



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



INSTITUTO DE HORTICULTURA

**RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO Y CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA-MOLECULAR DE GENOTIPOS DE JITOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

ALDO LARA IBARRA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
SECRETARÍA DE EXÁMENES PROFESIONALES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

Chapingo, Estado de México, mayo de 2018

RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR DE GENOTIPOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Tesis realizada por el C. Aldo Lara Ibarra bajo la supervisión del Comité Asesor Indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

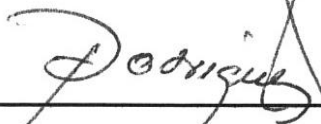
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



Dr. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR:



Dr. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



Dr. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
DEDICATORIA	xii
AGRADECIMIENTOS	xiii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	4
1.2 Objetivos Específicos	5
1.3 Hipótesis	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Cultivo como hortaliza	6
2.2 Evolución y taxonomía.....	6
2.2.1 Posición taxonómica.....	7
2.2.2 Relaciones filogenéticas	8
2.2.3 La evolución del color del fruto	9
2.2.4 Sistema de evolución.....	10
2.3 Domesticación	10
2.4 Distribución.....	12
2.5 Países productores de jitomate	12
2.6 Consumo mundial.....	15
2.8 Comercio nacional.....	17
2.9 Estrés vegetal.....	18
2.9.1 Estrés biótico	20
2.9.2 Estrés abiótico	21
2.10 Estrés por déficit hídrico	22
2.11 Acumulación de solutos compatibles	24

2.12	Ajuste osmótico	24
2.13	Control de sodio dentro de la planta	25
2.14	Las acuaporinas y los canales de agua	26
2.15	Papel de los transportadores de alta afinidad de K ⁺ (HKT)	28
2.16	La expresión de los genes de proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA) 29	
2.17	La salinidad reduce el crecimiento y la fotosíntesis en las especies sensibles .	30
2.18	El daño salino implica efectos osmóticos y efectos específicos de lones	30
2.19	Las plantas utilizan diferentes estrategias para evitar el daño por sal	32
2.20	El sodio es transportado a través de la membrana plasmática y al tonoplasto .	34
2.21	Mecanismos de la regulación del sodio en raíz y hojas	36
2.22	Pirofosfatasa de H ⁺ (AVP1)	39
2.23	Factores de transcripción	40
2.24	Los genes que responden al estrés están regulados por procesos dependientes e independientes de ABA.....	41
2.25	Familia de genes para factores de transcripción de etileno (ERF)	42
2.26	La enzima lipoxigenasa (LOX).....	44
2.27	Cambios morfológicos y bioquímicos en <i>Solanum Lycopersicum</i> L.....	47
2.28	Mejoramiento vegetal	48
2.29	Marcadores	48
2.30	Marcadores moleculares tipo SSR e ISSR	49
2.31	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
2.32	Mejoramiento genético al estrés por sal en jitomate	51
2.33	Contenido relativo de agua.....	51
2.34	Transcripción inversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) 52	
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1	Material vegetal	53
3.2	Análisis morfológico y bioquímico.....	53
3.2.1	Estrés salino durante el crecimiento vegetal	53

3.2.2 Preparación del sustrato	54
3.2.3 Fertilización	54
3.2.4 Diseño experimental	54
3.2.5 Evaluación de las mediciones	54
3.2.6 Análisis bioquímico	55
3.2.6.1 Clorofila.....	55
3.2.6.2 Azúcares.....	55
3.2.6.3 Contenido Relativo de Agua (CRA)	56
3.2.7 Análisis de datos	56
3.2.8 Dendrograma de datos morfológicos y bioquímicos.....	56
3.3 Análisis molecular	57
3.3.1. Extracción y purificación de ADN genómico	57
3.3.2 Cuantificación y calidad de ADN genómico	58
3.3.3 Amplificación por PCR.....	58
3.3.4 Determinación de relaciones entre genotipos de jitomate.....	60
3.3.5 Relaciones entre los individuos dentro de variedades y evaluación de la diversidad genética	60
3.3.6 Electroforesis de los fragmentos amplificados	60
3.4 Análisis de los datos.....	60
3.4.1 Prueba de Mantel	61
3.4.2 Aislamiento de ADNc de secuencias de genes mediante RT-PCR convencional	61
3.4.3 Análisis de secuencias genómicas de genes de resistencia al estrés por sal mediante PCR.....	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1 Respuesta de las plantas de jitomate al estrés por salinidad.....	64
4.1.1. Efecto del estrés salino en el contenido de clorofilas a, b y total, según la prueba de correlación de Pearson.....	64
4.1.2. Efecto del estrés salino en el contenido de azúcares de plantas de jitomate según la prueba de correlación de Pearson	66

4.1.1.3 Efecto del estrés salino en el contenido relativo de agua (CRA).....	68
4.1.1.4 Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila A.....	71
4.1.4. Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila B	73
4.1.4. Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila total	75
4.1.1.5 Efecto del estrés salino en la concentración de azúcares.....	76
4.1.1.6 Efecto del estrés salino en el área foliar	83
4.2 Correlaciones de mantel entre matrices obtenidas usando marcadores y las variables bioquímicas-morfológicas medidas	86
4.3 Análisis de relaciones genéticas entre 7 genotipos de jitomate mediante marcadores ISSR y conglomerados	88
4.4 Análisis de coordenadas principales (ACoP) para 10 individuos de 7 genotipos de jitomate mediante marcadores ISSR	94
4.5 Análisis de coordenadas principales para los 7 genotipos de jitomate individuales empleando marcadores moleculares ISSR	100
4.7 Comparación entre dendrogramas generados usando marcadores ISSR vs morfológicos-bioquímicos e ISSR + morfológicos bioquímicos.....	104
4.8 Resumen de resultados para la identificación de los genotipos tolerantes y susceptibles	108
4.10 Ordenamiento de genotipos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) por sus características morfológicas-bioquímicas medidas en la etapa reproductiva bajo condiciones de estrés salino severo, mediante un análisis de componentes principales.....	111
4.11 Amplificación de los genes de resistencia a estrés salino por PCR	113
VI. CONCLUSIONES.....	121
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	122

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores ISSR utilizados para la caracterización y evaluación de la diversidad genética de genotipos de jitomate.	59
Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores utilizados para hacer la RT-PCR.	61
Cuadro 3. Parámetros utilizados en la RT-PCR convencional para amplificar los cDNA de LOX donde el segmento 2 es de 51°C y para JERF1 cambia a 42 °C.	62
Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar las secuencias genómicas de los genes LOX y JERF1 mediante PCR.	63
Cuadro 5. Valores de correlación lineal de Pearson en el T1 (tiempo de exposición a salinidad) para las variables morfológicas-bioquímicas.	65
Cuadro 6. Resultados de la prueba de medias Tukey y Duncan para la variable contenido relativo de agua una vez dado el estrés (T1 CRA), para los genotipos evaluados.	69
Cuadro 7. Prueba de medias Tukey y Duncan y agrupaciones de los genotipos para el contenido de clorofila A.	71
Cuadro 8. Pruebas de Tukey y Duncan para la Clorofila B, para los genotipos evaluados.	74
Cuadro 9. Resultados de los estadísticos de Tukey y Duncan para las concentraciones de clorofilas totales en T1.	75
Cuadro 10. Resultados de las pruebas de Duncan y Tukey para el azúcar D-Manosa en los distintos genotipos evaluados.	77
Cuadro 11. Resultados de la las pruebas de Tukey y Duncan para la D-glucosa en T1, para los genotipos evaluados.	80
Cuadro 12. Resultados para la D-Galactosa según las pruebas de Tukey y Duncan, para los genotipos evaluados en T1.	81
Cuadro 13. Prueba de medias según Duncan y Tukey para la variable área foliar en T1 para los genotipos evaluados.	84
Cuadro 14. Descriptiva para marcadores moleculares.	89
Cuadro 15. Medidas de diversidad genética entre las poblaciones de los 7 genotipos de jitomate muestreados utilizando ISSR.	92
Cuadro 16. Resumen general de parámetros de diversidad genética dentro de cada población de los 7 genotipos de jitomate obtenidos mediante marcadores ISSR.	93

Cuadro 17. Coordenadas de los sitios de colecta de los genotipos de jitomate silvestres.	100
Cuadro 18. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los 7 genotipos de jitomate.....	103
Cuadro 19. Resumen de evaluación de características de los genotipos de jitomate durante la etapa reproductiva bajo tratamiento de estrés severo, para determinar su tolerancia o susceptibilidad al estrés salino.....	109
Cuadro 200. Matriz de componentes principales, para los caracteres Bioquímico-Morfológicos bajo la condición T1.	112
Cuadro 211. Varianza total explicada de las variables bioquímico-morfológicas evaluadas durante la etapa reproductiva del jitomate bajo condiciones de estrés salino (T1).....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Cladograma con 65 accesiones de 13 especies de jitomate (en grupos de sect. <i>Lycopersicon</i>) y otros grupos de taxa (sect. <i>Juglandifolia</i> , sect. <i>Lycopersicoides</i> , sect. <i>Petota</i> , Sect. <i>Etuberosum</i> y sect. <i>Basarthurum</i>) examinados en el análisis filogenético GBSSI por Peralta y Spooner (2001) con marcadores AFLPs. Los números indican las coincidencias en el remuestreo y entre paréntesis las veces que no aparece ese grupo.	9
Figura 2. Superficie cosechada y rendimientos mundiales de jitomate, 2004-2014.	13
Figura 3. Producción Mundial de Jitomate, 2004-2014.	14
Figura 4. Principales países productores de tomate en el año 2014.	15
Figura 5. Consumo mundial de jitomate, 2003-2013.	16
Figura 6. Mecanismo celular de entrada y salida de sodio, potasio, protones de hidrogeno y calcio, dentro de la célula y la vacuola.	33
Figura 7. Se muestra la función de SOS1, SOS2 y SOS3, la función de AtNHX en la regulación del Na ⁺ citoplasmático al interior de la vacuola.	35
Figura 8. Identificación del estrés salino por la planta <i>Thellungiella halophila</i> y los mecanismos que tiene para manejar dicho estrés.	38
Figura 9. Mecanismo de activación de la tolerancia al estrés osmótico.	42
Figura 10. Cambios en la concentración de clorofila a (CA), b (CB) y total (CT) en plantas de jitomate bajo condiciones de hidratación normal (T0) y bajo estrés por salinidad (T1).	66
Figura 11. Contenido de azúcares en T0 y T1 se puede observar que la cantidad de D-manosa y D-galactosa (T0 D-MAN y T0 D-GAL).	67
Figura 12. Respuesta de los genotipos según la variable CRA, en presencia del estrés por sal (T1) y en ausencia del estrés (T0), según el cálculo medio de la varianza para las 20 plantas por genotipo.	70
Figura 13. Contenido de Clorofila A en las variedades después de someterlas a estrés salino (T1) y sin estrés (T0).	72
Figura 14. Concentración de la clorofila B en T1 y T0 para cada variedad.	74
Figura 15. Contenido de clorofila total por variedad en T0 y T1.	76
Figura 16. Contenido de D-Manosa para el T1 y T0 de los diferentes genotipos.	78

Figura 17. Concentración de D-glucosa para los 7 genotipos evaluados a partir de 20 plantas testeadas para cada genotipo en los diferentes tiempos T0 y T1.....	81
Figura 18. Concentraciones de D-galactosa en T1 y T0 para cada genotipo analizado.....	83
Figura 19. Área foliar de los genotipos de jitomate durante T1 y T0.....	86
Figura 20. Correlación de Mantel entre matrices de datos derivados de marcadores moleculares ISSR y datos de variables morfológicas-bioquímicas. Se muestra en triángulos morados la relación del <i>loci</i> 2 para el marcador A7 (triángulo invertido morado) con los otros componentes medidos (círculos azules).....	87
Figura 21. Dendrograma de relaciones entre los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores moleculares ISSR's, con el método de varianza mínima de Ward y el coeficiente de similitud de Dice ($\sqrt{1-S}$), con el programa estadístico Infogen®.....	90
Figura 22. Patrones de bandas amplificados con los iniciadores ISSR A3 y P2 para los 7 genotipos de jitomate, donde MPM es el marcador de peso molecular, y los genotipos se indican con sus números y siglas correspondientes.....	91
Figura 23. Análisis de coordenadas principales para 70 individuos de los 7 genotipos de jitomate trabajados, empleando marcadores moleculares ISSR. En el círculo rojo se muestra el grupo I y en el verde el grupo II.....	95
Figura 24. Patrones de bandas obtenidos para los 10 individuos de algunos de los 7 genotipos de jitomate analizados, empleando el iniciador 7955, P3, A8 y P2, en la parte inferior de cada imagen se indica el genotipo al cual pertenecen en orden de diez pozos de izquierda a derecha, los últimos 5 pozos en la parte inferior derecha de cada imagen corresponden solo con al genotipo al final y el marcador de peso molecular esta indicado como MPM en el primer y el último pozo de cada gel.	99
Figura 25. Análisis de coordenadas principales para los 7 genotipos de jitomate individuales trabajados, empleando marcadores moleculares ISSR.....	101
Figura 26. Gráfico de la variación obtenida dentro y entre poblaciones para los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores ISSR, para los estadísticos F.	104
Figura 27. Dendrograma de relaciones entre los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores moleculares ISSR con el método de varianza mínima	

de Ward y el coeficiente de similitud de Dice ($\sqrt{1-S}$) con el programa estadístico Infogen®.....	105
Figura 28. Dendrograma de relaciones entre los genotipos de jitomate usando marcadores bioquímico-morfológicos en T0, con UPGMA con el método de Dice.	106
Figura 29. Dendrograma consenso de relaciones entre los genotipos de jitomate usando los marcadores ISSR y bioquímicos-morfológicos en T0, con UPGMA y Dice.	107
Figura 30. Dendrograma de relaciones bioquímico-morfológicas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) bajo condiciones de estrés salino severo.....	110
Figura 31. Gráfico en 2D donde se muestra el agrupamiento utilizando los datos bioquímico-morfológicos de los genotipos de jitomate (<i>S. lycopersicum</i> L.) durante la etapa reproductiva y bajo condiciones de estrés salino severo.	111
Figura 32. Amplificación del gen LOX de 2580 pares de bases de longitud, en los 7 genotipos de jitomate trabajados. La banda marcada con la flecha roja corresponde al gen LOX.....	113
Figura 33. Amplificación del gen JERF1 de 1119 pares de bases de longitud mediante PCR para los 7 genotipos de jitomate evaluados. La banda marcada con la flecha roja corresponde al gen JERF1.	114
Figura 34. Productos de RT-PCR convencional del gen JERF1 para cuatro genotipos de jitomate evaluados. A: C-115, B:C-200, C:C-101 y D: 'Floradade' con sus distintos tiempos 0 h; 0, 3 h; 3, 12 h; 12 y 24 h; todos se sometieron a 200 mM de NaCl.	115
Figura 35. Productos de RT-PCR convencional del gen LOX para los 4 genotipos de jitomate evaluados. A: C-200, B: 'Floradade', C: C-101 y D: C-115, con sus distintos tiempos 0 h: 0, 3 h; 3, 12 h; 12 y 24 h, todos se sometieron a 200 mM de NaCl.	118

DEDICATORIA

A mis padres Silvia Ibarra Horta y Joaquín Lara Sandoval.

A mis hermanos Diego Lara Ibarra y Deni Lara Ibarra por ser fuente de inspiración para hacerme de mis logros.

A mi familia por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme formar parte de su comunidad estudiantil.

A mis profesores y compañeros por compartirme su tiempo, experiencia y conocimientos.

A mi familia por todo el apoyo brindado.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por su dirección y apoyo durante toda la investigación.

A mi comité asesor: Dr. José Luis Rodríguez de la O y Dr. José Francisco Morales Domínguez por brindarme su apoyo y compromiso.

Al M.C.Noé Alarcón Cruz por su apoyo, conocimiento y manejo del cultivo de jitomate, así como su asesoría por el germoplasma trabajado.

A mis compañeros de laboratorio Luis Ángel y Sandra Fuentes por el apoyo y el trabajo en equipo.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en Juchipila Zacatecas, el 18 de noviembre de 1988. Realizó sus estudios superiores en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

En el 2013 obtuvo el título de Biólogo por parte de la UAA. Trabajó en el Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Autónoma de Aguascalientes en proyectos de investigación con ajo, moringa, cactáceas y otras. Se desempeñó en el nivel medio y superior de enseñanza y laboró en una unidad de manejo ambiental en El Ocote Aguascalientes.

En el 2016 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA-MOLECULAR DE GENOTIPOS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

La salinización del suelo es un proceso que afecta la productividad de muchos cultivos, entre ellos el jitomate. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar morfológica y molecularmente a siete genotipos de jitomate; identificar su tolerancia o susceptibilidad al estrés salino (NaCl) mediante variables morfológicas y bioquímicas; conocer la diversidad genética usando marcadores ISSR y medir la actividad de genes relacionados con la resistencia al estrés salino como LOX y JERF1. Las colectas C-101 y C-115 fueron identificadas como genotipos tolerantes, mientras 'Río Grande' y 'Floradade' como susceptibles. El análisis UPGMA realizado de los ISSR utilizando el coeficiente de Dice agrupó los genotipos por tamaño del fruto y características del ciclo de vida de la planta, por lo que éstos caracteres podrían estar asociados. La diversidad genética de Nei (He) encontrada entre las 7 poblaciones fue de 0.360, mientras que dentro de las poblaciones se obtuvieron los siguientes valores: 0.431 (C-64), 0.401 (C-101), 0.427 (C-115), 0.454 (C-122), 0.439 (C-200), 0.234 (Floradade) y 0.310 (Río Grande). El estadístico F_{ST} = 0.242 indicó una diferenciación grande en las frecuencias alélicas entre los siete genotipos de jitomate. Por otra parte, se observó la expresión de los genes JERF1 y LOX mediante RT-PCR convencional en hojas estresadas con NaCl a una concentración de 200 mM, observándose diferencias entre los genotipos susceptibles y tolerantes. JERF1 se expresó en el genotipo C-101 a las 0, 12 y 24 h, en C-200 a las 0 y 12 h y en el resto de los genotipos únicamente a las 0 h. La expresión del gen LOX se observó a las 0, 3, 12 y 24 h en C-200 y C-115, en tanto C-101 y 'Floradade' mostraron un comportamiento similar, pero sin actividad a las 12 h.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., estrés salino, diversidad genética, tolerancia, RT-PCR convencional.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Aldo Lara Ibarra.

Director de Tesis: Juan Porfirio Legaria Solano.

ABSTRACT

SALINE STRESS RESPONSE AND MORPHOLOGICAL-MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) GENOTYPES

The soil salinization process affects the productivity of many crops, including tomato. The objectives of this study were to make a morphological and molecular characterization of seven tomato genotypes, to identify their tolerance to saline stress (NaCl) through morphological and biochemical variables, to determine their genetic diversity using molecular markers of the ISSR type and to measure the activity of saline stress resistance related genes such as LOX and JERF1. The collections C-101 and C-115 were identified as tolerant genotypes, while 'Rio Grande' and 'Floradade' as susceptible. The UPGMA analysis of the ISSRs using Dice's coefficient grouped the genotypes by fruit size and characteristics of the life cycle of the plant, so these characters could be associated. The Nei's genetic diversity coefficient (H_e) found among the seven populations was 0.360, while within the populations the following values were obtained: 0.431 (C-64), 0.401 (C-101), 0.427 (C-115), 0.454 (C-122), 0.439 (C-200), 0.234 ('Floradade') and 0.310 ('Rio Grande'). The statistic F_{ST} = 0.242 indicated a large differentiation in the allelic frequencies among the seven tomato genotypes. Expression of the JERF1 and LOX genes was measured by conventional RT-PCR in stressed leaves with NaCl at a concentration of 200 mM, observing differences between the susceptible and tolerant genotypes. JERF1 was expressed in genotype C-101 at 0, 12 and 24 h, in C-200 at 0 and 12 h and only at 0 h in the rest of the genotypes. The expression of the LOX gene was observed at 0, 3, 12 and 24 h in C-200 and C-115, while C-101 and 'Floradade' showed similar behavior, but no activity at 12 h.

Key words: *Solanum lycopersicum*, saline stress, genetic diversity, tolerance, conventional RT-PCR.

Masters Degree Thesis in Agricultural Biotechnology Sciences, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Aldo Lara Ibarra.
Thesis advisor: Juan Porfirio Legaria Solano.

I. INTRODUCCIÓN

El jitomate es un cultivar de la familia Solanaceae y su nombre científico es *Solanum lycopersicum* L., es una especie originaria de América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. La domesticación se llevó a cabo en México. El nombre del jitomate procede del náhuatl 'xictli', ombligo y 'tomatl', tomate, que significa 'tomate de ombligo'. La planta puede ser de porte erecto o semirrecto, arbustivo, de tipo anual, con diversos tipos de variedades. El fruto es una baya ovalada, redonda o periforme. Su tamaño va desde pequeños frutos del tamaño de una cereza, hasta enormes frutos de 750 g. Se cultiva en lugares con temperaturas de 13 °C en la noche y 23 °C durante el día, la humedad relativa requerida va desde 60 a 80 % y la luminosidad más apropiada es de aproximadamente 85 MegaJoules por metro cuadrado, son los mínimos para la floración y cuajado. Se cultiva en suelos ligeramente ácidos de entre 6.2 a 6.8 pH (SAGARPA, 2010).

El jitomate es un producto que se cosecha a lo largo de todo el año y es en los primeros meses del mismo en el que se concentra su producción, principalmente en enero, febrero y marzo (SAGARPA, 2010). Según reportó el SIAP el jitomate para el año 2014 fue el séptimo cultivo con mayor valor de producción en México y el 77 a nivel nacional en el rendimiento (ton/ha) (SIAP, 2014). Su fruto se destinó principalmente en estado fresco al consumo, pero también sirve como materia prima para elaborar diversos derivados, como pastas, sopas y deshidratados, entre otros productos (SAGARPA, 2010).

En México durante el 2013 y 2016, se produjo un aumento de la producción de jitomate "Hecho en México" en un 35 por ciento, al pasar de dos millones 52 mil toneladas a dos millones 769 mil toneladas. Lo anterior representa un aumento en el volumen nacional en cuatro años de alrededor de 717 mil toneladas, las cuales son distribuidas entre el mercado nacional y el internacional, por otra parte

en el año 2017 la tasa de crecimiento fue del 7.8 por ciento. El jitomate es un cultivo que se produce en todo el país; los cinco estados principales son Sonora, San Luis Potosí, Baja California, Zacatecas y Michoacán, los que en conjunto, aportan el 52 por ciento del volumen nacional (SAGARPA, 2016).

El estado productor principal en México es Sinaloa, con 551 mil toneladas; San Luis potosí con 296.8 mil ton; Baja California con 225.9 mil ton, Zacatecas con 185 mil ton y Michoacán con 178.2 mil ton en el 2016. Esta actividad se realiza en una superficie de 46 mil 677 hectáreas y la producción promedio de los últimos cuatro años fue de 2 428 000 ton (SAGARPA, 2016).

En lo que respecta a comercio exterior, el jitomate ocupa el segundo lugar en importancia en el ámbito agroalimentario y el primero en el rubro agropecuario. Reportándose que para noviembre del año 2016 las exportaciones de dicho producto alcanzaron los 1 779 millones de dólares. Éste producto se exporta principalmente a Estados Unidos, Canadá y Japón, mientras que en México el consumo per cápita es de 13.8 kilogramos y en 2015 el valor de la producción se estimó en 20 640 millones de pesos (SAGARPA, 2016).

En México se ha observado que las zonas áridas están teniendo problemas de salinización. De forma simultánea, la calidad del agua se deteriora en esas áreas debido a las sales en ella. Si no se tiene cuidado en manejar el suelo y el agua de riego el problema de la salinización aumenta. Esto tiene como consecuencia un deterioro progresivo de los suelos por salinización, lo cual repercute en una disminución de su productividad y del rendimiento de la calidad de las cosechas. En Sonora existe este fenómeno, debido a que los recursos hidráulicos se han visto reducidos por la sobreexplotación de los acuíferos, debido a que pozos cercanos a la costa son contaminados por agua de mar. Por otra parte la salinización es provocada por la evaporación del agua que se acumula en las depresiones y por el movimiento ascendente de aguas procedentes de fuentes artesianas o de menor profundidad (Zamudio *et al.*, 2004). Dicho fenómeno

también ocurre en otros estados como Zacatecas, Guerrero, y varios más. Debido a que pertenecen a las zonas áridas del país y que no existe un mejor manejo del recurso.

El cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) que se encuentra en áreas con problemas de salinidad muestra en las plantas efectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, tales como la disminución de la fotosíntesis, un menor peso del fruto y cambios en la síntesis de proteínas, entre otros. Los problemas se dan desde comienzos de la germinación disminuyendo conforme aumente la sal en el medio y prolongando éste proceso. Por otra parte, el estrés salino ayuda a que los microorganismos ataquen al cultivo, esto ocurre tanto en especies silvestres como en las comerciales (Goykovic & Saavedra, 2007).

Algunos problemas resultantes de la salinización de los suelos son que se reduce el potencial hídrico de la solución del suelo, por lo que disminuye la disponibilidad de agua y crea un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos Na y Cl, que interfieren con la nutrición mineral y el metabolismo celular. La salinidad también afecta la fotosíntesis, debido a que se reduce el área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, también existe una disminución en el fotosistema 2. Detiene temporalmente el ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclasas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemos y un crecimiento limitado, esto en términos generales (Chávez & González, 2009).

En el jitomate el efecto de la salinidad es adverso, el porcentaje de germinación disminuye y el tiempo en el cual las semillas llevan a cabo este proceso aumenta. Respecto a las raíces, éstas alcanzan una menor longitud de modo que el volumen de suelo que prospectan es menor, los tallos alcanzan una menor altura, las hojas se reducen en número y presentan desecación en sus bordes de modo que hay menos producción de energía asociada a la fotosíntesis, el número y

peso de los frutos disminuye por lo que el rendimiento del cultivo también disminuye (Goykovic & Saavedra, 2007).

En cuanto a los estomas, la salinidad produce un efecto de disminución del número de éstos en la cara adaxial de las hojas y un ligero aumento en la cara abaxial, en consecuencia el menor valor (59.73 estomas/mm²) se encontró en los tratamientos más salinos y el mayor (175.17 estomas/mm²) en el menos salino en la cara abaxial de la hoja, indicando una probable forma de evasión anatómica por parte de las plantas de jitomate ante condiciones de estrés salino (Salas *et al.*, 2001).

De acuerdo con el contexto anterior, en la presente tesis se evaluaron 2 variedades comerciales de jitomate y 5 colectas silvestres, en las cuales se realizaron pruebas bioquímicas, morfológicas y genéticas, con el fin de determinar su tolerancia al estrés salino y realizar una caracterización molecular. Por otro lado se trabajó con 2 genes uno que codifica para la enzima lipoxigenasa (LOX) y otro que codifica para un factor de transcripción de genes de respuesta a etileno (JERF1) de los cuales se tienen estudios que otorgan mayor tolerancia al estrés por salinidad.

1.1 Objetivo general

Evaluar las respuestas morfológicas y bioquímicas al estrés salino de los distintos genotipos de jitomate con el fin de determinar su tolerancia o susceptibilidad.

Determinar la diversidad genética de las poblaciones evaluadas mediante marcadores moleculares tipo ISSR.

Observar la actividad de factores de transcripción que ayudan en la activación de mecanismos de tolerancia al estrés salino en plantas de jitomate.

1.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las respuestas de siete genotipos de jitomate a condiciones de estrés salino bajo invernadero.
- Medir caracteres morfológicos y bioquímicos de las plantas que podrían estar ligadas a la resistencia o tolerancia al estrés salino.
- Caracterizar molecularmente a los genotipos de jitomate por medio de marcadores ISSR.
- Identificar fragmentos de los genes LOX y JERF1 mediante PCR en todos los genotipos estudiados.
- Analizar la expresión de los genes LOX y JERF1 bajo condiciones de estrés salino.

1.3 Hipótesis

Mediante la evaluación de respuestas moleculares, bioquímicas y morfológicas es posible la identificación y diferenciación de genotipos de jitomate capaces de tolerar el estrés provocado por altas concentraciones de sal.

Los genotipos de jitomate comerciales tienen menor diversidad genética y por ello menor tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico que los genotipos silvestres, debido a la selección de dichos materiales que provoca la fijación de caracteres de interés agronómico.

La actividad de los genes asociados al estrés salino se relaciona con la tolerancia que pueda tener la planta al enfrentarse al estrés.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo como hortaliza

El jitomate, *S. Lycopersicon*, *S. esculentum*, se originó entre Perú y Bolivia y tuvo un centro de evolución en el sur de México, donde llegó hace unos 2 mil años. En México se desarrollaron formas de diversos colores en el fruto, aunque al principio eran deformes y arrugadas. El jitomate silvestre original era bilocular, como lo son todavía varias especies como el *L. pimpinellifolium*. El jitomate no ocupó un lugar preferente en las culturas precolombinas, y hasta que en Europa se desvaneció la idea de que era venenoso se comenzó a cultivar de forma comestible no como una planta ornamental, fue reconocido como hortaliza por los italianos en 1550, época en la que comenzó a ser apreciado. Llegó nuevamente a América en 1800 para ser “redescubierto” (Casseres, 1980).

2.2 Evolución y taxonomía

El clado del cual deriva el jitomate, es un grupo joven que se ha diversificado para ocupar una gran diversidad de hábitats. Los años estimados del género *Solanum* son 12 millones, basados en el 18S rDNA y el marcador de la ribulosa-bifosfato carboxilasa de la subunidad larga del cloroplasto (*rbcL*) por sus siglas en inglés y la ATP sintetasa B (*atpB*) (Wikström *et al.*, 2001); y la dispersión del clado del jitomate se estima en 7 millones basado en genes nucleares (Nesbitt & Tanksley, 2002). En éste periodo de tiempo, las especies de jitomate han ocupado varios hábitats a lo largo de las costas de sur América, por Ecuador, el Norte de Chile, y las Islas Galápagos, en altitudes de 3 mil metros sobre el nivel del mar, con varios grados de variación térmica. Para la biología evolutiva, el grupo es un buen ejemplo de una rápida evolución y adaptación a diversos ambientes y condiciones de estrés. Para tener una idea, los jitomates silvestres contienen genes útiles que pueden ser transferidos en los cultivares de jitomate, un amplio rango de resistencias a múltiples patógenos, tolerancias a drogas, salinidad y otros. El germoplasma encontrado en las variedades silvestres dará un amplio respiro al cultivar de jitomate (Ricket *et al.*, 1986).

2.2.1 Posición taxonómica

Tradicionalmente, el jitomate silvestre y el cultivado se colocan en la especie *Lycopersicon* en la familia de las Solanaceas, esto basado en los caracteres sexuales de la flor. Sin embargo, esto se ha considerado por el flujo del tomate en los últimos 450 años. En Europa los botánicos reconocieron la relación cercana del jitomate con el género *Solanum* y lo refirieron como *S. pomiferum*. Tournefort (1694) fue el que le dio nombre al jitomate como *Lycopersicon*, tenía un largo y multilocular fruto y por ello lo incluyó en *Solanum*, posteriormente en *Species Plantarum* se incluye como *Solanum Lycopersicum* (el jitomate cultivado) y *S. peruvianum*. Se vuelve a describir del mismo modo en The Gardener's Dictionary siguiendo los descriptores hechos por Tournefort y formalmente descrito como *Lycopersicon* (1754). Posteriormente, Miller (1768) hace descriptores basados en el sistema binomial de Linnaeus. Siguiendo esto se tienen tres especies *L. esculentum*, *L. peruvianum*, y *L. pimpinellifolium*. También estudió las papas y las clasificó como *L. tuberosum*, dijo que “éstas plantas (la papa) siempre fueron colocadas en el Género *Solanum* y ni el Dr. Linnaeus ha separado a *Lycopersicon* como un género distinto, teniendo en cuenta que el fruto se divide en celdas con una partición intermedia, como el fruto de ésta planta (el jitomate) concuerda con las características de otras especies de éste género, lo coloqué ahí”. En posteriores ediciones de The Gardener's and Botanist's Dictionary (Miller, 1807) el editor Thomas Martyn, siguiendo el criterio de Linnaeus incluye a *Lycopersicon* dentro de *Solanum*. Pero por los argumentos de Miller en esa época se seguía llamando *Lycopersicon* por la mayoría de los taxónomos. Hoy en día, se incluye al jitomate en el género *Solanum* y es ampliamente aceptado, soportado por evidencias en estudios filogenéticos de la familia Solanaceae basados en criterios moleculares y morfológicos. Estos resultados en filogenética muestran que los jitomates están profundamente entrelazados al género *Solanum* (Spooner *et al.* 1993, 2005; Bohs & Olmstead 1997; Olmstead & Palmer 1997; Olmstead *et al.* 1999; Peralta y Spooner 2001; Bohs, 2005).

2.2.2 Relaciones filogenéticas

Las relaciones evolutivas en el grupo del jitomate han sido difíciles de resolver debido a la joven edad del grupo, que incrementa la probabilidad de compartir polimorfismo con otros grupos, y baja los niveles de variación respecto de él con otros taxa. Morfológicamente, la clasificación ha sido difícil porque no se determinan variaciones buenas en la intraespecificidad. Se realizó un estudio de variabilidad genética en jitomate silvestre, usando caracteres morfológicos y caracteres moleculares de cloroplasto y mitocondria, así como RFLPs, isoenzimas, espaciadores internos transcritos (ITS), y de la enzima sintetasa de almidón (GBSSI o waxy), secuencias simples repetidas (SSRs), y amplificación de fragmentos polimórficos (AFLPs) para determinar las relaciones genéticas existentes entre los mismos. Se encontró que las relaciones evolutivas del grupo no están completamente resueltas y de hecho emergieron aspectos importantes del grupo (Peralta & Spooner, 2001), como se indica a continuación.

Los jitomates *S. Lycopersicon* son claramente monofiléticos y hermanos de las papas. El grupo *Juglandifolia* es claramente monofilético y hermano de *Lycopersicon*. *S. pennellii* es un grupo hermano del resto de tomates *Lycopersicon*. *S. chilense*, *S. corneliomulleri*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites* y *S. pennellii* tienen politomías entre ellos; en las relaciones morfológicas si forman un grupo, pero con los marcadores AFLPs relacionan a *S. huaylasense* con *S. arcanum* pero en mayor grado con *S. chilense*. En casi todos los análisis de datos el conjunto comprendido con frutos verdes como *S. chmielewskii* y *S. neorickii* están cercanamente relacionados a *S. arcanum* integrando un grupo monofilético. Las cuatro especies con color del fruto brillante sin excepción forman un grupo monofilético (*S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. lycopersicum*, y *S. pimpinellifolium*) (Figura 1).

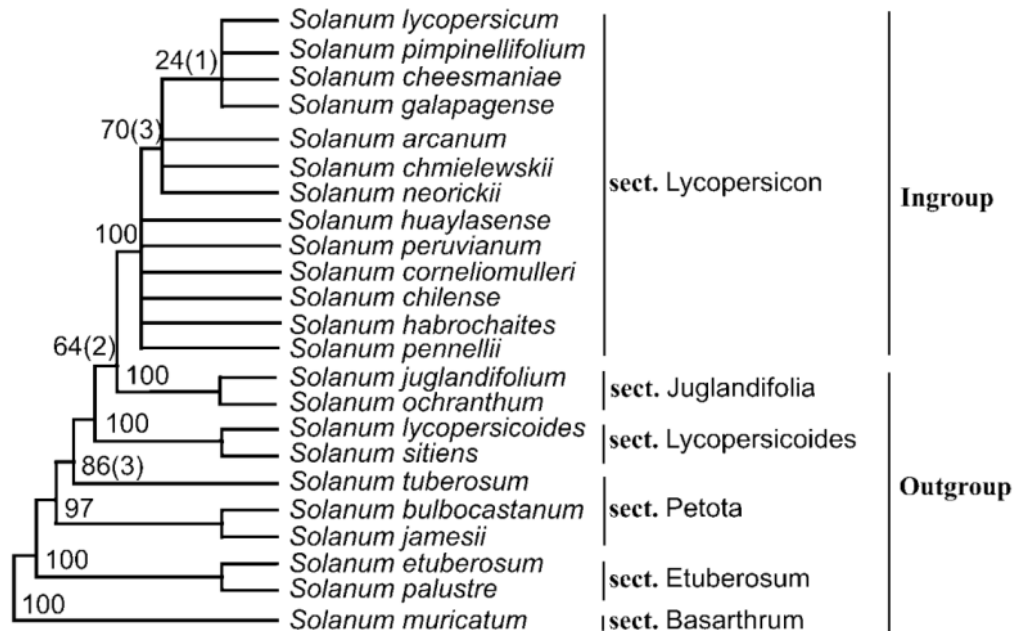


Figura 1. Cladograma con 65 accesiones de 13 especies de jitomate (en grupos de sect. *Lycopersicon*) y otros grupos de taxa (sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicoides*, sect. *Petota*, Sect. *Etuberosum* y sect. *Basarthrum*) examinados en el análisis filogenético GBSSI por Peralta y Spooner (2001) con marcadores AFLPs. Los números indican las coincidencias en el remuestreo y entre paréntesis las veces que no aparece ese grupo.

