGCTCCCTTTTTA	100 pb
	ARG R	TAGAGGAAAGCGCAAGTCCA	
PLPC	PLPC F	CGGTGAAATTGGATAACGAGA	78 pb
	PLPC R	TGCCGTAGCCCTTTTGTAG	
MEP	MEP F	TTGGGGTTGGAATTGTGTTT	121 pb
	MEP R	TCCGGCTTTTCACTTGAGAT	
ADP	ADP F	GCAGCTTTGGGAGCAGTAAA	101 pb
	ADP R	CACCCAGTTCCAACATCACA	
ZEP	ZEP F	TCCATCGCCAAAATCCTATG	160 pb
	ZEP R	TGAAGTGGGAAAACACTTGG	
OEE1	OEE1 F	CCCTGATATGGGAGCAACGG	152 pb
	OEE1 R	AAAGGGGTCACAGCAAGGTT	
PSBO	PSBO F	CAACGGTCCCCAAGGATGTA	149 pb
	PSBO R	ATCAAAAGGGGTCAGCAAGGT	

Tabla 5. Estandarización de los genes candidatos a control endógeno en respuesta a salinidad en tomate de árbol.

Gen	Ta estandarizada
Actina	62°C
Ubiquitina	68°C
α -tubulina	63°C
RPL8	61°C
TIP41	62°C

La temperatura de annealing establecida es el resultado de la estandarización mediante PCR gradiente de cada uno de los genes. En la temperatura detallada es donde se consiguió la amplificación más clara de los genes.

Tabla 6. Estandarización de los primers para los genes candidatos de tolerancia a la salinidad en tomate de árbol.

DET #	Gen	Resultado de la amplificación	Ta estandarizada	RT-qPCR
DET 1	ARG	Una sola banda en el expected size	64°C	SI
DET 2	CH4	Una sola banda en el expected size	60°C	SI
DET 3	MEP	Una sola banda en el expected size	60°C	SI
DET 4	ZEP	Una banda 100pb menor al expected size	-	NO
DET 5	PSBO	Dos bandas inespecíficas	-	NO
DET 6	OEE1	Una sola banda en el expected size	55°C	SI
DET 7	TSI-1	Dos bandas inespecíficas	-	NO
DET 8	PLPC	Dos bandas inespecíficas	-	NO
DET 9	ADP	No se observó amplificación a: 55, 57, 59 y 61°C.	-	NO

13. Figuras

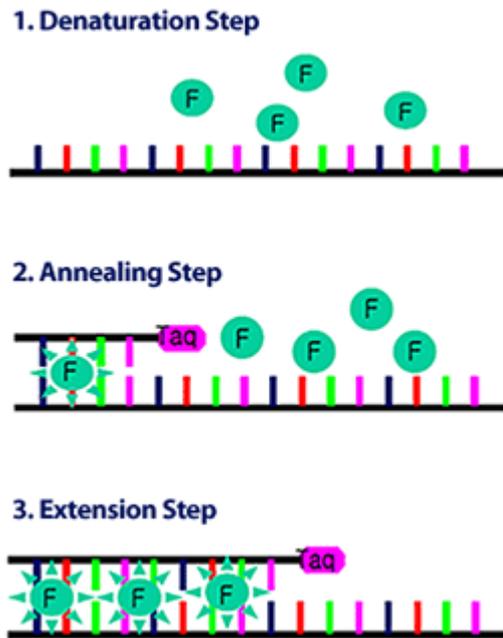


Figura 1. Fluorescencia en el RT-qPCR. Modo de acción del PCR cuantitativo. A medida que se polimeriza la cadena, las moléculas fluorescentes se adhieren a la doble cadena y comienzan a emitir fluorescencia. El equipo mide esta fluorescencia y determina el número de ciclos que esta se demora en pasar un umbral (Ct).

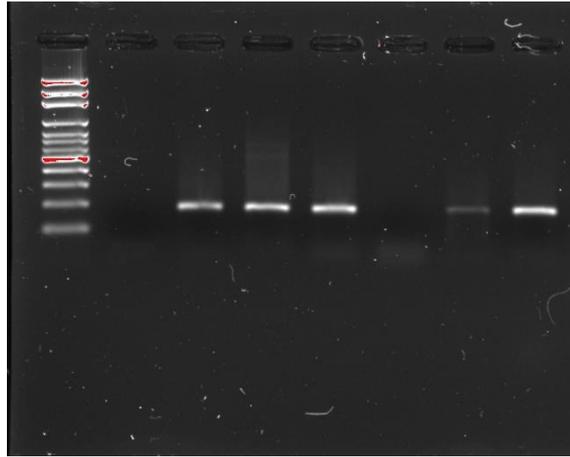


Figura 2. Amplificación del gen RPL8. Amplificación del gen RPL8. Carriles.1. Ladder 100pb. 2. Control negativo sin cDNA. 3 y 4. Muestra de tomate riñón. 5, 6, 7 y 8. Muestras de tomate de árbol. Expected size 184pb..

