



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON  
EL GEN *AtAVP1* TOLERANTES A SAL**

**TESIS**

Que como requisito parcial  
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

Presenta:

**ARIADNA GORETI LÓPEZ MÉNDEZ**

Bajo la dirección de:

**DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ**



Instituto de Horticultura

Chapingo, México, diciembre de 2019



REGISTRADO EN LA ACADÉMICA  
DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES  
SISTEMA DE EXÁMENES PROFESIONALES

**IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL  
GEN *AtAVP1* TOLERANTES A SAL**

Tesis realizada por **Ariadna Goreti López Méndez** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

**DIRECTOR:**



---

**DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ**

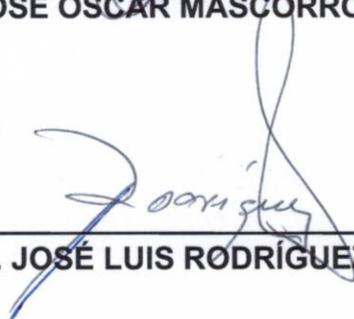
**ASESOR:**



---

**DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO**

**ASESOR:**



---

**DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O**

Chapingo, México, diciembre 2019

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	6
DATOS BIOGRÁFICOS.....	7
RESUMEN GENERAL .....	8
GENERAL SUMMARY .....	9
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL.....	11
2.1 EFECTOS DE LA SALINIDAD.....	11
2.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA A SALES EN PLANTAS .....	12
2.3 VENTAJAS DEL GEN <i>AtAVP1</i> .....	13
3. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN <i>AtAVP1</i> TOLERANTES A SAL EN GERMINACIÓN Y PLÁNTULA.....	15
RESUMEN .....	15
ABSTRACT .....	16
3.1 INTRODUCCIÓN .....	17
3.2 MATERIALES Y MÉTODO.....	19
3.2.1 Obtención de transformantes evaluados.....	19
3.2.2 Prueba de tolerancia a sal en germinación.....	19
3.2.3 Prueba de tolerancia a sal en plántula.....	20
3.2.4 Análisis estadístico.....	21
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	22
3.3.1 Prueba de tolerancia a sal en germinación.....	22
3.3.2 Prueba de tolerancia a sal en plántula.....	26
3.4 CONCLUSIONES.....	30
3.5 LITERATURA CITADA.....	31
IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN <i>AtAVP1</i> CON TOLERANCIA A SALES EN PLANTA ADULTA .....	34
RESUMEN .....	34
IDENTIFICATION OF TOMATO PLANTS TRANSFORMED WITH THE GEN <i>AtAVP1</i> WITH TOLERANCE TO SALTS IN ADULT PLANT .....	35
SUMMARY .....	35
3.6 INTRODUCCIÓN .....	36

3.7	MATERIALES Y MÉTODO.....	38
3.8	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
3.9	CONCLUSIONES.....	45
3.10	LITERATURA CITADA.....	45
4.	LITERATURA CITADA GENERAL.....	47

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Relación de plantas T2 de cada evento identificadas en cada grupo y determinación de las proporciones de acuerdo a los grupos tolerantes : suceptibles en germinación. ....	24
Cuadro 2.	Relación de plantas T2 de cada evento identificadas en cada grupo y determinación de las proporciones de acuerdo a los grupos tolerantes : suceptibles en plántula. ....	29
Cuadro 3.	Características de grupos de acuerdo con los caracteres asociados a variables generadas por el análisis discriminante. ....	42
Cuadro 4.	Relación de plantas T2 de cada evento identificadas en cada grupo y determinación de las proporciones de acuerdo a los grupos tolerantes : suceptibles en planta adulta. ....	43

## INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1.	Escala visual de vigor de planta de tomate en la etapa de plántula. ....	21
Figura 2.	Dendrograma jerárquico (distancias euclidianas y método de Ward) de 8 eventos en la generación T2 de tomate transformados con el gen <i>AtAVP1</i> , germinadas bajo estrés salino. ....	23
Figura 3.	Representación de variables discriminantes de 8 eventos en la generación T2 de tomate transformados con el gen <i>AtAVP1</i> , germinadas bajo estrés salino. ....	24

Figura 4. Promedios de materia seca de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento T0. Del 4-16 son eventos <i>AtAVP1</i> , 1-2 eventos TPS y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.....	25
Figura 5. Promedios de IVG y PG de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento T0. Del 4-16 son eventos <i>AtAVP1</i> , 1-2 eventos TPS y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.....	26
Figura 6. Efecto de solución salina en el porcentaje e índice de velocidad de emergencia en germinación de semillas de tomate.....	26
Figura 7. Dendrograma jerárquico de 8 eventos T0 en la generación T2 de tomate transformados con el gen <i>AtAVP1</i> , bajo estrés salino durante la etapa de plántula.....	27
Figura 8. Representación de variables discriminantes de 8 eventos T0 en la generación T2 de tomate transformados con el gen <i>AtAVP1</i> , bajo estrés salino en la etapa de plántula. ....	28
Figura 9. Promedios de ABC, MS, PE, IVE, VP, PS de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento. Del 4-16 son eventos <i>AtAVP1</i> , 1-2 eventos TPS y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.....	30
Figura 10. Efecto de sales en el desarrollo de plántulas de tomate. Arriba: 25 días después de la aplicación de solución de riego con 200 mM de concentración de sales; Abajo: testigo. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 11. Dendrograma jerárquico de 116 plantas T2 provenientes de 8 eventos T0 de tomate transformado con el gen <i>AtAVP1</i> , evaluadas bajo estrés salino en planta adulta.....	40
Figura 12. Representación de variables discriminantes de 131 plantas T2 de tomate bajo estrés salino en etapa de planta adulta. ....	41
Figura 13. Promedios de AP, NFC, PF, MSH, MST, MSF de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento. Del 4-16 son eventos <i>AtAVP1</i> y 1-2 eventos TPS evaluadas en planta adulta.....	44

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el financiamiento otorgado para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por 9 años de grandes oportunidades a su lado, por ser mi alma mater de enseñanza en estudios, vida y persona.

Al **Instituto de Horticultura** por las facilidades proporcionadas durante mi permanencia en la institución.

Al **Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez** por toda su confianza, el apoyo infinito para la realización de este proyecto de vida y formación.

Al **Dr. José Oscar Mascorro Gallardo** por ser parte importante durante la realización de esta tesis, así como cada una de sus aportaciones.

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O** por su valiosa aportación científica a esta investigación.

Al **Quim. Ricardo Gaspar Hernández** y al **C. Jorge Luis Sánchez Galicia** por su apoyo técnico en el laboratorio y en el invernadero.

A mis padres **Lilia Méndez** y **Alfonso López**, y a todas las personas que confiaron en mí, quienes me brindaron su cariño, amistad y apoyo durante este pequeño, pero significativo trayecto de mi vida. Infinitas GRACIAS.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Ariadna Goreti López Méndez  
Fecha de nacimiento: 26 de enero de 1994  
Lugar de nacimiento: Tecomán, Colima, México.  
Profesión: Agrónomo en Horticultura Protegida

### **Desarrollo académico**

Preparatoria 2010-2013 Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo  
Licenciatura 2013-2017 Agronomía en Horticultura Protegida. Universidad Autónoma Chapingo  
Maestría 2017-2019 Maestría en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

## RESUMEN GENERAL

### IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN *AtAVP1* TOLERANTES A SAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado una de las hortalizas de mayor importancia a nivel mundial. La salinidad de los suelos y el agua está aumentando considerablemente en las áreas de producción, por lo que se requiere desarrollar variedades con tolerancia a este factor. La transformación genética mediante el gen *AtAVP1*, el cual facilita el transporte de iones  $\text{Na}^+$  del citosol a la vacuola, a mostrado conferir resistencia a plantas hacia el estrés salino. El objetivo fue identificar eventos de transformación exitosos de plantas de tomate con el gen *AtAVP1* con tolerancia a sales durante la germinación, plántula y planta adulta. En las etapas de germinación y plántula se evaluó la generación T2 (proveniente de 11 eventos T0 de la línea L3 de tomate modificada genéticamente con el gen *AtAVP1*), 2 eventos con el gen *TPS*; así como la línea L3 original y un híbrido comercial. En la prueba de germinación se utilizó la concentración de 80 mM de NaCl. En plántula y planta adulta se empleó solución nutritiva adicionada con 200 mM de NaCl. La determinación de tolerancia o susceptibilidad en los tres estados fenológicos se realizó mediante análisis multivariado de agrupamiento y discriminante. En la etapa de germinación y plántula se identificaron con alto vigor 6 y 8 eventos *AtAVP1*, respectivamente, y 2 eventos *TPS* en ambas pruebas. En etapa de planta adulta, 5 eventos *AtAVP1* y uno de *TPS* mostraron el mejor desempeño. Mediante PCR se identificaron en T1 eventos transformantes con proporción 3 : 1 (tolerantes : susceptibles a sales); en contraste, las evaluaciones fenotípicas de la T2 no indicaron dicha proporción, al haber sido seleccionado solo eventos positivos en T1. La presencia de eventos con niveles de tolerancia variables, sugiere que existen diferentes niveles de expresión del gen ante condiciones de salinidad, ya que todos los eventos fueron derivados de una misma línea.

**Palabras clave:** NaCl, tolerancia, gen *AtAVP1*, germinación, plántula, planta adulta.

## GENERAL SUMMARY

### IDENTIFICATION OF TOMATO PLANTS TRANSFORMED WITH THE *AtAVP1* SAL TOLERANT GENE

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is considered one of the most important vegetables worldwide. The salinity of soils and water is increasing seriously in production areas, and it requires the development of varieties with tolerance to this stress. Genetic transformation with the *AtAVP1* gene, which facilitates the transport of Na<sup>+</sup> ions from the cytosol to the vacuole, has been shown to confer plant resistance to salinity conditions. The objective was to identify successful transformation events of tomato plants with the *AtAVP1* gene with salt tolerance during germination, seedling and adult plant stages. During germination and seedling, the T2 generation (obtained from 11 T0 events of the genetically modified tomato L3 line with the *AtAVP1* gene), two events with the *TPS* gene; as well as the original L3 line and a commercial hybrid were evaluated. In the germination test, the concentration of 80 mM NaCl was used. In seedling and adult plant stages, nutritional solution added with 200 mM NaCl was used. The determination of tolerance or susceptibility in the three phenological states was made by multivariate cluster and discriminant analyses. In the germination and seedling stages 6 and 8 *AtAVP1* events, respectively, were identified with high vigor and 2 *TPS* events in both tests. In the adult stage, 5 *AtAVP1* and one *TPS* events showed the best performance. By means of PCR in T1, transformative events with a 3 : 1 (tolerant : susceptible to salts) ratio were identified; however, phenotypic evaluations in T2 did not indicate such proportion, having been selected only positive events in T1. The presence of events with varying tolerance levels suggests that there are different capacities of gene expression in salinity conditions, since all events were derived from the same line.

**Keywords:** NaCl, tolerance, *AtAVP1* gene, germination, seedling, adult plant.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. Las condiciones desfavorables como la presencia de sales en suelo y agua de riego disminuyen su producción, por lo que la tolerancia a este factor ha sido atendida con interés dentro del mejoramiento genético.

