



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LOS GENES *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10*
(*SICBL10*) Y *RESPIRATORY BURST OXIDASE G* (*SIRBOHG*) EN
LA RESPUESTA DE TOMATE A ESTRESSES ABIÓTICOS

D.^a Yanira Estrada Fortes

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LOS GENES *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10*
(*SICBL10*) Y *RESPIRATORY BURST OXIDASE G* (*SIRBOHG*) EN
LA RESPUESTA DE TOMATE A ESTRESSES ABIÓTICOS

Autora:

D.^a Yanira Estrada Fortes

Directoras:

D.^a Maria del Carmen Bolarín Jiménez

D.^a Maria Isabel Egea Sánchez



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Yanira Estrada Fortes

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Vegetal

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

PAPEL DE LOS GENES Calcineurin B-like Protein 10 (SICBL10) Y Respiratory Burst Oxidase G (SIRBOHG) EN LA RESPUESTA DE TOMATE A ESTRESSES ABIÓTICOS

y dirigida por,

D./Dña. Maria del Carmen Bolarín Jiménez

D./Dña. Maria Isabel Egea Sánchez

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 30 de mayo de 2023

Fdo.: Yanira Estrada Fortes

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

"La ciencia es un viaje interminable hacia el conocimiento. Cada respuesta que encontramos solo plantea nuevas preguntas, y así seguimos avanzando, profundizando en la comprensión de nuestro mundo."

- Marie Curie

***A mis padres y a mi
hermana***

Agradecimientos

Llegados a este punto me es inevitable recordar a esa Yanira de 20 años que tras conocer lo que era una tesis doctoral, se negaba rotundamente a hacer una en el futuro. Una vez más la vida me demuestra su capacidad de sorprender. Así que hoy le digo tanto a la Yanira del pasado como a la del futuro, que siga a su corazón como hizo cuando emprendió este viaje, que todo lo que vendrá merecerá la pena, siempre. Aunque esto pueda parecer un simple libro, para mí es el resultado de años de aprendizaje, experiencias, y de un gran crecimiento personal que en conjunto hacen que hoy sea quien soy. Han sido muchas las personas que de una u otra forma han formado parte de este viaje y han hecho que con sus aportaciones, sugerencias, paciencia, comprensión o apoyo, yo haya podido alcanzar este logro académico que para mí tiene tanta importancia. Muchas gracias de corazón a todos.

En primer lugar, quiero agradecer a todos los profesores que han contribuido junto con mi familia a mi educación y mis valores. Me siento muy agradecida por la educación pública y de calidad que recibí en el Colegio Hernández Ardieta y el Instituto Sabina Mora de Roldán. En especial quiero mencionar a mis profesores de biología **M^a Jesús Estrella, Julia Velasco, Chema y Paco** por contribuir a mi gran vocación por las ciencias naturales. Mis profesores de lengua y matemáticas durante muchos años merecen un agradecimiento especial por el cariño que siempre me han demostrado y las lecciones de vida que me han enseñado. **Iria**, eras sin duda el ejemplo de profesora que yo quería ser de mayor y de la que viene mi vocación docente. Gracias por la pasión y el cariño. **Rafa**, gracias por ser un guía desde que me conociste y por el cariño que siempre me has demostrado. Tenías razón cuando me decías: “haz el doctorado, serán de los mejores años de tu vida y, además, si el día de mañana eres profesora de secundaria tendrás mucho más que transmitir a tus alumnos”. Sabio consejo, gracias por ser uno de los principales ‘culpables’ de que hoy esté aquí. Gracias infinitas a los dos, y también a mis ‘five’ **Carmen, Elías, Francis y Pedro** porque juntos decidimos que queríamos ser de mayores y sin vosotros nada habría sido igual en aquella decisiva etapa.

A todos y cada uno de mis profesores de Biología de la Universidad de Murcia: os tendré siempre muy presentes. Agradecer a la **Profesora M^a José Quiles** aquella conversación en su despacho que me ayudó a emprender este viaje y por todo el tiempo que le has dedicado a mis gestiones universitarias. Gracias al **Profesor José María Egea** por ser ese profesor entrañable de botánica que explicaba el maravilloso mundo de las angiospermas y que hizo aflorar la curiosidad por el mundo vegetal a esa Yanira de 19 años. Gracias por acogerme como alumna interna y permitirme desde aprender tareas de campo, hasta colaborar en la escritura de un libro, participar en mi primer congreso y conocer a esa persona que me llevó al lugar que durante los últimos 6 años ha sido mi segunda casa: el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), donde realicé mi TFG experimental y desde entonces ya no hubo vuelta atrás.