2.2.3 La evolución del color del fruto

Las variables de los caracteres del jitomate han generado mucha atención para entender las dinámicas evolutivas del grupo. Lo más obvio de estos caracteres es la evolución de los pigmentos carotenoides que afectan el color del fruto. El color del fruto de los tomates silvestres va de verde a rojo, naranja y amarillo. Varios estudios han demostrado que el verde del fruto es el carácter ancestral y éste color surgió una vez con el calado y éste origen se cree que tiene cerca de un millón de años. La razón por la cual existe una transición del color del fruto en la evolución del grupo no se sabe, pero se cree que podría estar relacionado con la dispersión de la semilla (Marshall *et al.*, 2001; Peralta & Spooner, 2001).

2.2.4 Sistema de evolución

Los caracteres como la autogamia (autocompatibilidad) y la alogamia (autoincompatibilidad), han tenido un papel importante en la evolución del clado en los jitomates silvestres. La alogamia (autoincompatibilidad) es un carácter ancestral en el jitomate, y la pérdida de la autoincompatibilidad ocurrió en tiempos diferentes. Es notable que la autoincompatibilidad se perdiera en algunas poblaciones de *S. pennellii*, algunas poblaciones de *S. habrochaites* y en el clado continuo de *S. neorickii* y *S. chmielewskii*. En el grupo siguiente se perdió la alogamia formando un grupo monofilético. En cuanto a los niveles de autocompatibilidad se ha demostrado que hay un reducido número de variaciones genéticas en las especies silvestres de jitomate. Sobre la autocompatibilidad del taxa, la variación existe en grado de la alogamia, se tiene que muchas poblaciones cambian hacia la alogamia en grados de ocurrencia de 0 a 40 % (Alvarez *et al.*, 2001). Dos especies a menudo crecen en contacto una con la otra, liderando la especulación que *S. neorickii* quizá evolucionó de *S. chmielewskii* por adquirir reproducción autógena, los estudios de aloenzimas encontraron gran diversidad en *S. chmielewskii*. Pero dentro y entre las especies autocompatibles, en las hojas se ha visto que se relacionan con variaciones morfológicas, incluyendo el largo de la corola y la mayor extensión del estigma, la cual ayuda a la polinización cruzada (Rick *et al.*, 1986).

2.3 Domesticación

La distribución de las especies silvestres de jitomate se encuentra en los Andes, el sitio de domesticación es incierto. Se tienen dos hipótesis, una indica que la domesticación de la especie fue en el sur de México contra la otra que nos dice que fue en Perú. La primera establece que la domesticación ocurre primero con los jitomates tipo “cherry” que migraron del Perú a Meso-América, y se domesticó en México. Por otro lado se tiene evidencia de que el uso del jitomate como alimento probablemente ocurrió en Centro América lo que es demostrado por la cultura, lengua, documentos históricos, así como por estudios genéticos. Respecto a la cultura, se tiene que existen textiles y cerámica donde se describen

las plantas cultivadas, una práctica común de las culturas Pre-Colombinas en Perú. Plantas importantes como maíz, papa, pepino, y otras aparecen en esos objetos pero no el jitomate. Existen cerámicas con una representación de las flores de la Solanaceas, posiblemente de la papa, pero que no corresponden con las de jitomate. Sin más no se han descubierto jitomates preservados en Perú o algún nuevo vestigio arqueológico que sugiera que se domesticó ahí. La palabra “tomate” o “jitomate” es derivada del “tomatl”, la palabra Azteca para dicha planta. Los Aztecas mezclaron tomates, chiles y otras semillas dentro de los molcajetes para hacer salsas, por el contrario los peruanos no tienen ninguna mención en sus registros que fueran importantes para la dieta o ni una palabra especial para tomate, se tiene reportada su mención hasta que ocurrió la conquista de México y Perú. Los registros italianos de los herbolarios mencionan el nombre tomate por Matthiolus (1544) lo que nos da la idea de una introducción temprana del jitomate como planta comestible por los italianos junto con el aceite, la sal y la pimienta. La temprana información de estos datos favorece el origen Mexicano del jitomate y también hay que tener en cuenta que la conquista de México por los españoles se dio en 1521, contra la conquista de Perú, que ocurrió en 1531 (Rick, 1995; Gould, 1983; Cutler 1998).

Un trabajo con aloenzimas demuestra que América Central es el sitio de domesticación. Los jitomates introducidos de Europa son homogéneos al compararlos con los jitomates tipo “cherry” del sur de México y América Central, pero distintos de los de América el Sur. Se tiene que las colectas de la región de los Andes para los tipo “cherry” tienen una variabilidad genética mayor comparándolas con otras regiones. Esto es consistente con el modelo de migración del centro de origen, bajo un efecto fundador, selección, y la consecuente pérdida de variación que conlleva dicho proceso. En muchos cultivares, una reducción de la diversidad genética es una de las mayores características que acompañan la domesticación, y esto parece que es verdad para el jitomate (Rick & Holle, 1990). El debate continúa si se domesticó primero en Perú o en México y hay referencias para ambas domesticaciones, pero se

deben obtener más evidencias para reafirmar los puntos en ambos casos, pero por las evidencias actuales se favorece la domesticación en México.

2.4 Distribución

Los españoles distribuyeron una gran cantidad de vegetales y frutas a través de su imperio. De América Central y México, los españoles los introdujeron en el Caribe y Filipinas, de Filipinas llegaron al Sureste de Asia y en última instancia a todo Asia (Smith, 1994). Con los españoles el jitomate también fue tomado y diseminado en Europa. Una mención temprana está en la literatura Italiana por el herbolario Petrus Andreas Matthiolus (1544), él describe al jitomate como “pomi dóro” (manzana dorada), indicando que el jitomate que se utilizó como comida por los europeos era de fruto amarillo. Los jitomates rojos fueron introducidos a Italia por los padres Católicos años después, se documentan en 1554 por Matthiolus (McCue, 1952). En Europa se tenía la creencia que era una planta tóxica, debido a su parecido con la belladona, el beleño y la mandrágora. Los ingleses mencionan que era una planta ornamental, pero en un escrito del jardín inglés de 1596 indica: “estas encantadores manzanas se las comen en el extranjero” y, se consideró que la planta entera tenía “un olor distintivo y pestilente”. En 1623 se distinguieron 4 tipos de tomates: rojos, amarillos, naranjas y dorados (Gould, 1983). De alguna forma los autores ingleses aumentaron el prestigio del jitomate en los 1750 al atribuirle el nombre científico *Lycopersicon esculentum* que significa “melocotón de lobo comestible”, el nombre se lo dio Miller. En 1752 el jitomate fue usado por los ingleses para darle sabor a las sopas. En 1758 el jitomate aparece en un libro de cocina británico muy popular “The Art of Cookery” por Hannah Glass (Cutler, 1998).

2.5 Países productores de jitomate

De acuerdo con la información de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la superficie de cosecha para el jitomate a nivel mundial creció a una tasa promedio de 1.7 % entre el 2004 y 2014, para ubicarse en 5.0 millones de hectáreas. En el mismo periodo, los rendimientos

promedio crecieron a un ritmo menor como se muestra en la Figura 2, de 1.2 % promedio anual, al ubicarse en 2014 en 34.0 toneladas por hectárea.

El 54.5 % de la superficie cosechada de jitomate en 2014 se concentró en cuatro países: China (19.2%), India (18.8%), Nigeria (10.8%) y Turquía (6.4%). México ocupa la décima posición mundial, con el 1.8 por ciento de la superficie cosechada de esta hortaliza.

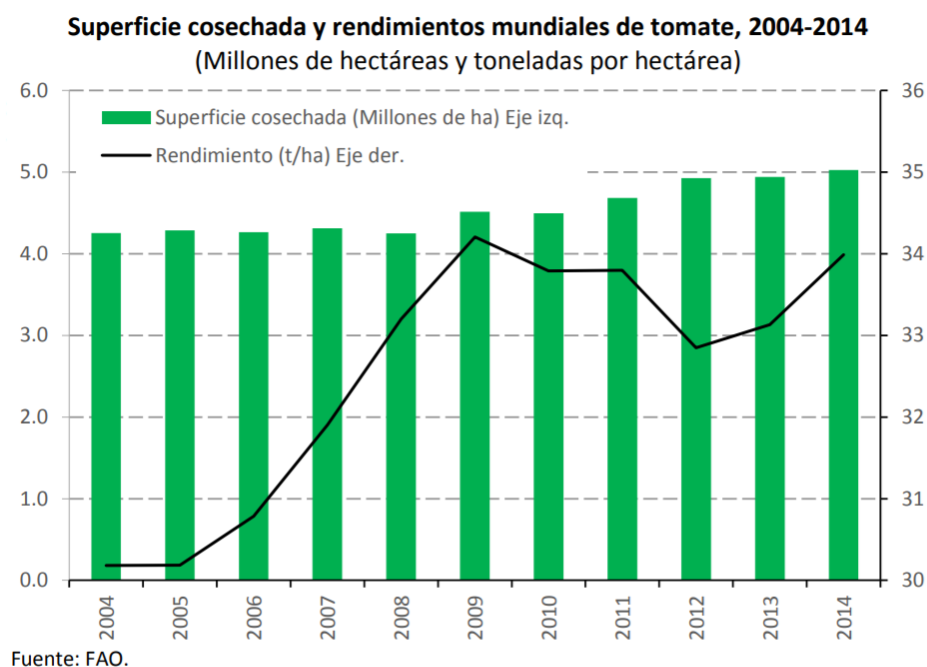


Figura 2. Superficie cosechada y rendimientos mundiales de jitomate, 2004-2014.

En 2014, la producción mundial de jitomate se ubicó en un máximo histórico de 170.8 millones de toneladas como se muestra en la Figura 3. Entre 2004 y 2014, ésta creció a una tasa promedio anual de 2.9 %. Lo anterior, impulsado tanto por aumentos en la superficie cosechada, como por incrementos en la productividad promedio. El 62.1% de la producción se concentró en cinco países: China (30.8%), India (11.0%), Estados Unidos (8.5%), Turquía (6.9%) y Egipto (4.9%), incluyendo tomate rojo y verde (Figura 3).

En China e India entre el 2004 y 2014 el volumen promedio creció a tasas de 5.9 y 9.1 por ciento, respectivamente. En china, el aumento se debe a un incremento en la productividad, en tanto que en India se destinó mayor superficie para el cultivo de la hortaliza. Así, la participación de China en una década pasó de 23.4 a 30.8 % y en India de 6.3 a 11.0 % (Figura 3).

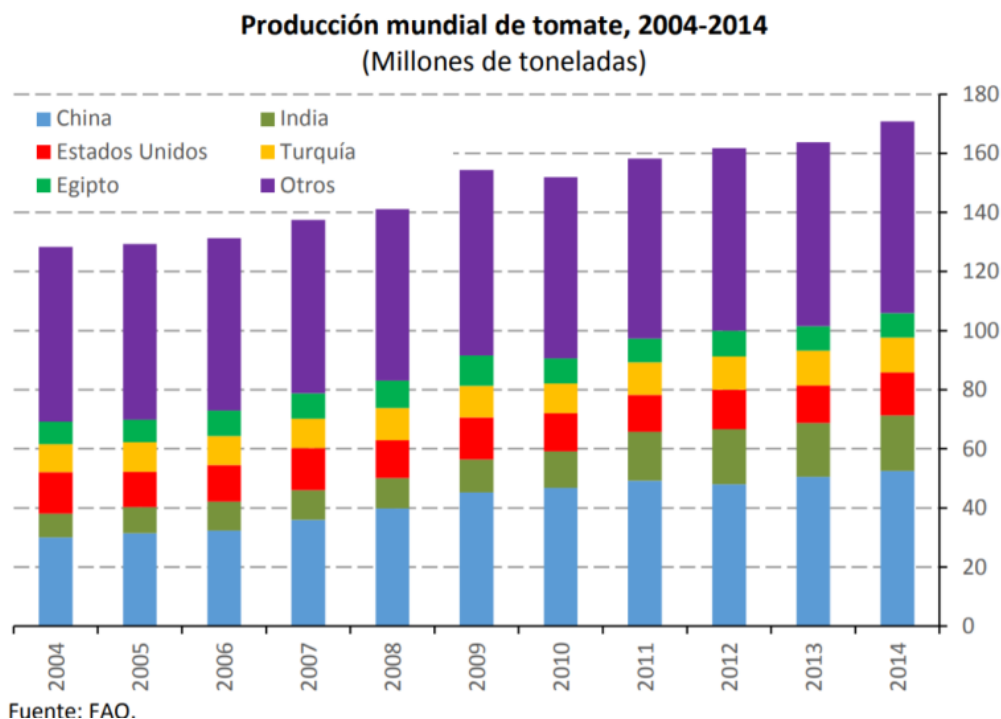


Figura 3. Producción Mundial de Jitomate, 2004-2014.

La superficie cosechada de jitomate en Estados Unidos decreció entre 2004 y 2014 a una tasa promedio anual de 0.6 %, mientras que el rendimiento creció a una tasa de 1.0%. Así, la producción aumentó a una tasa promedio anual de 0.4 %. Sin embargo, la participación de este país en la oferta mundial se redujo de 10.9 a 8.5% (Figura 3).

La producción de jitomate en Turquía y Egipto creció a tasas promedio anuales de 2.3 y 0.8 % entre el 2004 y 2014, respectivamente. En Turquía la superficie establecida con el cultivo de jitomate ha crecido principalmente en invernaderos, con el consecuente incremento en la producción. El jitomate es la hortaliza de

mayor importancia en la producción agrícola de ese país, como uno de los productos más relevantes en sus exportaciones hacia la Unión Europea, principalmente (Figura 3).

En 2014, México ocupó la décima posición en la producción mundial como se muestra en la Figura 4, con una participación de 2.1 %.

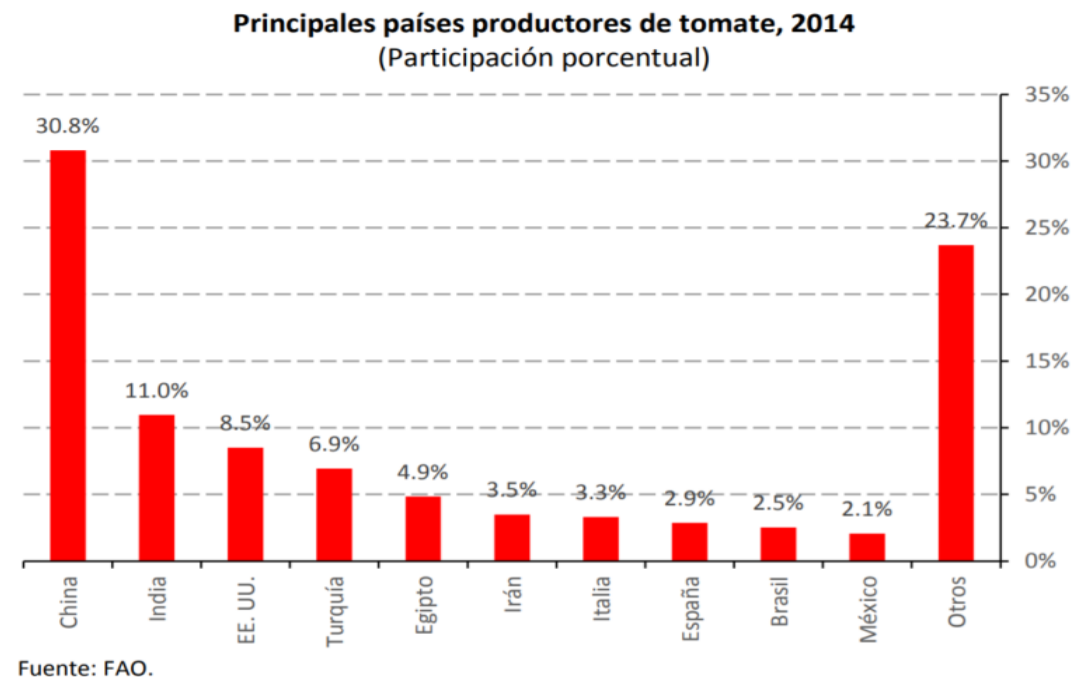


Figura 4. Principales países productores de tomate en el año 2014.

2.6 Consumo mundial

La década que corresponde a 2003 y 2013 se muestra en la Figura 5, el consumo de jitomate promedio anual creció a 3.2 %, al ubicarse en 159.4 millones de toneladas. La demanda de esta hortaliza creció a un ritmo mayor en China e India: 5.6 y 9.0 % promedio anual, respectivamente. En Estados Unidos, el crecimiento del consumo ha sido más moderado, con una tasa promedio anual de 0.9% (Figura 5).

Durante esa década el consumo promedio mundial de jitomate pasó de 16.7 kg a 20.6 kg, en tanto que en los dos principales países consumidores creció a un

ritmo mayor; en China pasó de 19.3 a 31.1 kg y en India se incrementó de 6.3 a 12.9 kg. Por su parte, el consumo per cápita en Estados Unidos se ha mantenido estable, con un promedio de kg durante ese periodo (Figura 5).

Turquía y Egipto registraron los mayores niveles de consumo per cápita en el mundo, con 98.7 y 90.1 kg por persona por año en 2013, respectivamente (Figura 5).

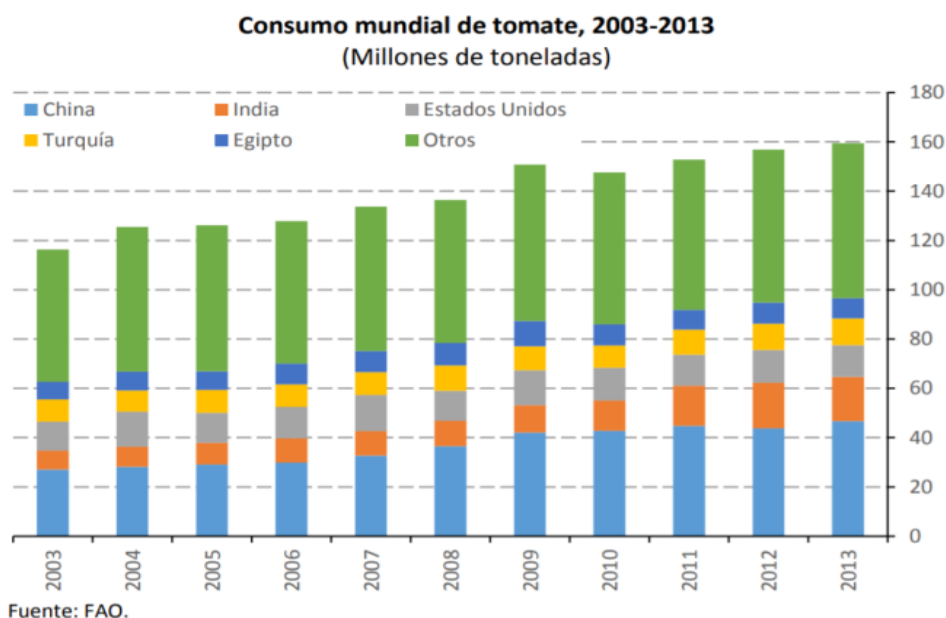


Figura 5. Consumo mundial de jitomate, 2003-2013.

2.7 Comercio internacional

Entre el 2005 y el 2015, las exportaciones mundiales crecieron a una tasa promedio anual de 3.8 %. En este rubro destacan México y Holanda, que participaron en 2015 con 20.3 y 15.1 % del volumen mundial exportado, respectivamente. Las exportaciones de estos países crecieron a tasa promedio anual de 5.6 y 3.5% durante esta década.

España, el tercer exportador mundial, participa con un 12.7% de las ventas mundiales; el volumen exportado de este país creció a una tasa promedio anual de 0.1 %. Otros importantes exportadores, son Turquía (7.3%) y Marruecos

(5.6%) que registraron un crecimiento sobresaliente de sus ventas al exterior durante el periodo 2005-2015.

El 50.1% del volumen mundial importado en 2015 se concentró en 4 países: Estados Unidos (22.3%), Alemania (10.7%), Rusia (9.3%) y Francia (7.7%). El volumen de compras estadounidense creció a una tasa promedio anual de 5.2% entre 2005 y 2015, mientras que las importaciones de Alemania y Rusia lo hicieron a una tasa promedio anual de 1.2% y 6.6 %, respectivamente.

En el 2015, México fue el principal exportador de jitomate en términos de volumen y valor de las ventas al exterior. En ese año, abasteció el 90.8% del volumen importado por Estados Unidos.

Holanda participa solamente con alrededor de 0.5% de la producción mundial de jitomate. Sin embargo, importa producto de España, Bélgica, Marruecos y Francia, principalmente, y lo reexporta a Alemania, Reino Unido, Italia y Suecia, entre otros.

Por otra parte, el precio del jitomate rojo en Estados Unidos, principal importador de esta hortaliza, registra fuertes variaciones durante el año. Desde 2012 mantiene tendencia al alza, y durante enero de 2016 alcanzó un nivel máximo histórico. Lo anterior, debido a la disminución en el abasto en ese país, por las afectaciones climáticas a la producción en Florida.

En enero del 2009 se vendía la tonelada en 3400 dólares y en junio en 3550, en abril del 2010 se vendió en 4600 y en septiembre del mismo año en 3100; como se ve varían mucho los precios pero rondan entre los 2900 a un máximo de 5600 dólares por tonelada que se alcanzó en febrero del 2016.

2.8 Comercio nacional

El cultivo del jitomate rojo es el quinto en importancia por su contribución en el valor de la producción agrícola primaria en México. En 2016, participó con 4.6 %

del valor total, después del maíz en grano (19.4%), la caña de azúcar (6.0%), el aguacate (5.9%) y el chile verde (4.7 %).

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción de jitomate rojo en México creció a una tasa promedio anual de 4.8% entre 2006 y 2016, por ubicarse en un volumen máximo histórico de 3.3 millones de toneladas.

Entre el 2012 y 2016 aumentó la superficie de cultivo tecnificada o semi tecnificada con malla sombra e invernaderos, un promedio de 26 % de las superficie total. Así, durante ese periodo se produjo en dichos lugares un 58% de la producción nacional (SAGARPA, 2016).

Entre el 2007-2011, la proporción sembrada con agricultura protegida (malla sombra e invernadero) fue de 8% del total, y la producción obtenida fue de un 24% del total. El aumento de la agricultura protegida se asocia principalmente con la obtención de cosecha de jitomate de mayor calidad para el mercado de exportación a Estados Unidos. Se estima que el jitomate rojo es la principal hortaliza producida en México con agricultura protegida (70%), seguido de pimiento (16%) y pepino (10%); el resto son productos como flores, chiles, berries y papaya (SAGARPA, 2016).

En Querétaro, Estado de México, Chihuahua y Zacatecas se obtienen los rendimientos más altos en la producción de jitomate. Se puede sugerir que es debido al avance en el cultivo en invernaderos y a la eficiente aplicación de programas de control de plagas y enfermedades (SAGARPA, 2016).

Los precios en el mercado nacional rondan entre los 13500 pesos la tonelada a los 2 500 pesos. Depende de la variedad, el “cherry” es el que ha llegado a los 13 500 pesos la tonelada. En el caso de la variedad “saladette” el precio al mayoreo ronda entre los 5 mil a los 17 mil pesos y la misma tonelada para el consumo al público se vende en 23 mil pesos (SAGARPA, 2016).

2.9 Estrés vegetal

Se tomó en cuenta que el estrés tiene un papel importante en la determinación del modo en que el suelo y el clima limitan la distribución de las especies vegetales. Por ello, la comprensión de los procesos fisiológicos que subyacen en el estrés por heridas, así como los mecanismos de adaptación y aclimatación de las plantas al estrés ambiental es de gran importancia tanto para la agricultura como para el medio ambiente. El estrés se define como un factor externo que ejerce una influencia negativa sobre la planta. En muchos casos, el estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO₂ y minerales) que están relacionados con el crecimiento (Taiz & Zeiger, 2006).

Se analizó que la tolerancia al estrés es la capacidad de la planta para hacer frente a condiciones desfavorables. En la literatura, el término resistencia al estrés se suele utilizar como un sinónimo de tolerancia al estrés, aunque se prefiera el último. Si la tolerancia aumenta como resultado de una exposición previa al estrés, se dice que la planta está aclimatada. La aclimatación se distingue de la adaptación porque ésta última se refiere al nivel de resistencia determinado genéticamente, que se ha adquirido por un proceso de selección tras numerosas generaciones. Lamentablemente, el término “adaptación” se utiliza en la literatura para indicar aclimatación. Y para aumentar la complejidad, la expresión genética tiene un papel importante en la adaptación. La respuesta al estrés incluye cambios en el ciclo celular y en la división celular, cambios en el sistema de endo-membranas, en la formación de vacuolas y cambios en la arquitectura de la pared celular, lo que conduce a un aumento de la tolerancia al estrés de las células. A nivel bioquímico, las plantas alteran el metabolismo en varias rutas para adaptarse a los estreses ambientales, incluida la producción de compuestos osmoreguladores como prolina y glicina betaína. Los procesos moleculares que relacionan la percepción de la señal de estrés con las respuestas genómicas que conducen a la tolerancia han sido estudiados estos últimos años (Taiz & Zeiger, 2006).

Se ha observado que los organismos en todo momento están sometidos a cambios dados por la concentración de luz, agua, nutrientes, temperatura, así como otros organismos que les enfermen o les provoquen daños en su estructura o las características en las que se encuentra su ambiente. Los factores climáticos, de suelo y que no sean provocados por un organismo vivo se les llama factores abióticos y aquellos en los que exista un cambio relacionado con un organismo vivo se les llama factores bióticos (Fujita *et al.*, 2006).

2.9.1 Estrés biótico

El estrés biótico se ha definido como aquel causado por la acción de otros seres vivos, entre los que se pueden mencionar los provocados por hongos, virus, nematodos y bacterias, éstos organismos se valen de medios para esquivar las defensas de las plantas, utilizan los estomas u otros órganos de comunicación natural entre la planta y el medio, mientras que otros utilizan presión mecánica o segregan enzimas específicas para romper los tejidos de la planta. Sin embargo, la mayoría invade tejidos enfermos o dañados (Fraser, 1952). La interacción entre plantas es otro apartado del estrés abiótico debido a que existe competencia por la luz, el agua y nutrientes y esto limita su desarrollo (Bertness & Callaway, 1994). Las estrategias que utilizan las plantas para asegurarse el acceso a dichos recursos son crecimiento rápido en longitud, la secreción de sustancias tóxicas para otras plantas (alelopatía) o el parasitismo (Weston, 1996). Los insectos pueden causar daño en las plantas, entre ellos se tiene a los chupadores que son capaces de transmitir virus o microorganismos en el tejido de la planta y los masticadores que raramente transmiten virus, pero dejan el tejido vegetal dañado y expuesto a ataques de hongos y bacterias necrófagos. Los vertebrados herbívoros también causan daño, dependiendo de qué es lo que se comen y el tiempo de desarrollo de la planta y actúan como vectores de microorganismos (Charco, 2002).

2.9.2 Estrés abiótico

El estrés ambiental o abiótico se ha definido como una fuerte restricción para el aumento de la productividad y de la extensión de los cultivos. Se estima que únicamente un 10% de la superficie de la tierra arable se encuentra libre de estrés. Cerca del 20% de la tierra presenta algún tipo de deficiencia o toxicidad mineral, 26% es afectada por estrés de sequía y 15% por congelación (Blum, 1988). Por un lado se tiene que el déficit hídrico se suele asociar a la salinidad en la rizosfera y al estrés por calor en las hojas (resulta del enfriamiento por evaporación debido a la baja transpiración) y el enfriamiento o congelación conducen a la reducción de la actividad hídrica y el estrés osmótico. También se tiene que las plantas presentan tolerancia cruzada, es decir, tolerancia a un estrés inducida por la aclimatación a otro. Este comportamiento implica que los mecanismos de resistencia a varios estreses comparten características comunes (Taiz & Zeiger, 2006).

Las plantas reaccionan a el estrés con un segmento completo de mecanismos, un ejemplo de ellos es que el estrés abiótico aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno en las células de las plantas y para contrarrestar eso producen isoprenoides que mitigan el estrés oxidativo que se produjo en las células (Vickers *et al.*, 2009). Por otro lado se tiene la resistencia a los metales pesados proporcionada por las metalochaperonas que son proteínas importantes en el transporte de metales iónicos llamadas HIPPs (heavy metal-associated isoprenylated plant proteins, por sus siglas en inglés) que contienen dominios de unión a metales (HMA) y un motivo final de Caax isoprenilación en el carboxilo terminal (Zhang *et al.*, 2015). Para la resistencia al estrés osmótico se tiene que la glicina betaina (GB) y la prolina son de los dos mayores osmolitos que se acumulan en la planta en respuesta a el estrés por drogas, sal, temperaturas extremas, radiación UV y metales pesados (Ashraf & Foolad, 2007).

Una vía muy importante en la respuesta al estrés son las rutas de transcripción que están compuestas de proteínas de integración (factores de transcripción) con secuencias reguladoras específicas en los promotores de los genes que regulan

la activación o no de los genes. Genes diferentes que están inducidos por la misma señal (deseccación o salinidad, por ejemplo) están controlados por una ruta de señalización que conduce a la activación de estos factores de transcripción. Los promotores de los genes regulados por ABA contienen una secuencia de seis nucleótidos conocida como elementos de respuesta a ABA (ABRE), que probablemente se unen a los factores de transcripción implicados en la respuesta a ABA. Los promotores de otros genes, que están regulados por estrés osmótico de modo independiente de ABA, contienen un elemento alternativo formado por una secuencia reguladora de nueve nucleótidos, el elemento de respuesta a la deshidratación (DRE) que es reconocido por un conjunto alternativo de proteínas de regulación de la transcripción (Taiz & Zeiger, 2006).

Así, los genes que se inducen por estrés osmótico parecen estar regulados ya sea por rutas de transducción de señales mediadas por la acción de ABA (genes dependientes de ABA), o bien por una ruta alternativa que responde al estrés osmótico y que es independiente de ABA. La acción de los factores de transcripción (llamados DREB1 y DREB2) que se unen a los elementos DRE en los promotores de los genes que responden al estrés osmótico, aparentemente, son activados por una cascada de señalización independiente de ABA. Otros genes que responden al estrés osmótico de forma independiente al ABA parecen estar directamente controlados por una cascada de señalización de las MAP quinasas, y existen mecanismos que no implican a DRE. La complejidad y las comunicaciones que existen entre distintos promotores, factores de transcripción y paquetes de genes que se encienden a la vez tiene como consecuencia una riqueza de adaptación al estrés de las distintas plantas (Taiz & Zeiger, 2006).

2.10 Estrés por déficit hídrico

Los cultivos agrícolas que se han trabajado principalmente en zonas semiáridas, sufren periodos de sequía durante alguna etapa de su desarrollo, la sequía al igual que una alta concentración de sal y las temperaturas bajas generan que la tasa de transpiración exceda a la toma de agua, generando el mismo efecto de estrés por déficit hídrico. A menudo la expresión del rendimiento depende de

algunos mecanismos para disminuir la transpiración y así prevenir daños por deshidratación. Cuando el estrés hídrico alcanza un nivel significativo en las plantas, ocurren mecanismos como el cierre estomático, enrollamiento, doblado o pérdida de hojas, ajuste osmótico y otros que disminuyen la pérdida de agua por la planta (López *et al.*, 2001).

Se ha comprobado que a medida que el contenido hídrico de la planta disminuye, las células se encogen y las paredes se relajan. Esta reducción en el volumen celular da lugar a una menor presión de turgencia y a la consiguiente concentración de los solutos en las células. La membrana plasmática se hace cada vez más gruesa y más comprimida porque cubre un área menor. Como la pérdida de turgencia es el primer efecto biofísico significativo del estrés hídrico, las actividades que dependen de la turgencia como la expansión foliar y la elongación radicular son las más sensibles a la deficiencia hídrica. La expansión celular es un proceso inducido por la turgencia y es extremadamente sensible al déficit hídrico. Una respuesta al estrés hídrico es la senescencia y la abscisión, esta última puede deberse fundamentalmente al incremento en la síntesis y la captación de la hormona vegetal etileno (Taiz & Zeiger, 2006).

En general en jitomate se ha visto que el déficit hídrico afecta cada aspecto del crecimiento de la planta que involucra a la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica. Entre los efectos generales más obvios del estrés hídrico son los fallos en la germinación, la reducción en la altura de la planta, área foliar y rendimiento del cultivo. Se tiene que además disminuye el número de flores y frutos, en la masa promedio de los frutos, las masas frescas y secas de la planta y del porcentaje de fructificación conjuntamente con el potencial hídrico de la hoja y el uso eficiente de agua, asociados con incrementos de temperatura en la hoja y la resistencia estomática. En el cultivo de tomate se ha detectado que una elongación de las raíces rápida y temprana es un indicador importante de resistencia al estrés (Florido & Bao, 2014).

2.11 Acumulación de solutos compatibles

Jiménez *et al.* (2015) demostraron que las plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a 50 mM de cloruro de sodio (NaCl) muestran una acumulación de prolina, que puede descompensar el equilibrio osmótico. Y en estas condiciones el efecto de la sal provoca un choque osmótico pero solo un leve desequilibrio iónico. Esto coincide con un “priming” o cebado que consiste en la sensibilización de las plantas ante un primer estímulo de estrés. Se encontró que se generó una respuesta epigenética al aplicar MSB (un derivado de la vitamina K3) a 20 mM, causando una huella epigenética en los promotores de prolina (P5CS1 y ERD5) que, como consecuencia, aumentan su expresión y la cantidad de este aminoácido en el citoplasma celular, esencial para contrarrestar el choque osmótico provocado por la sal.

Se ha encontrado que la glicina betaína (GB) y la trehalosa también ayudan a contrarrestar los efectos del estrés abiótico al proporcionar protección a las proteínas y estructuras de la membrana en contra de la deshidratación, regulando el estatus redox o actuando como desintoxicadores de radicales libres, en plantas superiores. La GB es inducida por estrés hídrico y por estrés salino, por sobreexpresión de las enzimas colina monooxigenasa (CMO) y betaína aldehído deshidrogenasa (Papageorgiou y Morate, 1995). La prolina es un osmolito muy estudiado en el jitomate, sin embargo se tiene que algunos autores mencionan que su acumulación en las células vegetales es un síntoma de daño, mientras otros consideran que es un mecanismo de tolerancia, esto debido a que a corto plazo no ayuda pero a largo plazo puede mitigar los efectos dañinos (Pineda *et al.*, 2012).

2.12 Ajuste osmótico

El ajuste osmótico es un fenómeno que se observó en las plantas, se produce a través de la biosíntesis de osmolitos y por la acumulación de iones, fundamentalmente K^+ y NO_3^- . La acumulación de iones se da en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos que no afectan la

funcionalidad de macromoléculas celulares (Buchanan y Balmer, 2005). Los solutos son principalmente moléculas de masa molecular pequeña (osmolitos) entre los que se tienen a azúcares solubles como la glucosa y la fructosa. A esta respuesta de sintetizar dichas moléculas se les conoce como osmorregulación. Este ajuste osmótico, influye en el crecimiento de la raíz para incrementar la extracción de agua, mientras exista la escasez de este recurso (Lakshmi *et al.*, 2009). El ajuste osmótico promueve la tolerancia a la deshidratación, pero no tiene un efecto importante en la productividad (Taiz & Zeiger, 2006).

2.13 Control de sodio dentro de la planta

Cuando *M. Crystallinum* se ha estudiado bajo estrés salino, se tiene que el sodio es acumulado y depositado en un gradiente a lo largo de su eje de crecimiento, con la mayor concentración depositada en las partes jóvenes de las hojas, donde es secuestrado dentro de la gran vacuola central de las células. Esto, en contraste con lo que sucede en las glicófitas, las cuales dirigen al sodio hacia las partes maduras de la planta en un intento de mantenerlo en las raíces. Las células llamadas vejiga guardan una gran cantidad de sodio en *M. Crystallinum*. Estas células son tricomas modificados y están en hojas y tallos, que se desarrollan durante el crecimiento de la planta, permanecen deprimidas en ausencia de sal pero se ven estimulados por ésta. Además, funcionan como reservorios de agua para las células fotosintéticas (mesófilo) que se encuentra dentro de la hoja (Adams *et al.*, 1998).

El secuestro de protones es debido a una bomba de (Na^+/H^+) que se activa por la bomba de protones del tonoplasto (V-ATPasa) la actividad de estos dos transportadores es inducida cuando las plantas o cultivos de células en suspensión son crecidos en presencia de sal. Las células vejiga tienen una mayor acumulación de sodio que se relaciona con una mayor actividad de la bomba Na^+/H^+ , y otros sitios que acumulan sodio son los tejidos jóvenes de las hojas (Barkla *et al.*, 2002).