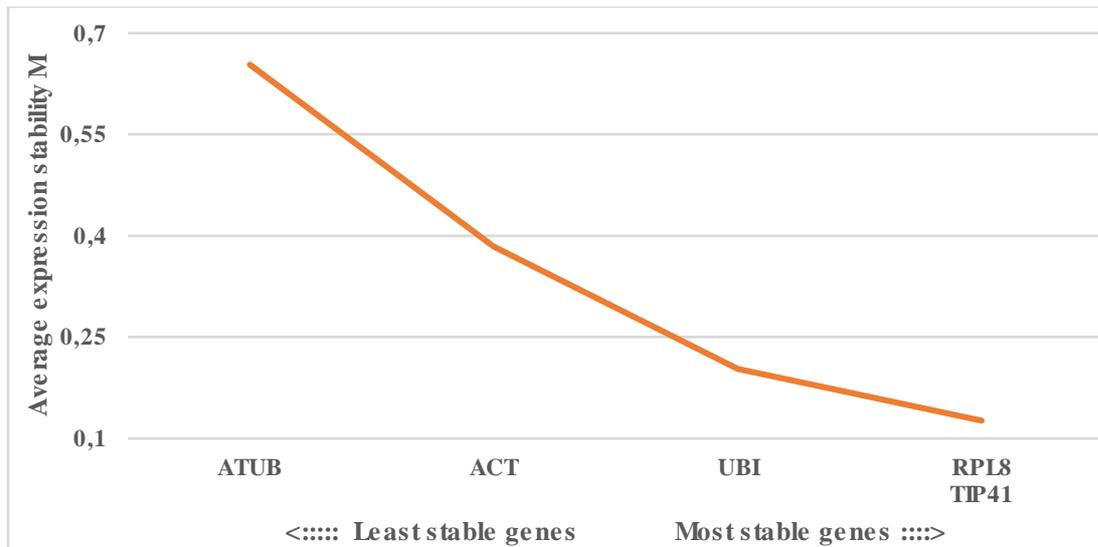


Figura 3. Análisis de estabilidad de los genes controles endógenos por el software geNorm. El valor M de los cinco genes candidatos se muestra para plantas de tomate de árbol después de 3 horas de exposición a la salinidad.

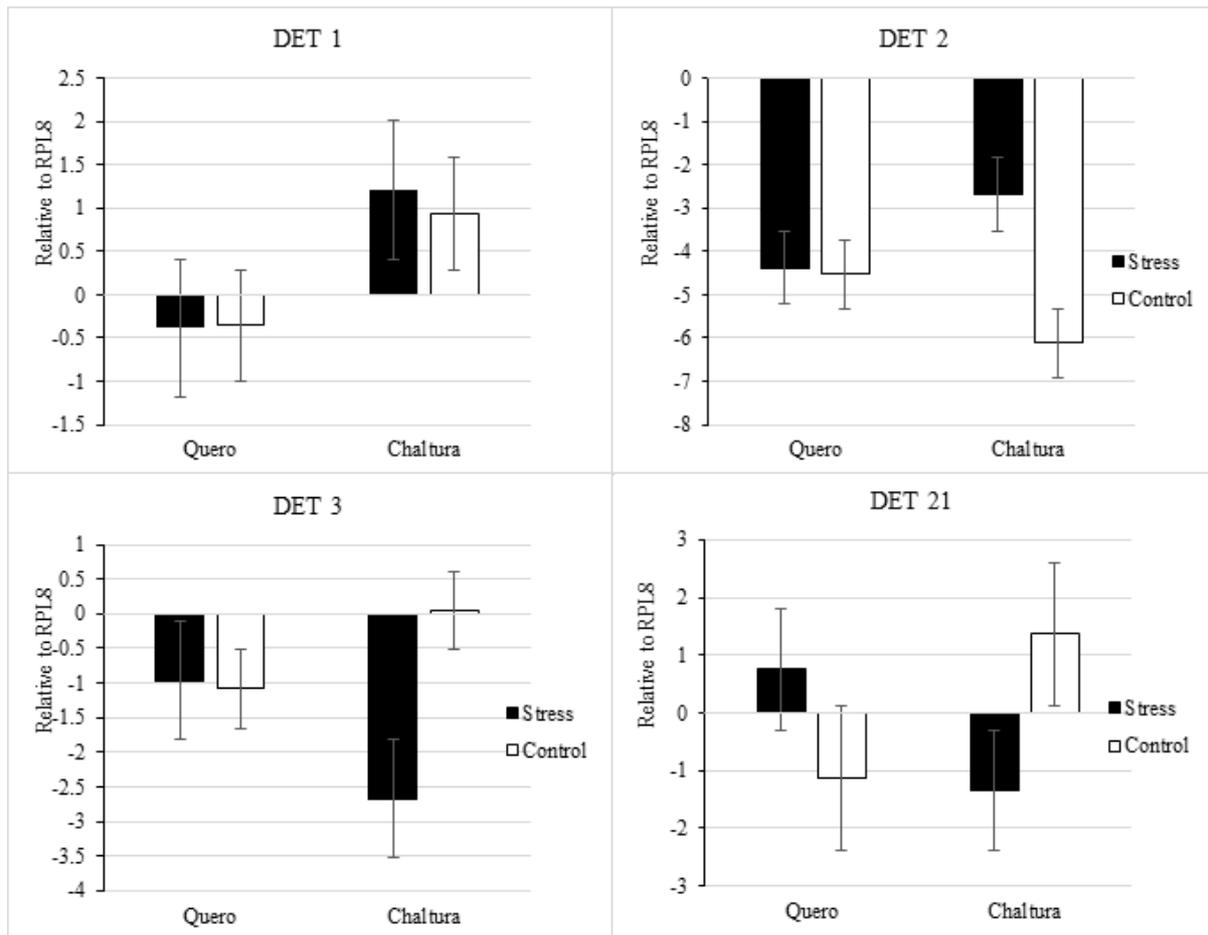


Figura 4. Perfil de expresión de 4 DETs candidatos de tolerancia a salinidad. El DET1 corresponde al gen AGP, el DET 2 corresponde al gen CH4, el DET 3 corresponde al gen MEP y el DET 21 corresponde al gen OEE1.