El cambio climático y el uso irracional de fertilizantes han incrementado los suelos afectados por salinidad (Reyes *et al.*, 2010), por lo que esta condición de estrés afecta alrededor de 800 millones de hectáreas de suelo y 32 millones de hectáreas de tierra agrícolas a nivel mundial (FAO, 2015). En México, cerca de 13 % (372,675 ha) de las tierras cultivadas sufren de estos problemas (SEMARNAT, 2010). Los suelos afectados tienen alta concentración de sales solubles ( $\text{Na}^+$ ) y elementos tóxicos ( $\text{Cl}^-$ ), y en menor porción elementos que contrarrestan estos efectos como el carbonato de sodio y el yeso, (FAO, 2018).

Por lo anterior, se prevé que el tomate tendrá en algún momento que desarrollarse con el uso de agua salina, o bien, en suelos salinos. Esta situación justifica el enfoque de algunos programas de mejoramiento genético para la búsqueda de variedades tolerantes (Florido & Bao, 2014). Una de las alternativas de mejoramiento la representa el uso de transgénicos, en donde uno de los genes empleados para conferir tolerancia a sal y sequía es el *AtAVP1*.

Dicho gen por medio de la ATP-asa permite el paso de iones de  $\text{Na}^+$  al interior de la vacuola, lo que contrarresta los efectos negativos del estrés osmótico en el citosol. El proceso de obtención de plantas transgénicas tolerantes a sales mediante el gen *AtAVP1*, obliga a la evaluación de los eventos positivos ante el estrés para corroborar el grado de expresión de la tolerancia adquirida.

Con base a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue identificar eventos de transformación exitosos de plantas de tomate con el gen *AtAVP1* con tolerancia al estrés salino durante la germinación, plántula y planta adulta.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL

### 2.1 EFECTOS DE LA SALINIDAD

Las plantas bajo condiciones de suelos salinos disminuyen su consumo de agua, lo que provoca intoxicación por iones y estrés osmótico (Munns & Tester, 2008). La mayoría de los cultivos son sensibles a este estrés en las diferentes fases de desarrollo del cultivo, desde la germinación hasta la madurez comercial del fruto (Nahar *et al.*, 2011). El tomate es una especie medianamente sensible a las sales, por lo que esta condición disminuye su desarrollo y rendimiento de fruto (Goykovic & Saavedra, 2007).

Las plantas en condiciones adversas como la salinidad son afectadas de dos formas generales, el estrés hídrico debido a la disminución del potencial osmótico en la zona de las raíces y la toxicidad por iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  debido a esto se presentan diversos problemas, retraso en la germinación de la semilla y disminución del porcentaje de germinación (Hajer *et al.*, 2006) ya que se afecta los procesos iniciales durante la germinación: imbibición, síntesis de enzimas y translocación de sustancias hacia el embrión retardando su crecimiento y el desarrollo inicial de la plántula (Reyes *et al.*, 2010); además disminuye la altura en las plantas, las hojas se presentan en menor número (Romero *et al.*, 2001), así mismo presentan clorosis y necrosis principalmente en los bordes (Goykovic & Saavedra, 2007), se disminuye la fotosíntesis (Florido y Bao, 2014), los contenidos de clorofila a y b se disminuyen al aumentar la concentraciones de sales (Hajer *et al.*, 2006) y ocurre la disminución potencial del rendimiento de frutos (Grainferberg *et al.*, 2000). También se presenta una disminución de materia seca (Reina-Sánchez *et al.*, 2005) y pérdida de agua, simultáneamente ocurre una disminución del potencial de turgencia (Blum, 2009), bajos potenciales osmóticos y acumulación de solutos debido a los iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (Talebi *et al.*, 2009) lo que provoca una disminución del peso fresco y seco. A nivel de la raíz, las sales alteran la absorción de agua que afectan el crecimiento de los órganos aéreos (Goykovic & Saavedra, 2007).

En tomate, la presencia de sales disminuye la densidad de estomas en la cara adaxial de las hojas, mientras que en la cara abaxial se incrementa ligeramente (Salas *et al.*, 2001); así mismo, disminuye la acumulación de biomasa, conductancia estomática, transpiración, los potenciales hídrico foliar, osmótico y la conductividad hidráulica de las raíces con concentraciones de 50, 100 y 200 mM de Na<sup>+</sup> en la solución nutritiva (Morales *et al.*, 2010).

## **2.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA A SALES EN PLANTAS**

Las respuestas de la planta al estrés provocado por sales dependen del genotipo, de su estado fenológico, de la duración y la severidad del estrés y de los factores ambientales que lo provocan (Cattivelli *et al.*, 2008).

Existen mecanismos que se activan ante el exceso de sales, entre ellos está la restricción de la absorción de iones en los tallos, para evitar la intoxicación en la parte aérea, así como la regulación osmótica la cual permite ajustar las altas concentraciones de sales al permitir competir a la raíz por agua (Salas *et al.*, 2001). Otras respuestas involucran cambios anatómicos y morfológicos que permiten mejorar el uso eficiente de agua e incrementar la tolerancia, entre ellos, la elongación inmediata y rápida de las raíces, lo cual es un indicador importante de resistencia al estrés (Foolad, 2007).

En la genética molecular se ha identificado la acción de algunos genes en la activación de mecanismos que regulan la expresión génica a la resistencia al estrés hídrico. La manipulación de estos genes, relacionados con el mantenimiento de la estructura y función de los componentes celulares, es una de las vías para obtener plantas tolerantes al estrés (Sanjari & Yazdansepas, 2008).

De esta forma, la respuesta de la planta al estrés salino podría considerarse, en cierta forma, similar a la que ocurre en condiciones de sequía. A nivel morfológico, anatómico y celular las plantas responden al estrés hídrico desarrollando adaptaciones evolutivas, tanto que les permiten vivir en condiciones de constante de estrés hídrico (Witcombe *et al.*, 2008). También poseen mecanismos de aclimatación que se activan en

respuesta a estrés hídrico. Se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente.

### **2.3 VENTAJAS DEL GEN *AtAVP1***

El mejoramiento genético asistido como la incorporación de genes es una de las estrategias para crear especies tolerantes o resistentes a los efectos del estrés hídrico. *AVP1* identificado en la vacuola de *Arabidopsis thaliana* es una bomba de protones que permite acidificar la vacuola mediante la liberación de energía por la hidrólisis de un pirofosfato (PPi) en dos moléculas de fosfato (Pi) (Yang *et al.*, 2007). *AVP1* se ubica principalmente en el tonoplasto de las células, pero también se ha localizado en la membrana plasmática donde la sobreexpresión de dicho gen da como resultado un aumento en la actividad y abundancia de H<sup>+</sup>-ATPasa.

Permite incrementar el tamaño de las células (Gaxiola *et al.*, 2001), mejorar la actividad de transportadores secundarios (Gaxiola *et al.*, 2002) y de reguladores de osmosis aumentando la cantidad de solutos, la retención de agua, de fosforo (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014) y nitrógeno (Hermans *et al.*, 2006). Las plantas transformadas con el gen *AtAVP1* muestran un mayor desarrollo del sistema radical y mayor capacidad de compartimentalización de Na, esto explicaría el incremento de la tolerancia a salinidad (Ferjani *et al.*, 2011; Gaxiola *et al.*, 2012).

Se ha tratado de entender y explicar la forma en la que el gen actúa para generar plantas tolerantes a condiciones de estreses abióticos. La primera de ellas es el secuestro de iones de Na<sup>+</sup> dentro de la vacuola mediante el uso de transportadores vacuolares como H<sup>+</sup>-PPasas vacuolar y antiportadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Al mantenerse los iones lejos del citosol sus efectos tóxicos disminuyen y ayuda a incrementar la retención de agua en los tejidos de las plantas. Para facilitar el secuestro de estos cationes el gen aumenta la acidificación de la vacuola. *AVP1* también regula el transporte de auxinas al aumentar la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana plasmática, además regula la concentración citosólica de PPi de tal manera que mejora la gluconeogénesis y, por tanto, el crecimiento heterotrófico de la planta. Se sabe que altas concentraciones de PPi en el citosol inhiben los procesos metabólicos. De tal

manera, es posible que *AVP1* pueda regular muchas de las rutas dependientes de PPI al hidrolizarlo con ayuda de las H<sup>+</sup>-PPasas, sin bombardeo de protones y sin gasto de energía. Se ha propuesto además el transporte mejorado de sacarosa desde la fuente hasta los tejidos de demanda, esto debido a la función de la PPI-sintasa en la membrana plasmática de las células acompañantes del floema (Schilling *et al.*, 2017).

### 3. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN *AtAVP1* TOLERANTES A SAL EN GERMINACIÓN Y PLÁNTULA

#### RESUMEN

El desarrollo de variedades transgénicas para contrarrestar efectos de sales en suelo y agua de riego en tomate es una alternativa que requiere su estudio y validación ante este tipo de estrés. El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas transformadas de tomate con el gen *AtAVP1*, con tolerancia a sales durante las etapas de germinación y plántula. Se empleó semillas T2 provenientes de 11 eventos T0 de la línea L3 de tomate modificada genéticamente con la constitución pTF101.1-35S::*AtAVP1*::NOS y dos eventos con el gen de la trehalosa (*TPS*). Además, se evaluaron la línea L3 original y un híbrido comercial. La prueba de germinación se realizó durante 15 días en cámara a 25 °C y humedad relativa de 80 %. Se utilizó una solución de agua destilada con 80 mM de NaCl. Se evaluó: porcentaje de germinación, materia seca acumulada e índice de velocidad de germinación. En plántula se empleó solución nutritiva adicionada con 200 mM de NaCl, aplicada entre 15 y 35 días después de la emergencia. Se evaluó porcentaje de emergencia, número de plántulas vivas, área bajo la curva del vigor (escala visual), porcentaje de sobrevivencia, vigor de plántula, materia seca acumulada e índice de velocidad de emergencia. A partir de plantas T2, en ambas etapas fenológicas (germinación y plántula) no se identificaron eventos transformantes con proporción 3 : 1, tolerantes : susceptibles a sales. La tolerancia se asoció al vigor durante la germinación y a la velocidad y porcentaje de emergencia altos; así como mayor acumulación de materia seca en plántula. La presencia de eventos con niveles de tolerancia variables, sugiere que existen diferentes niveles de expresión del gen ante condiciones de salinidad, ya que todos los eventos fueron derivados de una misma línea.

**Palabras claves:** estrés salino, gen *AtAVP1*, germinación, plántula, tolerancia.

# IDENTIFICATION OF TOMATO PLANTS TRANSFORMED WITH THE GEN *AtAVP1* SALT TOLERANTS IN GERMINATION AND PLANT

## ABSTRACT

The development of transgenic varieties to counteract the effects of salts in soil and irrigation water in tomatoes is an alternative that requires its study and validation under this stress. The objective of this investigation was to identify transformed tomato plants with the *AtAVP1* gene, with salt tolerance during the germination and seedling stages. Seeds from T2 generation of eight T0 events of the genetically modified tomato L3 inbred, with the constitution pTF101.1-35S::*AtAVP1*::NOS, and two events with the trehalose gene (TPS) were used. In addition, the original L3 inbred and a commercial hybrid were evaluated. The germination test was performed during 15 days in a chamber at 25 ° C and 80 % RH. A solution of distilled water with 80 mM NaCl was used. Germination percentage accumulated dry matter and germination speed index were evaluated. In seedling, nutritional solution added with 200 mM of NaCl was applied from 15 to 35 days after the emergency. Emergency percentage, alive seedlings, area under the vigor curve (visual scale), survival rate, seedling vigor, accumulated dry matter and emergency speed index were evaluated. From T2 plant, in both phenological stages (germination and seedling), transformative events weren't identified with a 3 : 1 ratio, tolerant : susceptible to salts. Tolerance was associated with vigor during germination and high emergency rate, percentage rate, and higher seedlings dry matter accumulation. Considering events with different level of tolerance imply that there are variable levels of gene expression under salinity conditions, since all events were derived from the same inbred.