Individuos tipo silvestres en *Arabidopsis* y en jitomate que mostraron poca actividad de la bomba Na^+/H^+ fueron sensibles a la salinidad, mientras que la sobre-expresión de la proteína responsable del intercambio Na^+/H^+ de *Arabidopsis*, ATNHX1, causó un aumento en el intercambio Na^+/H^+ y una mayor tolerancia a la salinidad en plantas transgénicas, la sola expresión del anti portador no confiere resistencia si no que son los tejidos y órganos donde se expresa, los factores determinantes (Barkla *et al.*, 2002).

Existen por lo menos 6 genes NHX en *Arabidopsis* relacionados. Solo un gen AtNHX1, es inducido igualmente por ambos iones lo cual sugiere que esa bomba funciona como un regulador del pH y de la osmorregulación del organelo donde se expresa, más que en la acumulación de sodio (Barkla *et al.*, 2002).

Para *M. crystallinum* al tener una bomba específica para sodio Na^+/H^+ y al no tener una inducción del intercambiador Na^+/H^+ en presencia de potasio, se sugieren que dicha bomba es un gen diferente de AtNHX1. La bomba NHX1 en *M. crystallinum* no se encuentra en el tonoplasto, ello se probó mediante una prueba de anticuerpos (Amtmann *et al.*, 2005).

Un estudio hecho con *T. halophila* demostró que hace un estricto control del sodio en la membrana celular y la vacuola, el intercambiador Na^+/H^+ SOS1 aumenta, pero no así la AHA3 ni la de HKT1. La expresión de NHX1 sólo se observó en la membrana plasmática de la raíz, la cual fue inducida por la salinidad. Hubo un aumento de la expresión de las proteínas VHA-E (bomba de sodio y protones) en las hojas pero no en las raíces, *T. halophila* lleva un control del movimiento iónico a través del tonoplasto y de la membrana plasmática (Vera-Estrella *et al.*, 2005).

2.14 Las acuaporinas y los canales de agua

Se han hecho estudios con acuaporinas (AQP) o canales de agua en las plantas, constituyen un grupo genético muy grande y juegan un papel esencial en los procesos biológicos. Son 4 familias: de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), las proteínas parecidas a la nodulina 26 (NIP),

grupo donde se encuentran proteínas que facilitan el transporte del glicerol y las pequeñas proteínas básicas integrales (SIP). Estímulos como la salinidad, la sequía el ácido abscísico provocan cambios en la expresión de las TIP y las PIP. Debido a algunos estudios se ha logrado ver que se transcriben las TIP y PIP pero no siempre se genera la proteína al aumentar la transcripción, en *M. crystallinum*, se ha logrado diferenciar mediante péptidos-específicos que existe una regulación diferente entre el estrés salino y el estrés osmótico. Durante el estrés salino, la cantidad de la proteína McTIP1;2 se vió reducida en el tonoplasto mientras que la correspondiente a McPIP2;1 aumentó en raíz. Los otros tejidos no tuvieron cambios en la planta. El estrés osmótico induce un aumento en la proteína McTIP1;2 tanto en hojas como en raíz, que contrasta con la disminución dada por el estrés salino. Estos resultados sugieren que *M. crystallinum* es capaz de discriminar exactamente entre el estrés iónico y el estrés osmótico, posiblemente por los diferentes mecanismos de transducción de señales (Bronwyn *et al.*, 2007).

Es importante estudiar el tráfico vesicular durante la redistribución de la McTIP1;2 causado por el estrés osmótico en las hojas, éste estudio se requiere para conocer los mecanismos de regulación de la expresión de esta proteína y la participación de las AQP en el control del estrés hídrico en compartimientos celulares diferentes a la membrana plasmática y el tonoplasto. Para estos estudios se requiere el análisis de microscopía confocal e inhibidores específicos del tráfico de vesículas y análisis de la expresión de las proteínas en membranas aisladas. Se demostró que el transporte de las AQP es inhibida por varios mecanismos. Por otro lado la AQP McTIP1;2 es glicosilada y es esencial que esto ocurra para que esta proteína se mueva por los organelos, ya que en presencia de la tunicamicina (inhibidor de la glicosilación de proteínas), el estrés osmótico no causó la re-localización de McTIP1;2. Se redistribuyen las AQP desde el tonoplasto hacia un compartimiento nuevo cuya función se desconoce. Este parece ser un cuerpo multivesicular, donde se ha detectado la distribución de la McTIP1;2, mediante inmunofluorescencia e inmunolocalización con partículas de oro, de esto se puede concluir que la redistribución de las AQP

forma parte de los mecanismos de regulación necesarios para que la célula sea capaz de restaurar y mantener la homeostasis celular durante el estrés osmótico (Vera-Estrella *et al.*, 2004).

2.15 Papel de los transportadores de alta afinidad de K⁺ (HKT)

Algunos mecanismos que se han estudiado son los adaptativos de las plantas para adecuarse a las condiciones de baja cantidad de nutrientes en el suelo. Estos son mecanismos de alta afinidad inducidos cuando los nutrientes se encuentran a concentraciones bajas (micromolares) y que presentan una alta afinidad por el sustrato. Los más importantes son K⁺, NH⁺, PO₄⁻, y otros. Los transportadores de alta afinidad de potasio se estudian en arroz debido a que hay 7 genes que codifican para ellos y las variaciones en su secuencia implican cambios en la afinidad. El transportador “OsHKT”; media el transporte de K⁺ y Na⁺ (además de Li⁺, Rb⁺ y Cs⁺) facilitando más el movimiento de Na⁺ hacia el interior de las células, lo cual podría indicar que este transportador es la vía de entrada de este elemento tóxico para las plantas. Debido a que este transportador se expresa principalmente en células que rodean el tejido vascular, posiblemente esté implicado en el transporte a distancia de Na⁺ y K⁺, más que en la absorción de estos elementos del suelo. Las variedades tolerantes de arroz mostraron que éste transportador se expresa a niveles reducidos, por lo que ello podría estar relacionado con un menor transporte de este elemento tóxico a las partes aéreas de la planta, explicando así la tolerancia de esta variedad a la salinidad. En la variedad susceptible la presencia de altas concentraciones de sal no causó efecto alguno en la expresión de ésta bomba, por tanto causando los efectos negativos en la planta. Estudios demuestran que el transportador OsHKT2;1 tiene alta afinidad por K⁺ pero no por Na⁺ (hasta 50 veces menor), esto indica que la propiedades de este transportador son adecuadas para la producción de plantas con el potencial de resistir niveles elevados de Na⁺, ya que la absorción de este elemento tóxico se podría inhibir por la presencia de K⁺, además de asegurar la toma de este último. Otro transportador parecido es el TaHKT2;1, que también tiene una mayor afinidad sobre el potasio que sobre el sodio. TaHKT2;1

aparentemente funciona como un cotransportador K^+/Na^+ cuando estos dos elementos se encuentran presentes en el medio, pero sólo cuando la proporción $Na^+:K^+$ es mayor a diez. Se debe estudiar más la afinidad de éstas especializaciones en torno a cómo absorber el K^+ , que se cree que es debido a los residuos de glicina pero un estudio en el cual se sustituye la glicina por la serina en una de 4 unidades sigue teniendo alta afinidad a K^+ lo cual sugiere que otras partes del transportador pueden estar involucradas ((Bronwyn *et al.*, 2007).

2.16 La expresión de los genes de proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEA)

Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación. El agua, como resultado de su constante dieléctrica, mantiene *in vivo* la estructura de proteínas y fosfolípidos, y es posible que proteínas tales como las LEA D-11 y D-13, las cuales forman una estructura en "*random coil*" (aminoácidos orientados al azar), sustituyan el agua y mantengan la estructura de proteínas y membranas en ausencia de esta. Para proteínas tales como la D-29, que pueden formar hélices anfifílicas, se ha propuesto que puedan actuar como trampas de iones, secuestrando iones que están concentrados durante la desecación. Aunque estas funciones no se han probado, existe evidencia circunstancial que sugiere su papel como protectoras en diferentes tipos de estrés. Se ha obtenido evidencia directa del papel de, al menos, algunas de estas proteínas en la tolerancia a la sequía, como es el caso de la Em de trigo, una proteína altamente hidrofílica, perteneciente al grupo 1, la cual fue sobre-expresada en levadura y confirió resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico (Swire-Clark & Marcotte, 1999).

Otro ejemplo es el de la proteína LEA del grupo 3, la HVA1 de cebada, que al ser sobre-expresada en plantas de arroz confiere resistencia a estrés hídrico y salino (Xu *et al.*, 1996). Esta misma proteína, al ser expresada en levadura, confiere resistencia a estrés salino y a congelamiento (Zhang *et al.*, 2000). Los datos obtenidos a partir de la sobre-expresión de estas y otras proteínas LEA apoyan

la hipótesis de que diferentes proteínas LEA desempeñan un papel importante en la protección contra la deshidratación celular (Moreno, 2009).

2.17 La salinidad reduce el crecimiento y la fotosíntesis en las especies sensibles

Las plantas pueden dividirse en dos grandes grupos según su respuesta a una elevada concentración de sales. Las halófitas son nativas de suelos salinos y completan su ciclo vital en este entorno. Las glicófitas (literalmente, “las plantas dulces”), son aquellas que no son capaces de resistir el mismo nivel de sales que las halófitas. Normalmente, existe un nivel crítico de concentración de sales a partir del cual las glicofitas comienzan a presentar síntomas de inhibición del crecimiento, decoloración de las hojas y pérdida de peso seco. Entre los cultivos más sensibles están el maíz, la cebolla, los cítricos, la lechuga y las judías; el algodón y la cebada son cultivos moderadamente tolerantes, y la remolacha y la palmera datilera son altamente tolerantes. Algunas especies altamente tolerantes a las sales, como *Suaeda marítima* y *Atriplex mummularia* (un arbusto salino), muestran una estimulación del crecimiento a concentraciones de Cl varias veces superior a los niveles letales para las especies sensibles (Taiz & Zeiger, 2006).

2.18 El daño salino implica efectos osmóticos y efectos específicos de iones

Los solutos disueltos en la zona radicular reducen el potencial osmótico (lo hacen más negativo), y a su vez el potencial hídrico del agua. El equilibrio hídrico total de las plantas se ve así afectado debido a que las hojas necesitan desarrollar un potencial hídrico más negativo para mantener un gradiente favorable entre el suelo y las hojas. Este efecto de los solutos disueltos es similar al que produce el déficit hídrico del suelo y la mayoría de las plantas responde a los niveles excesivos de salinidad en el suelo del mismo modo a como lo hacen frente al déficit hídrico (Taiz & Zeiger, 2006).

Una diferencia importante entre el bajo potencial hídrico provocado por la salinidad o por la desecación del suelo es la cantidad total de agua disponible. Durante la desecación del suelo la planta puede obtener una cantidad limitada de agua, lo que provoca el descenso paulatino de los potenciales hídricos. En la mayoría de los entornos salinos existe una gran cantidad de agua disponible (podemos decir ilimitada) a un potencial hídrico constante, aunque reducido (Taiz & Zeiger, 2006).

Es de particular importancia el hecho de que la mayoría de las plantas pueden ajustarse osmóticamente cuando crecen en suelos salinos. Este ajuste ayuda a prevenir la pérdida de turgencia (que poco a poco irá ralentizando el crecimiento de las células), al ir generando potencial hídrico menor. Pero estas plantas con frecuencia continúan creciendo, aunque más lentamente después de este ajuste por una razón todavía desconocida que curiosamente no está relacionada con la turgencia insuficiente (Taiz & Zeiger, 2006).

Además de las respuestas de las plantas a los bajos potenciales hídricos, los efectos tóxicos específicos de los iones también se producen cuando éstos se acumulan en las células a concentraciones perjudiciales (Na^+ , Cl^- o SO_4^{2-}). En condiciones no salinas, el citosol de las células de las plantas superiores contiene entre 100 y 200 mM de K^+ y de 1 a 10 mM de Na^+ , un medio iónico óptimo para muchas enzimas. Una relación anormalmente alta de Na^+ y K^+ inactiva las enzimas e inhibe la síntesis de proteínas. A altas concentraciones el Na^+ puede desplazar al Ca^{2+} en la membrana plasmática de los pelos radiculares de algodón y provocar un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática que puede ser detectado por la pérdida de K^+ de las células (Taiz & Zeiger, 2006).

Cuando se acumulan altas concentraciones de iones Na^+ o Cl^- en los cloroplastos, se inhibe la fotosíntesis. Dado que el transporte fotosintético de electrones parece ser relativamente insensible a las sales, bien el metabolismo del carbono o la fosforilación deben verse afectadas. Las enzimas extraídas de especies tolerantes a la sal son igual de sensibles a las altas concentraciones de

sal como las de las glicófitas, por lo tanto deben de ser otros los mecanismos que regulen la concentración de sal (Taiz & Zeiger, 2006).

2.19 Las plantas utilizan diferentes estrategias para evitar el daño por sal

Las plantas minimizan el daño por sal excluyendo las sales de los meristemos, sobre todo, en los brotes y de las hojas que se están expandiendo y realizando la fotosíntesis activamente. En las plantas sensibles a la sal, la resistencia a niveles moderados de salinidad en el suelo depende de la capacidad de las raíces de evitar que los iones potencialmente perjudiciales lleguen hasta el vástago (Taiz & Zeiger, 2006).

Recordemos que la banda de Caspary supone una restricción al movimiento apoplástico de los iones hacia el xilema. Para evitar la banda de Caspary, los iones han de pasar a la ruta simplástica a través de las membranas celulares. Esta transición ofrece a las plantas resistentes a la sal un mecanismo para excluir parcialmente los iones perjudiciales (Taiz & Zeiger, 2006).

Los iones sodio pueden entrar en las raíces pasivamente, por lo que las células de las raíces deben utilizar energía para activar el transporte de Na^+ de vuelta hacia la solución extracelular. Por el contrario, el Cl^- es excluido por el potencial eléctrico negativo de la membrana celular y la baja permeabilidad de la membrana plasmática de las raíces a este ión. Tanto el Ca^{2+} como el K^+ afectan a las concentraciones de Na^+ intracelular. A concentraciones altas de Na^+ , se inhibe la incorporación de K^+ mediante un sistema de transporte de alta afinidad K^+/Na^+ , HKT1, y este transportador actúa como un sistema de incorporación de Na^+ . El calcio, por otra parte, aumenta la selectividad K^+/Na^+ lo que hace aumentar la tolerancia a la sal (Lincoln y Eduardo, 2006).

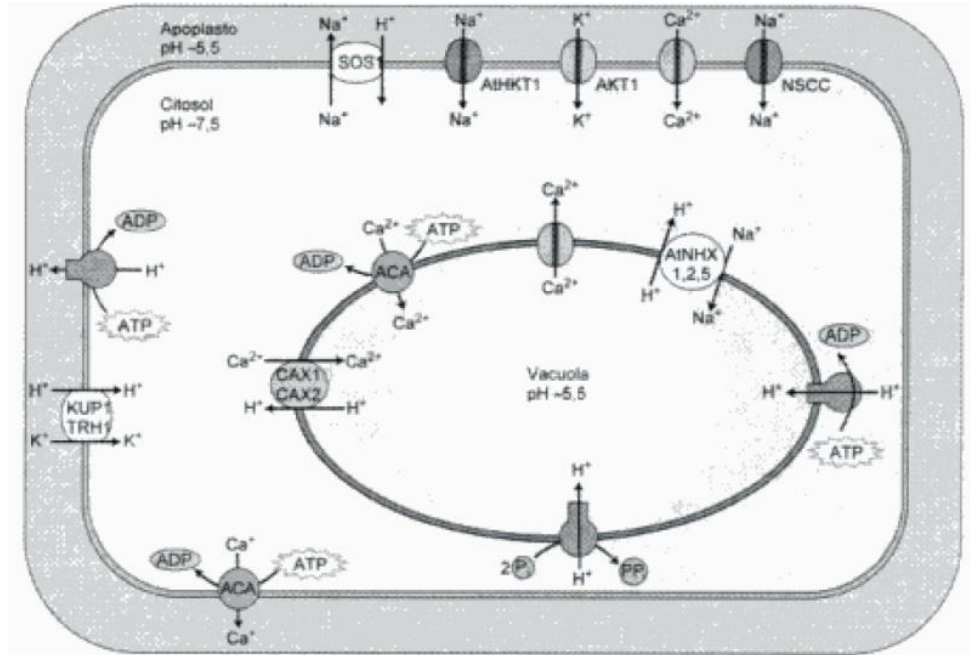


Figura 6. Mecanismo celular de entrada y salida de sodio, potasio, protones de hidrogeno y calcio, dentro de la célula y la vacuola.

En la Figura 6 se muestran las proteínas que median el transporte de sodio, potasio y calcio durante el estrés salino; SOS1, un anti-transportador Na⁺/H⁺ situado en la membrana plasmática; ACA una Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática/tonoplasto; KUP1/TRH1 un co-transportador K⁺/H⁺ de alta afinidad; atHKT1, un transportador de entrada de sodio; AKT1, un canal de K⁺; NSCC, un canal catiónico no selectivo; CAX1 o 2, un anti-transportador Ca²⁺/H⁺; atNHX1, 2 ó 5, un anti-transportador Na⁺/H⁺ de endomembranas. También se indica en la misma Figura 6 las proteínas que están implicadas en la homeostasis iónica, pero cuya identidad molecular bien se desconoce por el momento o no ha sido confirmada en plantas. Entre ellas se encuentran las proteínas que forman los canales de calcio de la membrana plasmática y del tonoplasto y las ATPasas vacuolares que bombean protones y las pirofosfatasa. La diferencia del potencial de membrana a través de la membrana plasmática suele ser de 12 a 200mV, negativo en el interior; a través de le membrana del tonoplasto es de 0 a 20 mV; y positivo en el interior (Taiz & Zeiger, 2006).

2.20 El sodio es transportado a través de la membrana plasmática y al tonoplasto

Los bombes de H^+ desde la membrana plasmática y el tonoplasto proporcionan la fuerza (potencial electro químico de H^+) que dirige el transporte secundario de iones. Una ATPasa es la principal responsable del aumento del delta pH y del gradiente de potencial a través de la membrana plasmática y una $H^+/-ATPasa$ vacuolar genera una delta pH y un potencial de membrana a través del tonoplasto (Taiz & Zeiger, 2006).

La actividad de estas bombas es necesaria para el transporte secundario del exceso de iones asociado a las respuestas vegetales al estrés salino. Este hecho está confirmado por los descubrimientos que muestran que la actividad de las bombas de H^+ aumenta con la salinidad, y la expresión genética inducida puede explicar parte de esta activación (Taiz & Zeiger, 2006).

El transporte de Na^+ dependiente de energía (salida) desde el citosol de las células vegetales a través de la membrana plasmática está mediado por el producto del gen SOS1 (del inglés salt overly sensitive, demasiado sensible a la sal) que actúa como un anti-transportador de Na^+/H^+ . El anti-transportador de SOS1 está regulado por los productos genéticos de, al menos, otros dos genes, conocidos como SOS2 y SOS3. SOS2 es una serina/treonina quinasa aparentemente activada por calcio a través de la función de SOS3, una proteína fosfatasa regulada por calcio (Figura 7) (Taiz & Zeiger, 2006).

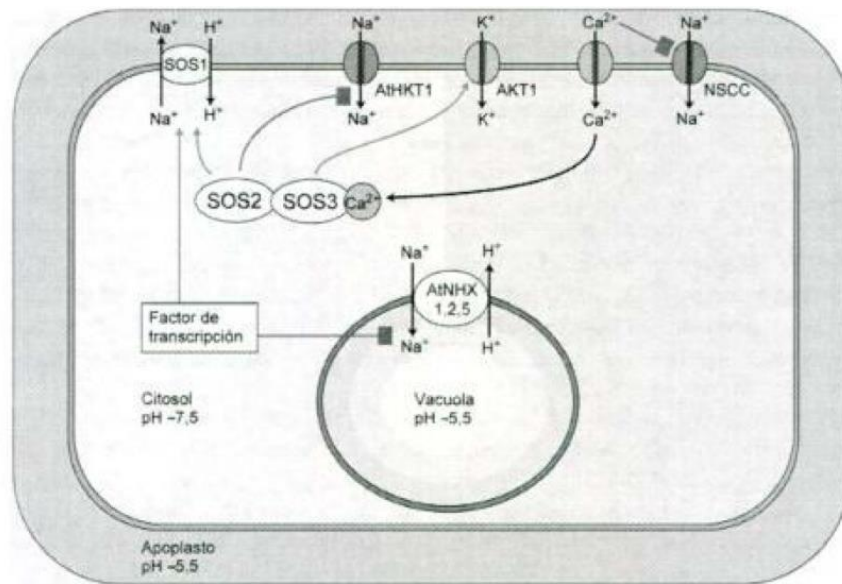


Figura 7. Se muestra la función de SOS1, SOS2 y SOS3, la función de AtNHX en la regulación del Na⁺ citoplasmático al interior de la vacuola.

La compartimentalización vacuolar de Na⁺ como se muestra en la Figura 7 resulta en parte de la actividad de una familia de anti-transportadores de Na⁺/H⁺ como AtNHX1 en *Arabidopsis*. Plantas transgénicas que sobre expresan el gen AtNHX1 muestran un aumento a la tolerancia a la sal en jitomate (Taiz & Zeiger, 2006).

Ocurre regulación de la homeostasis iónica por la ruta de transducción de señales SOS, el estrés salino y los niveles de calcio. SOS1 un anti-transportador de Na⁺/H⁺ de la membrana plasmática; SOS2 una serina/treonina quinasa; SOS3 una proteína de unión a Ca²⁺; HKT1, un transportador de entrada de sodio; AKT1, un canal de K⁺; NSCC, un canal catiónico no selectivo; NHX, 2 o 5, un anti-transportador de Na⁺/H⁺ de la endomembrana; una proteína indeterminada que actúa como un canal de Ca²⁺ que provoca el aumento en el calcio citosólico que activa la cascada SOS a través de SOS3. La cascada SOS debe regular negativamente a AKT1. Al mismo tiempo, la cascada SOS aumenta la actividad de SOS1 y de AKT1. A través de un factor de transcripción indeterminado, la cascada SOS aumenta la transcripción de SOS1 mientras que disminuye la transcripción de genes NHX. A bajas concentraciones de calcio, NSCC puede

también funcionar como una alternativa al sistema de entrada de sodio, aunque este transportador es inhibido por niveles altos de calcio (Taiz & Zeiger, 2006).

2.21 Mecanismos de la regulación del sodio en raíz y hojas

Dos fases están relacionadas el estrés osmótico y la toxicidad iónica: la primera respuesta es rápida aumentando la presión osmótica a la solución salina, la segunda es lenta tomando lugar después de la acumulación de Na^+ en los tejidos fotosintéticos. La sal afecta el crecimiento decreciendo el sistema fotosintético y la conductancia estomática. El cierre de los estomas es una respuesta dramática ante el estrés por sal. Al inhibirse la conductancia estomática se reduce la transpiración y fotosíntesis. En plantas como el algodón existe una asociación de decremento de la clorofila total y una deformación de la estructura de la clorofila. Por otro lado, la reducción de fotosintetizados aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activando enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y peroxidasas. Estas enzimas están relacionadas en la remoción y el balance de ROS. Estudios de éstas enzimas están relacionados con el control de señales de los procesos para crecimiento, respuestas de estrés y medición del ambiente (Hanin *et al.* 2016).

La ruta de MAPK es una respuesta al estrés biótico y abiótico para las enzimas antioxidantes, diferentes cascadas de MAPK activan diferentes enzimas de respuesta a ROS. El incremento en la acumulación de ROS como super óxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (NO) causan daños oxidativos en los compartimientos del apoplasto y la peroxidación de los lípidos de membrana, causando un impacto en la homeostasis iónica. Esto provoca acumulación de ácido salicílico, la célula muere e induce cierre estomático. Se descubrió una ruta entre los plastidios y el núcleo en la adaptación a la respuesta a sal, que hiló una unión en de las rutas ROS y ABA a estrés por drogas y sal (Hanin *et al.*, 2016).

Los sensores de hiper osmosis están relacionados con los canales de Ca^{2+} en el citosol de las raíces, visto con la aplicación de NaCl y manitol. La señal ocurre en

raíces y muchos tipos de células; esto indica que el mecanismo de censado al estrés por sal está relacionado a los canales de Ca^{2+} . El calcio está directamente relacionado a la respuesta a sal. La respuesta se extiende a las células endodermales y corticales, viaja a una velocidad de 400 micrometros sobre segundo. La respuesta se ha medido en los canales de calcio TPC1, éste juega un papel en la homeostasis de los cationes de la vacuola. La ruta hacia abajo depende de CDPKs y la proteína β -calcineurina (CBLs), la interacción entre la CDPKs y CBLs pueden activar la traducción de señales para la hiperósmosis y la transcripción de genes (Hanin *et al.*, 2016).

En respuesta a la salinidad se ha visto que se aumenta el contenido de Na^+ y se reduce el K^+ cambiando el potencial de membrana, presión osmótica, presión de turgencia, señales de calcio, señales ROS y otras. En un estudio con la planta halófito *Thellungiella halophila* y la glicófita *Arabidopsis* se ha demostrado un aumento en la expresión de los genes que codifican para una bomba selectiva de K^+/Na^+ y ello aumenta la tolerancia a sal (Figura 8). También muchos reportes demuestran el aumento K^+ en las plantas resistentes (Hanin *et al.* 2016).

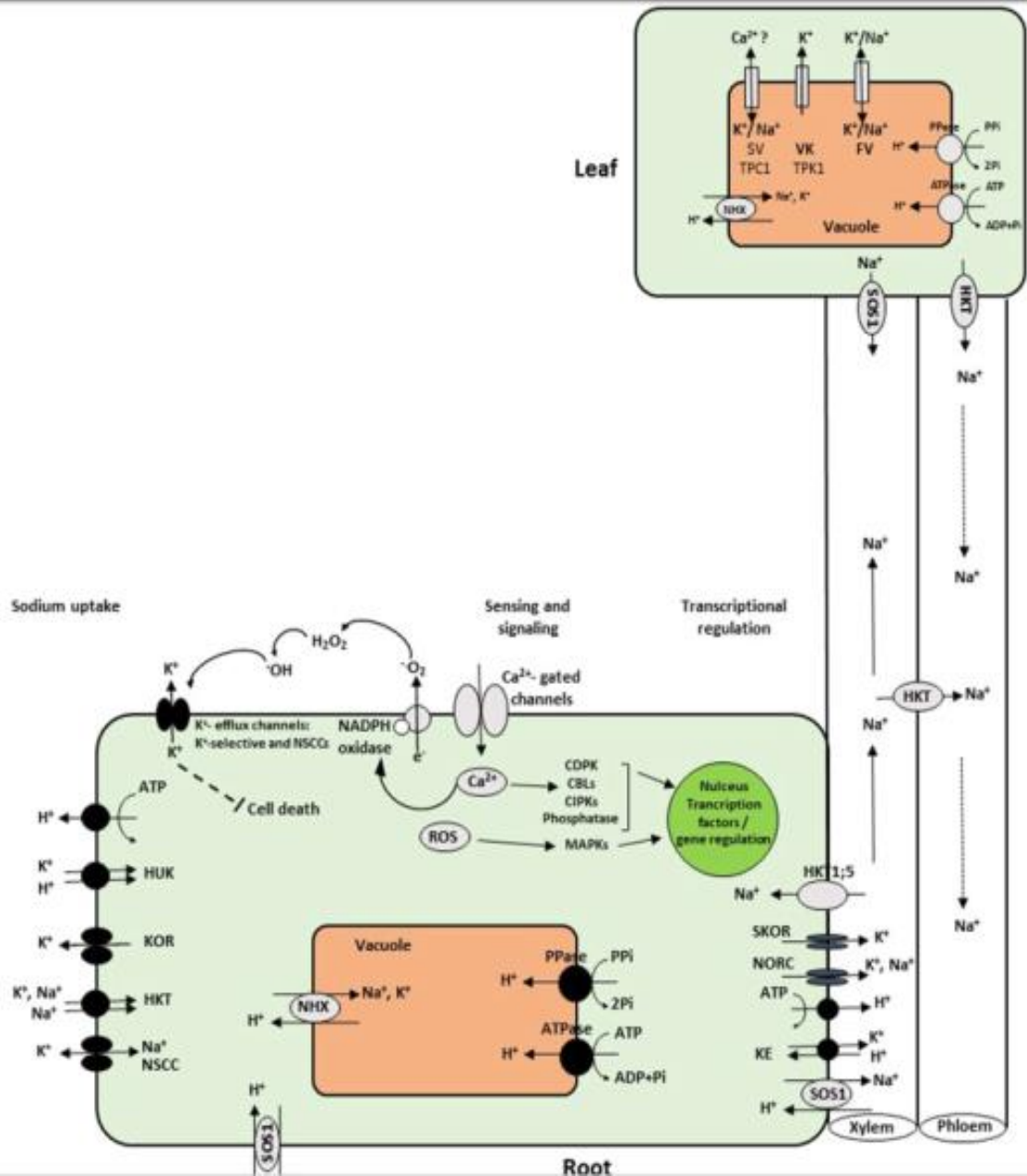


Figura 8. Identificación del estrés salino por la planta *Thellungiella halophila* y los mecanismos que tiene para manejar dicho estrés.

En la Figura 8 se muestra el mecanismo por el cual el Na^+ entra a las células de las raíces y cruza la membrana plasmática vía NSCC, CNGC, miembros de la subfamilia HKT 1, de la ruta metabólica del apoplasto. Para captar el estrés por sal, el Na^+ es censado por sensores de hiperósmosis y sensores de iones activados por Ca^{2+} , ROS, y algunas rutas metabólicas hormonales. CDPKs, CBLs, CIPKs, y MAPKs, envían transducción de señales cascada abajo a factores de

transcripción nucleares. Estas rutas metabólicas resultan en la activación de mecanismos de detoxificación, incluyendo el anti-transportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática (SOS1), HKT, y en el tonoplasto el intercambiador de Na^+ , K^+/H^+ (NHX). SOS1 saca el sodio de las células de las raíces al tejido parenquimatoso del xilema. La proteína HKT1 media el flujo en reversa de sodio sacándolo de las células de la hoja y colocándolo en el floema. Otros candidatos que acumulan el sodio en el xilema son canales no específicos de K^+ como KORC y NORC. Las proteínas NSCCs son selectivas para K^+ , como los TPC1 lo son para el Na^+ . Para mantener la baja concentración de Na^+ en las hojas, las proteínas HKT tienen que ser re-translocadas del tejido del xilema para pasar el sodio al floema, o ser secuestrado mediante la proteína NHX. Los otros son canales no selectivos de rectificación de señales para re-direccionar el sodio (Hanin *et al.*, 2016).

En las plantas glicofitas de acuerdo con Haninet *al.* (2016), la superioridad en tolerancia a la salinidad observada en *Brassica napus* fue debido a un mecanismo de osmotolerancia y una habilidad superior para retener el K^+ en el mesófilo de las hojas. Por otro lado, Byrt *et al.* (2007) demostró que hay QTLs relacionados con 5 genes ortólogos a HKT1 que aumentan la resistencia a la salinidad. También, se tiene que la sobre expresión de NHX en la vacuola aumenta la tolerancia a la salinidad en las plantas.

2.22 Pirofosfatasa de H^+ (AVP1)

La AVP1 localizada en la membrana del tonoplasto, fue sobre expresada en *Arabidopsis thaliana* mostrando un incremento a la tolerancia a salinidad, presumiblemente ello fue resultado de incrementar los iones dentro de la vacuola. La tolerancia a la salinidad fue aumentada en jitomate transgénico coexpresando el gen AVP1 y AtNHX1, en tomate también apenas se están estudiando las acuaporinas de membrana (Rao *et al.*, 2015).

El promotor vacuolar de la pirofosfatasa (TsVP1) aislado de *Thellungiella halophita* fue clonado y comparado con el AVP1 de *Arabidopsis thaliana*. Estos

genes tienen motivos similares y posición similar. En plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el promotor TsVP1 mostraron resistencia a salinidad casi en todos los tejidos con excepción de semillas, pero las raíces fueron las que mejor mostraron la resistencia a la salinidad. Un análisis de diferentes delecciones del promotor TsVP1, mostró que una región de 856 pb (-2200 a -1344) a la que se unen factores de transcripción puede aumentar la expresión del gen (Sun *et al.*, 2010).

Plantas transgénicas que sobre expresan la AVP1 son mucho más resistentes a las concentraciones de sal y la privación de agua que las plantas silvestres. Estas plantas transgénicas acumulan más iones sodio y potasio en los tejidos de las hojas que las tipo silvestres. Sin embargo, medidas directas aislando la vacuola de las plantas transgénicas con AVP1 demostraron que aumentó el consumo de los cationes. Lo que llevó a la conclusión de que se aumenta la retención de agua y los solutos acumulados en la vacuola y presumiblemente, el secuestro de los cationes tóxicos reduce los efectos tóxicos (Gaxiola *et al.*, 2001).

Estudios con *Arabidopsis* y VP1 sobre expresado han demostrado que se acumula más biomasa en los brotes y el sistema de las raíces, los niveles de disposición de los componentes celulares muestran una unión con la fotosíntesis, la carga del floema, los transportadores del floema, y con los órganos de la piel. VP1 sobre expresada muestra aumentar la constitución de los componentes celulares en el floema. Aumentando la biomasa que aumenta la carga del floema y el transporte (Pizzio *et al.*, 2015).

2.23 Factores de transcripción

Algunos factores de transcripción relacionados con el estrés a sal son: DREB, NAC, MYB, MYC, Cys2/His2 dedos de zinc, bZIP, AP2/ERF, y WRKY (Golldack *et al.*, 2002, 2014). Por otro lado las MAPKs pueden tener un efecto opositor descrito por la expresión en raíz de OsMAPK33, la sobreexpresión causó alta sensibilidad al estrés por drogas y salinidad comparada con las tipo silvestres

(Lee *et al.*, 2011). Por otro lado al sobre expresarse TMKP1 fue un regulador positivo para el estrés por sal en *Arabidopsis* (Zaidi *et al.*, 2016).

2.24 Los genes que responden al estrés están regulados por procesos dependientes e independientes de ABA

La transcripción génica está controlada por la interacción de proteínas reguladoras (factores de transcripción) con secuencias reguladoras específicas en los promotores de los genes que regulan. Genes diferentes que están inducidos por la misma señal (deshidratación o salinidad, por ejemplo) están controlados por una ruta de señalización que conduce a la activación de estos factores de transcripción específicos. Los estudios de los promotores de varios genes inducidos por estrés han conducido a la identificación de secuencias reguladoras específicas implicadas en los diferentes estreses. Por ejemplo, el gen RD29 contiene secuencias de DNA que pueden ser activadas por estrés osmótico y por ABA (Taiz y zeiger, 2006).

Los promotores de los genes regulados por ABA contienen una secuencia de seis nucleótidos conocida como elemento de respuesta a ABA (ABRE), que probablemente se une a los factores de transcripción implicados en la activación de los genes regulados por ABA. Los promotores de estos genes, que están regulados por estrés osmótico de modo independiente de ABA, contienen un elemento alternativo formado por una secuencia reguladora de nueve nucleótidos, el elemento de respuesta a la deshidratación (DRE) que es reconocido por un conjunto alternativo de proteínas de regulación de la transcripción. Así, los genes que están regulados por estreses osmóticos parecen estar regulados bien por rutas de transducción de señales mediadas por la acción de ABA (genes dependientes de ABA), o bien por una ruta de transducción de señal que responde al estrés osmótico y que es independiente de ABA (Taiz & Zeiger, 2006).

Se han implicado al menos dos rutas independientes de ABA en la regulación de la expresión génica como se muestra en la Figura 9. La acción posterior de los

factores de transcripción (llamados DREB1 y DREB2) que se unen a los elementos DRE en los promotores de los genes que responden al estrés osmótico, aparentemente, son activados por una cascada de señalización independiente de ABA. Otros genes que responden al estrés osmótico de forma independiente al ABA parecen estar directamente controlados por la cascada de señalización de las MAP quinasas. Otros cambios parecen no estar relacionados con DREB (Figura 9) (Taiz & Zeiger, 2006).