También me gustaría agradecer al **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** por haber sido el organismo donde he realizado esta tesis doctoral y al **Ministerio de Universidades** por haberme concedido la ayuda FPU que me ha permitido desarrollar esta tesis doctoral y poder vivir de ello en el proceso.

Quiero agradecer a **todas las personas que forman el CEBAS** (servicios de ICP y metabólica, gerencia, administración, conserjería, informática, mantenimiento y personal de la finca), que no siempre tienen el reconocimiento que merecen, pero son esenciales en nuestro trabajo.

El mayor de los agradecimientos de corazón es para una de mis directoras: **Mari Carmen Bolarín**, la fuerza incesable de nuestro grupo. Esta tesis no habría sido posible sin su dirección y grandísima ayuda, me siento muy afortunada de haber podido ser tu última tesis dirigida. No me has dejado a pesar de haberte jubilado y sé que me has regalado tus últimos momentos de dedicación, lo que es todo un honor para mí y tendré siempre presente, no me merecía tanto y me has demostrado una vez tu grandísimo corazón. Gracias por cada vez que me apretabas para que no perdiera el objetivo, por tus valiosos consejos (prometo intentar seguir siempre un “hilo conductor” en todo lo que haga en mi vida) y por el enorme apoyo recibido en esta última etapa de escritura tan dura. Has sido mucho más que una directora y dejas en mí una huella imborrable en forma de enseñanzas y, sobre todo, de valores humanos. Eres ejemplo de superación personal y de que las cosas que se hacen con pasión siempre se hacen mejor. Ojalá algún día ser la mitad de fuerte y buena investigadora que tú. Gracias infinitas, nunca te olvidaré.

Gracias a mi otra directora, tutora de tesis y amiga: **Isabel Egea**. Eres ese ser de luz que apareció en mi camino en el momento oportuno para -como tú dices- “robarme a tu padre” y hacer que mi corazón me indicase que seguir por aquí era el buen camino. Sabías mucho antes que yo que acabaría haciendo una tesis doctoral y has creído en mí cuando yo me he considerado incapaz de muchas cosas. Qué decirte que no sepas, si en estos 6 años te has convertido en mucho más que una amiga para mí. Gracias por ser mi mentora en el laboratorio, por hacerme sentir tan capaz de todo, por valorarme tanto y por el enorme cariño que siempre me has demostrado. Gracias por ser como una hermana mayor y por introducirme en el rocódromo que tanto me ha dado estos años. Gracias por hacer más amenos cada uno de los días en el trabajo y fuera de él, pero además por guiar a nuestro grupo por el camino correcto de la forma más humana y empática posible. Por ayudarme con todo siempre y -destaco en mayúsculas- en cualquier momento (porque toda tu familia se conoce ese ‘estoy con Yanira, no puedo’). Nuestro grupo no sería nada sin ti Jefsá. Pero no todo son gracias... No gracias por todos los cafés derramados en mis libretas, por hacerme sufrir en spinning o por perdernos por el monte a punto de morir por deshidratación, jajaja. ¡Que todo esto es solo el principio de todo lo que nos queda juntas!, te quiero mucho Isa, eres única.