**Keywords:** saline stress, *AtAVP1* gene, germination, seedling, tolerance.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los vegetales más consumidos en el mundo, después de la papa y antes de la cebolla. Su producción se ve afectada por diversos factores como sequía, salinidad, heladas, calor, plagas y enfermedades, entre otros. Esto ha sido la causa para la búsqueda de técnicas más eficientes de mejoramiento con el fin de generar variedades con tolerancia a los factores adversos de la producción. Generalmente, los mejoradores recurren en primera instancia a la utilización de recursos genéticos nativos o silvestres; no obstante, esto no ha sido suficiente para lograr los objetivos mencionados; es por ello que se ha recurrido al uso de técnicas biotecnológicas para incrementar la eficiencia del mejoramiento genético; entre las que se encuentra la incorporación de genes foráneos al genoma del cultivo.

La transformación genética mediante organogénesis es una de las técnicas más utilizadas para la incorporación de genes, ya que alrededor de 70 % de las plantas transgénicas han sido obtenidas con este método (Frary & Van-Eck., 2007). En la genética molecular se ha identificado la acción de algunos genes en la activación de mecanismos que regulan la expresión génica a la resistencia al estrés hídrico. La manipulación de estos genes, relacionados con el mantenimiento de la estructura y función de los componentes celulares, es una de las vías para obtener plantas tolerantes al estrés (Sanjari & Yazdarsepas, 2008). Plantas transformadas con el gen *AtAVP1* y su sobreexpresión han tenido como resultado la obtención de plantas tolerantes a la sal y sequía en especies como *Arabidopsis*, algodón, arroz, tabaco, tomate, alfalfa y maíz, (Pasapula *et al.*, 2010).

La tolerancia a sales adquirida puede explicarse por un aumento de la capacidad de absorción de Na<sup>+</sup> en las vacuolas. En tanto que la resistencia a la sequía se atribuye a una mayor capacidad osmorreguladora (Martino *et al.*, 2007).

*AVP1* también permite incrementar el tamaño de las células (Gaxiola *et al.*, 2001), mejorar la actividad de transportadores secundarios (Gaxiola *et al.*, 2002) y de reguladores de osmosis aumentando la cantidad de solutos, la retención de agua, de fósforo (Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014) y nitrógeno (Hermans *et al.*, 2006). Las

plantas transformadas con el gen *AtAVP1* muestran un mayor desarrollo del sistema radical y mayor capacidad de compartimentalización de  $\text{Na}^+$ , esto explicaría el incremento de la tolerancia a salinidad (Ferjani *et al.*, 2011; Gaxiola *et al.*, 2012).

Las plantas en condiciones adversas como la salinidad son afectadas de dos formas generales, el estrés hídrico debido a la disminución del potencial osmótico en la zona de las raíces y la toxicidad por iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  debido a esto se presentan diversos problemas, retraso en la germinación de la semilla y disminución del porcentaje de germinación (Hajer *et al.*, 2006) ya que se afecta los procesos iniciales durante la germinación: imbibición, síntesis de enzimas y translocación de sustancias hacia el embrión retardando su crecimiento y el desarrollo inicial de la plántula (Reyes *et al.*, 2010); además disminuye la altura en las plantas, las hojas se presentan en menor número (Romero *et al.*, 2001), así mismo presentan clorosis y necrosis principalmente en los bordes (Goykovic & Saavedra, 2007), se disminuye la fotosíntesis (Florido y Bao, 2014), los contenidos de clorofila a y b se disminuyen al aumentar la concentraciones de sales (Hajer *et al.*, 2006) y ocurre una disminución de materia seca (Reina-Sánchez *et al.*, 2005) y pérdida de agua.

La germinación de semillas y el desarrollo de plántulas son las dos etapas más críticas para el establecimiento de los cultivos y las más sensibles al estrés abiótico. Por tal razón, la búsqueda e incorporación de genes involucrados en el incremento de la tolerancia a salinidad dentro de estas etapas es uno de los objetivos en el mejoramiento genético (Patade *et al.*, 2011).

El objetivo de la presente investigación fue identificar plantas transformadas de tomate con el gen *AtAVP1*, con tolerancia a sales durante la etapa de germinación y plántula.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODO

La investigación se desarrolló en invernaderos y laboratorios de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México (19°29' LN, 98°53' LO y 2240 msnm), durante 2018 y 2019 en el Proyecto de Mejoramiento Genético de Jitomate.

### 3.2.1 Obtención de transformantes evaluados

Se estudiaron plantas transformadas de la generación T2 para los genes *AtAVP1* y *TPS* de la línea experimental de tomate L3. Su obtención se realizó de la siguiente manera:

A la línea experimental L3 se le aplicó un protocolo de transformación con el gen *AVP1* y otro con el gen *TPS*; ambos por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y organogénesis *in vitro*. En el primer caso, se obtuvieron 12 brotes de los cuales 7 eventos T0 resultaron positivos de acuerdo con la prueba de PCR. Posteriormente se obtuvo por autofecundación la descendencia T1 y a partir de pruebas PCR se identificaron 54 familias positivas, con los cuales por autofecundación se obtuvo la generación T2. Estas últimas fueron objeto del presente trabajo.

### 3.2.2 Prueba de tolerancia a sal en germinación

Se evaluó semilla de la generación T2 proveniente de 11 eventos T0 con el gen *AtAVP1* y semilla T2 provenientes de 2 eventos T0 con el gen *TPS* (gen de la trehalosa) de la línea experimental L3. También se empleó la línea L3 original y el híbrido comercial El Cid de Harris Moran®.

Se usó la concentración de cloruro de sodio de 80 mM. Para su preparación se utilizó agua destilada y NaCl calidad reactivo con 99.3 % de pureza. La unidad experimental consistió en una caja Petri de 9 cm de diámetro, con 25 semillas y papel filtro como sustrato, saturado con 2.5 ml de agua destilada o con la solución salina (80 mM). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. La prueba de germinación se realizó durante 15 días en cámara (LAB-TECH INC Modelo D-7140) en obscuridad constante, temperatura de 25 °C y humedad relativa de 80 %.

Se realizaron conteos diarios, durante 15 días, de las semillas germinadas. Una semilla germinada se consideró cuando ocurrió la protrusión de la radícula. Al final de la prueba se evaluó: porcentaje de germinación (%), peso seco (PS) e índice de velocidad de germinación (IVG), de acuerdo con la fórmula propuesta por Maguire (1962):

$$IVG = \sum_{i=1}^n (x_i/d_i) \quad i = 1, 2, 3, \dots, n$$

Dónde: n = número de conteos realizados durante la prueba;  $X_i$ = número de semillas germinadas entre el conteo i-1 y el conteo i;  $d_i$ = número de días después de la siembra en el conteo i.

### 3.2.3 Prueba de tolerancia a sal en plántula

En esta prueba se evaluaron los mismos genotipos de la etapa de germinación. Los cuales fueron sembrados en charolas de polipropileno de 200 cavidades con sustrato de turba. Durante los primeros 5 días después de la siembra (dds) se regaron con agua. Entre 5 y 25 dds se utilizó la solución nutritiva de Cadahia (2005) con concentración de 100 %. A partir de 26 dds se iniciaron los riegos con solución nutritiva adicionada con sal calidad reactivo (11.68 g de NaCl por litro), con concentración de 200 mM de NaCl. Este tratamiento se mantuvo hasta finalizar la prueba (50 dds).

Se realizaron conteos diarios del número de plántulas emergidas desde el primero hasta 20 dds, una plántula emergida se consideró cuando la plántula fue visible sobre el sustrato.

La unidad experimental consistió en 10 plántulas. Se empleó un diseño experimental de bloques completos al azar con 2 repeticiones. Al final de la prueba se evaluó porcentaje de emergencia (%), número de plántulas vivas (NV), área bajo la curva (ABC) de plantas muertas por sales, porcentaje de sobrevivencia (PS), vigor de plántula (VP) de acuerdo con la escala visual de la Figura 1; materia seca (MS en mg), para ello la parte aérea fue secada en estufa a 70 °C durante 3 días e índice de

velocidad de emergencia (IVE), de acuerdo con la fórmula propuesta por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n (x_i/d_i) \quad i = 1, 2, 3, \dots, n$$

Dónde: n = número de conteos realizados durante la prueba;  $X_i$ = número de semillas emergidas entre el conteo i-1 y el conteo i;  $d_i$ = número de días después de la siembra en el conteo i.



Figura 1. Escala visual de vigor de planta de tomate en la etapa de plántula.

### 3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue similar en ambas pruebas. Se realizó un análisis multivariado de agrupamiento con la matriz de distancias euclidianas cuadradas. El dendrograma se construyó con el algoritmo de mínima varianza de Ward. La altura de corte con base en el criterio cúbico de agrupamiento (Statistical Analysis System [SAS], 1983) y la

pseudo estadística  $t^2$  (Hotelling, 1951). Posteriormente, se corroboraron las agrupaciones mediante un análisis discriminante, en donde se consideró como variable clasificatoria los grupos generados en el análisis anterior y se realizaron análisis de varianza y comparaciones de medias de Tukey. Finalmente dentro de cada evento se registraron las frecuencias de individuos T2 tolerantes y susceptibles a sal. Se usó el paquete estadístico SAS, versión 9.1.

### **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1 Prueba de tolerancia a sal en germinación**

Durante la germinación, el híbrido comercial y la línea original L3 tuvieron el mayor vigor en dicha prueba con sales. Lo anterior se atribuye a la mejor calidad de semilla con respecto a los eventos transformados, ya que los protocolos de tratamientos de semillas comerciales garantiza la excelente calidad y vigor (Chen & Arora., 2013), al mejorar la germinación, emergencia y acumulación de materia seca (Nakaune *et al.*, 2012).

Durante la prueba de tolerancia a sal en la etapa de germinación, se usó la concentración de 80 mM de sal en la solución de riego y se observó que el desarrollo de las plántulas fue normal, aunque el principal efecto negativo ocurrió al retrasarse el proceso de germinación y desarrollo de plántula.

El análisis de agrupamiento con distancias euclidianas y método de Ward aplicado a 8 eventos *AVP1*, 2 eventos *TPS*, la línea L3 original y el híbrido comercial El Cid, indicó la conformación de cuatro grupos identificados mediante el criterio cúbico de agrupamiento (SAS, 1983), la pseudo F (Johnson, 1998) y la pseudo  $t^2$  (Hotelling, 1951) a una altura de corte de 0.02  $r^2$  semiparcial (Figura 2).