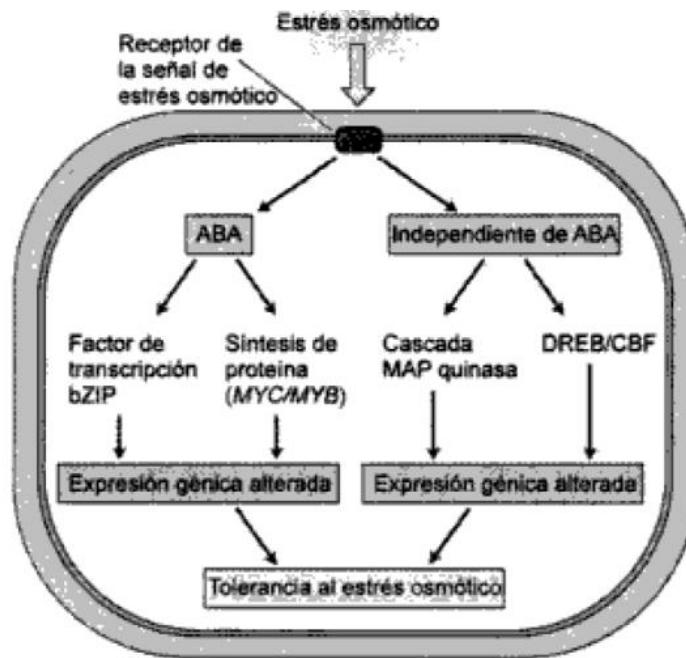


Figura 9. Mecanismo de activación de la tolerancia al estrés osmótico.

2.25 Familia de genes para factores de transcripción de etileno (ERF)

Los factores de transcripción de etileno (ERF) han mostrado estar íntimamente conectados con las respuestas adaptativas, defensivas y de estrés de diferentes rutas metabólicas en la planta. Se han estudiado 85 genes ERF y estudios filogenéticos en jitomate han revelado la existencia de los dominios ERF y su distribución en todos los grupos. La expresión de algunos factores de transcripción en respuesta a sal dio como resultado la identificación del gen SIERF80 involucrado directamente con el estrés por sal. Muchos factores de transcripción se han mostrado en la expresión génica en respuesta a varios

tratamientos de estrés biótico y abiótico, lo cual significa que están interconectadas las rutas de respuesta. La familia de genes ERF se induce por señales cruzadas de estrés. Ésta es una red compleja de señales que decide como la planta responderá al tratamiento. Estudios previos demuestran que la familia ERF tiene un dominio en la caja GCC cis-regulado en las regiones del promotor con respuesta a patógenos y a la respuesta por etileno similarmente, los dominios de unión a DREB y a elementos DRE y regulan la expresión en respuesta a la deshidratación y las temperaturas bajas. Sin embargo, Tsi1 ha demostrado generar resistencia a patógenos y a estrés osmótico, al sobre expresarse. El dominio de ERF parece estar relacionado con el promotor de la caja GCC para DRE el cual incluye los dominios de DREB2A, CBF1 y ERF. Esto sugiere que la señalización cruzada entre DREB y ERF no es excluyente. La sobreexpresión de la familia ERF en *Arabidopsis thaliana*, tabaco y jitomate ha demostrado que confiere un aumento en la resistencia al estrés biótico y abiótico. En adición los genes involucrados en la respuesta al ácido jasmónico, como parte del metabolismo secundario involucran a AP2/ERF en la respuesta a defensa. Como dato se tiene que la familia DREB muestra una diferenciación máxima en la expresión con respecto a deshidratación, sal y estrés por calor (Sharma *et al.*, 2010).

El factor de transcripción JERF1 se activa en respuesta a ácido jasmónico y etileno, el cual se une a la caja GCC de respuesta a etileno y también a la secuencia de unión a DRE, en jitomate la respuesta se induce al aplicar ácido abscísico, etileno, MeJa y tratamientos por sal, lo cual indica que JERF1 reúne la actividad de conectar diversas señales de traducción metabólicas, en tomate se encontró también que bajo condiciones de estrés salino a 300 mM se acumuló el gen a partir de los 10 min de expresarse y se sostuvo durante 4 horas comenzando a disminuir a partir de las 8 horas. También, se ha observado que la expresión del gen activa a las proteínas PR y confiere tolerancia de estrés por sal en tabaco (Sharma *et al.*, 2010).

En algodón se trabajó con el gen GhERF1 dando resultados similares para la adaptación sometiendo a las plantas a estrés por etileno, ácido abscísico, alta salinidad, frío y drogas (Qiao *et al.*, 2007).

2.26 La enzima lipoxigenasa (LOX)

La LOX (linoleato: oxígeno reductasa) es un tipo de dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema Z,Z-1,4-pentadieno. Los sustratos específicos para LOX son ácidos grasos poliinsaturados con estructura Z, Z-1,4-pentadieno. Los más comunes con este tipo de estructura dentro del reino vegetal son los ácidos linoleico y linolénico, aunque otros ácidos con ésta estructura también son sustratos efectivos de LOX en grado variable. En plantas, la enzima LOX no se encuentra confinada en un órgano en particular, su presencia se ha confirmado en raíces, cotiledones, hipocótilos, flores, hojas, y aún dentro de una misma planta, la actividad enzimática puede variar ampliamente. Así por ejemplo, en colza la actividad es alta en sus flores y baja en hojas y frutos (Kausch & Handa, 1955).

Las semillas de soja, una fuente relativamente rica de LOX, han sido y son el material biológico del cual se obtiene LOX. Actualmente, se considera que la soja contiene cuatro isoenzimas, L-1, L-2, L-3 y L-3b, aunque las dos últimas son tan similares en comportamiento y composición que normalmente se consideran como una sola, L-3, en la que se habrían producido ciertas modificaciones postrancipcionales. En base a sus propiedades, las isoenzimas de LOX de soja suelen agruparse en dos tipos I y II (Kausch & Handa, 1955).

Las enzimas codificadas por el gen LOX se nombran como hierro-contenedor dioxigenasas que catalizan la incorporación de moléculas de oxígeno en los ácidos grasos insaturados por la cara cis, cis, 1-4-pentadieno de la estructura. En las plantas, da como resultado hidroperoxidasa que es un intermediario en la producción de compuestos aromáticos volátiles como ácido jasmónico, y

traumatina. Las múltiples isoformas de LOX se han observado en la mayoría de los tejidos de las plantas, incluyendo al jitomate. La función de las isoformas en plantas es desconocida, pero los roles se juegan en todos los estados del crecimiento de la planta. La familia LOX multigénica está caracterizada en muchas especies de plantas, incluyendo la soya, arroz y los frijoles (Kausch & Handa, 1955).

Según Hou *et al.* (2015) la activación del gen LOX en el fruto no es buena debido a que acelera la senescencia del mismo. Menciona T. Karabudak *et al.* (2014), que la lipoxigenasa está involucrada en la tolerancia de las plantas al estrés por frío debido a que se sigue una ruta en la que se acumulan lípidos relacionados a la actividad de LOX y también participa la ácido graso desaturasa (FAF7) para estabilizar las membranas y/o inducir los genes de defensa que están relacionados con la ruta de los productos de peroxidación y con las especies reactivas de oxígeno (ROS) que están involucradas en la respuesta al estrés por sal.

Por otra parte LOX está también involucrada en la producción de ácido jasmónico y ácido salicílico durante la resistencia a nemátodos, pero el ácido jasmónico puede llegar a inhibir la resistencia, lo cual quiere decir que puede existir una relación de antagonismo entre el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Zinovéva *et al.*, 2013).

Las oxilipinas son una clase de lípidos de membrana que se derivan de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linolénico (18:3) y el ácido linoléico (18:2). El primer paso para la ruta de la formación de los oxilípidos resulta en la formación de ácido hidroperóxido (HPO). El proceso puede ocurrir por auto-oxidación química o puede darse por dos enzimas distintas la lipoxigenasa (LOX) o la α -dioxigenasa. En las plantas superiores, la LOX se encarga de catalizar la reacción de dioxigenación de los ácidos grasos poliinsaturados en una región estero-específica llevando a cabo la formación de 13S hidroperoxiderivados (13-LOX) o 9S hidroperoxidoderivados (9-LOX). Los

HPO pueden convertirse por distintas rutas metabólicas como son aldehídos volátiles, oxo-derivados, hidróxido-derivados, ceto-derivados, eters divinílicos y ciclopentenoles (Ghanemet *et al.*, 2012).

La enzima hidroperoxidasa (HPL) rompe HPO en un aldehído volátil y ω -oxo ácido graso, con la divinil éter sintetasa (DES) que forma divinil ésteres. Ácidos grasos hidroxilados (HO) pueden formarse por la reductasa y peroxidasa mediante distintos mecanismos; ceto-derivados resultan de la acción de la LOX por si sola transformando a HPO. La aleno sintasa cataliza la reacción para pasar de HPO a 13-HPOT y la aleno oxido ciclasa lo transforma en 12-oxo ácido fitodiénico (OPDA) y después de varios pasos más, éste se convierte en ácido jasmónico (JA). Las oxilipinas pueden encontrarse en las plantas, como compuestos libres o unidos a otras moléculas como fosfolípidos o galactolípidos (Ghanem *et al.*, 2012).

Las oxilipinas asumen funciones clave en los mecanismos de defensa de las plantas o en la señalización molecular. El ácido jasmónico (JA), particularmente se deriva de los metil ester derivados, conjugados de JA con isoleucina y precursores (OPDA). Están descritos como una señal importante en la adaptación ambiental y los mecanismos de estrés biótico y abiótico en las plantas (Ghanem *et al.*, 2012).

En el contexto del estrés por sal, se ha visto que el ácido jasmónico como una molécula señal puede aumentar la peroxidación de los lípidos junto con la enzima LOX que se ha descrito. Tras 21 días del estrés por sal se aumenta la producción de ácido jasmónico a una concentración de 0.20 nmol/g y las 13-HOD aumentan a 10.5 nmol/g y en el día 5 se tienen concentraciones de 0.05 nmol/g en tejido fresco. El aumento de estas sustancias se puede relacionar con la acumulación de sustancias tóxicas como los iones de NaCl, que pueden ejercer una notable influencia en los cambios ejercidos por las oxilipinas (Ghanem *et al.*, 2012).

En las hojas las isoformas de LOX (LOX A, LOX B y LOX E) incrementan a los 30 días de someterlas a estrés y en las raíces (LOX A, LOX B, LOX D y LOX E) tienden a bajar las concentraciones, lo que es consistente con la dependencia de las oxilipinas. Siguiendo la ruta del ácido jasmónico con LOX se ha visto ~~tiene~~ que aumentar la concentración de este tras 21 días después de la salinización en las raíces y en las hojas tras los 30 días, como resultado se tiene la cascada de reacciones que genera a el ácido jasmónico tras esta vía: LOX-AOS-AOC- y varias oxo-phytodienoato reductasas (Oprs). Otros resultados demuestran que la acumulación de oxilipinas y AJ pueden jugar un papel de señalización al estrés por sal en el floema, sin embargo no se ha demostrado una vía de translocación al floema (Ghanem *et al.*, 2012).

2.27 Cambios morfológicos y bioquímicos en *Solanum Lycopersicum* L.

La altura de las plantas de jitomate se ve afectada por la salinidad debido a que se inhibe el crecimiento, las hojas se presentan en menor número y a la vez se manifiesta una reducción de la densidad estomática por la cara adaxial, se presenta clorosis y necrosis principalmente en los bordes de las hojas (Romero *et al.*, 2001).

El área foliar se ve afectada negativamente por la salinidad pero es una variable que cambia dependiendo de si se trata de un cultivar o diferentes especies y poblaciones. La pérdida de área foliar puede variar de un 16% a un 33% (Goykovic & Saavedra, 2007).

Las altas concentraciones de Na⁺ en la región foliar interfieren con la fotosíntesis y la transcripción. Algunos de estos efectos son atribuido al déficit de K⁺ que ejerce una acción antagónica al Na⁺ (Rosa *et al.*, 2003).

2.28 Mejoramiento vegetal

El mejoramiento vegetal se basa en la variabilidad genética de las poblaciones el cual es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Con esta base y las acciones que diferentes mecanismos evolutivos ejercen sobre ésta se puede llevar a cabo selección dirigida para poder utilizar el material que ocupemos para poder generar nuevos desarrollos en el campo de la pesquería, industria pecuaria, agrícola, forestal y domesticación de especies. En nuestro campo lo que interesa son dos puntos: el primero es la evaluación de la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas y la evaluación de los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie (Piñero, 2008).

En México existe una gran reserva genética de *S. lycopersicum*, tanto silvestre como cultivada, pero poco explotada ya que el jitomate mejorado o cultivado posee una pobre o nula representación de las reservas del nativo. En el Centro y Sudamérica existen grandes acervos de *S. lycopersicon*, donde son ampliamente cultivadas y de uso regional las variedades autóctonas tipo “riñón” y una gran variedad de formas silvestres. Miller & Tanksley (1990) estimaron mediante un estudio con RFLPs, que los genomas del jitomate cultivado solo tiene una variedad de menos del 5% de la variación genética de sus parientes silvestres.

2.29 Marcadores

Un marcador genético es una variante alélica que se utiliza para marcar una estructura biológica o un proceso, por tanto es un locus que tiene que ser polimórfico y emplearse con una doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o para marcar otro locus ligado que controla el carácter de interés. Los atributos ideales de un marcador genético son: que

sea polimórfico, codominante, no epistáticos (se puede leer el genotipo a partir del fenotipo, sin que otro *loci* afecte al *loci* que se lee), neutro (que las sustituciones alélicas no tienen efectos fenotípicos) y el ambiente no lo tiene que afectar (Alvarez, 2011).

Los marcadores morfológicos fueron los primeros en utilizarse para analizar la segregación de los cruzamientos y los primeros en ser mapeados. Estos marcadores, sin embargo, tuvieron un uso limitado, principalmente, porque su expresión podía estar influenciada por el ambiente, o por otros factores genéticos, aunque debido a que para su evaluación sólo se necesita una guía y una visualización de los caracteres, se siguen empleando actualmente por su bajo costo. Otro tipo de caracteres incluyen la medición fisiológica de algunas características de interés para la selección de la planta como pueden ser la medición de la apertura y cierre de estomas, de la cantidad de azúcares, H₂O, fotosintetizados y algunos otros. Por otro lado la medición de proteínas como isoenzimas y las proteínas de reserva se pueden emplear de igual manera (Alvarez, 2011).

2.30 Marcadores moleculares tipo SSR e ISSR

Los marcadores moleculares son una herramienta útil y complementaria de la taxonomía vegetal, debido a que se basan en el análisis de la molécula de ADN ayudando a dilucidar o en su defecto a dar nuevas cuestiones a la taxonomía. Existen diversos marcadores moleculares con los cuales se pueden analizar y rastrear distintas secuencias de ADN. Los estudios con marcadores microsatélite o secuencias simples repetidas (SSR) son ubicuos a todos los genomas eucariontes. Muchos locus para los marcadores SSR se han desarrollado para muchas especies, son marcadores de tipo codominante, lo cual permite mostrar la mayor variabilidad de la región que se analice, la desventaja es que se tiene que conocer la región específica en la que se une para hacer un diseño de los oligonucleótidos previo al estudio.

Por otro lado, los marcadores inter SSR (ISSR) fueron desarrollados para no requerir la secuencia previa de la región a la que se va a anclar el oligonucleótido. Las bases constituyentes del oligonucleótido son secuencias repetidas de (CA), (CA)RG o (AGC)TY. El resultado de la amplificación de la secuencias entre dos SSRs, da como resultado un sistema de marcaje útil como huella genética, para el análisis de diversidad y mapeo genómico. El resultado son secuencias de ADN de diversos tamaños de la región amplificada y el tamaño depende del ADN molde obtenido del individuo evaluado. Una reacción típica puede dar de 20–100 bandas por carril dependiendo de la especie y el oligonucleótido utilizado. Estos marcadores se han empleado en muchas especies para determinar el nivel de polimorfismo que presentan, como el sorgo y el plátano, por mencionar algunas (Godwin *et al.*, 1997).

2.31 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos. Requiere de uno o dos oligonucleótidos sintéticos (“primers”, cebadores, iniciadores, oligos), generalmente entre 10 a 30 de bases de longitud y complementarios a la secuencia de nucleótidos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. Se requiere de un termociclador para realizar la desnaturalización de la cadena de ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la ADN polimerasa, teniendo como resultado una acumulación exponencial del fragmento amplificado de ADN. Además, emplea elementos como dNTPs, Mg⁺, amortiguador y H₂O para que se lleve a cabo la reacción. La Taq ADN polimerasa proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso esta ADN polimerasa es capaz de soportar temperaturas altas hasta de 100 °C. La clave para obtener alta especificidad en la reacción es saber las temperaturas adecuadas para llevarla a cabo y obtener los mismos resultados constantemente (Tamay *et al.*, 2013).

2.32 Mejoramiento genético al estrés por sal en jitomate

En México se han realizado trabajos para identificar germoplasma de *S. lycopersicum* tolerante a condiciones de salinidad en etapa de germinación. Se evaluaron 34 poblaciones de jitomate de Puebla y Veracruz, encontrando que el vigor es afectado negativamente en un 100 %, la germinación un 78% y el desarrollo de las estructuras morfológicas de plántula como raíz, hipócotilo y cotiledones en un 33%, definiéndose colectas con distintos grados de tolerancia (Estrada-Trejo *et al.*, 2014).

En Baja California se llevó a cabo un estudio de 7 cultivares sometidos a concentraciones de sal de 0, 50, 100, 150 y 200 mM, concluyendo que los cultivares “Missouri” y “Tropic” mostraron mayor tolerancia a la salinidad, logrando desarrollarse hasta en 150 mM de sal, indicando que de entre los cultivares puede hacerse selección de algunos genotipos para la tolerancia (Ruiz *et al.*, 2014).

Estudios relacionados al aumento de ajuste hormonal en *S. chilense* y en *S. lycopersicum* sugieren que existe una relación entre la acumulación de iones K^+ y Na^+ y el ácido salicílico, el etileno y las citoquininas, las cuales están relacionadas con la mejora del potencial osmótico en la especie *S. chilense* (Gharbi *et al.*, 2017).

2.33 Contenido relativo de agua

El CRA (contenido relativo de agua) es la expresión más usada para medir el nivel de agua del tejido. Es una medida del contenido de agua respecto al total de agua que este puede almacenar, se expresa como porcentaje y permite conocer el estado hídrico de la planta. Se relaciona con el potencial hídrico porque este y sus componentes (potencial de presión y de solutos) son función del volumen de agua del protoplasma (Argenteal *et al.*, 2006).

2.34 Transcripción inversa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Esta técnica es útil para el análisis de la expresión de un gen en un momento dado en la planta mediante el ARNm. Es una modificación de la PCR que incluye una extracción de ARN, una retrotranscripción mediante transcriptasa inversa, la formación de un ADN de doble cadena y, posteriormente, la PCR con “primers” específicos para el gen que se va a evaluar. Por último, se realiza el análisis del fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa, ésta técnica es más precisa que un Northern blot o fijación *in situ* (Salazar *et al.*, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Se utilizaron siete genotipos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), de los cuales dos fueron variedades comerciales, una es el jitomate 'Río Grande' tipo bola (R.G), (*S. Lycopersicum lycopersicum*) y la otra es la variedad 'Floradade' tipo Saladette (J.F). Los otros 5 genotipos fueron colectas de poblaciones silvestres obtenidas del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Chapingo, denominadas C-64, C-200, C-101, C-122 y C-115.

3.2 Análisis morfológico y bioquímico

3.2.1 Estrés salino durante el crecimiento vegetal

Se tomaron 20 semillas de cada genotipo, se realizó una selección de las semillas de las colectas (esto para las poblaciones silvestres), posteriormente las semillas se germinaron y las plántulas se transplantaron a bolsas negras con sustrato bajo condiciones de invernadero, con riego de 200 mililitros dos veces al día con solución nutritiva y se dejaron en crecimiento durante 1 mes.

Posteriormente las plantas se sometieron a estrés salino regándose también 2 veces al día con 200 mililitros de agua con las distintas concentraciones de sal (0,100, 150, 200 y 250 mM) durante 20 días, se midió a las plantas antes de que se aplicara el riego con agua salada y se le llamó a este tiempo T0 y después de someterlas al estrés se le denominó T1. Las características que se midieron fueron las siguientes: Área foliar (AF), contenido relativo de agua (CRA), clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT), D-manosa (D-MAN), D-galactosa (D-GAL) y D- glucosa (D-GLU).

3.2.2 Preparación del sustrato

Las plantas de jitomate se cultivaron en macetas con capacidad de 4 L que se llenaron con tezontle. Estas fueron humedecidas hasta alcanzar la capacidad de campo, registrando un peso inicial de 4.280 Kg para todas las macetas.

3.2.3 Fertilización

La fertilización se llevó a cabo mediante hidroponía, la solución nutritiva fue la siguiente: ultra sol 3X18, 763 g, NaCl 251g, cal 226 g, sulfuro de magnesio 300 g y ácido fosfórico 120 ml, en 1100 litros de agua, se realizaron dos riegos al día de 200 ml para las 140 plantas durante un mes.

3.2.4 Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental de bloques completos aleatorizados con 5 tratamientos y 4 repeticiones. Los tratamientos fueron las 5 concentraciones de sal aplicadas para obtener el estrés (0, 100,150, 200 y 250 mM). Cada unidad experimental constó de una maceta y una planta, las variables de interés son las mediciones : Área foliar (AF), altura de planta (AP), contenido relativo de agua (CRA), clorofila a (CA), clorofila b (CB), clorofila total (CT), D-manosa (D-MAN), D-galactosa (D-GAL) y D- glucosa (D-GLU).

3.2.5 Evaluación de las mediciones

Se evaluó el área foliar mediante el uso de fotografías tomadas a los folíolos y el uso de un software easy leaf área Free para la T0 y T1. La altura de la planta se registró en centímetros, ésta se midió de la superficie del sustrato hasta la hoja más alta de la parte aérea.

3.2.6 Análisis bioquímico

3.2.6.1 Clorofila

Se cuantificó el contenido de clorofila antes de riego con sal y después de los 20 días del tratamiento, se utilizó el método de extracción por acetona en el cual se tomó 0.5 g de hoja fresca y se agregó 5 ml de acetona al 80%, se maceró y se tomó el extracto para ser centrifugado a 2000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se ajustó el volumen a 6 ml con acetona al 80%. Se tomó 100 µL de muestra y se diluyó hasta 1 ml con acetona al 80% y se cuantificó en un espectrofotómetro de UV a longitudes de onda de 645 y 663 nm para obtener el contenido de clorofila a, clorofila b y clorofila total con base a las ecuaciones siguientes:

$$\text{Clorofila A} = 12.7 \cdot \text{Abs}_{663\text{nm}} - 2.69 \cdot \text{Abs}_{645\text{nm}}$$

$$\text{Clorofila B} = 22.9 \cdot \text{Abs}_{645\text{nm}} - 4.68 \cdot \text{Abs}_{663\text{nm}}$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila A} + \text{Clorofila B}$$

(Fernández & Johnston, 1986).

3.2.6.2 Azúcares

El total de azúcares solubles (mg/ de peso fresco) se tomó antes de iniciar el tratamiento y pasados los 20 días de tratamiento salino y fue determinado en base al método descrito por Dubois (1951) con algunas modificaciones. Se tomó 0.1 g de hojas frescas, se les añadió 5 ml de etanol al 80% y se calentó por 1 h a 80 °C. Se tomó 250 µL del extracto y se mezcló con 250 µL de fenol al 18% y 250 µL de agua destilada, se mezcló y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 h. Luego se añadió 1.25 ml de ácido sulfúrico y se mezcló. La absorbancia

se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 UV/vis utilizando como blanco etanol al 80%.

3.2.6.3 Contenido Relativo de Agua (CRA)

El contenido relativo de agua (CRA) se evaluó antes de aplicar el tratamiento con solución salina y tras 20 días de aplicarlo, se registró el peso fresco de los segmentos de las hojas durante dos horas después de la escisión, utilizando una balanza analítica. El peso túrgido se obtuvo después de colocar los segmentos de hojas en cajas de petri con agua destilada durante 24 horas. El peso seco se midió luego de secar los segmentos de hojas por 72 horas a 70 °C. El contenido relativo de agua se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$\text{CRA (\%)} = [(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso túrgido} - \text{Peso seco})] \times 100$$

(Siddique *et al.*, 2000).

3.2.7 Análisis de datos

Durante el análisis estadístico realizado para los datos morfológicos y bioquímicos anteriormente mencionados se aplicó un Análisis de Varianza y una Prueba de Comparación de Medias (Tukey $\alpha \leq 0.05$ y Duncan $\alpha \leq 0.05$). Éste análisis se realizó utilizando el paquete computacional IBM SPSS Statistics 23.

3.2.8 Dendrograma de datos morfológicos y bioquímicos

Con los datos obtenidos en los análisis morfológicos y bioquímicos se procedió a realizar una matriz. Fue necesario hacer una estandarización previa de los datos con el paquete computacional NTSYSpc 2.2, con el fin de realizar un análisis de correlación entre las variables, así como un análisis de componentes principales y obtener un dendrograma con datos morfológicos y bioquímicos, el cual posteriormente fue comparado con un dendrograma obtenido con marcadores

moleculares mediante pruebas de Mantel y así conocer la correlación existente entre estos dos análisis.

3.3 Análisis molecular

3.3.1. Extracción y purificación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se pesó 0.3 g de tejido joven y fresco de hoja de cada una de los 7 genotipos, y se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, mismo que se transfirió a microtubos de 1.5 mL. Para la extracción del ADN se utilizó el método descrito por Dellaporta (1983). Se agregó 600 µL de la solución extractora (Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na₂ 50 mM, NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, SDS 0.1 % pH 8.0) a cada microtubo y se incubó a 65 °C por 10 min con inversión ocasional de los tubos. Se adicionó 200 µL de acetato de potasio a una concentración 5 M, se agitaron los tubos por inversión y se dejaron por 30 min a una temperatura de 4 °C. Se centrifugó a temperatura ambiente por 10 min a una velocidad de 12,000 rpm, se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 mL conteniendo 700 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a una temperatura de -20 °C.

Se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a una velocidad de 12,000 rpm, eliminando el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 200 µL de solución para diluir, una vez disuelto el precipitado se añadió a cada tubo 2 µL de ARNasa A y se dejó incubar por 1 h a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se adicionó 20 µL de acetato de sodio 3 M y 200 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó incubando 2 h a una temperatura de -20 °C.

Finalmente, se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a una velocidad de 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con 300 µL de etanol al 70 %, se dejó secar la pastilla y se disolvió en 100 µL de TE. Las muestras se almacenaron a 4 °C para futuros análisis.

3.3.2 Cuantificación y calidad de ADN genómico

Para conocer la concentración de ADN ($\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) de cada muestra se realizó una dilución 1:100, agregando 10 μL de muestra de ADN + 990 μL de H_2O bidestilada estéril y por medio de un Espectrofotómetro Genesys10 UV/Vis a una longitud de onda de 260 nm se obtuvo su absorbancia y su concentración por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \times 100}{1000}$$

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Se mezcló 3 μL de ADN y una gota de amortiguador de carga (0.1% azul de bromofenol, 0.1 % de xilen cianol, 30% de Ficol y 1 % de SDS) y se cargó a los pozos del gel.

Como amortiguador de corrida se utilizó TAE 10X (40 mM Tris-acetato, pH 7.6, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$), diluido a una proporción de 0.5X. La electroforesis se realizó a 100 V hasta que las muestras recorrieron tres cuartas partes del gel para luego ser teñido con bromuro de etidio ($0.5 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$) por 15 min. Posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290.

3.3.3 Amplificación por PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 μL de reacción compuesta de: 2.2 μL de H_2O PCR, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X, 2.0 μL de MgCl_2 (25 mM), 3.0 μL de iniciador (10 pMol), 0.3 μL de Taq ADN polimerasa ($5\text{U}.\mu\text{L}^{-1}$) y 5.0 μL de ADN ($10 \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$).

Con el fin de detectar polimorfismos entre los genotipos de jitomate se procedió a realizar la técnica ISSR-PCR, donde se probaron 50 iniciadores, de los cuales se obtuvo productos de PCR con 10 de ellos. En el Cuadro 1 se indican algunas características de estos iniciadores.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador marca Techne TC-512 bajo las condiciones siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 min, luego 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 1 min y la amplificación a 72 °C por 2 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min, en el Cuadro 1 se muestran los ISSRs utilizados y su polimorfismo en %.

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores ISSR utilizados para la caracterización y evaluación de la diversidad genética de genotipos de jitomate.

Iniciador	Secuencia	% polimorfismo	No. Loci / iniciador
A7	5'-CAC ACA CAC ACA CAC AAC-3'	88.00	9
A8	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3'	69.00	13
A3	5'-CTC CTC CTC CTC CTC CTC-3'	91.66	12
P1	5'-GAG CAA CAA CAA CAA CAA-3'	40.00	5
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG-3'	75.00	12
P5	5'-AGA GAG AGA GAG AGAG-3'	53.84	13
A4	5'-CACACACACACACACAAG-3'	100.00	13
P2	5'-CTG AGA GAG AGA GAG AGAG-3'	28.57	7
7941	5'-GAGA GAG AGA GAG AGA-3'	88.00	9
7955	5'-AGAG AGA GAG AGA GAG-3'	60.00	10
TOTAL		69.40	103

3.3.4 Determinación de relaciones entre genotipos de jitomate

Para detectar polimorfismos entre las variedades se realizaron mezclas de cada uno de los genotipos adicionando 5 µL de cada individuo en un microtubo de 200 µL, se cuantificó y se llevó cada mezcla a una concentración de 10 ng.µL⁻¹ para la realización de la técnica de PCR utilizando los 10 iniciadores descritos anteriormente.

3.3.5 Relaciones entre los individuos dentro de variedades y evaluación de la diversidad genética

Con el fin de determinar relaciones entre individuos dentro de las variedades de jitomate y entre las poblaciones, así como la diversidad genética presente en las poblaciones, se evaluó el polimorfismo en 10 individuos de cada genotipo, utilizando 10 iniciadores del tipo ISSR.

3.3.6 Electroforesis de los fragmentos amplificados

La electroforesis para la separación de productos de PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.2% (p/v) utilizando TAE 0.5X como amortiguador, se realizó en una cámara electroforética horizontal a 120 V cargando 12.5 µL de muestra por pozo. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos. Para la documentación de las huellas de ADN se utilizó el sistema Kodak High Performance Ultraviolet Transiluminator EDAS-290.

3.4 Análisis de los datos

Con los patrones de bandas obtenidos se determinó el número de las mismas o los polimorfismos detectados para cada genotipo y se realizó una matriz binaria presencia o ausencia (1 y 0, respectivamente) para cada uno de los iniciadores usando el programa Office Excel. La matriz binaria se analizó con el software InfoGen/E donde se utilizó un coeficiente de similitud de DICE, se hizo un análisis de conglomerados por el método de medias aritméticas (UPGMA) para obtener

un dendrograma tomando cada genotipo como una unidad taxonómica operacional (OTU).

3.4.1 Prueba de Mantel

Con el fin de determinar la correlación existente entre matrices generadas a partir de patrones de bandeo moleculares y las pruebas bioquímico-morfológicas se realizó una prueba de Mantel con las matrices resultantes de ambos análisis utilizando el software NTSYSpc 2.2 e IBM SPSS 23.

3.4.2 Aislamiento de ADNc de secuencias de genes mediante RT-PCR convencional

Se tomó hojas de 4 genotipos trabajados (C-101, Floradade, C-115, C-200) y se colocaron en tubos de cultivo celular conteniendo 50 ml de NaCl a 200 mM durante 0 h, 3 h, 12 h y 24 h. Se realizó una extracción de ARNm al momento de terminado el tiempo de los tratamientos.

La extracción de ARNm se llevó a cabo mediante el protocolo de extracción de Trizol LS Reagent de la marca Thermofisher. Una vez purificado, el ARNm se utilizó para sintetizar la primera cadena de cDNA con el protocolo First Strand cDNA kit #k1611 para los genes de LOX y JERF1. Las secuencias de los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 2. Las condiciones de reacción aplicadas en los diferentes pasos de la RT-PCR se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores utilizados para hacer la RT-PCR.

Iniciador	Forward	Reverse
LOX	5'- GAATTCATGTCTTTGGGTGGAA TTGT-3'	5'- GGATCCCTATATAGACACACTG TTGG-3'
JERFF1	5'- GAATTCATGTGTGGTGGTGCA ATTAT-3'	5'- GGATCCTTAGTAGGCACCTCCC ATTA-3'

Las secuencias resultantes se corrieron en geles de agarosa para ver la presencia o ausencia de las bandas en los diferentes tiempos del experimento, los ciclos de RT-PCR que se utilizaron se muestran en el Cuadro 3. Las secuencias se aislaron y purificaron para su posterior secuenciación para poder llevar a cabo una clonación posterior.

Cuadro 3. Parámetros utilizados en la RT-PCR convencional para amplificar los cDNA de LOX donde el segmento 2 es de 51°C y para JERF1 cambia a 42 °C.

Acción	# Ciclos	Temperatura	Tiempo	3.4.3 Análisis de
1. Desnaturalización	1	95°C	5 min	
2. Amplificación del cDNA	30	Segmento 1 94°C	60 seg	
		Segmento 2 51°C	60 seg	
		Segmento 3 72°C	60 seg	
3. Elongación terminal	1	72° C	10 min	

secuencias genómicas de genes de resistencia al estrés por sal mediante PCR

Se realizó PCR de 2 genes LOX y JERF1 para comprobar que estaba presente en todos los genotipos con los que se trabajó. En el Cuadro 4 se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados.

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar las secuencias genómicas de los genes LOX y JERF1 mediante PCR.

Inicia dor	Forward	Reverse	Temp. Alineami ento
LOX	GAATTCATGTCTTTGGGT GGAATTGT	GGATCCCTATATAGACAC ACTGTTGG	51 °C
JERF 1	GAATTCATGTGTGGTGG TGCAATTAT	GGATCCTTAGTAGGCAC CTCCCATTA	42°C

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y se comprobó que las secuencias estuvieran dentro del peso molecular esperado, se realizó purificación de las bandas para poder mandar secuenciar y comprobar que fueran las secuencias esperadas.

La PCR se llevó a cabo como antes se ha señalado solo modificando la temperatura y en vez de colocar un solo iniciador como es el caso de los ISSR se empleó dos para poder amplificar las secuencias de los genes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Respuesta de las plantas de jitomate al estrés por salinidad

4.1.1. Efecto del estrés salino en el contenido de clorofilas a, b y total, según la prueba de correlación de Pearson

En el Cuadro 5 se muestra que existe una correlación baja y positiva entre los tratamientos de salinidad y la cantidad de clorofilas a, b y total de los materiales evaluados. Los valores de correlación fueron de 0.338, 0.237 y 0.386, respectivamente, lo que sugiere que los tratamientos de salinidad aplicados no afectan la cantidad de clorofila de los genotipos de jitomate. Sin embargo, cuando se realizó una comparación entre los materiales no estresados (T0 CT) y los estresados (T1 CT) para la cantidad de clorofila total (CT), en la Figura 10 se observa que aumenta la cantidad de clorofila total después de aplicar los tratamientos de salinidad T1 CT con respecto al tratamiento testigo (T0 CT). Es posible que bajo los tratamientos de salinidad las plantas trataron de producir mayor cantidad de clorofila total debido al déficit hídrico que estaban sufriendo a fin de generar más fotosintetizados y tratar de contrarrestar el efecto del estrés. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Chávez & González (2009), quien no observa un incremento significativo en la cantidad de clorofilas por efecto del estrés salino. En nuestro trabajo, por lo contrario, observamos un efecto de la salinidad en el incremento en las concentraciones de las clorofilas a, b y total al aplicar los tratamientos a partir de una concentración de NaCl de 100 a 200 mM. Según menciona Ashraf & Foolad (2007) la cantidad de pigmentos fotosintéticos es un buen indicador para medir los efectos del estrés por salinidad ya que éste tiene una incidencia directa sobre la tasa fotosintética. En plantas de *Hibiscus esculentus* se ha reportado un aumento de la clorofila en situación de estrés salino, mientras que en *Zea mays* y *Carthamus tinctorius* el contenido disminuye y en *Ricinus communis* los contenidos de clorofila varían según el tiempo de exposición y el nivel de estrés al que se sujeta la planta, en el caso del *L. esculentum* todos los pigmentos decrecieron por el estrés salino y al igual que en *R. communis* el efecto depende del tiempo de exposición, pero se encontró

que la variedad de jitomate Argy mostró ser más tolerante al estrés salino que los otros cultivares como Hazera y Dalli (Dognalar *et al.*, 2010). En plántulas de trigo menciona Argentel *et al.* (2006) que si existe una relación en el contenido de clorofilas respecto al de los carotenoides bajo estrés salino.

Cuadro 5. Valores de correlación lineal de Pearson en el T1 (tiempo de exposición a salinidad) para las variables morfológicas-bioquímicas.