Y como no, agradecer a mis compañeros de grupo presentes y a los que lo fueron, todos vosotros habéis sido esenciales y esta tesis sin duda es un poco de todos vosotros. **Borja Flores**, si hubiera tenido un tercer director ese habrías sido tú. Gracias por tu dedicación, ayuda y atención siempre y de la mejor forma, por los correos informativos y recordatorios y por estar siempre pendiente de que todo vaya sobre ruedas. Todos sabemos que la parte de invernaderos y las medidas de CIRAS no habrían sido posibles sin tus conocimientos. Gracias por el aprecio y cariño que me has mostrado todos estos años. También quiero agradecer a mis chicas de sala: A **Belén**, esa mujer fuerte de la que todo el mundo debería aprender y cuyos consejos son oro puro. Gracias por hacerme pensar tantas veces sin ni si quiera tú saberlo, muchas de tus palabras están a menudo en situaciones de mi vida y eso sí que es dejar marca. Gracias por hacernos sentir apreciadas catadoras de tus nuevos postres, y por esforzarte en traer el orden a nuestros laboratorios y la calma al caos de los muestreos. Tu trabajo ha sido fundamental para poder llevar a cabo cada técnica desde que empecé mi TFG hasta el final de mi tesis doctoral, gracias. A **Celia**, porque eres el ejemplo de que la felicidad depende de la manera en que uno se tome la vida y contagias tu alegría por donde pasas. Gracias por todo el trabajo que me adelantaste cuando estaba de estancia, por haber sido mi mano derecha durante este último año y por haber asumido más responsabilidades de las que debías durante mi encierro de escritura. Te debo mucho, espero poder seguir compartiendo muchos momentos contigo y ver cómo terminas de sacarles el jugo a nuestros queridos mutantes 698 y 916 en tu futura tesis doctoral. A **Amanda**, por ser la primera alumna de TFG que guíé en el laboratorio y con quien compartí tantos ratos agradables y por ese primer artículo en que trabajamos tan duro juntas, que aunque no forme parte de esta tesis doctoral le tengo un aprecio especial. El amaranto y la quinoa siempre me recordarán un poquito a ti. A **Minerva**, por darme la tranquilidad que suponía confiar en ti a ojos cerrados en el laboratorio y por tu gran involucración siempre en todo. Por tu compañía en la poyata durante una de mis etapas más fuertes de trabajo y como no, gracias por hacer más amenos todos esos encierros en el CEBAS hasta las 22:00 h tras horas de microscopía. Quiero destacar esa capacidad de preparar el mejor reactivo eFOX en la mitad de volumen, y tú sabes bien qué significa esto y decirte que fue un placer tenerte como alumna y compañera, no tengo dudas de que serás una grandísima investigadora. A **Leire**, porque gracias a tu paso por nuestro laboratorio conocí a mi gemela vasca y se forjó una amistad muy fuerte. Gracias por tu apoyo durante mis baches, por confiar en mí y tenerme siempre presente a pesar de la distancia. Gracias por ser tan única y como no, gracias por acogerme durante mi estancia en Vitoria y enseñarme tan de cerca la cultura vasca. A **Silvia**, gracias por ser luz y vida y porque tu presencia en nuestro grupo fue un chute de alegría en vena. Recuerdo con cariño tu forma de decirme “Ay Yanis...” con tu gran sonrisa cuando algo no salía bien y tú te lo tomabas siempre con humor a pesar de mi agobio (me enseñaste mucho) y gracias por tu ayuda y tu cariño. A **Manu** por todos esos muestreos interminables a 50°C en los invernaderos haciendo que el trabajo más duro sin duda de la tesis, lo fuera un poquito menos. Gracias por compartir conmigo esas medidas de potencial hídrico pre-dawn que salieron regular pero que nos obligaban a levantarnos a las 4:30 am, y sobre todo por los merecidos desayunos de después y las empanadillas con ensaladilla que me traías de biología. A **Laura** por todo lo que me enseñaste en el poco tiempo que estuviste con nosotros y por tu gran ayuda con las RT-qPCRs gracias a que aprendiste a hacerlas increíblemente rápido y bien. No podía dejarme a **Irene** y **Félix**, doctorandos anteriores a mí a los que he tenido la suerte de conocer a pesar de no haber compartido poyata y con los que he disfrutado de buenos momentos fuera del

CEBAS. Gracias, porque mi tesis doctoral parte de vuestro gran trabajo previo y vuestras tesis doctorales han sido sin duda mi bibliografía de consulta de rutina. Dejasteis el listón muy alto. También querría destacar ese importante papel que han tenido los alumnos de prácticas y TFGs que han pasado por el grupo y que sin duda han aportado su granito de arena a esta tesis doctoral: gracias **María, Ana, Marta, Noelia, Joseco, Nadia y Clemente**. Esta tesis doctoral recoge el trabajo conjunto de 5 años de trabajo en este grupo unido y que trabaja de forma coordinada. Estoy orgullosa de formar parte del grupo de Estrés, Producción y Calidad del CEBAS, sois muy grandes.