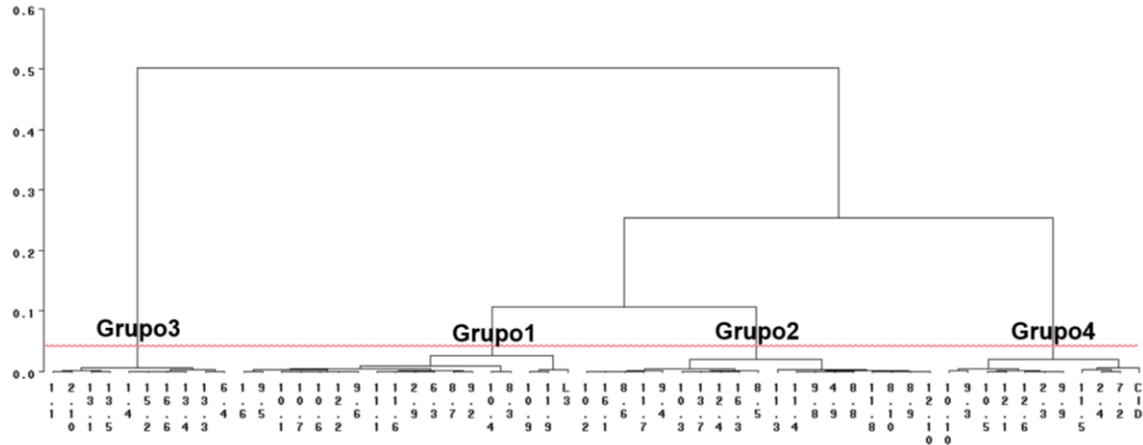


Figura 2. Dendrograma jerárquico (distancias euclidianas y método de Ward) de 8 eventos en la generación T2 de tomate transformados con el gen *AtAVP1*, germinadas bajo estrés salino.

El análisis discriminante, realizado al considerar los grupos sugeridos, determinó que una variable discriminante, VD1, explicó 96 % de la variación total de los datos. La VD1 se asoció en forma positiva con PG, IVG y mayor acumulación de materia seca durante la germinación con 80 mM de NaCl. Por lo tanto, valores altos de VD1, implicaron mayor tolerancia al estrés salino, y viceversa. La prueba de restitución (Johnson, 1998) reubicó solamente dos familias en grupos diferentes.

Los grupos 4 y 1 (Figura 3) fueron considerados como tolerantes al mostrar mejor desempeño en esta prueba. El grupo 4 incluye 5 eventos T0 *AtAVP1*, 1 de trehalosa y el híbrido comercial Cid. Llama la atención la presencia de este híbrido, explicada por la excelente calidad de la semilla comercial, la cual, repercutió en un vigor adecuado. En el grupo 1, también con buena respuesta, aparecen 6 eventos *AtAVP1* y 2 de trehalosa; así como la línea original L3 no transformada. Esta última línea también obtuvo ventajas al mostrar buena calidad de semilla.

Los grupos con mayor susceptibilidad a sales fueron el 2 y 3, con menor acumulación de materia seca, y porcentaje e índice de germinación. Debido a la disminución del potencial y la toxicidad por iones de cloruro y sodio; el retraso en la velocidad y el porcentaje de germinación son dos de los efectos más notables en el desarrollo de las plántulas en condiciones de salinidad (Cuartero *et al.*, 2006; Hajer *et al.*, 2006).

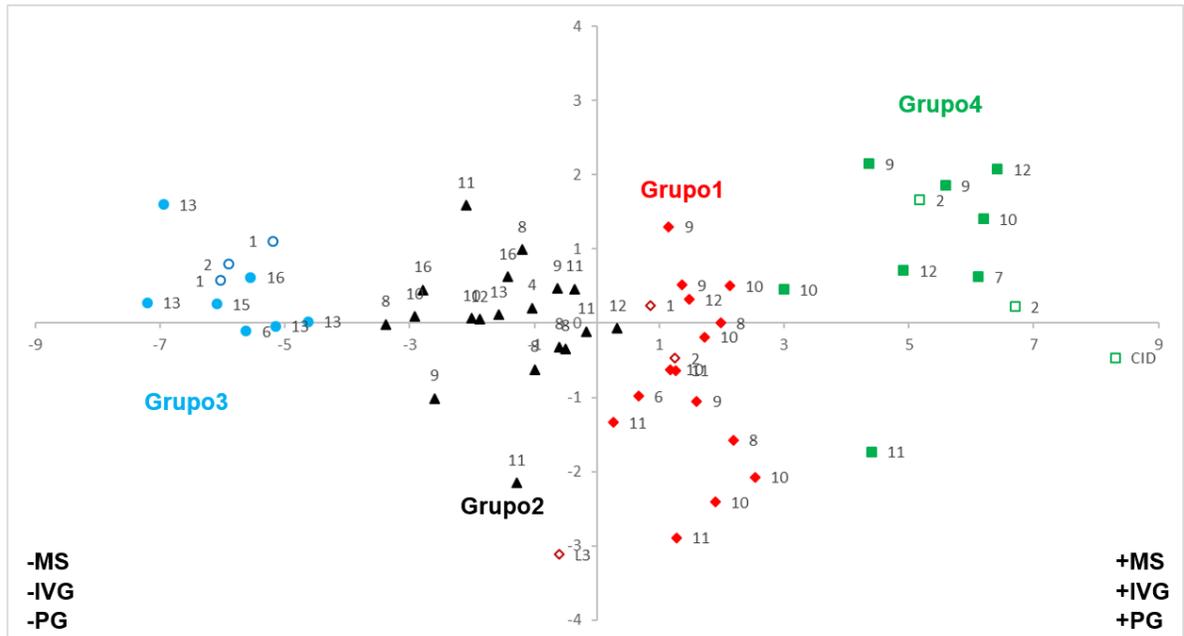


Figura 3. Representación de variables discriminantes de 8 eventos en la generación T2 de tomate transformados con el gen *AtAVP1*, germinadas bajo estrés salino.

La distribución de eventos transgénicos de los cuatro grupos detectados, a través de las variables discriminantes se presenta en el Cuadro 1, considerando que los grupos 1 y 4 fueron tolerantes a sales, y los grupos 2 y 3 fueron susceptibles. De acuerdo a la relación entre los grupos tolerantes y susceptibles se pudo identificar una segregación 1 : 1. Lo anterior no concuerda con los resultados de las relaciones 3 : 1 o 15 : 1 esperadas, esto puede deberse a que los tamaños de muestras fueron muy pequeños y a la selección dirigida de eventos positivos en T1. Sin embargo se puede observar que las plantas de dos eventos (10 y 13) mostraron una segregación 3 : 1 ( $p < 0.05$ ), de manera individual.

Cuadro 1. Relación de plantas tolerantes y susceptibles a sal durante germinación de individuos de generación T2, provenientes de 11 eventos T0 transformados.

T0	Frecuencia	Grupos				Tolerantes	Susceptibles
		1	2	3	4		
4	1	0	1	0	0	0	1
6	2	1	0	1	0	1	1
7	1	0	0	0	1	1	0

8	7	2	5	0	0	2	5
9	7	3	2	0	2	5	2
10	9	5	2	0	2	7	2
11	8	3	4	0	1	4	4
12	5	1	2	0	2	3	2
13	5	0	1	4	0	0	5
15	1	0	0	1	0	0	1
16	3	0	2	1	0	0	3
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>27</b>	<b>22</b>

Las figuras 4 y 5 muestran los promedios de las variables MS, IVG y PG de las plantas susceptibles y tolerantes en cada evento. Se puede observar que los eventos poseen relaciones variables y en cuatro de ellos todas sus plantas fueron susceptibles. También se muestra que la única planta evaluada en el evento 7 resulto tolerante.

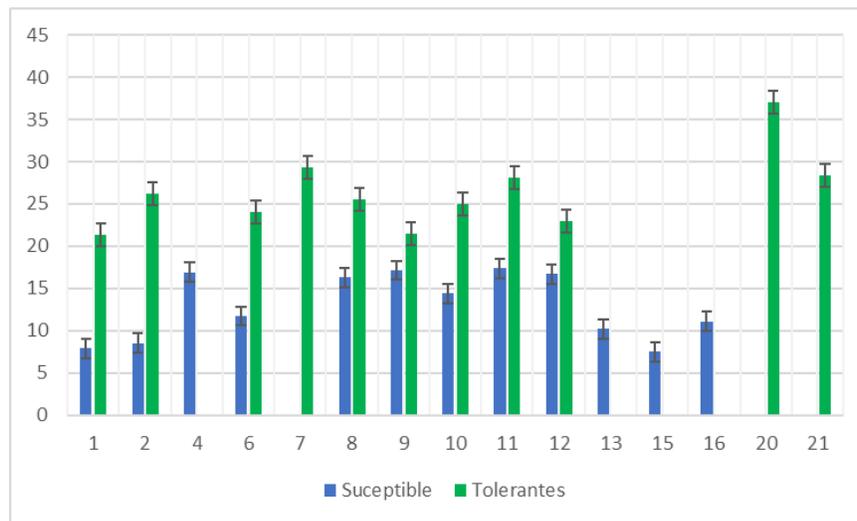


Figura 4. Promedios de materia seca de plantas susceptibles y tolerantes 13 eventos T0. Del 4-16 son eventos *AtAVP1*, 1-2 eventos *TPS* y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.

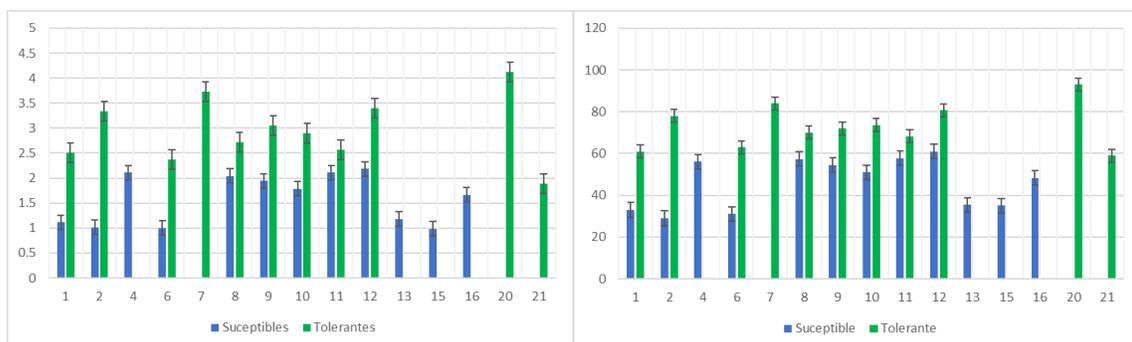


Figura 5. Promedios de IVG y PG de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento T0. Del 4-16 son eventos *AtAVP1*, 1-2 eventos *TPS* y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.

Cattivelli *et al.* (2008) mencionan que la respuesta de la planta bajo tensión salina depende del genotipo, de la duración y la severidad del estrés. En el presente estudio al tratarse de líneas transformadas aún en segregación, la variación ocurrida fue también debida a los diferentes niveles de expresión del gen. Sus diferencias pueden atribuirse a que la H-ATPasa vacuolar, al constar de muchas subunidades, requiere sobre expresarse en un nivel correcto para lograr una mayor actividad del complejo, lo que generaría, la expresión mejorada de las bombas de protones vacuolares al aumentar el secuestro de iones (Gaxiola *et al.*, 2001).



Figura 6. Efecto de solución salina en el porcentaje e índice de velocidad de emergencia en germinación de semillas de tomate.

### 3.3.2 Prueba de tolerancia a sal en plántula

En la prueba de plántula realizada en charolas de germinación y turba como sustrato, tuvo duración de 50 días, de los cuales, en los últimos 25 las plántulas estuvieron bajo estrés salino (200 mM en la solución de riego).