		Sal mM	T1 Área Foliar	T1 CRA	T1 Clorofila A (µg/mL)	T1 Clorofila B (µg/mL)	T1 Clorofila Total (µg/mL)	T1 D-Manosa (mg/g)	T1 D-Galactosa (mg/g)	T1 D-Glucosa (mg/g)
Sal mM	Correlación de Pearson	1	0.111	-0.019	0.338**	0.237**	0.386**	-0.723**	-0.728**	-0.726**
	Sig. (Bilateral)	0	0.822	0.822	0	0.004	0	0	0	0
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 Área Foliar	Correlación de Pearson	0.111	1	-0.012	-0.029	0.041	0.014	-0.101	-0.095	-0.096
	Sig. (Bilateral)	0.187	0	0.889	0.735	0.629	0.87	0.229	0.258	0.256
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 CRA	Correlación de Pearson	-0.019	-0.12	1	0.06	-0.091	-0.037	0.104	0.081	0.111
	Sig. (Bilateral)	0.822	0.889	0	0.479	0.282	0.664	0.215	0.335	0.188
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 Clorofila A (mg/L)	Correlación de Pearson	0.338**	-0.029	0.06	1	0.094	0.701**	-0.118	-0.12	-0.117
	Sig. (Bilateral)	0	0.735	0.479	0	0.266	0	0.159	0.153	0.163
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 Clorofila B (mg/L)	Correlación de Pearson	0.237**	0.041	-0.091	0.094	1	0.769**	-0.185*	-0.183*	-0.186*
	Sig. (Bilateral)	0.004	0.629	0.282	0.266	0	0	0.027	0.029	0.026
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 Clorofila Total (mg/L)	Correlación de Pearson	0.386**	0.014	-0.037	0.701*	0.769**	1	-0.208*	-0.208*	-0.209*
	Sig. (Bilateral)	0	0.87	0.664	0	0	0	0.013	0.013	0.012
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 D-Manosa (µg/L)	Correlación de Pearson	-0.728**	-0.01	0.104	-0.118	-0.185*	-0.208*	1	0.997**	0.998**
	Sig. (Bilateral)	0	0.229	0.215	0.159	0.027	0.013	0	0	0
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 D-Galactosa (µg/L)	Correlación de Pearson	-0.728**	-0.095	0.081	-0.12	-0.183*	-0.208*	0.997**	1	0.998**
	Sig. (Bilateral)	0	0.258	0.335	0.153	0.029	0.013	0	0	0
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143
T1 D-Glucosa (µg/L)	Correlación de Pearson	-0.726**	-0.096	0.111	-0.117	-0.186*	-0.209*	0.998**	0.998**	1
	Sig. (Bilateral)	0	0.256	0.188	0.163	0.026	0.012	0	0	0
	N	143	143	143	143	143	143	143	143	143

Se marca con * las relaciones con una significancia de 0.05 (bilateral) y con ** aquellas con una correlación significativa de 0.01 (bilateral).

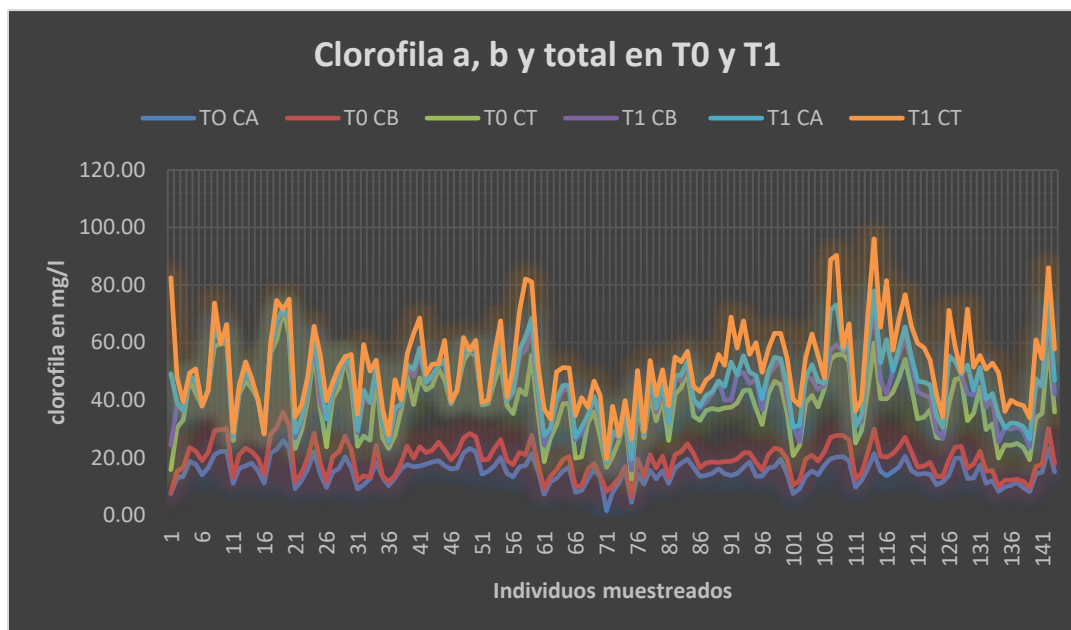


Figura 10. Cambios en la concentración de clorofila a (CA), b (CB) y total (CT) en plantas de jitomate bajo condiciones de hidratación normal (T0) y bajo estrés por salinidad (T1).

En maíz y otras especies la disminución en el contenido de clorofilas se ha utilizado como un indicativo del efecto del estrés. En el caso del jitomate los niveles de las clorofilas se incrementan, lo que podría ser un indicativo de tolerancia al estrés salino, por lo que la medición de esta variable podría ser útil para la selección de genotipos tolerantes a este factor abiótico.

4.1.2. Efecto del estrés salino en el contenido de azúcares de plantas de jitomate según la prueba de correlación de Pearson

El estrés salino mostró correlación alta y negativa con la concentración de carbohidratos como la D-Manosa, D-Galactosa y D-glucosa (Cuadro 5). A medida que hubo un incremento en los niveles de salinidad disminuyó la cantidad de estos azúcares en las plantas. Los valores de correlación de Pearson fueron de -0.723, -0.728 y -0.726, respectivamente (Cuadro 5).

De la Figura 11 se observa que en el tratamiento sin estrés (T0) la concentración de varios de los azúcares alcanza hasta 350 μg en varios individuos, mientras que bajo estrés por salinidad (T1) los niveles decaen casi a cero en algunos individuos.

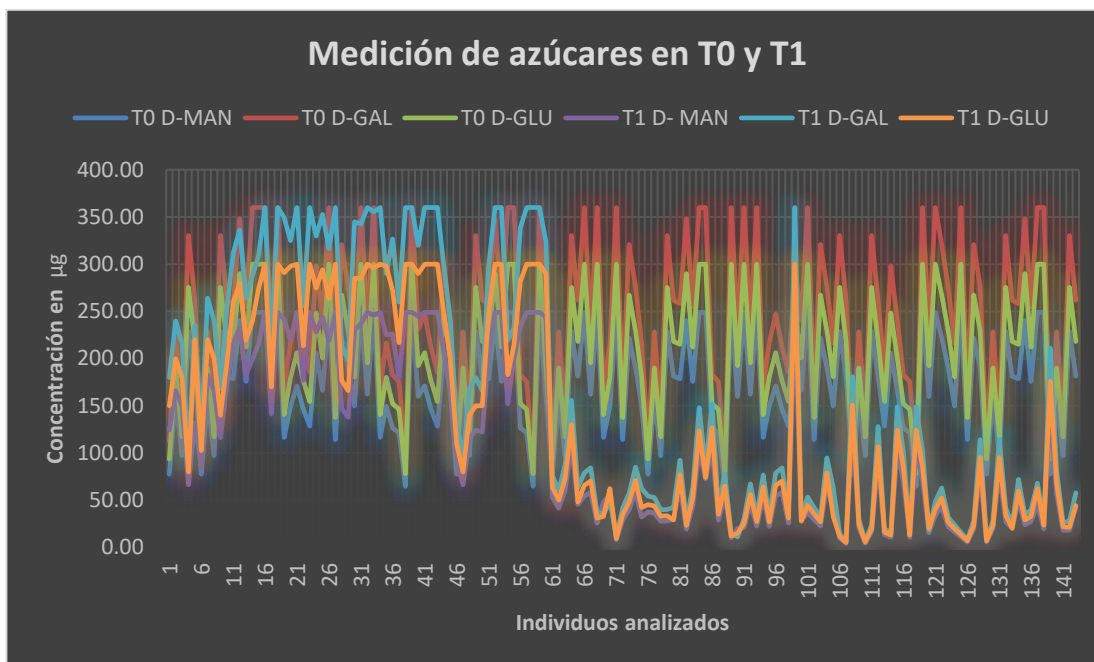


Figura 11. Contenido de azúcares en T0 y T1 se puede observar que la cantidad de D-manosa y D-galactosa (T0 D-MAN y T0 D-GAL).

En otro estudio (Hernández, 2017), con jitomates bajo condiciones de estrés salino encuentran que existió un aumento de la concentración de azúcares en las variedades comerciales, en la variedad comercial Micro-Tom el estrés por salinidad aumentó un 29 y 28 % la concentración de glucosa y la fructosa, respectivamente; mientras que en la variedad Optima provocó un aumento del 148 % y el 146 % de ambos azúcares, respectivamente. La tolerancia se asoció a la acumulación de prolina y azúcares solubles, así como menos niveles de malondialdehído, un producto de la peroxidación lipídica inducida por especies activas de oxígeno (Trujillo *et al.*, 2008), parece que hay un periodo en el cual la planta de jitomate aumenta los niveles de azúcares y ese periodo está asociado al estrés hídrico, pero una vez que la planta diferencia entre el estrés hídrico y

salino los niveles de azúcares tienden a reducirse linealmente al aumentar la concentración de las sales.

Aunque para nuestro trabajo estadísticamente no es significativo el número de individuos que después del estrés sigue generando glucosa, si parece una variable o señal que permita seleccionar estos materiales debido a que bajo estrés siguen teniendo energía para utilizarla en procesos como generar flores y por ende frutos.

4.1.1.3 Efecto del estrés salino en el contenido relativo de agua (CRA)

En el Cuadro 5 se muestra que el contenido relativo de agua (CRA) y el área foliar bajo condiciones de estrés por salinidad (T1) no tuvieron ninguna correlación estadísticamente significativa según la correlación de Pearson, por lo tanto no hay una relación lineal de estos componentes con los otros medidos para T1.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la comparación de medias Tukey y Duncan de las variedades bajo condiciones de estrés salino (T1). Se observa que existen diferencias significativas entre las medidas de los distintos genotipos muestreados después de darse el estrés. La media significativamente más alta fue para el genotipo C-101, mismo que se mostró más tolerante después de aplicar el estrés, por lo cual obtuvo una respuesta que generó un grupo diferente en la prueba de Duncan. En lo relativo a la prueba de Tukey, se encontró que las variedades C-64 y C-200 también muestran valores que las diferencian de los otros genotipos para el contenido relativo de agua, existiendo diferencias genotípicas entre las variedades para ésta característica.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de medias Tukey y Duncan para la variable contenido relativo de agua una vez dado el estrés (T1 CRA), para los genotipos evaluados.

T1 CRA				
PRUEBA/GENTIPO		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey	Río Grande	21	49.993	
	Floradade	22	55.67	
	C-115	20	56.54	
	C-122	20	60.79	
	C-64	20	63.64	63.64
	C-200	20	63.88	63.88
	C-101	20		85.46
	Sig.		0.51	0.061
Duncan	Río Grande	21	49.99	
	Floradade	22	55.67	
	C-115	20	56.54	
	C-122	20	60.79	
	C-64	20	63.64	
	C-200	20	63.88	
	C-101	20		85.46
	Sig.		0.107	1

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

En la Figura 12 se observa que el genotipo C-101 tuvo la mejor respuesta para retener agua en los tejidos y mantener turgencia celular (CRA, por arriba del 80 %) ante el estrés salino.

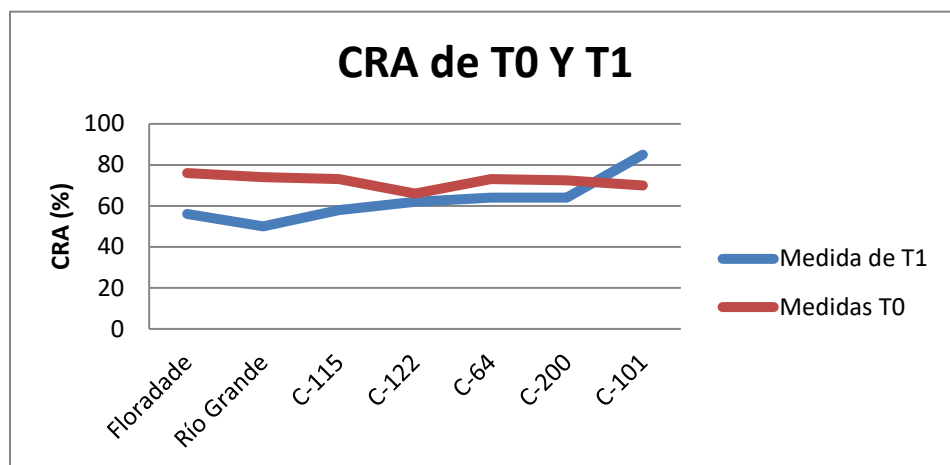


Figura 12. Respuesta de los genotipos según la variable CRA, en presencia del estrés por sal (T1) y en ausencia del estrés (T0), según el cálculo medio de la varianza para las 20 plantas por genotipo.

Como ya se mencionó, las pruebas estadísticas avalan diferencias estadísticas significativas para este factor. La pérdida de turgencia celular provocada por el estrés salino se debe a una disminución del potencial hídrico del suelo por la acumulación de sales, llegando a ser inferior que el potencial de las células de la raíz para absorber el agua disponible (González, 2001). Además, en la misma Figura 12 se observa que después del estrés salino las variedades comerciales 'Floradade' y 'Río Grande', fueron las que tuvieron una peor respuesta a los cuatro tratamientos de sal y los genotipos no comerciales obtuvieron los mejores porcentajes de contenido relativo de agua. Los 4 genotipos silvestres C-101, C-122, C-200 y C-64 tuvieron un valor de CRA igual o por encima del 60 % bajo estrés salino.

Sin estrés las variedades comerciales fueron las que mostraron mejor contenido relativo de agua, aunque todos por igual o por encima del 67.5 % de CRA, lo cual indica que las variedades comerciales bajo estrés tuvieron una caída considerable en el CRA dado que rondaban por encima del 70 %. De los resultados se puede inferir que los genotipos silvestres pueden tolerar más tiempo el estrés salino que las variedades comerciales.

4.1.1.4 Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila A

El Cuadro 7 muestra la comparación de medias múltiple de Duncan y de Tukey para la concentración de clorofila A en los genotipos evaluados. La prueba de Duncan arrojó diferencias significativas entre los genotipos pero la de Tukey que maneja un umbral fijo de los valores no muestra grupos, aunque si se sigue la tendencia de los grupos mostrados por Duncan es posible distinguir genotipos más propensos a tolerar el estrés salino que si se considera la prueba de Tukey.

Cuadro 7. Prueba de medias Tukey y Duncan y agrupaciones de los genotipos para el contenido de clorofila A.

T1 CLOROFILA A (µg/mL)				
PRUEBA/GENOTIPO		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey	C-200	20	3.63	
	Floradade	22	3.74	
	Río Grande	21	4.78	
	C-64	20	5.39	
	C-122	20	5.49	
	C-101	20	5.49	
	C-115	20	6.57	
	Sig.		0.088	
Duncan	C-200	20	3.63	
	Floradade	22	3.74	
	Río Grande	21	4.78	4.78
	C-64	20	5.39	5.39
	C-122	20	5.49	5.49
	C-101	20	5.49	5.49
	C-115	20	6.57	6.57
	Sig.		0.129	0.137

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

El genotipo que mostró la mejor respuesta para éste factor fue el C-115 como se observa en la Figura 13.

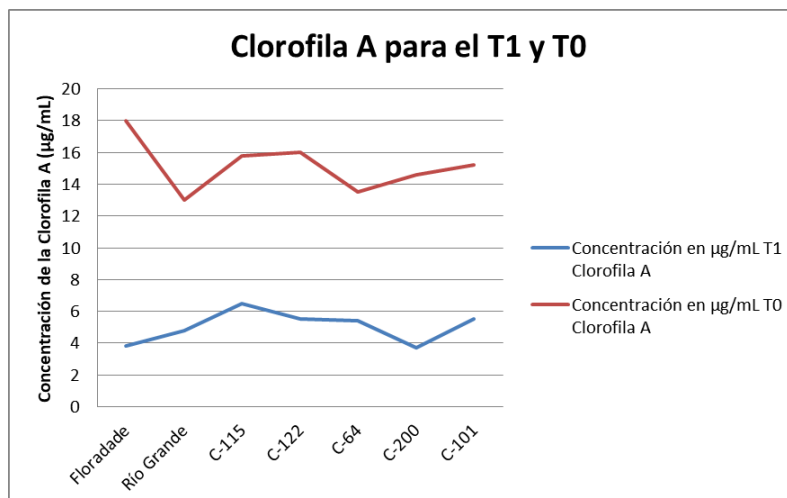


Figura 13. Contenido de Clorofila A en las variedades después de someterlas a estrés salino (T1) y sin estrés (T0).

Dicho genotipo fue el que tuvo la mayor concentración del pigmento en comparación con el resto de los genotipos. Sin embargo las colecciones C-64, C-101 y C-122, mostraron concentraciones por arriba de los 5 µg/mL. Bajo condiciones de estrés (T1) todos los genotipos disminuyeron la concentración de la clorofila A en comparación con las condiciones no estresantes (T0), aunque las variedades comerciales “Floradade” y “Río Grande” redujeron en mayor grado sus concentraciones.

En la misma Figura 13, se observa que sin estrés (T0) la variedad comercial ‘Floradade’ fue la que presentó mayor cantidad de clorofila A de todos los genotipos, sin embargo el pigmento disminuyó drásticamente bajo el estrés (T1).

Se sabe que la disminución de las funciones fotosintéticas se debe entre otros varios factores al contenido de clorofila que tenga la planta, ya que la clorofila se puede degradar en condiciones de estrés por las clorofilasas, enzimas que remueven el fitol de la estructura del pigmento (Santos, 2004).

Por otra parte, se sabe que se puede inhibir su síntesis debido al estrés salino por bloqueo de la ruta del ácido glutámico y el ácido aminolevulínico (ALA), precursor de la síntesis de los tetrapirroles (Santos, 2004). Esto puede ocurrir en

la etapa en que la planta diferencia al estrés salino del estrés por déficit hídrico o por choque térmico ya que parece que las enzimas de la vía de síntesis de la clorofila son afectadas por esta vía (Satpal & Tripathy, 2014). Los resultados muestran que la síntesis de la clorofila A disminuyó siendo consistente con lo anteriormente citado.

También, se ha reportado que el estrés salino induce una reducción en el número de cloroplastos, los cuales también muestran degradación de los tilacoides y las membranas (Santos, 2004). Bajo estrés salino, se ha reportado que la planta de jitomate variedad “Río Grande” acorta su ciclo de crecimiento, generando una rápida maduración de las hojas (Akca & Samsunlu, 2012) y a la vez disminuye su capacidad de emisión de brotes, esto es consistente con lo encontrado en nuestro trabajo para dicha variedad. De Lucena *et al.* (2012) demuestra en mango que hubo una disminución tanto en número de hojas como en el contenido de clorofilas a medida que aumentaban la salinidad en el medio. Dicho fenómeno se observó en este trabajo solo con las variedades comerciales pero no con los genotipos silvestres.

4.1.4. Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila B

El Cuadro 8 muestra la comparación de medias múltiple de Duncan y de Tukey para la concentración de clorofila B en los genotipos evaluados. Se observa que no hubo formación de grupos alternos en las dos pruebas, teniendo un comportamiento igual en ambos casos.

Cuadro 8. Pruebas de Tukey y Duncan para la Clorofila B, para los genotipos evaluados.

T1 CLOROFILA B (µg/mL)			
PRUEBA/GENTIPO		N	Subconjunto para alfa = 0.05
			1
HSD Tukey	C-200	20	1.04
	C-101	20	1.79
	Río grande	21	1.8
	C-122	20	2.15
	Floradade	22	2.44
	C-64	20	2.7
	C-115	20	2.76
	Sig.		0.722
Duncan	C-200	20	1.04
	C-101	20	1.79
	Río grande	21	1.8
	C-122	20	2.15
	Floradade	22	2.44
	C-64	20	2.7
	C-115	20	2.76
	Sig.		0.192

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

En la Figura 14, se observa que el estrés salino disminuye la cantidad de clorofila B producida por las plantas de jitomate, siendo el genotipo silvestre C-200 el que muestra menos cantidad (de 1 µg/mL).

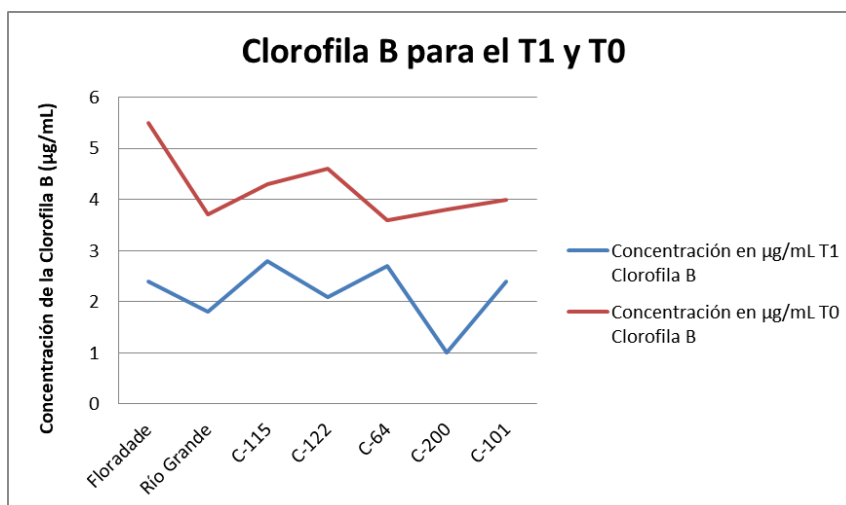


Figura 14. Concentración de la clorofila B en T1 y T0 para cada variedad.

Las variedades comerciales disminuyeron la concentración de T0 a T1 en un 50 % pero en este caso no existe significancia estadística como el caso de la Clorofila A.

4.1.4. Efecto del estrés salino en la concentración de clorofila total

En el Cuadro 9 se observa la formación de dos grupos de variedades bien definidos para las clorofilas totales. Estas diferencias sugieren que los genotipos tendieron a comportarse de dos formas distintas en relación al estrés salino. Si se comparan los materiales de manera individual, es posible apreciar que el genotipo C-115 es el que destaca en su contenido de clorofila total aunque estadísticamente se comporta como los otros exceptuando al genotipo 200. En general según lo mencionado anteriormente se tiene que el contenido de clorofilas disminuye al pasar de T0 a T1 pero existen diferencias estadísticas significativas para señalar que hay genotipos tolerantes tomando en cuenta éste factor (Figura 15).

Cuadro 9. Resultados de los estadísticos de Tukey y Duncan para las concentraciones de clorofilas totales en T1.

T1 CLOROFILA TOTAL (µg/mL)				
PRUEBA/GENOTIPO		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD Tukey	C-200	20	4.46	
	Floradade	22	6.09	6.09
	Río Grande	21	6.2	6.2
	C-101	20	7.11	7.11
	C-122	20	7.35	7.35
	C-64	20	7.93	7.93
	C-115	20		9.27
	Sig.		0.312	0.421
Duncan	C-200	20	4.46	
	Floradade	22	6.09	6.09
	Río Grande	21	6.2	6.2
	C-101	20	7.11	7.11
	C-122	20	7.35	7.35
	C-64	20	7.93	7.93
	C-115	20		9.27
	Sig.		0.057	0.082

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

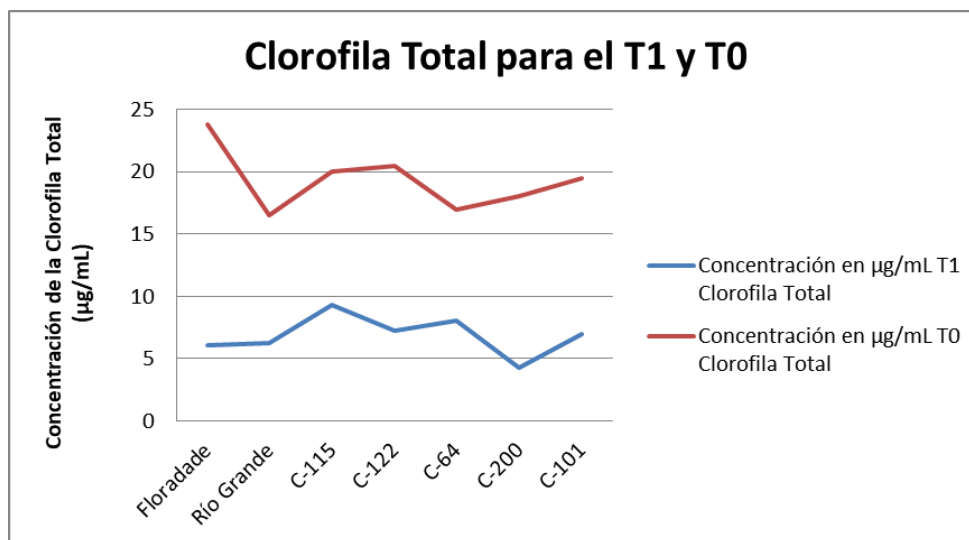


Figura 15. Contenido de clorofila total por variedad en T0 y T1.

4.1.1.5 Efecto del estrés salino en la concentración de azúcares

En el Cuadro 10 se observa que existe evidencia estadística para distinguir 3 grupos respecto a la concentración de D-manosa después del estrés salino según la prueba de Duncan y dos grupos según Tukey.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de Duncan y Tukey para el azúcar D-Manosa en los distintos genotipos evaluados.

T1 D-Manosa (mg/g)					
PRUEBA/GENTIPO		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD Tukey	C-64	20	62.94		
	Río Grande	21	70.9	70.9	
	Floradade	22	80.78	80.78	
	C-200	20	128.48	128.48	
	C-101	20	135.77	135.77	
	C-115	20		143.17	
	C-122	20		145.75	
	Sig.		0.088	0.073	
Duncan	C-64	20	62.94		
	Río Grande	21	70.9		
	Floradade	22	80.78	80.78	
	C-200	20		128.48	128.48
	C-101	20			135.77
	C-115	20			143.17
	C-122	20			145.75
	Sig.		0.526	0.071	0.556

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

La prueba de Duncan permite distinguir las variedades susceptibles de las resistentes. Este criterio es el que mejor refleja el comportamiento que mostraron los materiales en el experimento y señala muy bien que los genotipos que fueron tolerantes al estrés salino son aquellos englobados en el grupo 3 (C-200, C-101, C-115 y C-122).

En la Figura 16 puede verse que las variedades comerciales ‘Floradade’ y ‘Río Grande’ presentan cantidades muy bajas de D-manosa y el genotipo C-64 también, siendo el genotipo C-122 el que más acumuló este carbohidrato después de darse el estrés. Se puede observar el comportamiento mostrado por la prueba de Duncan.

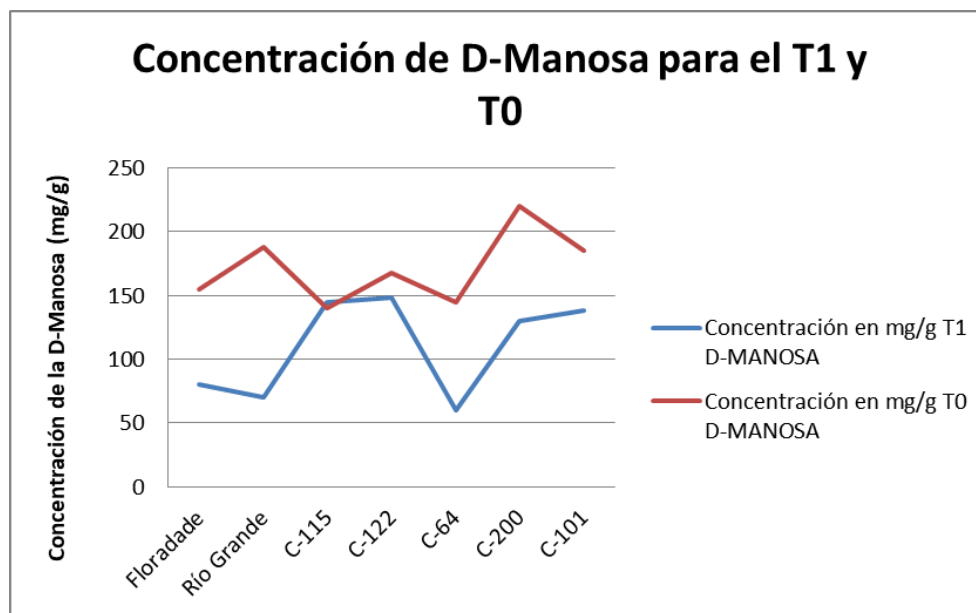


Figura 16. Contenido de D-Manosa para el T1 y T0 de los diferentes genotipos.

En la misma Figura 16 se observa que el genotipo C-115 no cambió su comportamiento con respecto a la concentración de D-manosa obtenida en T0 y T1 y de hecho aumentó un poco dicha concentración y el genotipo C-122 no bajó tanto su concentración, como en el caso de genotipo C-64 que bajó significativamente su concentración en T1 y en T0, los genotipos C-200 y C-101 no bajaron su concentración más allá de los 130 mg/g.

Unos polisacáridos hemicelulósicos presentes en las paredes celulares son los mananos que constituyen un grupo muy heterogéneo en el que la D-manosa es el componente mayoritario. Su cadena central puede estar formada únicamente por restos de D-manosa unidos por un enlace $\beta(1-4)$ o presentar restos de D-glucosa intercalados (glucomananos), los mananos pueden ser componentes de reserva en algunas semillas mientras que los (galacto) glucomananos están presentes en cantidades significativas en paredes secundarias de tejido lignificado de coníferas (12-15%) y en menor cantidad de angiospermas (3-5%) (Azcón & Talón, 2000).

Las reservas de carbohidratos están constituidas por los carbohidratos no estructurales totales. Ellos son los primeros productos de la fotosíntesis, y constituyen la energía usada para los procesos asociados con el crecimiento y

mantenimiento. Como una consecuencia, el balance entre la fotosíntesis (fuente), el crecimiento y la respiración (sumidero) determina las concentraciones de carbohidratos no estructurales en la planta, con valores absolutos que dependen del rango de crecimiento y el estado de desarrollo, así como de las condiciones ambientales (Fulkerson & Donaghy, 2001). Los carbohidratos no estructurales son reductores como glucosa y pentosanos, los no reductores son sacarosa, fructosanos y almidón. El hecho de que las plantas acumulen la manosa y glucosa biodisponible para utilizar en distintas rutas metabólicas que requiera en un futuro en condiciones de estrés es un indicativo de que la planta está tolerando el estrés y se está preparando para futuros problemas que tenga en el desarrollo. En *Lolium perenne* se relacionó el contenido de fructosanos en la envoltura foliar y en la base de las hojas con el rendimiento de las ramas durante los primeros días después de la defoliación, observándose que se incrementó en 2 ó 3 veces la actividad de la exohidrolasa del fructosano en la envoltura foliar (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). Se sabe que la salinidad induce menor abundancia y actividad de la manitol deshidrogenasa (MTD) que transforma el manitol en manosa, dando lugar a la acumulación de manitol pero no de azúcares en los tejidos de las plantas (Benavides-Mendoza, 2002). En nuestros ensayos los genotipos mostraron la respuesta contraria, acumulando azúcares en presencia del estrés lo cual contradice lo encontrado por este autor. Por otro lado, la ruta que sintetiza manitol, un osmolito reconocido por proporcionar tolerancia al estrés hídrico requiere (glucosa-6-fosfato), la glucosa en algunos genotipos se acumuló tras el estrés como se verá más adelante, esto podría ayudar a generar más osmolitos protectores.

En el Cuadro 11 se muestran los resultados de la prueba de medias para la D-glucosa, según Duncan y Tukey. La prueba de Duncan permitió agrupar a los genotipos en 3 grupos.

Cuadro 11. Resultados de la las pruebas de Tukey y Duncan para la D-glucosa en T1, para los genotipos evaluados.

T1 D-Glucosa (mg/g)				
PRUEBA/GEN TIPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
HSD Tukey	C-64	20	78.05	
	Río Grande	21	85.19	85.19
	Floradade	22	96.57	96.57
	C-200	20	153.9	153.9
	C-101	20	165.05	165.05
	C-115	20	171.64	171.64
	C-122	20		175.33
	Sig.		0.061	0.081
Duncan	C-64	20	78.05	
	Río Grande	21	85.19	
	Floradade	22	96.57	96.57
	C-200	20		153.9
	C-101	20		165.05
	C-115	20		171.64
	C-122	20		175.33
	Sig.		0.591	0.076
				0.55

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

De la Figura 17 se muestra que en T0 la concentración de glucosa superó los 150 mg/g, lo cual es un indicativo de referencia debido a que los genotipos C-115, C-122, C-200 y C-101 superaron ésta cantidad en T1 y las variedades comerciales junto con C-64 decayeron por debajo de los 100 mg/g. El

comportamiento de éste azúcar es muy parecido al de la D-manosa, formándose 3 grupos según la prueba de Duncan.

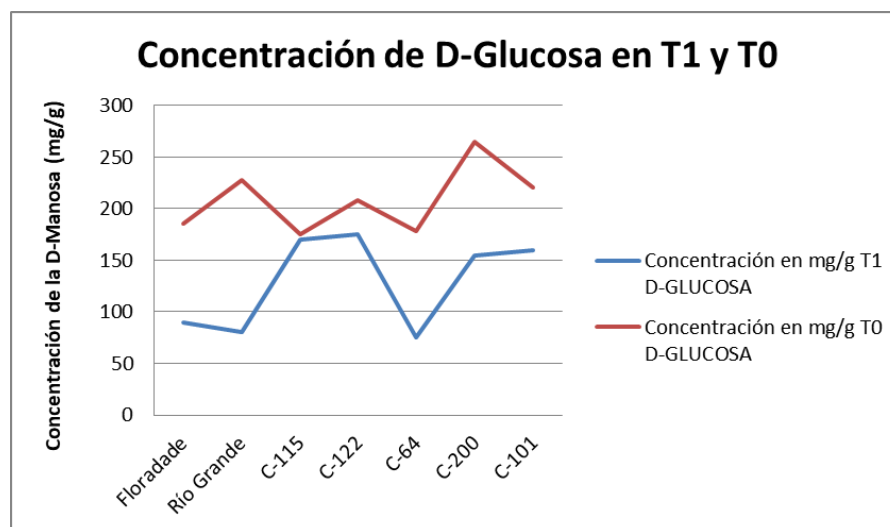


Figura 17. Concentración de D-glucosa para los 7 genotipos evaluados a partir de 20 plantas testeadas para cada genotipo en los diferentes tiempos T0 y T1.

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de la prueba de medias para la D-galactosa, según Duncan y Tukey. En este caso el grupo 4 generado según la prueba de Duncan muestra los genotipos que dieron buenas respuestas para la variable medida en relación al estrés y sugiere que los genotipos superiores son C-200, C-101, C-115, y C-122, todos materiales silvestres.

Cuadro 12. Resultados para la D-Galactosa según las pruebas de Tukey y Duncan, para los genotipos evaluados en T1.

T1 D-Galactosa (mg/g)						
PRUEBA/GENTIPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	
HSD Tukey	C-64	20	92.88			
	Río Grande	21	104.08	104.08		
	Floradade	22	116.4	116.4		
	C-200	20	181.9	181.9		
	C-101	20	202.72	191.55		
	C-115	20		202.72		
	C-122	20		210.32		
	Sig.		0.067	0.085		
Duncan	C-64	20	92.88			
	Río Grande	21	104.08	104.08		
	Floradade	22	116.4	116.4	116.4	
	C-200	20		181.9	181.9	181.9
	C-101	20			191.55	191.55
	C-115	20				202.72
	C-122	20				210.32
	Sig.		0.565	0.054	0.063	0.504

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

En la Figura 18 se observa que los genotipos C-115 y C-122 no decayeron en T1 en contraste con las variedades comerciales 'Floradade' y 'Río Grande' y el genotipo silvestre C-64, en que las concentraciones cayeron por debajo de 100 mg/g, en tanto que las variedades C-200 y C101 se mantuvieron por encima de 150 mg/g al igual que lo hicieron los genotipos C-115 y C-122, se observó que estos últimos genotipos lograron estabilizar las concentraciones de D-galactosa, no así los primeros 3, donde decayeron considerablemente.

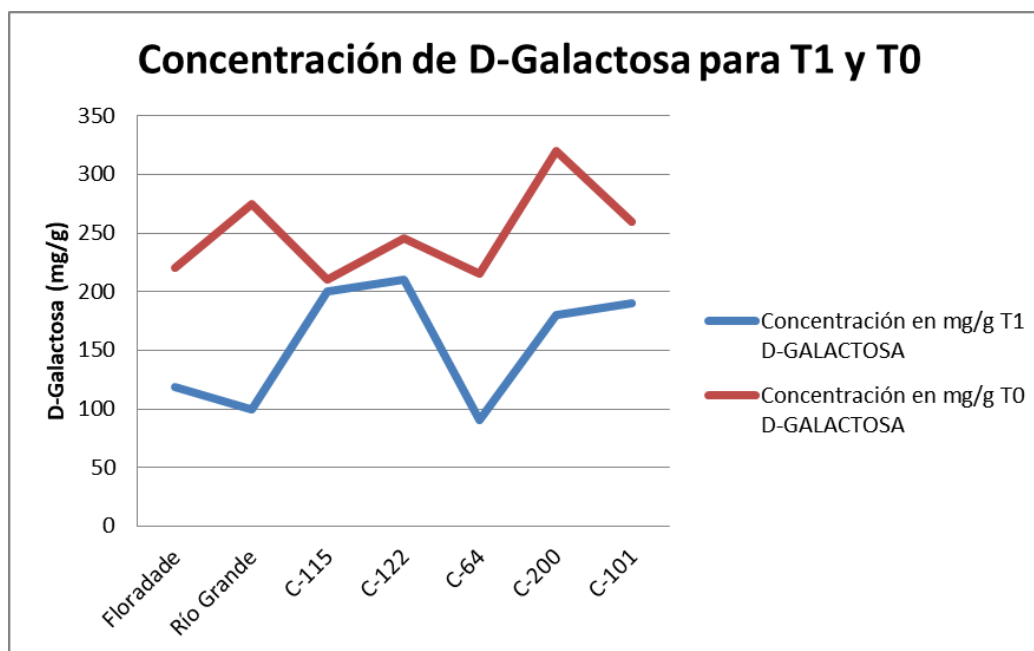


Figura 18. Concentraciones de D-galactosa en T1 y T0 para cada genotipo analizado.

También, se observó que las variedades 'Floradade' y 'Río Grande' decaen considerablemente en sus concentraciones de D-galactosa. De tener valores arriba de 200 mg/g en T0 bajaron a 100 mg/g en T1, mientras que los genotipos C-115 y C-122 no redujeron su concentración por debajo de los 200 mg/g en T1, el genotipo que obtuvo la concentración más baja fue el C-64 mientras que C-200 obtuvo 180 mg/g y 190 mg/g para C-101. En el caso del genotipo C-200 que mostró valores por encima de 300 mg/g en T0, fue el que mayor producción de D-galactosa tuvo de los genotipos evaluados.

4.1.1.6 Efecto del estrés salino en el área foliar

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de la prueba de medias para el área foliar, según Duncan y Tukey.

Cuadro 13. Prueba de medias según Duncan y Tukey para la variable área foliar en T1 para los genotipos evaluados.

T1 Área Foliar (cm2)					
PRUEBA/GEN TIPO	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
HSD Tukey	C-115	20	7.95		
	C-101	20	13.06	13.06	
	Río Grande	21	15.78	15.78	15.78
	C-122	20	16.02	16.2	16.02
	C-64	20	16.26	16.26	16.26
	Floradade	22		18.12	18.12
	C-200	20			22.53
	Sig.		0.056	0.552	0.208
Duncan	C-115	20	7.95		
	C-101	20	13.06	13.06	
	Río Grande	21		15.78	
	C-122	20		16.02	
	C-64	20		16.26	
	Floradade	22		18.12	18.12
	C-200	20			22.53
	Sig.		0.112	0.112	0.119

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se utilizó el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.404 para HSD Tukey y Duncan. Los tamaños de grupo no son iguales para HSD Tukey y Duncan. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo.

En el mismo Cuadro 13 se observa que se forman 3 grupos tras haberse proporcionado el estrés. Los grupos formados tienen que ver un tanto con el efecto del estrés, aunque también las diferencias se deben a la morfología intrínseca (tamaño de folíolos) de los genotipos evaluados.

En la Figura 19 se muestra que bajo condiciones de estrés salino (T1) hubo una reducción del área foliar para la mayoría de los genotipos. La colección C-200 tuvo una reducción del 22.58 %, el genotipo “Floradade” un 33.33 %, “Río Grande” un 46.66 %, C-64 de 48.38%, C-101 un 44 %, C-115 un 66.66 % y C-122 un 34.7 %. Por lo cual todos los genotipos sufrieron pérdida de área foliar y estadísticamente se encontraron 3 grupos distinguibles según la prueba de Tukey. El grupo 3 es el que se mostró mejor para tolerar el estrés salino según ésta variable.

La disminución del área foliar es algo que ocurre cuando se somete a las plantas al estrés salino, como lo menciona Romero *et al.* (2001) para los cultivares Daniela con un 16% de área total después del estrés y Moneymarker con un 33%

después de someterlas a una concentración de sal de 70 mM. También, Goykovic & Saavedra (2007) en *L. esculentum* observaron una reducción en el número de hojas, el área foliar y menos frutos con menos pesos bajo estrés salino, detectando además una gran heterogeneidad en la respuesta al estrés, puesto que algunos cultivares fueron altamente sensibles y otros tolerantes. En *Psidium guajava* L. la salinidad también redujo el área foliar y el peso específico de las hojas (Casierra, 2006). En las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) se detectó una reducción del área foliar y un aumento proporcional del área necrosada con la concentración de sales en la planta, donde con 80 mM de NaCl se observó un área necrosada hasta del 80% en algunos casos para el cultivar Chandler (Casierra y Nehidy, 2005). En nuestros ensayos no observamos medidas de reducciones tan grandes como el 80% en área foliar, pero variaron entre un 22.58% y un 66.66%.

En T0 como se muestra en la Figura 19, las variedades comerciales tuvieron un área foliar entre 27 cm² y 30 cm², mientras que el genotipo C-200 fue el que tuvo mayor área, de 31cm². Una vez se establece el estrés en T1 se puede observar que el genotipo C-200 continuó siendo el que más área tuvo y las áreas de los genotipos comerciales se redujeron a 18 cm² para 'Floradade' y 16 cm² para 'Río Grande'.

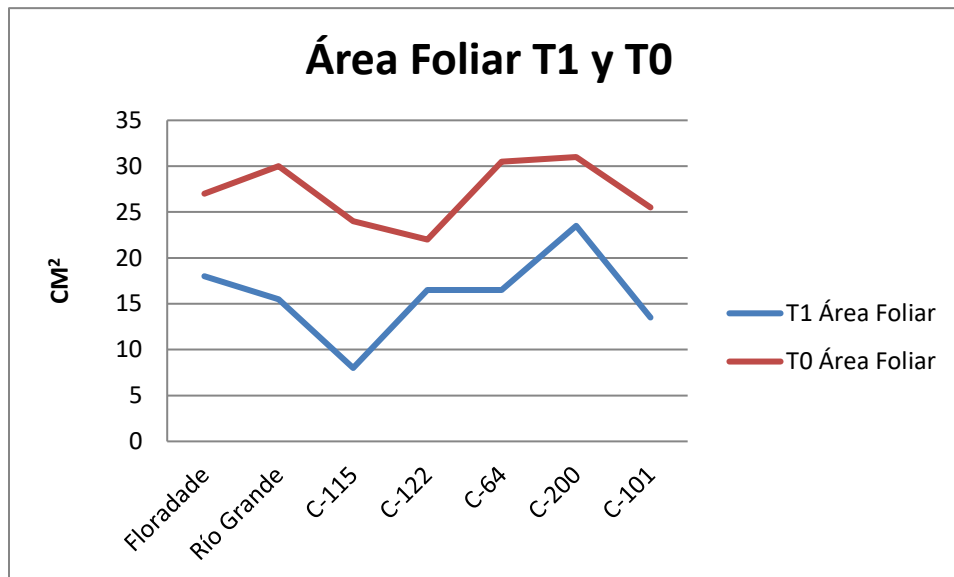


Figura 19. Área foliar de los genotipos de jitomate durante T1 y T0.

4.2 Correlaciones de mantel entre matrices obtenidas usando marcadores y las variables bioquímicas-morfológicas medidas

La prueba de correlación de Mantel dio como resultado un valor de 5.87 % (Figura 20), lo que significa la no existencia de correlación entre los marcadores moleculares ISSR y los marcadores morfológicos-bioquímicos. En la misma Figura 20 se observa que se forman dos conglomerados, uno cargado hacia la parte genética (marcadores ISSR) y otro hacia la parte bioquímica-morfológica, dando una dispersión no proporcional de los datos o no directa ya que las similitudes dependen de la relación que pueden existir entre un marcador y alguna de las variables bioquímicas-morfológicas medidas.

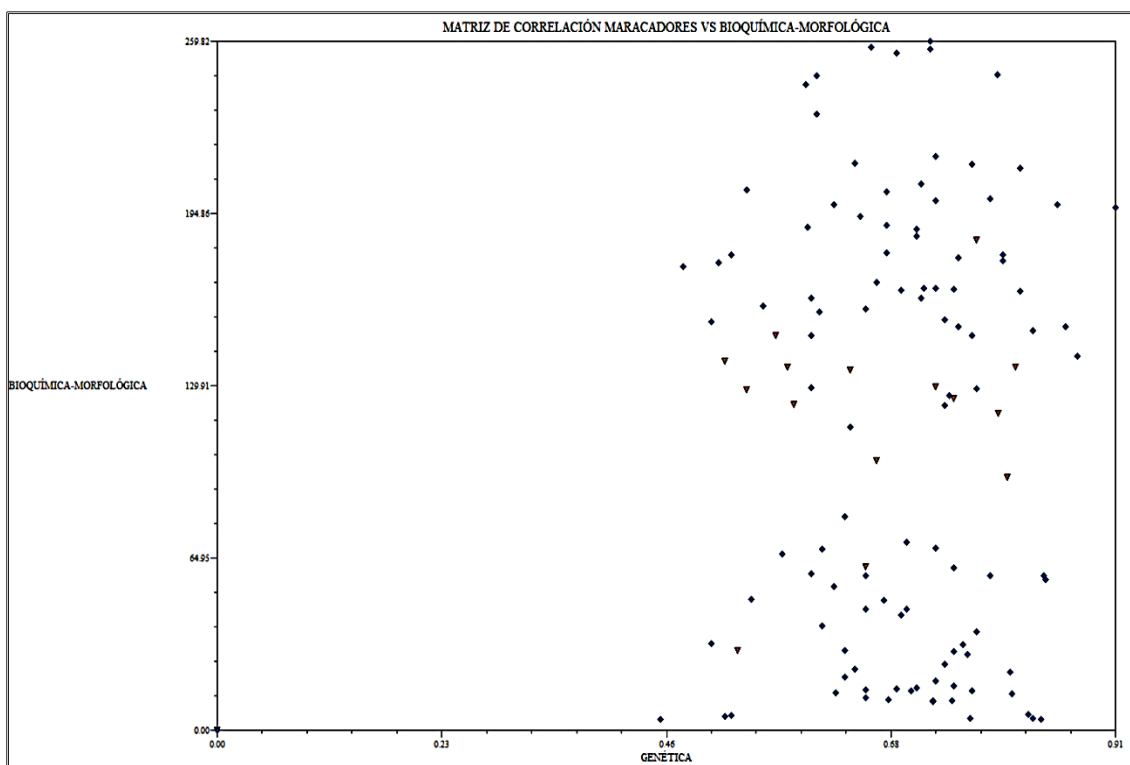


Figura 20. Correlación de Mantel entre matrices de datos derivados de marcadores moleculares ISSR y datos de variables morfológicas-bioquímicas. Se muestra en triángulos morados la relación del *loci* 2 para el marcador A7 (triángulo invertido morado) con los otros componentes medidos (círculos azules).

En las matrices de similitud obtenidas para cada tipo de medición se observó que la relación entre los datos no es correspondiente debido a que se comparan datos genéticos vs fenotípicos. Dentro de tipos de variables si puede haber algo de correlación por ejemplo los azúcares d-galactosa y d-glucosa se relacionan entre sí en un 17.5%. También, distintos *loci* de distintas regiones del genoma representados por los marcadores utilizados pueden no estar relacionados en forma directa con las características bioquímicas-morfológicas. Esto concuerda con lo reportado por Mazzucato *et al.* (2010) quienes relacionaron SSR's contra los rasgos de los descriptores morfológicos para el fruto, encontrando que la relación fue de 46 %, lo cual es una correlación baja y no significativa. Además, el mismo autor pero en el año 2008, en un análisis mediante QTLs encontró escasa asociación de los marcadores contra las mediciones del fruto,

mencionando que hubo baja significancia estadística entre ellos. Algo similar reportó Casals *et al.* (2011) quien no encontró relación de similitud entre las matrices de AFLP y datos fenotípicos.

Las comparaciones entre las matrices derivadas de datos morfológicos y moleculares no siempre son correspondientes mediante éste análisis ya que no existe una relación directa simple entre los resultados de los marcadores moleculares con los de mediciones fenotípicas. Otro estudio mediante marcadores SSR's dio como resultado un coeficiente de $r=0.644$, lo cual muestra cierto grado de correlación entre los datos analizados, pero dicha relación no es tan grande como se podría esperar (Yon-Sham *et al.*, 2009).

Mediante marcadores AFLP's Florido *et al.* (2007), comparó matrices obtenidas con dichos marcadores con matrices donde lo que variaba era la especie de tomate y encontró correlaciones del 99.8 %, recomendando utilizar la matriz de similitud de Dice para comparar dichas matrices.

4.3 Análisis de relaciones genéticas entre 7 genotipos de jitomate mediante marcadores ISSR y conglomerados

Se usaron 10 iniciadores ISSR para determinar relaciones de parentesco entre los 7 genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum*). En el Cuadro 14 se muestra que el porcentaje de bandas polimórficas fue de 71.84% y el de bandas monomórficas de 28.16 %.

Cuadro 14. Descriptiva para marcadores moleculares.

Resumen	Cantidad de casos
Muestras	7
Muestras duplicadas	0
Bandas (número total)	103
Patrón bandas duplicadas	51
Bandas monomórficas	29
Bandas polimórficas	74

En la Figura 21 se muestra un dendrograma de relaciones entre los siete genotipos evaluados. Se observa que según la línea de corte situada a una distancia de 0.51 se forman tres grupos. Un primer grupo lo formaron las variedades comerciales 'Río Grande' (R.G) y 'Floradade' (J.F) y los materiales silvestres C-122 y C-200, donde 'Rio grande' relacionó más con C-122 y 'Floradade' con C-200. El segundo grupo se integró con los genotipos silvestres C-101 y C-64; mientras que el tercer grupo lo conformó C-115. Los marcadores ISSR utilizados fueron eficaces para diferenciar a los genotipos evaluados. Los genotipos más emparentados fueron 'Río Grande' y C-122, C-101 y C-64, mientras que el más distante fue C-115.

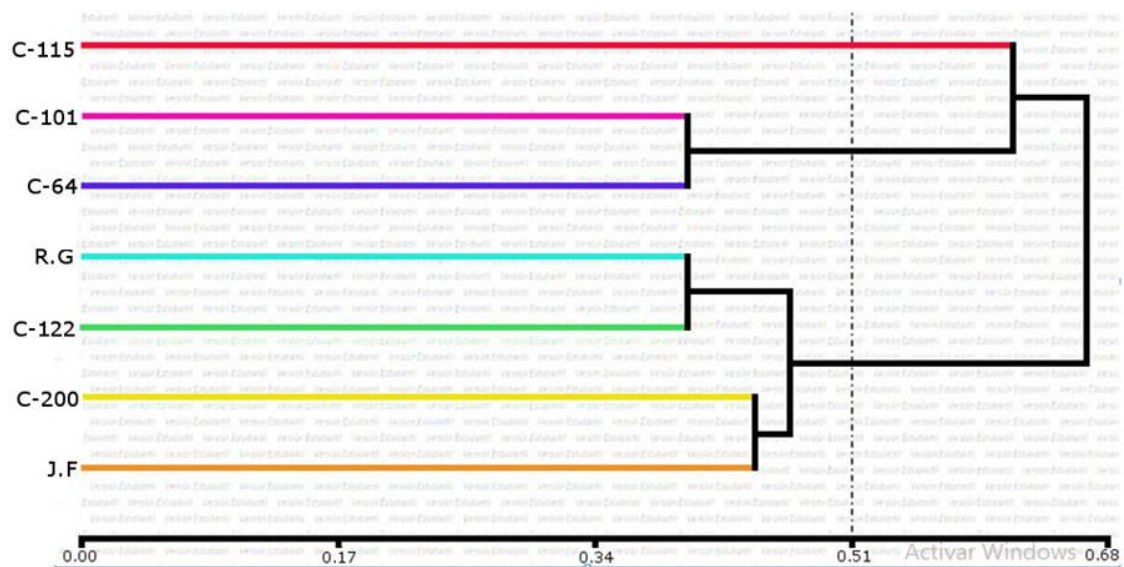


Figura 21. Dendrograma de relaciones entre los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores moleculares ISSR's, con el método de varianza mínima de Ward y el coeficiente de similitud de Dice ($\sqrt{1-S}$), con el programa estadístico Infogen®.

Los marcadores ISSR empleados no requieren conocimiento previo del genoma y generan alto polimorfismo. Se aplican en estudios de diversidad genética, filogenética, genómica y evolución biológica (González *et al.*, 2011). Mediante la secuenciación se ha verificado que en jitomate comercial existe muy poco polimorfismo en su ADN (Park *et al.*, 2004). En un estudio hecho por González *et al.* (2011) para *Lycopersicum spp* con iniciadores ISSR generó 144 bandas, de las que sólo 53 presentaron polimorfismo, con promedio de 14.4 bandas por iniciador. En nuestro estudio 74 bandas mostraron polimorfismo, con un promedio de 10.4 bandas por iniciador.

En la Figura 22 se muestra un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos con los iniciadores ISSR, A3 y P2.

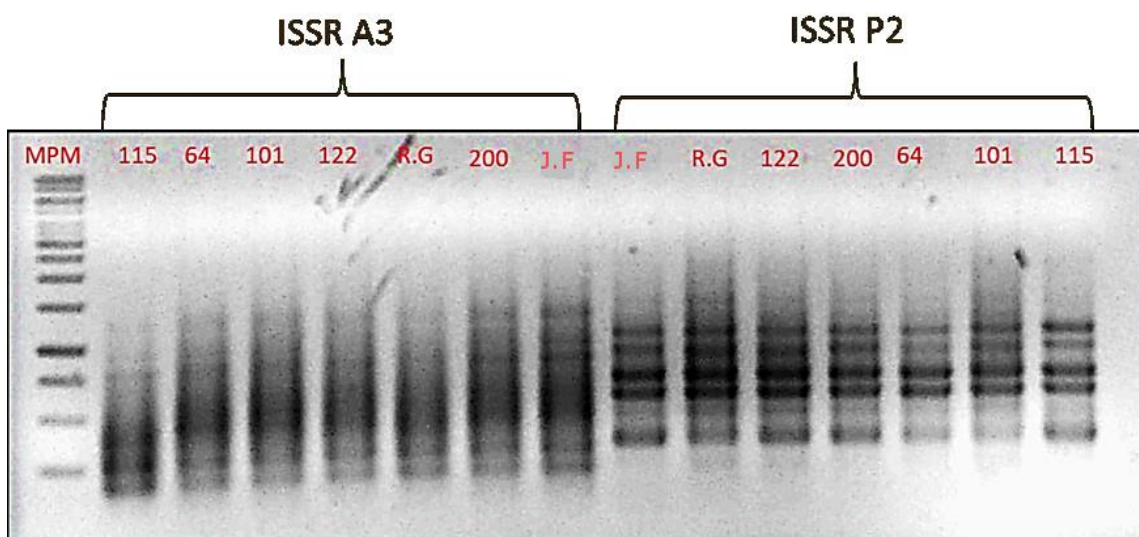


Figura 22. Patrones de bandas amplificados con los iniciadores ISSR A3 y P2 para los 7 genotipos de jitomate, donde MPM es el marcador de peso molecular, y los genotipos se indican con sus números y siglas correspondientes.

En la Figura 21 a un valor de 0.51 del coeficiente de similitud de Dice se puede observar la formación de 3 grupos, el primero por el genotipo C-115 que es una planta con área foliar chica, de crecimiento indeterminado, de frutos pequeños y con pocos racimos; el segundo grupo incluyó a los genotipos C-64 y C-101 que presentan las características antes mencionadas para el primer grupo, con la diferencia que los racimos que se observaron en estos genotipos son de mayor número en las plantas. En el tercer grupo se observan las variedades comerciales 'Floradade' (J.F) y 'Río Grande' (R.G) con frutos grandes y el genotipo C-200 también de fruto grande, las variedades comerciales no tienen crecimiento indeterminado pero las variedades silvestres si lo presentan, los racimos de las variedades comerciales son grandes y de los dos genotipos silvestres no tienen muchos frutos por racimo, de lo cual podemos indicar que los marcadores pudieron unirse en regiones del genoma asociadas al ciclo de vida como el tipo de crecimiento de la planta, tamaño del fruto, tamaño del área foliar, número de racimos por planta, y otros que podrían determinar las diferencias genéticas entre

los grupos analizados. Los genotipos que mostraron tolerancia como C-101 y C-115 se agruparon en grupos diferentes a los genotipos susceptibles, lo que sugiere que los marcadores pudieron distinguir grupos por su tolerancia y susceptibilidad al estrés por sal.

Un estudio realizado por Terzopoulos & Bebeli (2008) utilizando ISSR en colectas de 33 genotipos de jitomate en Grecia, obtuvieron un promedio de variación genética de 0.797 con el coeficiente de Jaccard, en nuestro estudio y utilizando la distancia de Dice a nivel de 0.51 se formaron 3 grupos obteniendo menor similitud que ellos.

En el Cuadro 15 se indican los valores de diversidad genética obtenidos entre las poblaciones de los siete genotipos. El valor de heterocigosidad esperada fue de 0.334 y la diversidad genética entre las poblaciones de 0.360.

Cuadro 15. Medidas de diversidad genética entre las poblaciones de los 7 genotipos de jitomate muestreados utilizando ISSR.

No. De Bandas	74
No. B Frec. $\geq 5\%$	74
No. P. Bandas	74
No. Bandas. ($\leq 25\%$)	0
No.LC. Bandas($\leq 50\%$)	0
He.	0.334
He. C.	0.017
He. Imp.	0.360
He. Imp. C.	0.018

No. B Frec. $\geq 5\%$; Número de bandas con una frecuencia igual o mayor que el 5%. No. P. Bandas: Número de bandas únicas para la población, No.Bandas ($\leq 25\%$):No. de bandas comunes encontradas en un 25% de las poblaciones; No. LC. Bandas ($\leq 50\%$): número de bandas comunes encontradas en un 50% de las poblaciones; He.: heterocigosidad esperada; He. C.: Corrección de He; He. Imp.: Heterocigosidad imparcial encontrada; He. Imp. C.: Corrección para He. imp. Donde se tiene que la diversidad genética entre poblaciones es He. Imp.

Casals *et al.* (2011) trabajó con AFLP encontró que las variedades Montserrat y Pera Girona obtuvieron un polimorfismo de 6.2% y 7.4%, respectivamente, lo cual

es un polimorfismo bajo pero con los marcadores ISSR pudimos obtener hasta 74 bandas polimórficas para los genotipos evaluados.

En un trabajo donde se evaluaron 216 genotipos de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) de cultivares híbridos y líneas élite donde se utilizó marcadores SSR y la mayoría de los genotipos provenían China, obtuvieron un 72.3% de polimorfismo para toda la colección de genotipos, mientras que en nuestro trabajo obtuvimos un 69.3% de polimorfismo. Ellos obtuvieron distancias genéticas de Nei entre las poblaciones con valores de 0.04 (SyAU y CAU), 0.07 (SyAU y AU vs BVRC) y 0.11 (SyAU, CAU y BVRC vs Nunhems) (Chen *et al.*, 2009). En nuestro trabajo obtuvimos una heterocigocidad dentro de cada población de 0.45 a 0.234 (Cuadro 16) y entre las poblaciones de 0.36 (Cuadro 15), por lo que los genotipos estudiados mostraron gran diversidad genética entre poblaciones y dentro de las poblaciones, Benor *et al.* (2008) obtiene un 0.85 de similitud entre los grupos más alejados usando UPGMA entre poblaciones de China, Japón, Corea y EEUU, nosotros de un 0.68 utilizando UPGMA y Dice por lo que la similitud entre grupos obtenida es menor que la que tienen ellos.

Otro trabajo con AFLP's realizado en Cuba muestra 69 bandas polimórficas de 305 amplificadas lo cual corresponde a un 22.6% de polimorfismo que se asoció a *S. peruvianum*, *S. pennellii* y *S. habrochaites*, los resultados mostraron una limitada variación genética entre las diferentes accesiones del tomate cultivado (Florido *et al.*, 2007).

Cuadro 16. Resumen general de parámetros de diversidad genética dentro de cada población de los 7 genotipos de jitomate obtenidos mediante marcadores ISSR.

Genotipos	Na	Ne	IS	He	uHe	LP	%LP
-----------	----	----	----	----	-----	----	-----

C-64	2	1.734	0.594	0.409	0.431	57	100
C-101	2	1.675	0.559	0.381	0.401	67	100
C-115	2	1.725	0.59	0.406	0.427	65	100
C-122	2	1.798	0.618	0.431	0.454	55	100
C-200	2	1.758	0.602	0.417	0.439	61	100
Floradade	2	1.576	1.412	0.348	0.234	97	61.86
Río Grande	2	1.526	0.430	0.295	0.310	97	71.13
Promedio	2	1.68	0.68	0.38	0.38	71.28	90.42

Na: número de alelos observados, Ne: número efectivo de alelos, IS: índice de Shannon, He: heterocigocidad esperada, uHe: heterocigocidad corregida, LP: *loci* polimórficos, %LP: porcentaje de *loci* polimórficos.

4.4 Análisis de coordenadas principales (ACoP) para 10 individuos de 7 genotipos de jitomate mediante marcadores ISSR

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) es una técnica que permite rastrear patrones en un conjunto de datos multivariados, estos datos pueden ser *loci* múltiples (variables) y muestras múltiples (Peakall y Smouse, 2006). En la Figura 23 se muestran los grupos formados por los individuos de las siete variedades de jitomate y en la Figura 24 se muestra un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos para 10 individuos de cada población usando el iniciador 7955, P3, A8 y P2.

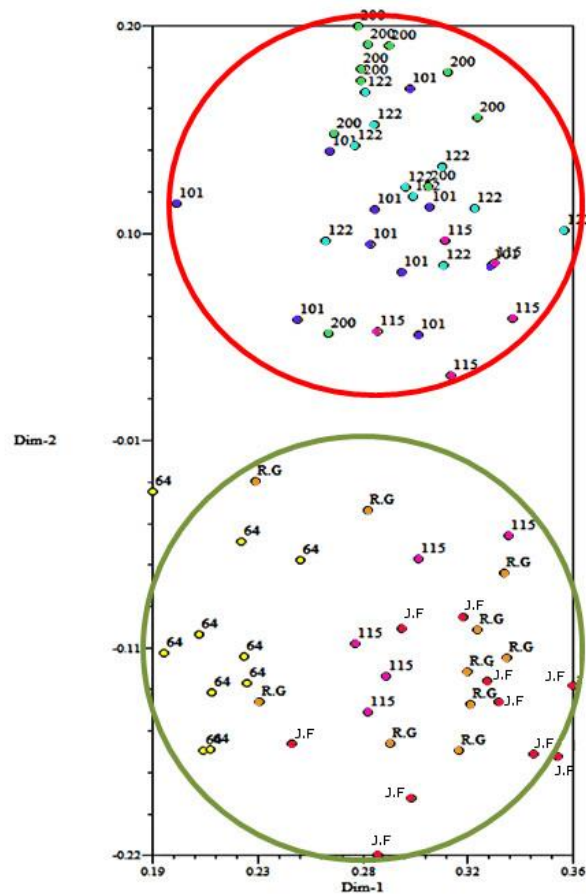


Figura 23. Análisis de coordenadas principales para 70 individuos de los 7 genotipos de jitomate trabajados, empleando marcadores moleculares ISSR. En el círculo rojo se muestra el grupo I y en el verde el grupo II.

Según el ACoP se formaron dos grandes grupos, donde el grupo I, encerrado con el círculo rojo, se integró por los genotipos silvestres C-200, C-122, C-101 y algunos individuos de C-115. El grupo II, encerrado por el círculo verde, lo formaron las variedades comerciales “Rio Grande” (R.G) y “Floradade” (J.F), el genotipo silvestre C-64 y parte de individuos del genotipo C-115 (Figura 23). En lo que se refiere al grupo I formado por el genotipo C-122 y C-200, estos materiales fueron colectados en sitios geográficos de una altura mayor que el resto separándolos por distancia geográfica de los demás genotipos. El genotipo C-101 es de una región cercana al mar a 12 m de altura pero de una franja ecológica que quizá se comparta por eso tiende a unirse a los genotipos C-122 y C-200 y formar parte del grupo I.

El genotipo C-115 tiende a agruparse tanto con genotipos del grupo I como del grupo II. En este último grupo se relaciona con las variedades comerciales “Río Grande” y “Floradade”. C-115 presenta frutos pequeños de 1 a 3 cm de ancho y racimos con 5 a 9 frutos.

La variable altitud geográfica puede jugar un papel importante para determinar diferencias genéticas entre los grupos de jitomate silvestre, por otra parte el aislamiento geográfico y los cuellos de botella que se pueden generar en estas poblaciones pueden ser muy rápidos debido a que es una especie autógama (se puede autopolinizar al ser hermafrodita), por ello al aislarse una población puede presentarse el efecto fundador y con ello fijar los genes en éstas poblaciones como ya se comprobó para *Solanum* sección *Lycopersicon* en 4 especies silvestres del género como *S. lycopersicum* var. Cerasiforme, *S. habrochaites*, *S. neorickii* y *S. pimpinellifolium*; dichas especies generaron mayor variabilidad genética por el solo hecho de que las poblaciones se distribuyeran en ríos, terrenos baldíos, jardines, y otros. Para determinar la diversidad genética se utilizaron marcadores SSR y se analizaron 17 *loci* en desequilibrio de ligamiento encontrando gran riqueza de heterocigosidad esperada. Para *S. lycopersicum* var. Cerasiforme obtienen un valor de 0.506, *S. pimpinellifolium* 0.614, *S. habrochaites* 0.53 y *S. neorickii* de 0.459. En comparación, en nuestro trabajo obtuvimos valores de heterocigosidad esperada de 0.454 a 0.234 (Cuadro 16) (Morales *et al.*, 2016). Los cuales son menores que los obtenidos por estos investigadores, sin embargo los marcadores empleados por nosotros también nos permitieron distinguir que los genotipos muestreados presentan diversidad genética para las variedades silvestres colectadas en Guerrero.

En otro estudio de diversidad genética realizado en Italia utilizando marcadores tipo SSR para 61 genotipos obtuvieron valores de heterocigosidad esperada de 0.22 a 0.44. Estos resultados indican que si se utilizan SSR es posible medir y clasificar mejor los genotipos de *Solanum lycopersicum* ya que en variedades comerciales de Italia tuvieron valores de heterocigosidad esperada de 0.36 y con genotipos silvestres de América Latina un 0.44. Como es de esperar, las

variedades comerciales tienen menor diversidad. En el presente trabajo también se encontraron bajos valores de diversidad en los genotipos comerciales: 0.310 para 'Río Grande' y 0.234 para 'Floradade' (Cuadro 16), estos valores entran dentro del rango de valores aceptables para genotipos comerciales con marcadores moleculares (Mazzucato *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó, en el presente trabajo usando marcadores ISSR los materiales forman grupos distinguibles por región geográfica y altura. Los genotipos C-115 y C-64 comparten el tamaño del fruto pequeño de 2 a 5 cm de diámetro, al igual que el área del foliolo más pequeña que el resto de genotipos. En contraste el genotipo C-200 tiene un tamaño de fruto comparable con el de la variedad comercial 'Río Grande' y el área del foliolo es de un tamaño similar al de dicha variedad comercial, el genotipo C-122 es morfológicamente parecido a los genotipos C-115 y C-64 según las características mencionadas anteriormente para ellos, sólo que el número de foliolos en la planta era mayor que el de los genotipos C-115 y C-64.

En un estudio hecho por Morales *et al.* (2014) encontró que las variables como ancho de la hoja (foliolo), longitud del nervio principal, longitud del peciolo son altamente significativas para correlacionar los genotipos a nivel morfológico, así como las que caracterizan al fruto como el número de locus, longitud del fruto, diámetro del fruto, peso de frutos en campo y número de flores por planta. Pero las variables como longitud de la nervadura principal, longitud del peciolo, longitud de sépalos, altura a la primera inflorescencia muestran muy baja correlación en el análisis de coordenadas principales que realizaron. En su estudio trabajaron con 166 accesiones pertenecientes a cinco especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*, por desgracia no emplearon marcadores moleculares para el estudio pero pudieron separar a *S. habrochaites* del resto. En comparación nosotros pudimos distinguir al menos dos grupos de genotipos aislados por altura y posición geográfica, y también obtuvimos mayor diversidad genética empleando marcadores ISSR que solo haciendo caracterización morfológica.

Otro estudio con marcadores tipo SNP de 410 accesiones que se creía habían asociado a 5 subgrupos por los datos de pedigrí las cuales eran: 144 procesados, 122 mercado fresco, 88 cosecha clásica, 43 silvestre tipo 'cherry' y 16 *S. pimpinellifolium*. Mediante un análisis de componentes principales y de desequilibrio se soportó la separación del tipo de mercado fresco en un grupo de 110 de fruto largo y otros 12 en las accesiones tipo 'cherry' (cultivado 'Cherry'). Simultáneamente se dividió a los tipo de cultivo clásico en 61 accesiones de fruto largo, 15 en las accesiones tipo 'cherry' con la integración a la subpoblación tipo 'cherry cultivar'. Encontraron 7 subgrupos: 141 procesados, 110 fruto alargado de mercado fresco (antes referidos como mercado fresco), 61 fruto alargado de cultivo clásico (anteriormente referido como cultivo clásico), 27 cultivar tipo 'cherry', 12 'criollos', 43 silvestres 'cherry' y 16 *S. pimpinellifolium*. La heterocigosis encontrada para cada subgrupo a partir de 7,684 SNP fue de 0.02 para procesados, 0.01 para el mercado fresco con fruto largo, 0.01 para largo del fruto cosecha clásica y 0.04 para *S. pimpinellifolium*. Los análisis de la heterocigosis para las variedades comerciales revelan una diversidad genética reducida en contraste con los encontrados en este trabajo para las variedades silvestres y cultivares aunque éstas últimas no son las mismas que ellos utilizaron (Cuadro 16). Los resultados que obtuvimos con los marcadores ISSR son menos precisos que los SNP ya que los SNP son codominantes al igual que los SSR y los ISSR no lo son, por ello se pierde parte de la información de los heterocigotos y los homocigotos dominantes al no saber diferenciarlos por el tipo de marcador que usamos al hacer el análisis. El mejoramiento genético tiende a reducir la diversidad genética en las variedades mejoradas, mientras que en el caso de los materiales silvestres pueden colonizar nuevas zonas ecológicas y aumentar su diversidad, al estar en campo abierto pueden ocurrir cruza entre las poblaciones silvestres cercanas aumentando un poco la diversidad de las mismas (Sim *et al.*, 2012).

En un estudio hecho por Zuriaga *et al.* (2009) con más de 200 accesiones de *S. pimpinellifolium* de Perú y Ecuador, encontraron que los datos climáticos de los sitios de colecta estuvieron altamente correlacionados con la diversidad genética.

La falta de uniformidad de los climas de los dos países demostró ser un factor importante para determinar la alta diversidad. La mayor diversidad se ubicó en el Norte de Perú y la menor en las Islas Galápagos, observando que las interacciones entre *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* fueron muy cercanas entre ambas especies, esto puede confirmar nuestra sospecha de que las zonas ecológicas son las que han determinado los grupos del análisis de la Figura 23.

Los botánicos han postulado que los jitomates tipo ‘Cherry’ son plantas ferales de una posible mezcla entre las silvestres y las cultivadas (Rick & Halle, 1990; Peralta *et al.*, 2007). Estudios recientes revelan que *S. pimpinellifolium* tipo ‘Cherry’ silvestre y cultivado han evolucionado como especies complejas producto de una alta hibridización dando como resultado un grupo llamado *S. lycopersicum cerasiforme*, las hibridizaciones se han dado entre los grupos de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* (Ranc *et al.*, 2008).