El análisis de agrupamiento (distancias Euclidianas al cuadrado y algoritmo de Ward) sugirió la conformación de cinco grupos [criterio cúbico de agrupamiento (SAS, 1983), pseudo F (Johnson, 1998) y pseudo  $t^2$  (Hotelling, 1951)], a una altura de corte de 0.03  $r^2$  semiparcial (Figura 7).

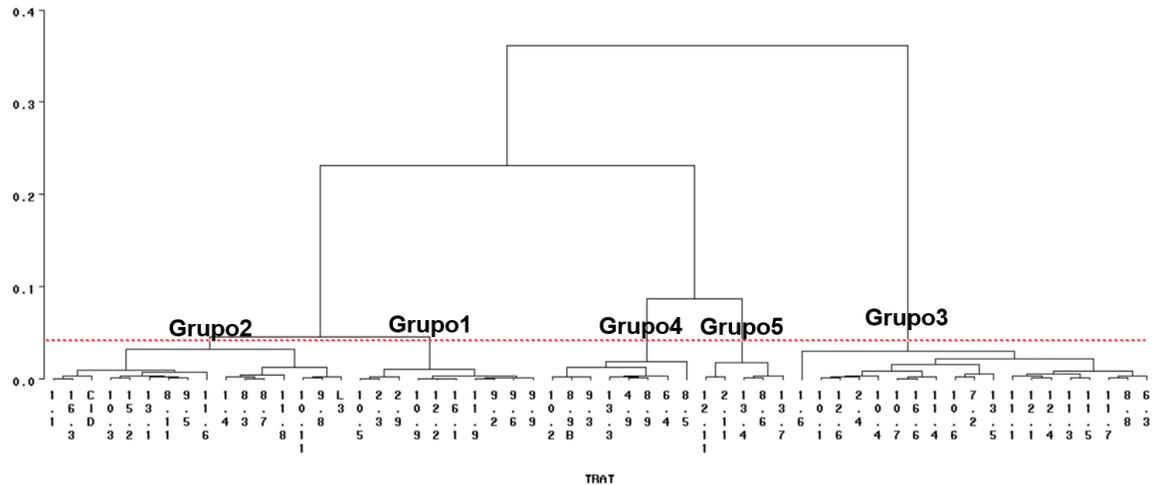


Figura 7. Dendrograma jerárquico de 8 eventos T0 en la generación T2 de tomate transformado con el gen *AtAVP1*, bajo estrés salino durante la etapa de plántula.

Posteriormente, dos variables discriminantes, VD1 y VD2, explicaron 96 % de la variación total de los datos, con 77 % y 19 %, respectivamente. La VD1 se asoció en forma positiva con mayor ABC, PE e IVE ante el estrés salino; en tanto que altos valores de VD2 indicaron mayor MS, PS y VP. Así, altos valores de VD1 y VD2, implicaron mayor tolerancia al estrés salino, lo que se representa en la Figura 8. La prueba de restitución (Johnson, 1998) reubicó solamente tres genotipo en un grupos diferentes.

En el grupo 3, se identificaron 8 eventos *AtAVP1* y 2 de trehalosa, y el grupo 1, con 5 y 1 eventos, respectivamente, los cuales tuvieron el mejor desempeño en esta prueba. Li *et al.* (2005) mencionan que la sobreexpresión del gen *AVP1* mejora la absorción de nutrimentos al afectar la abundancia y actividad de la H-ATPasa en la membrana plasmática. Cabe mencionar que el híbrido comercial no tuvo presencia en estos dos grupos destacados.

La mayor susceptibilidad a sales la tuvieron los grupos 2, 4, 5 al mostrar menor desarrollo de materia seca, vigor de plántula, porcentaje de sobrevivencia, área bajo la curva, porcentaje e índice de velocidad de emergencia. Reyes *et al.* (2010) mencionan que bajo condiciones de estrés salino las plántulas disminuyen su desarrollo inicial; además de una disminución en la altura de las plantas (Romero *et*

al., 2001) debido a que las sales alteran la absorción de agua y nutrientes. Lo que resulta en una pérdida de peso fresco y seco.

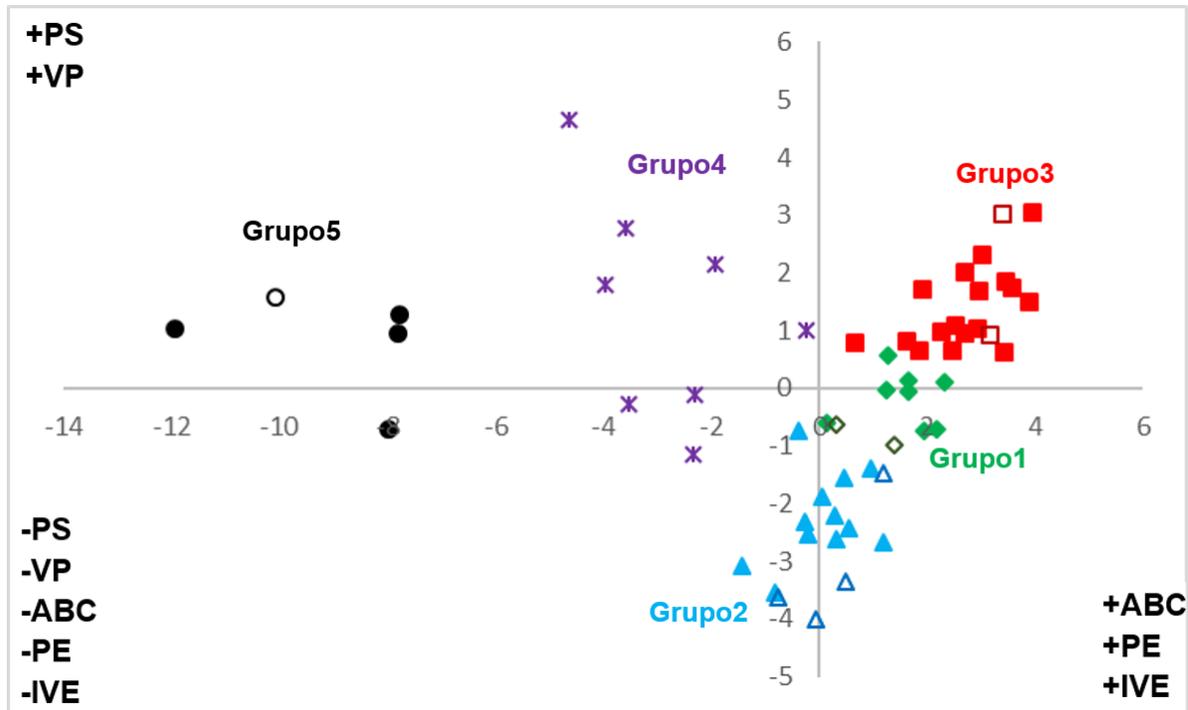


Figura 8. Representación de variables discriminantes de 8 eventos T0 en la generación T2 de tomate transformado con el gen *AtAVP1*, bajo estrés salino en la etapa de plántula.

Al tratarse de eventos en donde el gen aún no está fijo, bajo segregación, se tuvo diferencias en la tolerancia dentro de cada evento; por lo que la tolerancia a la salinidad en cada evento dependerá de las condiciones ambientales y de la capacidad de sobreexpresión del transgén para controlar la absorción de iones de  $\text{Na}^+$  en la vacuola, esto permitirá una mayor retención de agua y menos toxicidad en el citosol (Schilling *et al.*, 2017). Al igual que la germinación, la etapa de plántula es una de las más críticas e importantes en el desarrollo de la planta, de tal manera que al tener una mejor respuesta en la tolerancia a sales se tendrán mejores plantas adultas (Lastiri-Hernández *et al.*, 2017).

La distribución de eventos transgénicos dentro de los cinco grupos detectados se presenta en el Cuadro 2, considerando que los grupos 1 y 3 representan tolerancia a sales, en tanto que los grupos 2, 4 y 5 fueron susceptibles. De acuerdo a la relación entre los grupos tolerantes y susceptibles se pudo identificar una segregación 1 : 1. Lo

anterior no concuerda con los resultados de las relaciones 3 : 1 o 15 : 1 esperadas, esto puede deberse a que los tamaños de muestras son muy pequeños y la selección dirigida. Uno de los eventos de manera individual mostró una segregación 3 : 1 (evento 12).

Cuadro 2. Relación de plantas T2 de cada evento identificadas en cada grupo y determinación de las proporciones de acuerdo a los grupos tolerantes : susceptibles en plántula.

T0	Frecuencia	Grupo					Tolerantes	Susceptibles
		1	2	3	4	5		
4	1				1		0	1
6	2			1	1		1	1
7	1			1			1	0
8	7		3	1	2	1	1	6
9	6	3	2		1		3	3
10	9	2	2	4	1		6	3
11	8	1	2	5			6	2
12	5	1		3		1	4	1
13	5		1	1	1	2	1	4
15	1		1				0	1
16	3	1	1	1			2	1
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>23</b>

La figura 9 muestra los promedios de las variables evaluadas en esta etapa (ABC, MS, PE, IVE, VP, PS), respectivamente de las plantas susceptibles y tolerantes en cada evento. Dentro de cada evento se puede observar que la mayoría de ellos cumple relaciones variables. En esta prueba se pudieron identificar 2 eventos (4 y 15) que todas sus plantas evaluadas fueron susceptibles, al igual que los testigos la línea L3 sin transformar (20) y el Cid (21).



Figura 9. Promedios de ABC, MS, PE, IVE, VP, PS de plantas susceptibles y tolerantes de cada evento. Del 4-16 son eventos *AtAVP1*, 1-2 eventos *TPS* y 20-21 corresponden a la L3 sin transformar y el Cid, respectivamente.

### 3.4 CONCLUSIONES

En ambas etapas de desarrollo, germinación y plántula, se identificaron familias T2 con mayor tolerancia a sal. Esto indica la capacidad del gen para expresarse durante diferentes etapas fenológicas; además de los diferentes niveles de tolerancia, lo que puede atribuirse a diferencias en los niveles de expresión del transgén.

No se pudo corroborar las proporciones de tolerantes : susceptibles, esperadas. Esto puede deberse al tamaño de la muestra y al tipo de selección que se hizo en la semilla.

Esto permitirá un mejor desarrollo de plántulas, debido a que dichas etapas son las más susceptibles ante efecto de sales. Al ser tan importantes estas etapas, los cambios favorables y las adaptaciones que se puedan tener durante esta etapa se verán reflejados en el posterior crecimiento y desarrollo de las plantas.

### 3.5 LITERATURA CITADA

- Cadahia, L. C. (2005). *Fertirrigación. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales*. 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. 681p.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. and Stanca, A. M. (2008). Drought tolerant improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res.*, 105, 1-14.
- Chen, K. and Arora, R. (2013). Priming memory invokes seeds stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 33-45.
- Cuartero, J., Bolarin, M. C., Asins, M. J., and Moreno, V. (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1045-1058. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erj102>
- Frary, A. & Van-Eck, J. (2007). Organogenesis from Transformed Tomato Explant. *Methods in Molecular Biology*, 286, 141-150.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., and Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H-pump. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 11444–11449.
- Hajer, A. S., Malibari, A. A., Al-Zahrani, H. S. and Almaghrabi, O. A. (2006). Responses of three tomato cultivars to sea water salinity. Effect to salinity on the seedling growth. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10), 855-861.
- Hotelling, H. (1951). A generalized t test and measure of multivariate dispersion. *Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and*

Probability. Berkeley, California: University of California Press,  
[https://projecteuclid.org/download/pdf\\_1/euclid.bsmsp/1200500217](https://projecteuclid.org/download/pdf_1/euclid.bsmsp/1200500217)

Johnson, E. D. (1998). Applied Multivariate, Methods for data Analysts. USA: Cole Publishing Company.