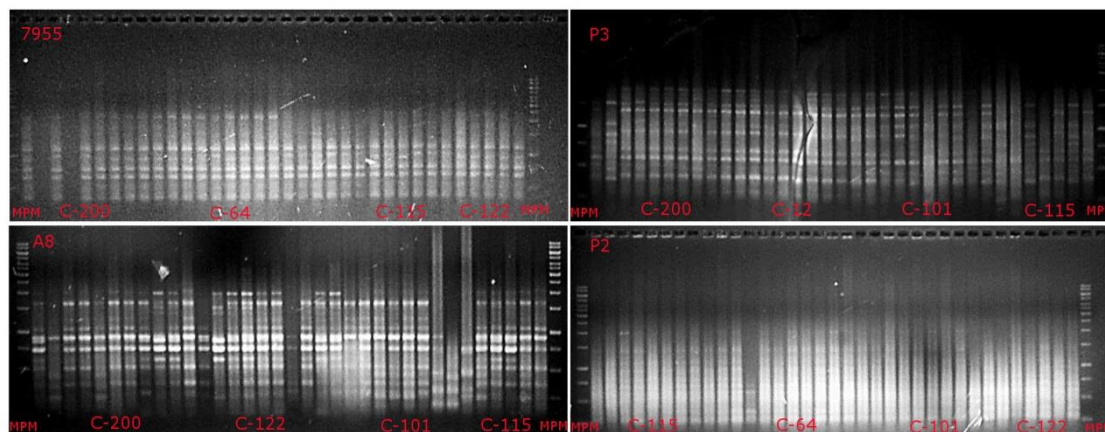


Figura 24. Patrones de bandas obtenidos para los 10 individuos de algunos de los 7 genotipos de jitomate analizados, empleando el iniciador 7955, P3, A8 y P2, en la parte inferior de cada imagen se indica el genotipo al cual pertenecen en orden de diez pozos de izquierda a derecha, los últimos 5 pozos en la parte inferior derecha de cada imagen corresponden solo con al genotipo al final y el marcador de peso molecular esta indicado como MPM en el primer y el último pozo de cada gel.

En el Cuadro 17 se indican las coordenadas de los sitios de colecta de los materiales silvestres evaluados.

Cuadro 17. Coordenadas de los sitios de colecta de los genotipos de jitomate silvestres.

Genotipos	Latitud	Longitud	Altura
C-200	17°33.665'N	100°16.416'O	2680 M
C-122	16°47.600'N	99°50.290'O	1717 M
C-101	16°57.379'N	100°7.638'O	12 M
C-115	17°5.966'N	100°27.985'O	16 M
C-64	18°4.521'N	102°44.4200'O	62 M

4.5 Análisis de coordenadas principales para los 7 genotipos de jitomate individuales empleando marcadores moleculares ISSR

En la Figura 25 se muestran los resultados del ACoP considerando a cada variedad de manera individual. Se observa que los genotipos estudiados se encuentran separados genéticamente unos de otros, los genotipos C-101 y C-64 son los más relacionados genéticamente. Desde el punto de vista geográfico (Cuadro 17) son poblaciones muy cercanas una de la otra y sus nichos ecológicos pueden ser también muy parecidos debido al clima de la región. El genotipo 'Floradade' (J.F) es el que se muestra más separado del resto y parece el más diferenciado, posiblemente por la selección aplicada durante el mejoramiento genético.

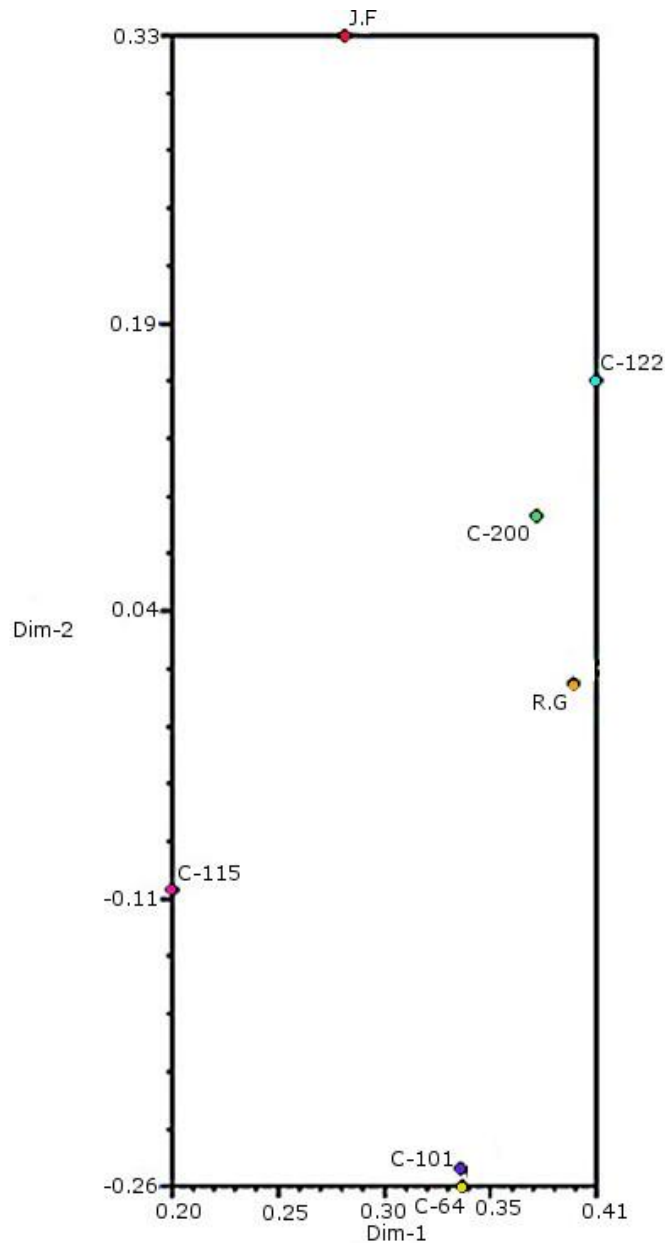


Figura 25. Análisis de coordenadas principales para los 7 genotipos de jitomate individuales trabajados, empleando marcadores moleculares ISSR.

Los genotipos C-200 y 'Río grande' R.G se encuentran en la parte central de la gráfica, tienen la particularidad de presentar un tamaño de fruto y hojas grandes por lo que éstas características genéticas podrían hacer que se agrupen en ésta región. En comparación con el estudio de individuos podemos determinar que existen diferencias entre los genotipos estudiados y que en algunos casos como en las variedades comerciales se puede discriminar con mayor facilidad los

grupos, pero en las silvestres podría existir cruzamiento entre ellas y con las comerciales que generaran nuevos genotipos como es el caso del genotipo C-64 y quizá el C-101 por estar muy cerca genéticamente del genotipo C-64.

También, el que las variedades C-200, C-122 y 'Río grande' (R.G) se agrupen en el centro puede ser debido a que los marcadores se asocian a regiones del genoma que pueden tener que ver con el ciclo de vida y el desarrollo de la planta en altitudes por encima de los mil metros. Por otro lado al genotipo comercial 'Floradade' lo que más lo caracteriza es la forma del fruto redonda, esto podría ser un indicativo de que los ISSR utilizados se asociaron a regiones del genoma relacionadas con el desarrollo del fruto ya que separa a éste genotipo del resto. El genotipo 'Río Grande' (R.G) y el C-200 tienden a estar más cercanos debido posiblemente a que ambos comparten un fruto grande, no de tipo "Cherry" como el resto de los silvestres.

Mediante SNPs se han relacionado polimorfismos específicos a la forma del fruto, por ejemplo una delección en el cromosoma old-gold-crimson (og^c) resulta en la perdida de la función de la licopeno beta-ciclasa enzima que degrada el licopeno, resultando en la acumulación de licopeno y dándole una apariencia de rojo oscuro/morado al fruto del tomate otro es el color amarillo dado por una delección que da un codón TGA de stop que resulta en una proteína truncada de psy1 en la parte terminal de 23 amino ácidos generando el color amarillo (Fray & Grierson, 1993).

4.6 Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 7 genotipos de jitomate usando marcadores tipo ISSR

En el Cuadro 18 se presentan los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA), así como el porcentaje de variación entre poblaciones y dentro de individuos encontrados para los 7 genotipos de jitomate.

Cuadro 18. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los 7 genotipos de jitomate.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	VC	Iter.#	PV	Estadísticos de F
Entre Poblaciones	6	294.5	49.095	3.740	1000	24%	$F_{ST}=0.242$
Dentro de individuos	63	737.100	11.07	11.700	1000	76%	
Total	69	1031.671		15.440		100.00	

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrado medio, Iter.#: número de repeticiones, CV: Varianza de los componentes y PV: porcentaje de variación, *= $p < 0.001$.

El mismo Cuadro 18 y la Figura 26 muestran que la diversidad genética entre poblaciones es del 24% y de un 76% dentro de los individuos. El coeficiente de diferenciación genética en función de las frecuencias alélicas de los genotipos de jitomate tuvo un valor de $F_{ST}= 0.242$ ($p < 0.0001$). En función de los parámetros de este estadístico, se asume que los genotipos de jitomate están claramente diferenciados genéticamente. Esto se debe en buena medida a que se reconocen grupos de genotipos distintos de jitomate como ya se ha comentado por las distintas regiones geográficas en que crecen lo que favorece la diferenciación genética entre ellos. También, hay que considerar que dentro de un mismo genotipo existe variabilidad genética. Este estadístico no asume modelos de mutación y únicamente diferencia entre poblaciones y dentro de poblaciones.

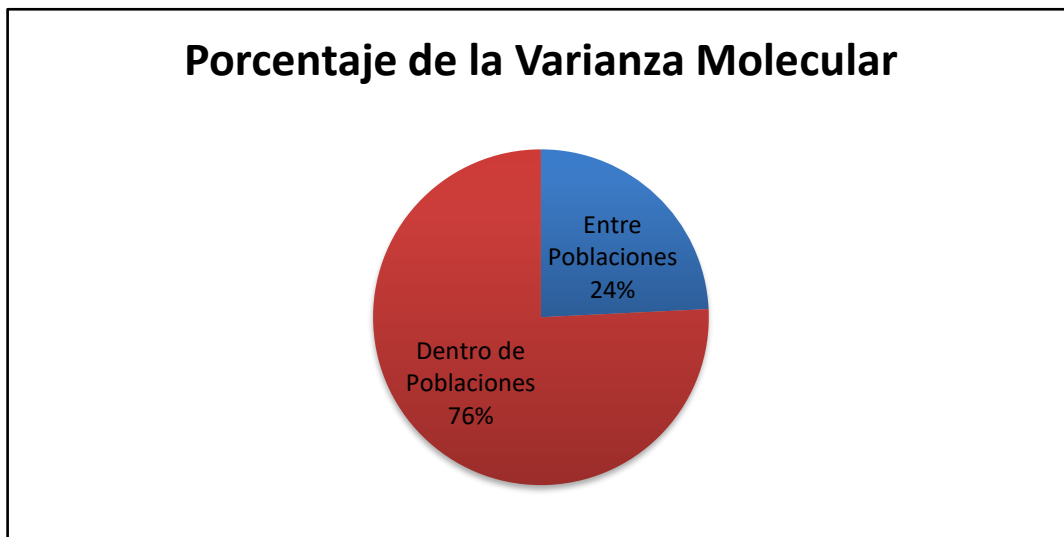


Figura 26. Gráfico de la variación obtenida dentro y entre poblaciones para los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores ISSR, para los estadísticos F.

En un estudio realizado por Ranc *et al.* (2008) se compararon 380 genotipos de *Solanum lycopersicum* con marcadores SSR. El valor estimado de F_{ST} obtuvo un alto valor de diferenciación de 0.21. Si se compara este valor con el obtenido en el presente estudio, es posible afirmar que los materiales que evaluamos presentan altos grados de diversidad entre poblaciones.

4.7 Comparación entre dendrogramas generados usando marcadores ISSR vs morfológicos-bioquímicos e ISSR + morfológicos bioquímicos

En la Figura 27 se muestra un dendrograma de relaciones entre los siete genotipos de jitomate evaluados usando marcadores ISSR. Se observa que según la línea de corte situada a una distancia de 0.51 se forman tres grupos. Un primer grupo lo formaron las variedades comerciales 'Río Grande' (R.G) y 'Floradade' (J.F) y los materiales silvestres C-122 y C-200, donde 'Rio grande' relacionó más con C-122 y 'Floradade' con C-200. El segundo grupo se integró con los genotipos silvestres C-101 y C-64; mientras que el tercer grupo lo conformó C-115. Los marcadores ISSR utilizados fueron eficaces para diferenciar a los genotipos evaluados. Los genotipos más emparentados fueron 'Río Grande' y C-122, C-101 y C-64, mientras que el más distante fue C-115.

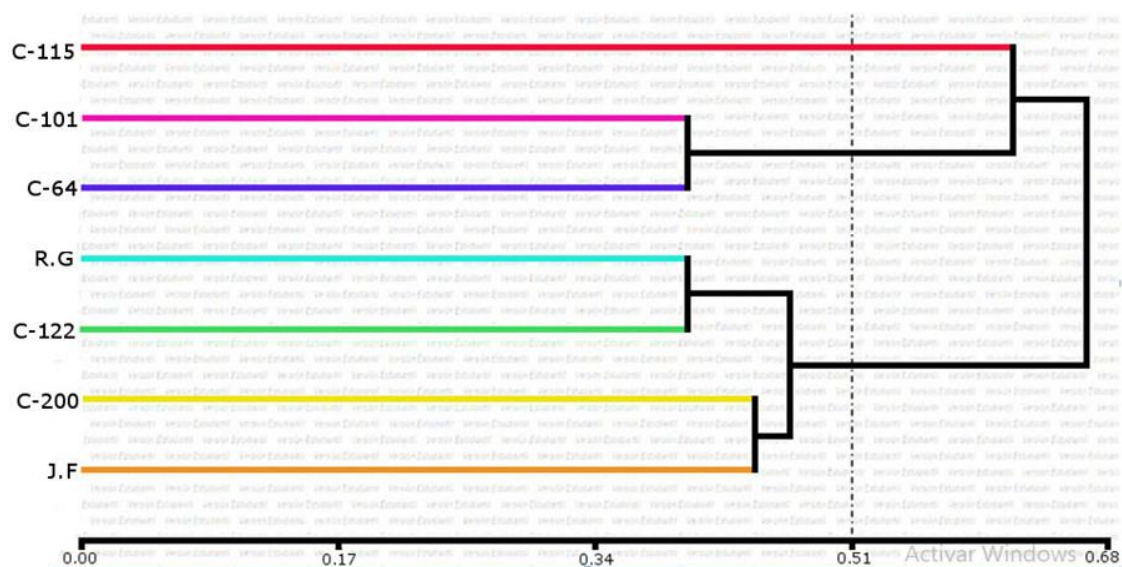


Figura 27. Dendrograma de relaciones entre los 7 genotipos de jitomate empleando marcadores moleculares ISSR con el método de varianza mínima de Ward y el coeficiente de similitud de Dice ($\sqrt{1-S}$) con el programa estadístico Infogen®.

Utilizando coeficientes de distancia DIST se realizaron también dendrogramas correspondientes usando variables bioquímicas-morfológicas y un árbol consenso ISSR + los datos bioquímico-morfológicos, esto con el fin de comparar las agrupaciones entre los diferentes tipos de marcadores.

En la Figura 28 se muestra el dendrograma obtenido usando marcadores morfológicos-bioquímicos. A un coeficiente de distancia DIST de 28.43 se observa la formación de dos grandes grupos. El grupo I lo formaron las colecciones C-115, C-64 y C-122, además de la variedad comercial 'Floradade' (J.F). El grupo II quedó integrado por la variedad comercial 'Río Grande' (R.G) y las colectas C-101 y C-200.

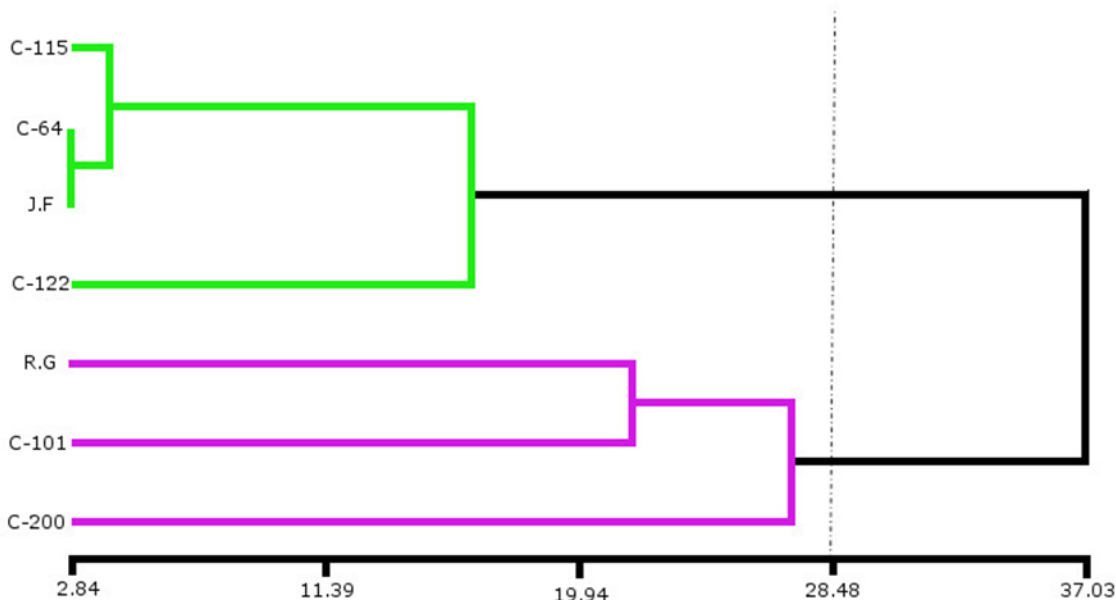


Figura 28. Dendrograma de relaciones entre los genotipos de jitomate usando marcadores bioquímico-morfológicos en T0, con UPGMA con el método de Dice.

En el mismo dendrograma (Figura 28) se puede observar discordancia con el dendrograma generado usando solo marcadores ISSR (Figura 27), en el cual se agrupan el genotipo C-64 y el C-101, mientras que en este el C-64 se une con el genotipo comercial 'Floradade' (J.F) y el C-101 con el genotipo comercial 'Río Grande' (R.G). Por otro lado, el genotipo C-200 se encuentra más relacionado al genotipo C-101 a diferencia del árbol construido con los ISSR que lo relaciona más con la variedad comercial 'Floradade' tipo saladette.

Por otro lado, los resultados muestran grupos relacionados por el tamaño del área foliar como es el caso del grupo II formado por 'Río Grande' (R.G), C-101 y C-200, que fueron los genotipos con mayor área foliar. El grupo I se integró en su mayoría con genotipos con área foliar reducida, el genotipo que no presenta esta característica es la variedad comercial 'Floradade' (J.F). Como es de esperar se reduce la distancia en similitud entre las poblaciones evaluadas en comparación con el generado mediante ISSR, comenzando a diferenciarse los grupos a un coeficiente de 28.48 y el punto de similitud más pronunciado es el de 37.03.

En la Figura 29 se muestra el dendrograma consenso obtenido usando marcadores ISSR + morfológicos-bioquímicos. A un coeficiente de distancia DIST de 0.11 se observa la formación de dos grandes grupos. El grupo I lo formó la colección C-101 y el grupo II se integró con el resto de los genotipos.

Grupo I: genotipos C-115, C-64, C-122 y 'Floradade' (J.F.)

Grupo II: Río grande (R.G), C-101 y C-200.

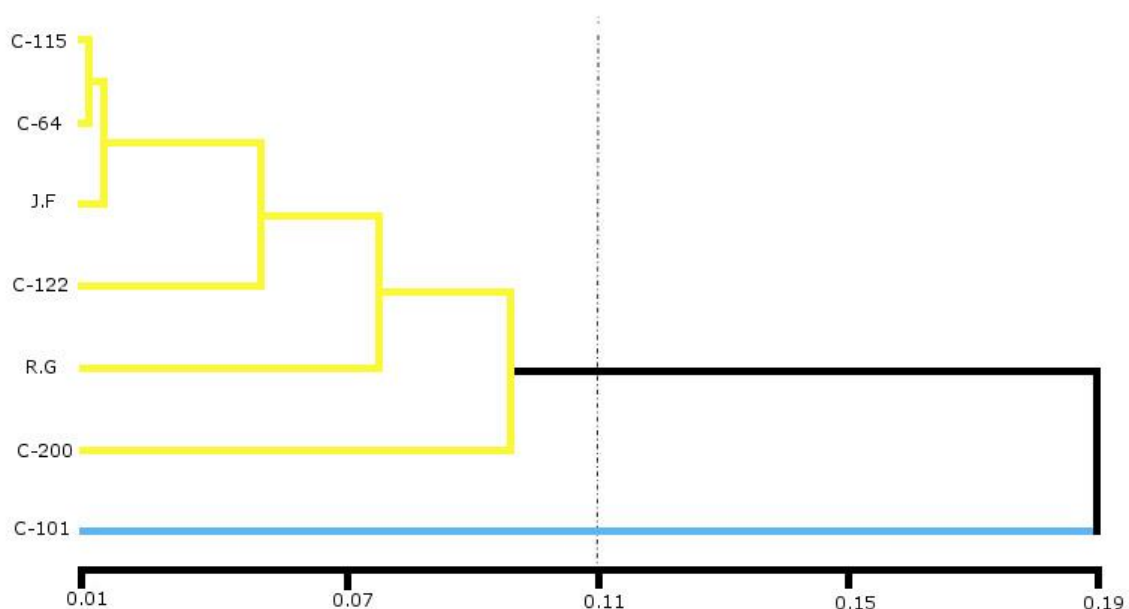


Figura 29. Dendrograma consenso de relaciones entre los genotipos de jitomate usando los marcadores ISSR y bioquímicos-morfológicos en T0, con UPGMA y Dice.

En la misma Figura 29 se puede observar que los genotipos C-115 y C-64 se agrupan con 'Floradade' (J.F.) como ocurre en la Figura 28 con los marcadores bioquímico-morfológicos. Una diferencia es que en la Figura 29 se muestran 2 grupos uno formado solo por el genotipo C-101 y otro que conjunta como subgrupos derivados al resto de los genotipos, a diferencia del dendrograma hecho a partir de solo ISSR (Figura 27) que muestra que cada genotipo forma un grupo definido.

4.8 Resumen de resultados para la identificación de los genotipos tolerantes y susceptibles

Para la identificación de los genotipos tolerantes y susceptibles se procedió a realizar una evaluación en la etapa reproductiva según una escala de valores para cada variable, calificando a los genotipos como: +++, con tolerancia; ++, tolerancia media; +, tolerancia mínima y finalmente con el signo –, al que no presentaba tolerancia según la variable evaluada. Al final se contabilizó el número de signos + y en base al total se clasificaron los genotipos como tolerantes, medio tolerantes y susceptibles. Se consideró como genotipos tolerantes a los que sumaban las mejores características y como susceptibles a los que sumaban las peores características (Cuadro 19).

Para la etapa reproductiva bajo tratamiento de salinidad se identificó con mayor tolerancia y con 17 puntos al genotipo C-101, mientras que el genotipo 'Río Grande' (R.G) fue el más susceptible con una calificación de 6 puntos (Cuadro 19). Los genotipos silvestres fueron los que obtuvieron los puntajes más altos, siendo estos las variedades C-200, C-101, C-122 y C-115. Dichas colecciones mostraron resistencia aún a concentraciones de sal de 250 mM, mientras que los genotipos comerciales 'Floradade' (J.F) y 'Río Grande' (R.G) mostraron tolerancia sólo hasta los 100 mM de concentración salina. El genotipo C-64 mostró ser medianamente tolerante a dicho estrés, resistiendo concentraciones de 150 mM (Cuadro 19).

Cuadro 19. Resumen de evaluación de características de los genotipos de jitomate durante la etapa reproductiva bajo tratamiento de estrés severo, para determinar su tolerancia o susceptibilidad al estrés salino.

VARIABLES/ GENOTIPOS	RÍO GRANDE	FLORADADE	C-115	C-122	C-64	C-200	C-101
CRA(%)	-	-	+	+	+++	+++	+++
CLOROFILA A	+	-	+++	++	++	-	++
CLOROFILA B	-	++	++	+	++	-	-
CLOROFILA TOTAL	+	+	+	+	+	-	+
D-MANOSA	-	+	+++	+++	-	+++	+++
D-GLUCOSA	-	+	+++	+++	-	+++	+++
D-GALACTOSA	+	+	+++	+++	-	+++	+++
ÁREA FOLIAR	+++	++	+	++	++	+++	++
TOTAL	6	8	17	16	10	15	17

4.9 Construcción del dendrograma y determinación de relaciones bioquímicas morfológicas entre los genotipos bajo condiciones de estrés salino

Con el fin de verificar la agrupación de genotipos bajo condiciones severas de estrés salino se obtuvo un dendrograma de relaciones mediante un análisis de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de DIST, formándose 3 grupos a una distancia de 0.075 (Figura 30) quedando integrado de la manera siguiente:

Grupo I: Variedades comerciales 'Floradade' (J:F) y 'Río Grande' (R.G.).

Grupo II: Genotipos C-101, C-200, C-115 y C-122.

Grupo III: Genotipo C-64.

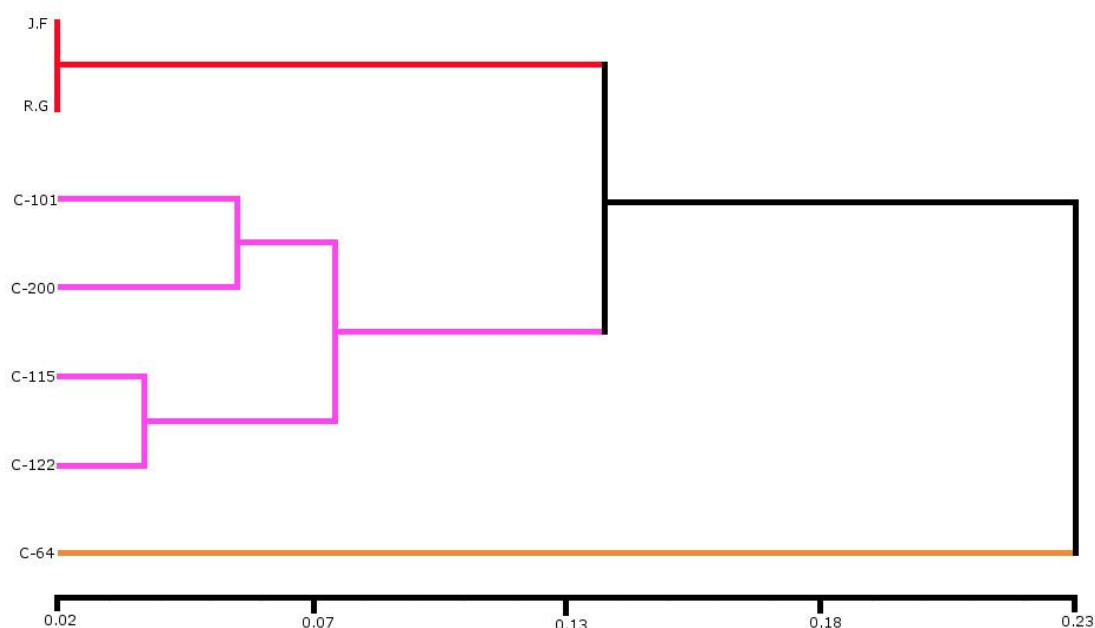


Figura 30. Dendrograma de relaciones bioquímico-morfológicas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de estrés salino severo.

En el dendrograma de la Figura 30 se observa que los genotipos comerciales forman el grupo I, siendo los más susceptibles al estrés salino como se muestra en el Cuadro 19. El grupo II quedó integrado por C-101, C-200, C-115 y C-122, que fueron los más tolerantes al estrés por salinidad; mientras que C-64 formó el grupo III. C-64 resultó ser una variedad medianamente tolerante al estrés salino.

4.10 Ordenamiento de genotipos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) por sus características morfológicas-bioquímicas medidas en la etapa reproductiva bajo condiciones de estrés salino severo, mediante un análisis de componentes principales

Al realizar un ordenamiento de los genotipos de jitomate por los caracteres morfológicos-bioquímicos medidos en la etapa reproductiva bajo condiciones de estrés salino severo (Figura 31), se observó una agrupación muy semejante a la obtenida en el dendrograma de la Figura 30. Se distingue la relación de cercanía que existe entre los genotipos comerciales 'Río grande' (R.G) y 'Floradade' (J.F), mientras que los genotipos silvestres tienden a separarse significativamente de los comerciales confirmando las relaciones mostradas en la Figura 30 y los resultados del Cuadro 19, referente a las variedades que se mostraron como resistentes, medianamente resistentes y susceptibles, separándose los grupos acorde también a lo observado en los análisis de varianza y los otros análisis mostrados.

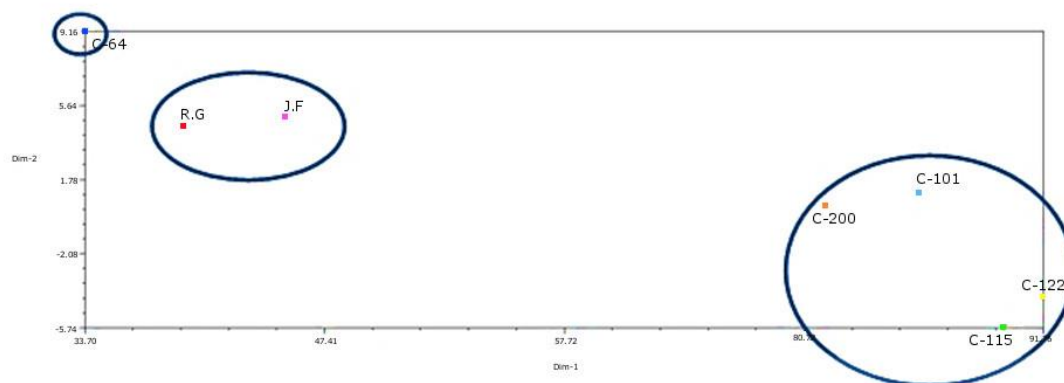


Figura 31. Gráfico en 2D donde se muestra el agrupamiento utilizando los datos bioquímico-morfológicos de los genotipos de jitomate (*S. lycopersicum* L.) durante la etapa reproductiva y bajo condiciones de estrés salino severo.

En el Cuadro 20 se indica que las variables que contribuyeron a explicar en mayor proporción la variación debida al componente 1 fueron los tres azúcares (D-MAN, D-GAL y D-GLU), el área foliar (AF) y la clorofila b (CB); mientras que las que explican el componente 2 fueron la clorofila A (CA) y la clorofila total (CT). Entre

los dos componentes explican un 86.9 % del comportamiento bajo condiciones de estrés salino de las plantas, como se muestra en el Cuadro 21

Cuadro 200. Matriz de componentes principales, para los caracteres Bioquímico-Morfológicos bajo la condición T1.

Matriz de componente ^a		
	Componente	
	1	2
T1 AF	-.784	.535
T1 CRA(%)	.343	.542
T1 CB	.840	-.462
T1 CA	.321	-.860
T1 CT	.729	-.672
T1 D- MAN	.789	.587
T1 D-GAL	.791	.580
T1 D-GLU	.796	.584
Método de extracción: análisis de componentes principales.		
a. 2 componentes extraídos.		

Cuadro 211. Varianza total explicada de las variables bioquímico-morfológicas evaluadas durante la etapa reproductiva del jitomate bajo condiciones de estrés salino (T1).

Varianza total explicada						
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	3.952	49.406	49.406	3.952	49.406	49.406
2	3.006	37.579	86.985	3.006	37.579	86.985
3	.686	8.570	95.555			
4	.268	3.344	98.899			
5	.087	1.088	99.987			
6	.001	.013	100.000			
7	1.852E-16	2.315E-15	100.000			
8	-7.447E-16	-9.308E-15	100.000			
Método de extracción: análisis de componentes principales.						

4.11 Amplificación de los genes de resistencia a estrés salino por PCR

Con la finalidad de determinar si los 7 genotipos de jitomate presentaban los genes LOX y JERF1 de resistencia al estrés salino se llevaron a cabo reacciones de amplificación mediante PCR. El gen LOX codifica para la enzima lipooxigenasa y los productos de amplificación se muestran en la Figura 32. En ésta se observa la presencia de dicho gen en los 7 genotipos de jitomate evaluados en este estudio, el resto de bandas que se ve en la imagen pueden ser distintas secuencias de genes que pertenecen a la misma familia de genes LOX.

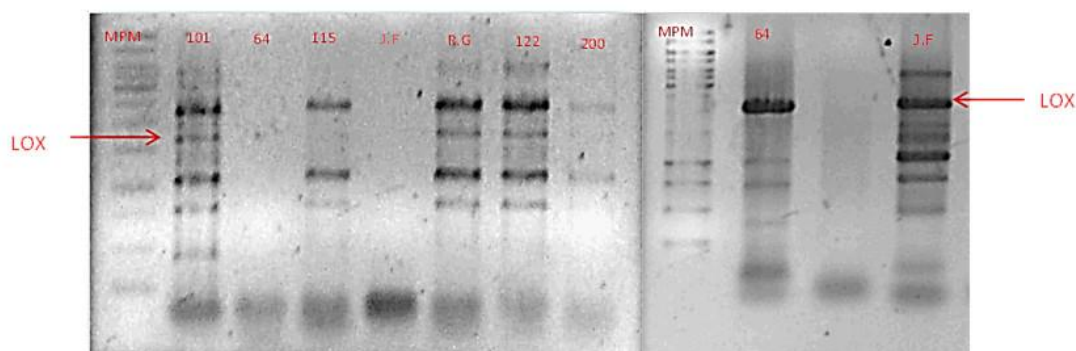


Figura 32. Amplificación del gen LOX de 2580 pares de bases de longitud, en los 7 genotipos de jitomate trabajados. La banda marcada con la flecha roja corresponde al gen LOX.

Para el gen JERF1 también se realizaron amplificaciones mediante PCR para comprobar si el gen estaba presente en los 7 genotipos de jitomate evaluados. Se obtuvieron bandas correspondientes a dicho gen como se muestra en la Figura 33.

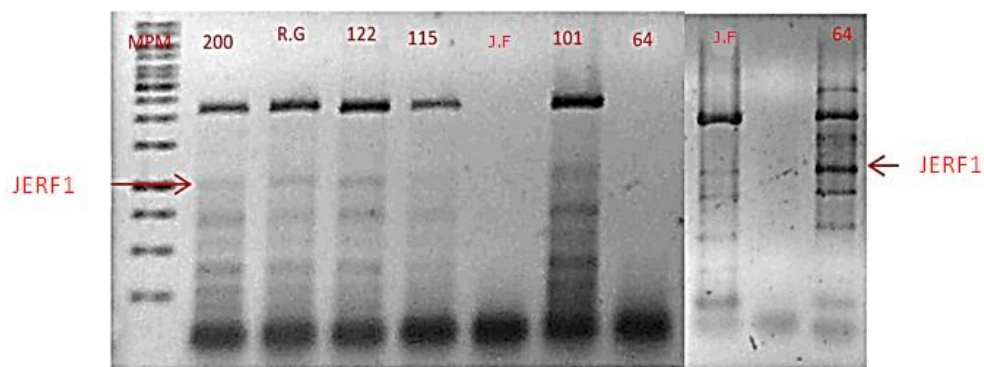


Figura 33. Amplificación del gen JERF1 de 1119 pares de bases de longitud mediante PCR para los 7 genotipos de jitomate evaluados. La banda marcada con la flecha roja corresponde al gen JERF1.

4.12 Amplificación de los genes de resistencia a estrés salino mediante RT-PCR convencional

En ésta parte del trabajo se evaluó la expresión de los genes LOX y JERF1 cuando los genotipos C-115, C-200, C-101 (silvestres) y la variedad comercial 'Floradade'(J.F) se sometieron a estrés salino (200 mM de NaCl) durante 0, 3, 12 y 24 horas.

Se observó la presencia del gen JERF1 de un tamaño de 222 pb en las plantas sometidas a estrés como se muestra en la Figura 34.

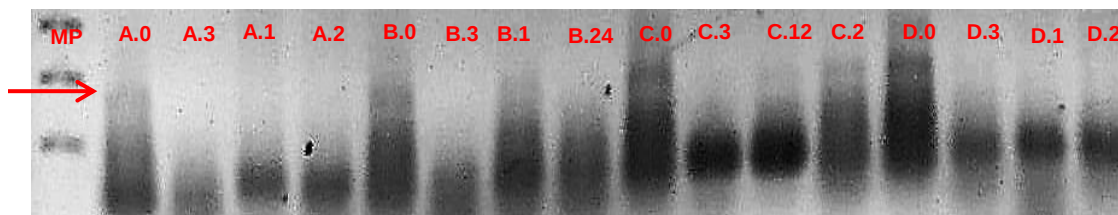


Figura 34. Productos de RT-PCR convencional del gen JERF1 para cuatro genotipos de jitomate evaluados. A: C-115, B:C-200, C:C-101 y D: 'Floradade' con sus distintos tiempos 0 h; 0, 3 h; 3, 12 h; 12 y 24 h; todos se sometieron a 200 mM de NaCl.

La banda correspondiente al gen está a nivel de la flecha roja marcada. Se observa que todos los individuos mostraron expresión del gen en a las 0 horas lo cual corresponde a 15 min en los que se colocó las hojas en la solución salina. El genotipo C-115 no volvió a presentar activación del gen hasta las 24 horas, el genotipo comercial 'Floradade' (J.F) tipo saladette (D) tampoco volvió a presentar la banda en algún tiempo de duración del estrés (solo a las 0 h), el genotipo C-101 reactivó el gen a las 12 horas y a las 24 horas, y por último el genotipo C-200 sólo activó el gen tras los 15 min de que se sometió al estrés y a las 12 h (en B.12).

Se conoce que la familia de genes de Factores de Transcripción de Etileno (ERF) tiene una respuesta a ataque por patógenos. Para nuestro trabajo ello queda descartado debido a que las hojas sometidas al estrés eran hojas nuevas, no se observó presencia de ningún microorganismo en ellas y las plantas no mostraron indicios de estar enfermas (Sharma *et al.* 2010). JERF1 también puede responder al etileno; al respecto en las hojas que sometimos al estrés se pudo observar epinastia, la cual está dada por síntesis de etileno y auxinas. Este fenómeno es normal en plantas sometidas a estrés abiótico, en jitomate se tiene que el gen JERF1 se puede inducir mediante ácido abscísico, etileno, MeJa y tratamientos por sal, lo cual sugiere que en nuestros experimentos pudo existir activación de la expresión génica de JERF1 por dos vías, una mediante el etileno en las hojas que mostraron epinastia y la sal, solo hay que tomar en cuenta que la epinastia se generó como consecuencia de someter las plantas al estrés salino y la planta comenzó a general etileno para reforzar los mecanismos de estrés a los que se veía sometida. También se ha observado que los transcritos de dicho gen se acumulan en jitomate tras 10 minutos de someterse a estrés por sal a 300 mM y ello se sostuvo durante 4 horas, disminuyendo tras 8 horas de estar sometida la planta a estrés (Sharma *et al.* 2010). En nuestro caso no obtuvimos dicha

respuesta en todos los genotipos sometidos, lo que si se observó fue que tras 15 minutos de someterse al estrés todas las plantas activaron el factor de transcripción JERF1. El genotipo C-101 que en el presente trabajo mostró ser tolerante al estrés por sal mostró la activación del gen a las 0, 12 y 24 h (en C.0, C.12 y C.24), dicha actividad no la mostró ningún otro genotipo probado, esto puede sugerir un mecanismo molecular más preciso para activar esta ruta metabólica en éste genotipo.

En tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) se ha encontrado que los ERFs son factores de transcripción importantes, algunos de ellos interactúan con la caja GCC de los elementos de respuesta a la deshidratación (DRE), por acción del etileno, metil jasmonato, ácido abscísico y sal, es el caso del factor de transcripción JERF1 que conecta las distintas rutas de transducción de señales. También en el tabaco se encontró que la sobre expresión de JERF1 activa a la caja GCC contenida por genes de osmotolerancia GLA, Prb-1b y CHN50 en condiciones normales y subsecuentemente se encontró que se promueve tolerancia a la salinidad como resultado de la regulación de la tolerancia osmótica, obteniéndose tolerancia a 300 mM de NaCl (Zhang *et al.* 2004). En nuestro trabajo pudimos comprobar que dicho gen es activado como parte de la respuesta al estrés salino, en diferentes tiempos por la planta de jitomate y en concentraciones de 200 mM, por lo que puede ser un gen relevante para dicha resistencia en las plantas silvestres y pueden existir variedades de dicho factor de transcripción en los genotipos silvestres que quizá le den mayor precisión a la respuesta osmótica. En otro estudio se aisló una variante del gen JERF1 llamado JcERF1 en las plantas de *Jatropha curcas*. El gen se usó para obtener plantas transgénicas de tabaco y se observó tolerancia al estrés por sal. Se evaluó la expresión del gen mediante RT-PCR en tiempo real y las unidades relativas de dicho gen fueron al tiempo 0 una unidad relativa de expresión, a la hora 2.5 unidades, a las 3 horas 0.5 unidades, a las 6 horas 1.5 unidades, a las 12 horas 2.5, a las 24 horas 3.25 y a las 48 horas 2.25 unidades en las plantas transgénicas (Yang *et al.* 2014). Si bien nosotros no pudimos medir por unidades relativas presentamos un comportamiento de la actividad del gen en nuestro trabajo observando que

JERF1 en los tiempos 0, 12 y 24 h del genotipo C-101 fue el que se mostró activo. Se ha demostrado que el silenciamiento del gen JERF1 en plantas infectadas por el Virus del Mosaico de Tabaco promueve que las plantas mueran rápidamente, por lo que se presupone como un factor de transcripción importante en la interacción planta-virus, en nuestro trabajo lo mostramos como un factor de transcripción para estrés abiótico sin embargo es un gen muy versátil siendo activado por varios factores al parecer dañinos en la mayoría de los casos para la planta (Dartan y Burcu, 2004).

También se ha propuesto que JERF1 es un factor de transcripción que modula rí o arriba la actividad de los genes lipoxigenasa (LOX) y la fenilalanina amonio-liaza (PAL) induciendo la expresión de los genes correspondientes, con el resultado de incrementar la síntesis del ácido jasmónico (AJ)/ácido salicílico (AS) y la activación de la respuesta de defensa dependiente de AJ/AS. Como se ha mencionado, JERF1 también se une a los elementos *cis* GCC y DRE/CRT controlando la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico y biótico, esto debido a que las proteínas ERF contienen sitios de fosforilación y la fosforilación de éstas proteínas promueve la unión a la caja GCC; por otra parte interactúa con una proteína básica de unión a leucina ABF2 y activa la transcripción de genes regulados por ácido abscísico (ABA). Por lo anterior se ha propuesto que JERF1 requiere una regulación de su función mediada por fosforilación u otras proteínas cooperativas (Pan *et al.*, 2014). Debido a los niveles de expresión mostrados por el genotipo C-101 podemos deducir que podría tener una mejor regulación del JERF1 que los otros genotipos analizados, que podría estar regulada por una mejor cascada de fosforilación y más proteínas cooperativas.

Por otro lado, los productos de amplificación del gen LOX por RT-PCR mostraron la amplificación de la banda de un tamaño de aproximadamente 197 pb en las plantas sometidas a estrés salino como se muestra en la Figura 35. El genotipo C-200 se expresó en los 4 tiempos, el genotipo 'Floradade' (J.F) mostró actividad a las 0, 3 y 24 h (B.0, B.3 y B.24), el genotipo C-101 se activó en los tiempos 0, 3 y 24 h (C.0, C.3 y C.24) y el genotipo C-115 mostró actividad en los 4 tiempos.

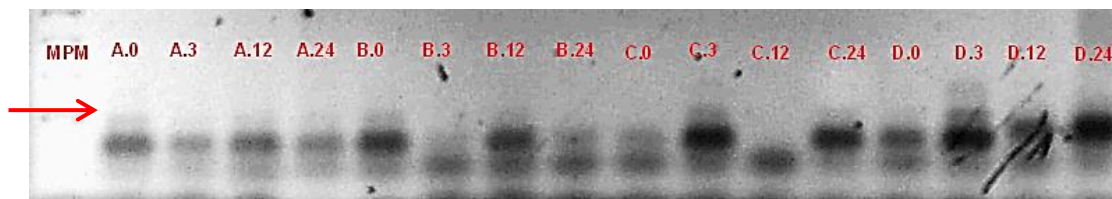


Figura 35. Productos de RT-PCR convencional del gen LOX para los 4 genotipos de jitomate evaluados. A: C-200, B: 'Floradade', C: C-101 y D: C-115, con sus distintos tiempos 0 h: 0, 3 h; 3, 12 h; 12 y 24 h, todos se sometieron a 200 mM de NaCl.

El gen LOX puede estar relacionado con la biosíntesis de ácido jasmónico y ha sido reportado también como gen de inducción de la expresión de ABA, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácidos grasos conjugados. Se tiene la hipótesis de que bajo distintos estímulos los rayos UV y los ácidos grasos pueden activar distintas rutas donde participan MAP kinasas, como en mecanismos de resistencia al frío (Karabudak *et al.*, 2014). Como se observa en la Figura 35 en el incremento en la expresión del gen LOX bajo el estrés por sal podrían estar participando las rutas de MAP kinasas, que pueden detonar la alarma para que la planta pueda comprobar la clase de estrés que se le está aplicando en ese momento.

La actividad del gen LOX puede estar relacionada no sólo con la generación de hidroperóxidos lipídicos si no también radicales superóxidos vía oxidación de nucleótidos de piridina y por ello contribuir al estrés oxidativo en las células de las plantas. Similarmente se ha establecido que los mecanismos de defensa de la planta requieren el deterioro de los lípidos de membrana o reacciones tardías que coinciden con la formación de lípidos derivados en sustancias fito-toxicas quizá mediadas por LOX (Molina *et al.*, 2002). Podemos mencionar que los genotipos estudiados tuvieron actividad del gen LOX en los distintos tiempos y dos de ellos mostraron tolerancia a 250 mM por lo que si bien la actividad de éste

gen puede traer consecuencias negativas, parece que provoca el encendido de otras rutas metabólicas que compensan positivamente el estrés por sal.

Rodríguez *et al.* (1999) encontraron que la alta actividad de la lipoxigenasa y la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa en tejido calloso de jitomate a 50 mM de NaCl mostraron una diferencia significativa contra el control por lo que sugieren que la tolerancia a salinidad en tejido calloso de jitomate es debido a la alta capacidad de formación de hidroperóxido de ácidos grasos poliinsaturados que son precursores moleculares del ácido jasmónico, que desencadena un sistema de defensa en las células ayudando a la tolerancia al estrés salino y a la captura de especies reactivas de oxígeno. En nuestro estudio se pudo observar una actividad constante del gen de LOX, lo que sugiere que el aumento en la actividad de dicho gen puede involucrar la activación de la respuesta al estrés dada por el ácido jasmónico.

Ghanem *et al.* (2012) mencionan que en las raíces de jitomate encontraron una reducción en la concentración de oxilipinas después de 5 días de estrés con sal (son el resultado de la actividad de las enzimas lipooxigenasas), y tras 21 días de estrés se reforzó el decremento de la concentración. También, determinaron mediante caracterización enantiomérica que las oxilipinas se presentan en forma enzimática. Esto indica que la auto oxidación masiva de lípidos no se presenta en los órganos que están en contacto directo con la sal y por ello las membranas no tienen un proceso de peroxidación fuerte. En las hojas se observó un incremento de las oxilipinas bajo el estrés salino y se localizaron de forma enzimática. Para la abscisión de las hojas se ha reportado un incremento de oxilipinas, pero lo que se ha demostrado es que no se lleva a cabo un proceso no enzimático de auto oxidación bajo el estrés por sal. Por otro lado, un aumento del ácido jasmónico se observó bajo el estrés por sal teniendo su máximo pico a los 21 días. Como hemos mencionado las rutas metabólicas que pueden desencadenar las oxilipinas pueden también provocar un aumento en la resistencia a diferentes tipos de estrés.

La expresión del gen LOX puede variar según el genotipo muestreado. En *Lycopersicon esculentum* (Lem) y *L. pennellii* (Lpa) se ha encontrado que la actividad en condiciones normales y bajo estrés salino son distintas; en Lpa se observó que bajo condiciones normales en el cloroplasto LOX estaba un 400 % más activo que en Lem. Sin embargo bajo condiciones de estrés salino 100 mM, la actividad en Lpa disminuyó un 50 % y en Lem aumentó un 150 % en los cloroplastos (Mittova *et al.*, 2001). Si bien nosotros no realizamos la cuantificación directa de LOX, si podemos aventurar que los genotipos más tolerantes al estrés salino como C-101 y C-115 pudieran tener mecanismos diferentes que activan la expresión del gen.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis morfológicos y bioquímicos realizados en el presente trabajo fue posible identificar genotipos de jitomate tolerantes y susceptibles al estrés salino en la etapa reproductiva. Se identificó a los genotipos C-115 y C-101 como los más tolerantes y los genotipos más susceptibles fueron los comerciales 'Río Grande' y 'Floradade'. Los dos componentes principales pudieron explicar el 86.9% de la varianza total de los datos de las plantas en condiciones de estrés salino. Los genotipos que lograron generar azúcares pese al estrés salino tienen la posibilidad de utilizar dichos azúcares en distintas rutas metabólicas, entre ellas la generación de más osmolitos protectores.

Los marcadores moleculares empleados mostraron la existencia de una baja similitud entre los genotipos evaluados y una diversidad genética grande, con respecto a lo presentado por otros autores. Los genotipos silvestres presentaron mayor diversidad genética que los cultivares que se evaluaron. La diversidad genética que presentan nuestros materiales es mayor que la presentada por trabajos que refieren colectas en Asia y Europa, pero menor a la presentada por trabajos que refieren colectas en América del sur (Ecuador y Perú).

El análisis de coordenadas principales mostró que la distribución de los genotipos evaluados podría estar asociada en mayor medida por la altura y la distribución de los nichos ecológicos de las zonas de colecta a las cuales pertenecen los genotipos.

En los materiales que mostraron ser tolerantes al estrés salino se presentó mayor activación de los genes JERF1 y LOX con respecto a los tiempos en los que se llevó a cabo el estrés, por lo que podrían presentar un mejor mecanismo de identificación del estrés el cual les ayuda en activar todas las rutas de tolerancia de los genes evaluados a diferencia de los materiales en los que no se presenta dicha actividad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P.A., Nelson, D.E, Yamada, S., Chmara, W., Jensen, R.G, Bohnert, H.J. and Griffiths, H. (1998). Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinus* (Aizoaceae). *New Phytologist*, 138,171-190.
- Alvarez, M.G. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos tropicales*, 32(2), 154-169.
- Alvarez, A.E., Van de Wiel, C.C.M., Smulders, M.J.M. & Vosman, B. (2001). Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet*, 103, 1283–1292.
- Akca, Y. & Samsunlu, E. (2012). The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut. *Pakistan Journal Botany*, 44(5), 1513 – 1520.
- Amtmann, A., H. J., Bohnert y Bressan, R. A. (2005). Abiotic Stress and Plant Genome Evolution. *Search for New Models Plant Physiology*, 138, 127-130.
- Argentel, L., González, L. M., Ávila, C. & Aguilera, R. (2006). Comportamiento del contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos fotosintéticos de variedades de trigo cultivadas en condiciones de salinidad. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 49-53.
- Ashraf, M.& Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Elsevier Enviromental and Experimental Botany*, 51(2), 206-216.
- Azcón, J.B. & Talón, M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGRAW – HILL Interamericana. Ediciones Universitat de Barcelona, 8-16.
- Balzarini, M.G., Di Rienzo, J.A., (2016). InfoGen versión, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Camacho-Emiterio, J. & Pantoja O. (2002). Na⁺/H⁺ exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na⁺ storage. *Functional Plant Biology*, 29(9), 1017 – 1024.
- Benavides-Mendoza A.,(2002). Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas. Departamento de horticultura universidad autónoma agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, Coah. México. Tesis doctoral, 228.
- Benor, S., Zhang, M., Wang, Zh. & Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) inbred lines using SSR molecular markers. *Elsevier Journal of genetics and genomics*, 35, 373-379.

Bertness, M.D. & Callaway R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends in Ecology & Evolution Cell Press*, 9, 191-193.

Blum, A.,(1988). Plant Breeding for Stress Environments. *CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida*. 43-78.

Bohs, L., & Olmstead, R.G., (1997). Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. *Systematic Botany*, 22, 5-17.

Bohs, L., (2005). Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences. In: Keating RC, Hollowell VC, Croat T (eds) Festschrift for William G. Darcy: the legacy of a taxonomist. *Monographs in Systematic Botany Missouri*, 104, 27–49.

Bronwyn, J., Barkla, Vera-Estrella, R., Balderas, E. & Pantoja, O. (2007). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotecnología*, 14, 263-272.

Buchanan, B. B. & Balmer, Y., (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 187-220.

Casals, J., Pascual, L., Cañizares, J., Cebolla-Cornejo, J., Casañas, F. y Nuez, F.(2011). The risks of success in quality vegetable markets: Possible genetic erosion in Marmande tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) and consumer dissatisfaction. *ELSEVIER Scientia Horticulturae*, 130(1), 78 -84. Doi: 10.1016/j.scienta.2011.06.013

Casierra, P. F., (2006). Distribución y producción total de materia seca en guayabo (*Psidium guajava* L. cv. Palmira ICA-1) bajo estrés salino. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en Tunja. Universidad de los Llanos – Villavicencio Meta, Colombia, 59-66.

Casierra, P. F. & Nehidy, G. (2005). Crecimiento y distribución de materia seca en cultivares de fresa (*Fragaria* sp.) bajo estrés salino. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. *Agronomía Colombiana*, 23, 83-89.

Casseres, E. (1980). Producción de Hortalizas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas San José, Costa Rica, 13-17.

Chen, J., Wang, H., Shen, H., Chai, M., Li, J., Qi, M. & Yang, W. (2009). Genetic variation in tomato populations from four breeding programs revealed by single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat markers. *Elsevier, Scientia Horticulturae*, 122, 6-16.

Chávez, L. & González L.M, (2009). Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. Instituto de Investigación Agropecuaria “Jorge Dimitrov” Cuba, ITEA 105, 231-256.

Charco, J. (2002). Introducción al estudio de la velocidad de regeneración natural del bosque mediterráneo y de los factores antropozoógenos que la condicionan. Editor: La regeneración natural del Bosque Mediterráneo en la Península Ibérica, Servicio de publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente, 279-290.

Cutler, K.D., (1998). From wolf peach to outer space - tomato history and lore. In: Tantalizing tomatoes: smart tips and tasty picks for gardeners everywhere. 21st Century Gardening Series, Brooklyn Botanic Garden, New York.

Dartan and Burcu (2004). A novel AP2 domain transcription factor from *lycopersicon esculentum*, funtions in Tabacco Mosaic Virus pathogenesis. *Sabancı University Research Database*, Thesis, 100.

De Lucena, C.C., De Siqueira, D.L., Prieto, M. H. E. & Cecon, P. R. (2012). Salt stress change chlorophyll fluoresece in mango. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal-SP*, 34(4), 1245- 1255.

Dognalar, Z., Demir, K., Basak, H., Gul I. (2010). Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research*, 5, 2056-2065.

Estrada-Trejo, V., Lobato, R.O., García, G. S., Carrillo, C. C., Castillo, F. G., Contreras, E. M., Ayala, O.J.G., De la O, M.I. & Artola, A. M. (2014). Diversidad de poblaciones nativas de jitomate para germinación en condiciones salinas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(6), 1067-1079.

Fernández, G. & Johnston, M. (1986). Fisiología vegetal experimental. Servicio editorial IICA, Costa Rica, 28.

Florido, B. C.M. & Bao, F. L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Reserva científica del departamento de Biología Vegetal*, 35(3), 70-88.

Florido, M., Arencibia, A., Plana, D., Alvarez, M. J. L. & Lara, R.M. (2007). Análisis de la diversidad genética en tomate (*Solanum* L. SECCIÓN *Lycopersicon* SUBSECCIÓN *Lycopersicon*) utilizando AFLP. *Cultivos tropicales*, 28(3), 83-87.

Fraser, L. (1952). Seedling yellows, an unreported virus disease of citricus. *Agricultural Gazette of New South Wales*, 63, 125-131.

Fray, R.G & Grierson, D. (1993). Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Molecular Biology*, 22, 589-602.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Naruska, Y., Yamaguchi, K. & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 436-442.

Fulkerson, W.J. & Donaghy, D.J. (2001). Plant-soluble carbohydrate reserve and senescence – Key criteria for developing an effective grazing management system for ryegrass-based pastures: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41, 261-275.

Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Danga, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L. & Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11444-11449.

Ghanem, M. E., Ghars, M. A., Frettinger, P., Pérez-Alfocea, F., Lutts, S., Wathelet, J.P., Jardin, P. & Fauconnier, M.L. (2012). Organ-dependent oxylipin signature in leaves and roots of salinized tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *ELSEVIER, Journal of Plant Physiology*, 160, 1090-1101.

Gharbi, E., Martínez, J.P., Benahmed, H., Hichri, I., Dobrev, P.I., Motyka, V., Quinet, M. & Lutts, S. (2017). Phytohormone profiling in relation to osmotic adjustment in NaCl-treated plants of the halophyte tomato wild relative species *Solanum chilense* comparatively to the cultivated glycophyte *Solanum lycopersicum*. *Plant Science*, 258, 77-89.

Godwin, I.D., Atiken, E.A. & Smith, L.W.. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524 – 1528.

Golldack, D., Su H., Quigley F., Kamasani U.R., Muñoz-Garay C., Balderas E., Popova O.V., Bennett J., Bohnert H. and Pantoja O. (2002). Characterization of a HKT-type transporter in rice as a general alkali cation transporter. *The Plant Journal*, 31, 529-542.

Golldack, D., Li, Ch., Mohan, H. & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers on plant science*, 5, 151.

González, L.M. (2001). Apuntes sobre la fisiología de las planta cultivadas en condiciones salinas. *Cultivos Tropicales*, 23 (4), 47-57.

González, B. A., Cisne, C. J., Querol, L. D., & Morán, C. J. C. (2011). Germoplasma de tomate silvestre (*Lycopersicum spp*) en la reserva de recursos genéticos de Apacunca (RRGA), Chinadera. *La calera*, 11(7), 33-40.

Gould, W.A. (1983). Tomato production, processing and quality, AVI Publishing company, Westport, CT, USA, 445.

Goykovic, V. C. & Saavedra, G.R. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA (Chile)*, 25(3), 47–58.

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laolaze, L. & Masmoudi, K. (2016). New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1787. doi: 10.3389/fpls.2016.01787

Hernández, P. V. (2017). Respuesta de tomate a condicionantes abióticos y mitigación de su efecto mediante estrategias agronómicas. Universidad Politécnica de Cartagena. Programa de Doctorado, 264.

Hou, Y., Meng, K., Han, Y., Ban, Y. Q., Wang, B., Suo, J., Lv, J. & Rao, J. (2015). The persimmon 9-lipoxygenase gen DkLOX3 plays positive roles in both promoting senescence and enhancing to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1073.

Jiménez, D. A., Borges, A.A., Luis, J.C., Valdés, F. Sandalio L.M. & Pérez J.A. (2015). Priming effect of menadione sodium bisulphite against salinity stress in *Arabidopsis* involves epigenetic changes in genes controlling proline metabolism. *Elsevier Environmental and Experimental Botany*, 120, 23-30.

Karabudak, T., M., Özdemir, B. F. & Türkan, I. (2014). Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase 7 and lipoxygenase gene expression. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1401-1410.

Kausch K. D. & Handa, A. K. (1995). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a Lipoxygenase cDNA from Ripening Tomato Fruit. *Plant Physiology*, 107, 669 - 670.

Lakshmi, P. Satish, K., Tran, L. & Nguyen, H. (2009). Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant & Cell Physiology*, 50 (7), 1260-1276.

Lee, S.K., Kim, B.G., Kwon, T.R., Jeong, M.J., Park, S.R., Lee, J. W., Byun, M. O., Kwon, H.B., Matthews, B. F., Hong, C. B. & Park, S. C. (2011). Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gen OsMAP33 enhances sensitivity to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Springer Journal of Biosciences*, 36(1), 139 – 151.

López, S. J., Castro, S. & Huerta, A. (2001). Influencia del estrés hídrico sobre el contenido de ceras epiculares en etapas fenológicas del sorgo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24(1), 57-62.

Lu, C.W., Shao, Y., Li, L., Chen, A.J., Xu, W.Q, Wu, K.J., Luo, Y.B. & Zhu, B. Z. (2011). Overexpression of SIERF1 tomato gene encoding an ERF-type transcription activator enhances salt tolerance. *Springer Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 118–125.

Marshall, J.A., Knapp, S., Davey, M.R., Power, J.B., Cocking, E.C., Bennett, M.D. & Cox, A.V. (2001). Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum*

(*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA región. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1216-1222.

Mazzucato, A., Papa, R., Bitocchi, E., Mosconi, P., Nanni, L., Negri, V., Enea P. M., Siligato, F., Piero, S. G., Tiranti, B. & Veronesi, F. (2008). Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 657-669. DOI: 10.1007/s00122-007-0699-6.

Mazzucato, A., Ficcadenti, N., Caioni, M., Mosconi, P., Piccinini, E., Venkata, R. R. S., Sestili, S. & Ferrari, V. (2010). Genetic diversity and distinctiveness in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces: The Italian case study of "A pera Abruzzese". *Elsevier Scientia Horticulturae*, 125, 55-62. doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.013

McCue, G.A. (1952). The History of the Use of the Tomato: An Annotated Bibliography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 39, 289-348.

Miller, J.C. & Tanksley, S.D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4): 437-48.

Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. & Guy, M. (2001). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 115(3), 393-400.

Molina, A., Bueno, P., Marín, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P., Belver, A., Venema, K. & Donaire, P. (2002). Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist*, 156, 409-415.

Morales, P. M. N., Espinosa, L. G., Morales, A. Á. R., Sánchez, M. B. R., Jiménez, C. Á. M. & Milián, G. Y. (2014). Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 62-73.

Morales, P. M. N., Morales, A. Á. R., Artiles, V. A., Yoamel, M. G. & Espinosa, L. G. (2016). Caracterización fenotípica y genética de cuatro especies silvestres del género *Solanum*, SECCIÓN *Lycopersicon*. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 109-119.

Moreno, P. F. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una Revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.

Morvan-Bertrand, A., Boucaud, J., Le, S. J. & Prud'homme, M.P. (2001). Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne*. L. *Springer Planta*, 213(1), 109-120.

Nesbitt, T.C. & Tanksley, S.D. (2002). Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, 162, 365–379.

Olmstead, R.G. & Palmer, J.D. (1997). Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic Botany*, 22, 19-29.

Olmstead, R.G., Sweere, J.A., Spangler, R.E., Bohs, L. & Palmer, J.D. (1999). Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew Publishing, 111-137.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (consultado en línea: 2017): <http://www.fao.org/themes/es/>

Pan, X., Li, Y., Zhang, H., Huang, R., Liu, W. Ming, J., Liu, S. & Li, X. (2014). Expression of signalling and defence-related genes mediated by over-expression of JERF1, and increased resistance to sheath blight in rice. *Plant Pathology*, 63, 109-116.

Papageorgiou, G. C. y Morata, N. (1995). The usually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Res.*, 44, 243-252.

Park, Y. H., West, M. A. & St Clair, D.A. (2004). Evaluation of AFLPs for germoplasm fingerprinting and assessment of genetic diversity in cultivars of tomatoes (*Lucopersicum esculentum* L.). *Genome*, 47(3), 510 -518. Retrieved for <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g06-016#.V0Oo7PnhCM->

Peakall, R., & Smouse, P.E. (2006). GENEALEX 6. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.

Peralta, I.E. & Spooner, D.M. (2001). Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*, 88, 1888–1902.

Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M. (2007). The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* L. section *lycopersicon* (mill.) wettst.) and their outgroup relatives (*Solanum* sections *juglandifolium* (rydb.) child and *lycopersicoides* (child) peralta). *Systematic Botany Monographs*, 84, 1-186.

Pineda, B., García, J. O. A., Antón, T., Pérez, F., Moyano, E., García, B. S., Campos, J.F., Angosto, T., Morales, B., Capel, J., Moneno, V., Lozano, R., Bolarín, M. C. & Atarés, A. (2012). Tomato: Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance, in *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*, Volume 1 & Volume 2 (eds N. Tuteja, S. S. Gill, A. F. Tiburcio and R. Tuteja),

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 1085-1120. doi: 10.1002/9783527632930.ch43.

Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, vol. I: conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO México, 437-494.

Pizzio, G.A., Paez-Valencia, J., Khadillkar, A.S., Regmi, K., Patron-Soberano, A., Zhang, Sh., Sanchez-Lares, J., Furstenau, T., Li, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Yadav, U. P., Ayre, B. G. & Gaxiola, R. A. (2015). Arabidopsis type I proton-pumping pyrophosphatase expresses strongly in phloem, where it is required for pyrophosphate metabolism and photosynthate partitioning. *Jstor Plant Physiology*, 167(4), 1541-1553.

Qiao, Z. X., Huang B. & Liu, J.Y. (2008). Molecular cloning and functional analysis of ERF gene from cotton (*Gossypium hirsutum*). *ELSEVIER Biochemical et Biophysical Acta (BBA)- Gene Regulatory Mechanisms*, 1779, 122 – 127.

Rao, E.S., Kadirvel, P., Symonds, R. C., Geethanjali, S., Thontadary, R. N. & Ebert, A. W. (2015). Variations in DREB1A and VP1.1 genes shows association with salt tolerance traits in wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*). *Plos One*, 10(7), 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0132535

Ranc, N., Muños, S., Santoni, S. & Causse, M. (2008). A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (Solanaceae). *BMC Plant Biology*, 8(1), 130, 1-16. doi:10.1186/1471-2229-8-130

Rick, C.M. (1986). Reproductive isolation in the *Lycopersicon peruvianum* complex. In: D'Arcy WG (ed) *Solanaceae: biology and systematics*. Columbia University Press, New York, 477-495.

Rick, C. M., Deverna, J. W., Chetelat, R. T. & Stevens, M. A. (1986). Meiosis in sesquidiploid hybrids of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 3580–3583.

Rick, C.M. (1995). Tomato: *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). In: Smartt J, Simmonds NW (eds) *Evolution of crop plants*. Longman, Harlow, Essex, England, UK, 452–457.

Rick, C.M, & Holle, M. (1990). Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* - genetic-variation and its evolutionary significance. *Economic Botany*, 44, 69–78.

Ruiz, F. H. E., Villalpando, R. L. G., Murillo, B. A., Beltrán, F. A. M. & Hernández, L. G. M. (2014). Respuesta diferencial a la salinidad de genotipos de tomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill.) Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, Tierra Latinoamericana, 32 (4), 311 - 323.

Rodríguez, R.M.P, Kerkeb, L., Buno, P. & Donaire, J.P. (1999). Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺ - ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill) calli. Plant Science, 143,143-150.

Romero, A. R., Soria, T. &Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. Plant Science, 160, 265-272.

Rosa, M. R., Ruiz J. M. & Romero, L. (2003). Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. Journal of Food Agriculture and Environment, 1(1), 70-74.

SAGARPA. (2010). Monografía de cultivos jitomate. pp. 1-10.

SAGARPA. (2016). Panorama Agroalimentario Tomate rojo. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. FIRA, pp. 1-37.

Salas, J. E., Sanabria, M., & Pire, R. (2001).Variación en el índice y densidad estomática en la plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Bioagro, 13(3), 99 – 104.

Salazar, A. M. M., Sandoval, A. S. R. & Armendáriz, J. S. B. (2013). Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill Interamericana Editores, 273.

Santos, C. V. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. Elsevier Scientia Horticulturae, 103(1), 93-99.

Satpal, T. & Tripathy, B.C. (2014). Salt-stress induced modulation of chlorophyll biosynthesis during de-etiolation of rice seedlings. Physiologia Plantarum, 153, 477-491.

Sharma, M. K., Kumar, R., Solanke, A. U., Sharma, R., Tyagi, A.K. & Sharma, A.K. (2010). Identification, phylogeny, and transcript profiling of ERF family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Springer Molecular Genetics and Genomics*, 284, 255-275.

Siddique, M., Hamid, A., & Islam, M. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. Botanic. Bulletin of Academy Sinica, 41, 35-39.

Sim, S.C., Van Deynze, A., Stoffel, K., Douches, K. S., Zarka, D., Ganai, M. W., Chetelat, R. T., Hutton, S.F., Scott, J. W., Gardener, R. G., Panthee, D. R., Mutschler, M., Myers, J. R. &Francis, D. M. (2012). Hig-Density SNP Genotyping of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Reveals Patterns of Genetic Variation Due

to Breeding. PLoS ONE, 7(9), e45520. Dirección DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045520>

Smith, A. F. (1994). The Tomato in America: Early history, Culture, and Cookery. University of South Carolina press.11-52.

Spooner, D.M., Anderson, G.J. & Jansen, R.K. (1993). Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (Solanaceae). American Journal of Botany, 80, 676-688.

Spooner, D.M., Peralta, I.E. & Knapp, S. (2005). Comparison of AFLPs to other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes (Solanum L. Section Lycopersicon (Mill.) Wettst. Subsection Lycopersicon. *Taxon*, 54, 43-61.

Sun, Q., Gao, F., Zhao, L., Li, K., & Zhang, J. (2010). Identification of a new 130 bp *cis*-acting element in the *TsVP1* promoter involved in the salt stress response from *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biology*, 10, 90. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-10-90>.

Swire-Clark, G.A. & Marcotte, W.R. (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology*, 39(1), 117-28.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Publicaciones de la Universitat Jaume, 2, 1129-1191.

Tamay, L.D., Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2, 70-78.

Terzopoulos, P.J. & Bebeli, P.J. (2008). DAN and morphological diversity of selected Greek tomato (*solanum lycopersicum* L.). *Elsevier Scientia Horticulturae*, 116(4), 354-361.

Trujillo, L.E., Sotolongo, M., Menéndez C., Ochogavía, M.E., Coll, Y., Hernández, I., Borrás-Hidalgo, O., Thomma, B. P. H. J., Vera, P. & Hernández, L. (2008). SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tabaco plants. *Plant Cell Physiology*, 49(4), 512-525.

Vera-Estrella, R., Bronwyn, J., Barkla, Hans, J., Bohnert, Omar P. (2004). Novel Regulation of Aquaporins during Osmotic Stress. *American Society of Plant Biologists*, 135, 2318-2329.

Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., García-Ramírez, L., & Pantoja, O. (2005). Salt Stress in *Thellungiella halophila* Activates Na⁺ Transport Mechanisms Required for Salinity Tolerance. *Plant Physiology American Society of Plant Biologists*, 139(3), 1507-1517.

- Vickers, E.C., Gershenzon, J., Lerdau, T. M. & Loreto, F. (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*, 5, 283-291.
- Weston L.A. (1996). Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, 88, 860-866.
- Wikström, N., Savolainen, V., & Chase, M.W. (2001). Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *The Royal Society, Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 268, 2211–2220.
- Xu, G., Gregor, J., Thomas D., Cornelis, P. H. & Massoud, R. R. (1996). Step sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 20(4), 773-83.
- Yang, H., Yu, Ch, Yan, J., Wang, X., Chen, F., Zhao, Y. & Wei, W. (2014). Overexpression of the *Jatropha curcas* JcERF1 Gen Coding an AP2/ERF-Type Transcription Factor Increases Tolerance to Salt in Transgenic Tobacco. *Biochemistry*, 79(11), 1226-1236.
- Yon-Sham, K.Y., Sun-Gi,P. & Seung-In, Y. (2009). Assessment of Genetic Variation among Comercial Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Varieties Using SSR Markers and Morphological Characteristics. *Genes and Genomics*, 3, 1-10.
- Zaidi, I., Ebel, C., Belgaroui, N., Ghorbel, M., Amara, I., Hanin, M. (2016). The wheat MAP kinase phosphatase 1 alleviates salt stress and increases antioxidant activities in *Arabidopsis*. *Elsevier Journal of Plant Physiology*, 193, 12–21.
- Zamudio, G. B., López, P. L., Alcántar, G. G., González, E. D., Ruz, C. J. Z., Castellanos, J. (2004). Delimitación de áreas salinas en el distrito de riego de Caborca, Sonora, México. *Tierra Latinoamericana*, 22(1), 91-97.
- Zhang, X., Feng, H., Feng, CH., Xu, H., Huang, X., Wang, Q., Duan, Xi., Wang, Xi., Wei, Gu., Huang, Li., Kang, Zhe. (2015). Isolation and characterization of the cDNA encoding for a wheat heavy metal-associated isoprenylated plant protein involved in stress responses. *Plant Biology*, 17(6), 1176-1186.
- Zhang, Y., Bell, A.,Perlman, P.S. &Leibowitz, M.J. (2000). Pentamidine inhibits mitochondrial intron splicing and translation in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Cambridge University Press*, 6(7), 937-951.
- Zhang, H., Hung, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Xi., Huang, D. & Huang, R. (2004). The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tabacco. *Springer Planta*, 220(2), 262-270.

Zinová, S.V, Vasiukova, N.I., Udalo, Zh.V. & Gerasimova, N.G. (2013). The participation of salicylic and jasmonic acids in genetic and induced resistance of tomato to *Meloidoyne incognita* (Kofoid and White, 1919). Article in Russian *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, 3, 332 - 40.

Zuriaga, E., Blanca, J.M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R. & Nuez, F. (2009). Classification and phylogenetic relationships in *Solanum* section *Lycopersicon* based on AFLP and two nuclear gene sequences. *Springer Genetics Resources Crop Evolution*, 56(5), 663-678. DOI 10.1007/s10722-008-9340-z.