Lastiri-Hernández, M. A., Álvarez-Bernal, D., Soria-Martínez, L. H., Ochoa-Estrada, S. y Cruz-Cárdenas, G. (2017). Efecto de la salinidad en la germinación y emergencia de siete especies forrajeras. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1245-1257.

Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., Undurraga, S., Mariya, K., Richards, E. L., Krizek, B., Murphy, A. S., Gilroy, S. and Gaxiola, R. (2005) Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase *AVP1* regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310, 121–125.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination, aid in selection and evaluation of seedling emergence vigor. *Crop Science*, 2,176-177.

Martinoa, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism, *J. Exp. Bot.* 58, 83–102.

Nakaune, M., Hanada, A., Yin, Y., Matsukura, C., Yamaguchi, S. and Ezura, H. (2012). Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 28-37.

Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qui, X., Zhu, L., Zhang, X. Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R. and Payton, P. (2010). Expression of an Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fiber yield in field conditions. *Plant Biotechnol. J.* 1–12.

Patade, V. Y., Maya, K. and Zakwan, A. (2011). Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in capsicum. *Res. J. Seed Sci.* 4, 125–136.

Schilling, R. K., Tester, M., Marschner, P., Plett, D. C. and Roy, S. J. (2017). AVP1: One Protein, Many Roles. *Trends in Plant Science*, 22(2), 154-162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.012>

Statistical Analysis System (SAS Institute). (1983). SAS technical report A108. Cubic clustering criterion. Cary, N.C. USA, [https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/v82/techreport\\_a108.pdf](https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/v82/techreport_a108.pdf)

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN *AtAVP1* CON TOLERANCIA A SALES EN PLANTA ADULTA

##### RESUMEN

La salinidad en suelo o agua es uno de los principales estreses abióticos. La mayoría de los cultivos son susceptibles a la salinidad incluyendo el tomate. Por lo tanto, el estrés por salinidad suele ser una de las limitantes en la producción. El objetivo de la presente investigación fue obtener eventos de transformación exitosos de plantas de tomate con el gen *AtAVP1*, con tolerancia a sales durante la etapa de planta adulta. Se estudiaron 18 genotipos de la línea L3 transformada con el gen *AtAVP1*, 2 genotipos con el gen de la trehalosa (*TPS*) y la línea L3 original. Las plantas se establecieron en bolsas de polipropileno con espuma volcánica, se utilizó una concentración de 200 mM de NaCl en la solución de riego. El análisis de agrupamiento indicó la conformación de cinco grupos. El análisis discriminante determinó que tres variables discriminantes, VD1, VD2 y VD3, explicaron 96 % de la variación total de los datos, con 46, 34 y 16 %, respectivamente. Los grupos 1 y 5 fueron los que tuvieron mejor desempeño en esta prueba con 23 y 9 eventos *AtAVP1* provenientes de 5 eventos T0 respectivamente. Los grupos con mayor susceptibilidad a sales fueron el 2, 3 y 4 caracterizados por el bajo vigor, frutos de medio y pequeño tamaño; media, baja y alta deficiencia de calcio. A partir de plantas T2 no se identificaron eventos transformantes con proporción 3 : 1, tolerantes : susceptibles a sales. La tolerancia se asoció al vigor general dada por AP, NR, NFD, MSH y MST. La presencia de eventos con niveles de tolerancia variables, sugiere que existen diferentes niveles de expresión del gen ante condiciones de salinidad, ya que todos los eventos fueron derivados de una misma línea.

**Palabras claves:** salinidad, tolerancia, gen *AVP1*, tomate, resistencia, planta adulta.

# IDENTIFICATION OF TOMATO PLANTS TRANSFORMED WITH THE GEN *AtAVP1* WITH TOLERANCE TO SALTS IN ADULT PLANT

## SUMMARY

Salinity in soil or water is one of the main abiotic stresses for crops; however, most of them are susceptible to salinity, including tomato. Therefore, salinity stress is usually one of the limitations in production. The objective of this research was to obtain successful transformation events of tomato plants with the *AtAVP1* gene, with salt tolerance during the adult plant stage. 18 genotypes of the L3 line transformed with the *AtAVP1* gene, 2 genotypes with the trehalose gene (*TPS*) and the original L3 line were studied. The plants were established in polypropylene bags with volcanic foam, a concentration of 200 mM NaCl was used in the irrigation solution. Clustering analysis indicated the formation of five groups. The discriminant analysis determined that three discriminant variables, VD1, VD2 and VD3, explained 96% of the total variation of the data, with 46, 34 and 16%, respectively. Groups 1 and 5 were the ones that performed better in this test with 23 and 9 *AtAVP1* events from five T0 events respectively. The groups with the highest susceptibility to salts were two, three and four characterized by low vigor, medium and small size fruits; medium, low and high calcium deficiency. From transformants T2, transformative events with a 3: 1 ratio were not identified, tolerant: susceptible to salts. Tolerance was associated with the general vigor given by AP, NR, NFD, MSH and MST. The presence of events with different tolerance levels suggests that there are different levels of gene expression under salinity conditions, since all events were derived from the same line.

**Keywords:** salinity, tolerance, *AVP1* gene, tomato, resistance, adult plant.

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Entre 60 y 80 millones de hectáreas en el mundo son afectadas por la salinidad; de las cuales, 34 millones de tierra agrícola irrigada adolecen de este problemas (FAO, 2011). Esto representa una de las limitantes más importantes de la producción, ya que la mayoría de cultivos, incluyendo al tomate, son susceptibles a esta condición.

La exposición a condiciones de estrés por sales en plantas adultas genera diversos efectos en el desarrollo, entre ellos la disminución en la altura de las plantas, las hojas se presentan en menor número (Romero *et al.*, 2001), así mismo presentan clorosis y necrosis principalmente en los bordes (Goykovic & Saavedra, 2007), se disminuye la fotosíntesis (Florido y Bao, 2014), los contenidos de clorofila a y b se disminuyen al aumentar la concentraciones de sales (Hajer *et al.*, 2006) y ocurre la disminución potencial del rendimiento de frutos (Grainferberg *et al.*, 2000). También se presenta una disminución de materia seca (Reina-Sánchez *et al.*, 2005) y pérdida de agua, simultáneamente ocurre una disminución del potencial de turgencia (Blum, 2009), bajos potenciales osmóticos y acumulación de solutos debido a los iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (Talebi *et al.*, 2009) lo que provoca una disminución del peso fresco y seco. A nivel de la raíz, las sales alteran la absorción de agua que afectan el crecimiento de los órganos aéreos (Goykovic & Saavedra, 2007).

En tomate, la presencia de sales disminuye la densidad de estomas en la cara adaxial de las hojas, mientras que en la cara abaxial se incrementa ligeramente (Salas *et al.*, 2001); así mismo, disminuye la acumulación de biomasa, conductancia estomática, transpiración, potenciales hídrico foliar, osmótico y la conductividad hidráulica de las raíces con concentraciones de 50, 100 y 200 mM de  $\text{Na}^+$  en la solución nutritiva (Morales *et al.*, 2010).

Existen mecanismos que se activan ante el exceso de sales, entre ellos está la restricción de la absorción de iones en los tallos, para evitar la intoxicación en la parte área, así como la regulación osmótica la cual permite ajustar las altas concentraciones de sales al permitir competir a la raíz por agua (Salas *et al.*, 2001). Otras respuestas involucran cambios anatómicos y morfológicos que permiten mejorar el uso eficiente

de agua e incrementar la tolerancia, entre ellos, la elongación inmediata y rápida de las raíces, lo cual es un indicador importante de resistencia al estrés (Foolad, 2007). A nivel morfológico, anatómico y celular las plantas responden al estrés hídrico desarrollando adaptaciones evolutivas, tanto que les permiten vivir en condiciones de constante de estrés hídrico (Witcombe *et al.*, 2008).

Para enfrentar este problema en la agricultura, se requiere de diversas estrategias, entre ellas, el uso de variedades mejoradas ya sea mediante mejoramiento clásico o asistido, que expresen tolerancia a esta condición adversa. Así, la obtención de plantas de tomates resistentes y/o tolerantes a salinidad es uno de los objetivos que persigue el mejoramiento genético. Eventualmente se ha recurrido a recursos silvestres para la búsqueda de tolerancias; sin embargo, al tratarse de un carácter poligénico, su manejo en el mejoramiento es complejo. Actualmente el uso de variedades modificadas genéticamente ha sido una de las alternativas que permite acortar estos procesos.

Se ha identificado la acción de algunos genes en la activación de mecanismos que regulan la expresión génica a la resistencia al estrés hídrico. La manipulación de estos genes, relacionados con el mantenimiento de la estructura y función de los componentes celulares, es una de las vías para obtener plantas tolerantes al estrés (Sanjari & Yazdarsepas, 2008), tal como el gen *AtAVP1*, el cual al ser sobreexpresado y requerir de la expresión de una sola subunidad del complejo es capaz de conferir a la planta cierta tolerancia o resistencia a condiciones de estrés salino (Gaxiola *et al.*, 2001).

El objetivo de la presente investigación fue identificar eventos de transformación exitosos de plantas de tomate con el gen *AtAVP1* con tolerancia a sales durante la etapa de planta adulta.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODO

Se estudiaron plantas transformadas de la generación T2 para los genes *AtAVP1* y *TPS* de la línea experimental de tomate L3. Su obtención se realizó de la siguiente manera:

A la línea experimental L3 se le aplicó un protocolo de transformación con el gen *AVP1* y otro con el gen *TPS*; ambos por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y organogénesis *in vitro*. En el primer caso, se obtuvieron 12 brotes de los cuales 7 eventos T0 resultaron positivos de acuerdo con la prueba de PCR. Posteriormente se obtuvo por autofecundación la descendencia T1 y a partir de pruebas PCR se identificaron 54 familias positivas, con los cuales por autofecundación se obtuvo la generación T2. Estas últimas fueron objeto del presente trabajo.

Con base en lo anterior, se estudiaron 114 plantas T2 transformados con el gen *AtAVP1*, provenientes de 8 eventos T0, y 12 plantas T2 transformados con el gen *TPS1*, provenientes de 2 eventos T0, seleccionados previamente por su tolerancia a sales durante las etapas de germinación y plántula. También se evaluaron 5 plantas de la línea L3 original. Estos genotipos se establecieron en charolas de polipropileno con sustrato de turba. Durante el almácigo se regó con solución nutritiva de Cadahia (2005) al 100 %. Veinte días después se trasplantaron en bolsas de polietileno de capacidad de 15 L con espuma volcánica como sustrato en condiciones de invernadero y sistema hidropónico abierto. El manejo del cultivo fue el convencional, conducido a un sólo tallo y densidad de plantación de 2 plantas·m<sup>-2</sup>. Se utilizó una concentración de 200 mM de NaCl en la solución nutritiva, aplicada a partir de los 25 días después de la siembra (ddt).

La unidad experimental consistió de una maceta con una planta. Se registró: altura de planta (AP en cm), número de racimos (NR), número de frutos desarrollados (NFD), número de frutos con deficiencias de calcio (NFC), peso de frutos (PF en g), número de frutos maduros (NFM), materia seca hoja (MSH, en g·planta<sup>-1</sup>), materia seca tallo desde su base hasta el primer racimo (MST1, en g·planta<sup>-1</sup>), materia seca tallo desde

el primer racimo hasta el ápice (MST2, en g-planta<sup>-1</sup>), materia seca de frutos (MSF, en g-planta<sup>-1</sup>).

Se realizó un análisis multivariado de agrupamiento a partir de la matriz de distancias euclidianas cuadradas. El dendrograma se construyó con el algoritmo de mínima varianza de Ward. La altura de corte se determinó con base en el criterio cúbico de agrupamiento (Statistical Analysis System [SAS], 1983) y la pseudo estadística  $t^2$  (Hotelling, 1951).

Para corroborar las agrupaciones generadas, a los promedios de los índices de tolerancia por colecta se les aplicó un análisis discriminante, en donde se consideró como variable clasificatoria los grupos generados en el análisis anterior. Se usó el paquete estadístico SAS, versión 9.1.

#### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Fueron evaluados plantas T2 de 8 eventos T0 que tuvieron comportamiento adecuado ante la presencia de sales en germinación y plántula. Debido a que se trató de plantas aún segregantes, los análisis se realizaron al considerar plantas individuales, con lo que el tamaño de muestra correspondió a 131 plantas. En esta prueba se usó 200 mM de NaCl en la solución de riego. Los efectos negativos observados en todas las plantas fue la disminución del crecimiento, así como una alta frecuencia de frutos con deficiencias de calcio y amarillamiento de hojas. Estos síntomas son característicos de la toxicidad por sal en tomate (Cuartero & Fernández, 1999).

El dendrograma del análisis de agrupamiento (distancias euclidianas y método de Ward) de las 116 plantas estudiadas indicó la conformación de cinco grupos identificados mediante el criterio cúbico de agrupamiento (SAS, 1983), la pseudo F (Johnson, 1998) y la pseudo  $t^2$  (Hotelling, 1951) a una altura de corte de 0.03  $r^2$  semiparcial (Figura 11).

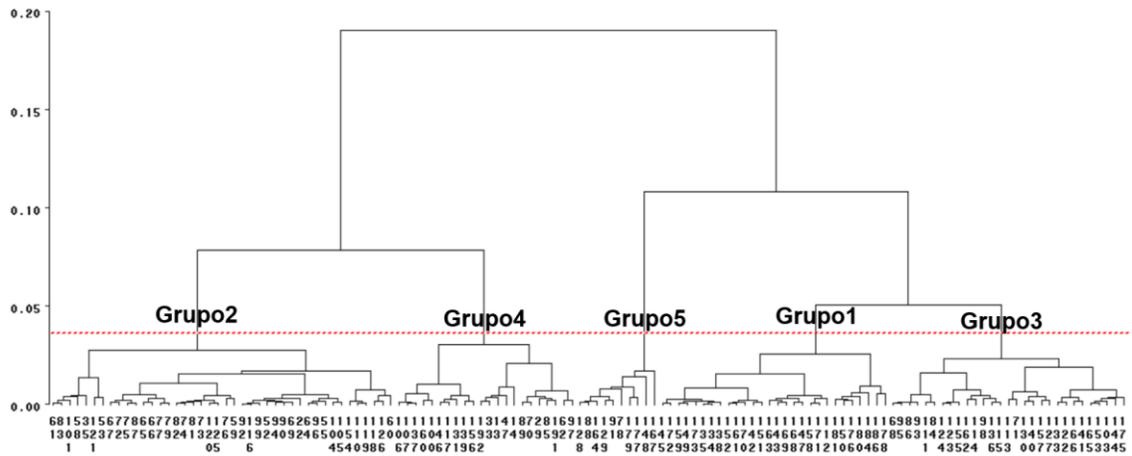


Figura 10. Dendrograma jerárquico de 116 plantas T2 provenientes de 8 eventos T0 de tomate transformado con el gen *AtAVP1*, evaluadas bajo estrés salino en planta adulta.

Para corroborar la penitencia de estos grupos se realizó un análisis discriminante con los cinco grupos generados. Dicho análisis determinó que tres variables discriminantes, VD1, VD2 y VD3, explicaron 96 % de la variación total de los datos, con 46, 34 y 16 %, respectivamente. La VD1 se asoció en forma positiva con mayor AP, NR, NFD, MSH y MST lo que define a la VD1 como un índice general de vigor; la VD2 se asoció con un mayor desarrollo de frutos (PF, MSF y NFM); en tanto que altos valores de VD3 indicaron mayor frecuencia de frutos con deficiencia de calcio (Cuadro 3). La prueba de restitución (Johnson, 1998) reubicó a 9 plantas en grupos diferentes. La Figura 12 presenta la distribución espacial de los genotipos en función de las primeras tres variables discriminantes.

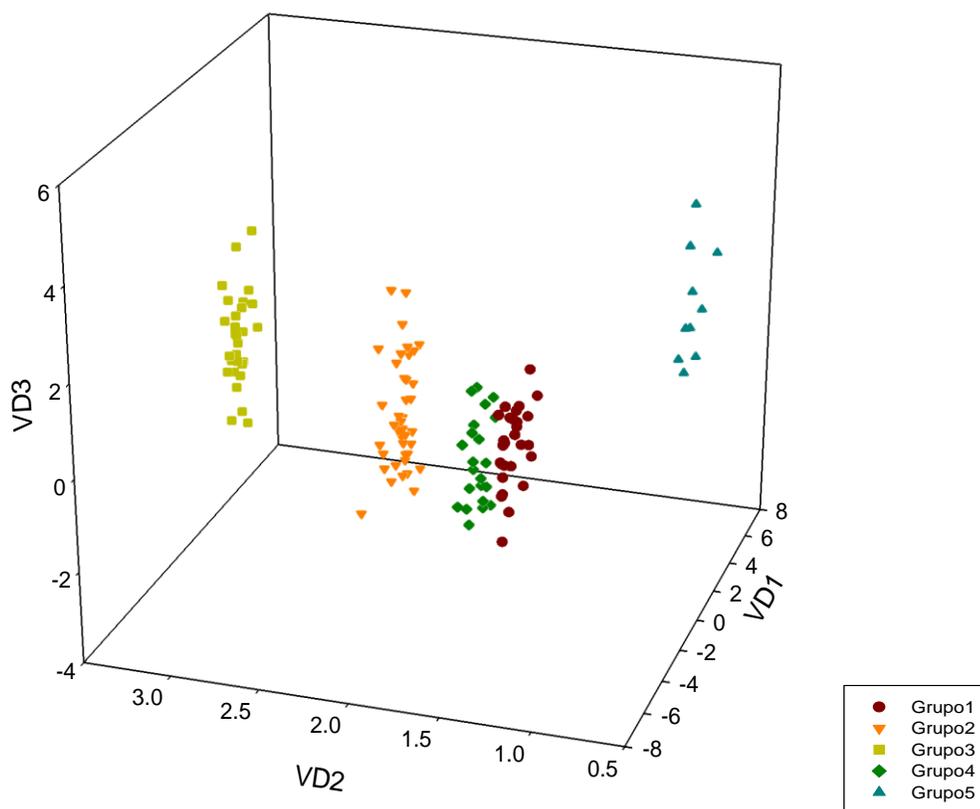


Figura 11. Representación de variables discriminantes de 116 plantas T2 de tomate bajo estrés salino en etapa de planta adulta.

Con base en lo anterior los grupos 1 y 5 tuvieron mejor desempeño en esta prueba (Cuadro 3). El grupo 1 incluye 23 plantas T2 *AtAVP1* provenientes de 5 eventos T0, tres plantas T2 de trehalosa provenientes de un evento T0 y dos plantas de la línea L3 sin transformar. En el grupo 5, también con buena respuesta aparecen 9 plantas T2 *AtAVP1* provenientes de igual manera de 5 eventos T0 y una planta T2 de trehalosa (Figura 12). En ambos grupos coinciden en mayor frecuencia plantas provenientes de tres eventos T0.

Los grupos con mayor susceptibilidad a sales fueron el 2, 3 y 4 caracterizados por el bajo vigor, frutos de tamaño pequeño y medio; y con deficiencias media, alta y baja, respectivamente, de calcio en el fruto (Cuadro 3). Los efectos por sales incluyen desde la disminución de la altura, el número de hoja y la materia seca; así como el amarillamiento de las hojas debido a la disminución de actividad fotosintética y los contenidos de clorofila (Florido & Bao, 2014; Hajar *et al.*, 2006; Reina-Sánchez *et al.*,

2005; Romero *et al.*, 2001). Además, ocurre una disminución en el rendimiento de los frutos (Grainferberg *et al.*, 2000) y deficiencias nutrimentales debido a las distorsiones del contenido de iones, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{NO}_3^-$  como resultado de los cambios en la acumulación neta de los nutrimentos y el contenido de agua en la planta (Cuartero & Fernández-Muñoz, 1999).

En el Cuadro 3 la VD3 estuvo asociada con la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los frutos. A excepción del grupo 4, se puede observar que la relación entre el tamaño de fruto y la deficiencia de calcio es contraria a lo que la literatura menciona. La disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  causa una reducción en el tamaño del fruto y una baja incidencia de frutos con pudrición apical (Saure, 2001). Esto puede deberse a que los sumideros competitivos como las hojas, las flores, los frutos y los meristemos ejercen su influencia sobre el movimiento del calcio de manera independiente. Además, una de las causas de la pudrición de los extremos apicales en los frutos de tomate es debido a una disminución en la absorción de calcio por las raíces y un aumento en la resistencia al transporte dentro de la fruta (Carvajal *et al.*, 2000). Ferjani *et al.* (2011) mencionan que las plantas transformadas con el gen *AVP1* muestran un mejor desarrollo del sistema radical, por tal razón, se podría decir que la disminución de frutos con deficiencias de calcio se debe a que estas plantas tienen un mejor desarrollo radical. Gaxiola *et al.* (2001) menciona que las plantas transgénicas con expresión de *AtAVP1* acumulan mayor cantidad de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en su tejido foliar, que les debe conferir mayor resistencia a altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  que las plantas no transformadas.

Cuadro 3. Características de grupos de acuerdo con los caracteres asociados a variables generadas por el análisis discriminante.

<b>Grupo</b>	<b>VD1</b>	<b>VD2</b>	<b>VD3</b>
1	Alto vigor	Fruto grande	Baja deficiencia de $\text{Ca}^{2+}$
2	Bajo vigor	Fruto medio	Media deficiencia de $\text{Ca}^{2+}$
3	Vigor medio	Fruto medio	Alta deficiencia de $\text{Ca}^{2+}$
4	Vigor medio	Fruto pequeño	Baja deficiencia de $\text{Ca}^{2+}$

---

5      Vigor alto      Fruto medio      Alta deficiencia de Ca

---

La distribución de eventos transgénicos dentro de los cinco grupos detectados se presenta en el Cuadro 4, considerando que los grupos 1 y 5 representan tolerancia a sales, en tanto que los grupos 2, 3 y 4 fueron susceptibles. De acuerdo a la relación entre los grupos tolerantes y susceptibles no se pudo identificar una segregación 3 : 1 o 15 : 1 como se esperaba, esto puede deberse a que los tamaños de muestras son muy pequeños y la selección dirigida.

Cuadro 4. Relación de plantas T2 de cada evento identificadas en cada grupo y determinación de las proporciones de acuerdo a los grupos tolerantes : susceptibles en planta adulta.

T0	Frecuencia	Grupo					Tolerante	Susceptible
		1	2	3	4	5		
6	5		5				0	5
7	7	2	2		2	1	3	4
9	17	2	7	5	1	2	4	13
10	26	7	6	5	5	3	10	16
11	33	11	10	7	5		11	22
12	13		4	5	2	2	2	11
13	6	1	1	3		1	2	4
16	7		2	2	3		0	7
<b>Total</b>	<b>114</b>	<b>23</b>	<b>37</b>	<b>27</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>32</b>	<b>82</b>

La Figura 13 muestra los promedios de las variables (AP, NFC, PF, MSH, MST, MSF) evaluadas en esta etapa de las plantas susceptibles y tolerantes en cada evento. Dentro de cada evento se puede observar que la mayoría de ellos cumple relaciones variables. En esta prueba se pudieron identificar eventos susceptibles en cada una de las variables muestreadas, la mayoría de dichos eventos no coinciden en todos los órganos evaluados, esto puede deberse a que el nivel de expresión puede ser diferente en cada órgano de las plantas transgénicas.

En la construcción del transgén se utilizó el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), dicho promotor es ampliamente utilizado para la expresión transgénica en plantas (Bhullar *et al.*, 2007) debido a que posee expresión constitutiva y ectópica. Es decir, dicho gen es capaz de expresarse en la mayoría de

las plantas en todos los órganos independientemente del estado de desarrollo. Benfey *et al.* (1990) mencionan que para tener la expresión de un gen promotor se requiere de elementos cis y factores de transcripción involucrados en el control transcripcional del gen, sin embargo, estos factores transcripcionales que interactúan con el promotor van a variar de acuerdo con la edad y etapa de desarrollo de la planta, el fondo genético y el órgano involucrado. Por tal razón, el nivel de expresión en las diferentes etapas de desarrollo y órganos puede ser diferente.



Figura 12. Promedios de AP, NFC, PF, MSH, MST, MSF de plantas suceptibles y tolerantes de cada evento. Del 4-16 son eventos *AtAVP1* y 1-2 eventos *TPS* evaluadas en planta adulta.

#### 4.4 CONCLUSIONES

Se identificaron plantas T2 capaces de contrarrestar y permanecer en condiciones de sales con mejor respuesta que otras. Esto debido a los diferentes niveles de expresión del transgén, dado por la edad y etapa de desarrollo de la planta, el fondo genético y el órgano involucrado.

No se pudo identificar las proporciones esperadas (3 : 1), debido al tamaño de la muestra y la selección dirigida.

Lo anterior sugiere analizar mediante pruebas de PCR la segregación del transgén con la finalidad de verificar las proporciones esperadas.

#### 4.5 LITERATURA CITADA

- Benfey, P. N., Ren, L. and Chua, N. H. (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J*, 9, 1677–1684.
- Carvajal, M., Cerdá, A. and Martínez, V. (2000). Modification of the response of saline stressed tomato plants by the correction of cation disorders. *Kluwer Academic Publishers*, 30, 37–47.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R. (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, 83-125.
- FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)—managing systems at risk. In: Food and Agriculture. Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M. and Tsukaya, H. (2011) Keep an eye on PPI: the vacuolar-type H<sup>+</sup>- pyrophosphatase regulates postgerminative development in arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 2895–2908. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085415>
- Florida, M., y Bao, L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultrop*, 35 (3), 70-80.

- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., and Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H-pump. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 11444–11449.
- Grainferberg, A., Giustiniani, L., Barsanti, L. and Botrini, L. (2000). Effect of salt-stress on tomato fruit quality. *Colture-Protette*, 29(6), 71-80.
- Hajer, A. S., Malibari, A. A., Al-Zahrani, H. S. and Almaghrabi, O. A. (2006). Responses of three tomato cultivars to sea water salinity. Effect to salinity on the seedling growth. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10), 855-861.
- Hotelling, H. (1951). A generalized t test and measure of multivariate dispersion. Proceedings of the Second Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley, California: University of California Press, [https://projecteuclid.org/download/pdf\\_1/euclid.bsm/1200500217](https://projecteuclid.org/download/pdf_1/euclid.bsm/1200500217)
- Johnson, E. D. (1998). Applied Multivariate, Methods for data Analysts. USA: Cole Publishing Company.
- Reina-Sánchez, A., Romero-Aranda, M. and Cuartero, J. (2005). Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agricultural Water Management*, 78, 54-66.
- Romero, R., Soria, T. and Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160, 265-272.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (1983). SAS technical report A108. Cubic clustering criterion. Cary, N.C. USA, [https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/v82/techreport\\_a108.pdf](https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/v82/techreport_a108.pdf)

## 5. LITERATURA CITADA GENERAL

- Blum, A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Res.*, 112, 119-123.
- Cuartero, J. and Fernández-Muñoz, R. (1999). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, 83-125.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. and Stanca, A. M. (2008). Drought tolerant improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crop Res.*, 105, 1-14.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. and Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective BMC. *Plant Biology*, 11, 163-176.
- FAO. (2015). Technical issues of salt-affected soils.
- FAO. (2018). El Manejo de Suelos Afectados por Salinidad. Consultado 23-04-2018 en <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-afectados-por-salinidad/es/#c239240>
- Ferjani, A., Segami, S., Horiguchi, G., Muto, Y., Maeshima, M. and Tsukaya, H. (2011) Keep an eye on PPI: the vacuolar-type H<sup>+</sup> pyrophosphatase regulates postgerminative development in arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 2895–2908. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085415>
- Florido, M., y Bao, L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultrop*, 35 (3), 70-80.
- Foolad, M. R. Tolerance to Abiotic Stresses. (2007). Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato. *Science Publishers, Enfield*, 2, 521-590.

- Gaxiola, R. A., Fink, G. R., and Hirschi K. D. (2002). Genetic Manipulation of Vacuolar Proton Pumps and Transporters. *Plant Physiology*, 129, 967-973.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., and Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H-pump. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 11444–11449.
- Gaxiola, R. A., Sánchez, A. C., Páez-valencia, J., Ayre, G. B., and Elser, J. J. (2012). Genetic Manipulation of a “Vacuolar” H<sup>+</sup>-PPase: From Salt Tolerance to Yield Enhancement under Phosphorus-Deficient Soils. *Plant Physiology*, 159, 3–11.
- Goykovic, V., and Saavedra, G. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESI*, 25 (3), 47-58.
- Grainferberg, A., Giustiniani, L., Barsanti, L. and Botrini, L. (2000). Effect of salt-stress on tomato fruit quality. *Colture-Protette*, 29(6), 71-80.
- Hajer, A. S., Malibari, A. A., Al-Zahrani, H. S. and Almaghrabi, O. A. (2006). Responses of three tomato cultivars to sea water salinity. Effect to salinity on the seedling growth. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10), 855-861.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J., and Verbruggen, N. (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Science*, 11, 610–617.
- Krasensky, J. and Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp.Bot.*, 30, 1-16.
- Lakshmi, P., Satish, K., Tran, L. and Nguyen, (2009). H. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant & Cell. Physiol.*, 50 (7), 1260-1276.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination, aid in selection and evaluation of seedling emergence vigor. *Crop Science*, 2,176-177.

- Maldonado, C., Oujado, E. y Squeo, F. El efecto de la disponibilidad de agua durante el crecimiento de *Lycopersicon chilensis* sobre la capacidad de sus semillas para germinar a distintas temperaturas y concentración de manitol y NaCl.
- Morales, C. D., Dell'Amico, C. J., Rodríguez, C. P., Torrecillas, A. y Sánchez-Blanco, M. J. (2010). Efecto del estrés por NaCl en el crecimiento y las relaciones hídricas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) durante el período vegetativo. *Cultrop*, 31 (4)
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Nahar, K. and Gretzmacher, R. (2011). Response of Shoot and Root Development of Seven Tomato Cultivars in Hydroponic System under Water Stress. *Acad. J. Plant Sci.*, 4 (2), 57-63.
- Reina-Sánchez, A., Romero-Aranda, M. and Cuartero, J. 2005. Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agricultural Water Management*, 78, 54-66.
- Reyes, Y., Mazorra, L. M., Martínez, L. y Núñez, M. (2010). Efecto del análogo de brasinoesteroide (biobras-16) en la germinación y el crecimiento inicial de las plantas de dos variedades de tomate en condiciones de estrés salino. *Cultivos Tropicales*, 31 (2), 103-109
- Rezaei, M. A.; Jokar, I.; Ghorbanli, M.; Kaviani, B. and Kharabian-Masouleh, A. (2012). Morpho-physiological improving effects of exogenous glycine betaine on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. PS under drought stress conditions. *POJ*, 5 (2), 79-86.
- Roelfsema, M. R. G. and Hedrich, R. (2002). Studying guard cell in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytol.*, 153, 425-431.

- Romero, R., Soria, T., and Cuartero, J. (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160, 265-272.
- Saibo, N. J. M., Lourenço, T., and Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103, 609-623.
- Salas, J., Sanabria, M. y Pire, R. (2011). Variación en el índice y densidad estomática en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sometidas a tratamientos salinos. *Bioagro*, 13 (3), 99-104.
- Salazar-Moreno, R., Rojano-Aguilar, A. y López-Cruz, I. L. 2014. La eficiencia en el uso del agua en la agricultura controlada. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 5 (2), 177-183.
- Sanjari, P. A., and Yazdansepas, A. (2008). Evaluation of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes under Pre- and Post-anthesis Drought Stress Conditions. *Journal Agriculture Science Technology*, 10, 109-121.
- Schilling, R. K., Tester, M., Marschner, P., Plett, D. C. and Roy, S. J. (2017). AVP1: One Protein, Many Roles. *Trends in Plant Science*, 22(2), 154-162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.012>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Consultado 10-02-2019 en [www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)
- Talebi, R., Fayaz, F., and Naji, A. M. (2009). Effective selection criteria for assessing drought stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Gen Appl Plant Physiology*, 35, 64-74.
- Thompson, A. J., Andrews, J., Mulholland, B. J., McKee, J. M. T., Hilton, H. W., Horridge, J. S., Farquhar, G. D., Smeeton, R. C., Smillie, I. R. A., Black, C. R. and Taylor, I. B. (2007). Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.*, 143, 1905-1917.

- Wahb-Allah, M. A.; Alsadon, A. A. and Ibrahim, A. A. (2011). Drought Tolerance of Several Tomato Genotypes Under Greenhouse. *Conditions World Applied Sciences Journal*, 15 (7), 933-940.
- Witcombe, J. R., Hollington, P. A., Howarth, C. J., Reader, S. and Steele, K. A. (2008). Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biol. Sci.*, 363 (1492), 703-716.
- Yang, H. Zhang, X., Gaxiola, R. A., Xu, G., Peer, W. A. and Murphy, A. S. (2014) Over-expression of the *arabidopsis* proton-pyrophosphatase *AVP1* enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. *J. Exp. Bot.* 65(12), 3045–3053. DOI: 10.1093/jxb/eru149
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., Murphy, A., and Gaxiola R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 735–745
- Zushi, K. and Matsuzoe, N. (2009). Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Sci. Hort.*, 120, 181-187