Además, durante estos años he tenido la suerte de conocer a personas maravillosas en el CEBAS que han tenido una importancia enorme durante todos estos años. Gracias **Sonia Medina**, por el apoyo y el interés que siempre me has demostrado, por todas esas comidas y por los buenísimos ratos. Estoy orgullosa de haber sido partícipe de todo lo que has conseguido a lo largo de estos años. Gracias a esos amigos y compañeros de planta a quienes he acudido siempre que me he saturado en mi pasillo. Gracias por sacarme del CEBAS a comer en tantas ocasiones y por todos los ratos que hemos pasado fuera de él. Gracias por todos vuestros consejos y ayuda recibida cada vez que os he preguntado alguna duda (que han sido muchas). Gracias **Álvaro** por tus abrazos inesperados pero que a veces tan necesarios eran y por todos esos buenos ratos tanto en persona como a través de la pantalla. Gracias **Paula** por transmitirme calma siempre con tus palabras y por tu cariño. Gracias a los dos por hacer de la cuarentena una etapa más 'tierna' jajaja. Gracias **Lucía** por ser mi ejemplo FPU y por estar siempre disponible para mí con tanto cariño. Gracias **Juan** por esos mini ratos desenfadados y esa cercanía que sobre todo en estos últimos meses me ha sido tan agradable. Gracias **Jesús Amo** por la enorme ayuda que me has dado en todo lo referente a biología molecular. Sabes que si por nosotras fuera te poníamos un puesto ya mismo en nuestro grupo. Gracias también por ser esa persona con la que liberar tensión quejándonos de todo en los momentos duros, pero con la que acabar viendo la vida como realmente de maravillosa es. Gracias a otras personas con las que he compartido algunos momentos y que me han ayudado siempre que lo he necesitado: gracias, **Silvia, Reyes, Almudena, María López, Sandra, Sabrina, Juanan, Jesús Guillamón, Inma, Sandra, Mamen, Raquel, Rosa, Marga, Quique y Nieves**.

I wish to give a big and warm thank you to everybody belonging to the 'Molecular Genetics and Cell Biology of Plants' group at the IBBP in Münster University. All of you have made my stay there one of the best experiences in my life. Especially, thank you **Jörg Kudla** for giving me the opportunity to fulfil this stay at your laboratory. And also thank you to **Yiduo Chen, Tobias Becker, Rainer Waadt, Leonie Steinhorst, Felix Rehms, Chaoqun Wang, Nan Zhou, Ruimin Zhu, Thomas Wyganowski, and Gefeng He** for being such good and nice colleagues, teaching and helping me so much and giving part of your time to me, both inside and outside the laboratory. I will never forget all of you.

En lo personal, me siento muy agradecida por tener a tantas personas que me quieren y a las que quiero, que han supuesto un un motivo de mi felicidad siempre. Gracias **Claudia y Sandra**, sois esas primas amigas como hermanas que siempre formaréis parte esencial de mi vida por mucho tiempo que pase. Gracias **Noemí** por ser esa amiga incondicional desde que nos conocimos en el cole. Como no, gracias a mis amigos de la universidad, que me han acompañado desde hace 10 años. Gracias **Marina, Merce, Vicky, Anabel y Carmen** porque sois mis mejores amigas sin duda, cada rato con vosotras siempre es vida y me ha ayudado a desconectar de la rutina y recargar fuerzas. Gracias por cada conversación motivadora, por ser mis confidentes, por aguantar mis audios eternos y mis quejas cuando la tesis ha podido conmigo. Gracias por ser parte de esto tan bonito que tenemos y que perdura a pesar de los años y la distancia. Gracias **Borja** por todos los momentos que me has regalado durante estos 10 años, guardo todos y cada uno por haber sido divertidos y especiales, pero especialmente gracias por estos últimos años durante mi tesis doctoral ya que has sido esencial y no se me ocurre nadie mejor que tú para hacer uno de esos planes nuestros improvisados pero que sin duda mejoran toda una semana. Gracias **Jesús Ganga**, por ser y por estar siempre desde que nos conocemos, especialmente por tu gran apoyo cuando mi vida dio un giro de 180° durante mi estancia en Alemania.

También quiero agradecer a esas personas que durante 5 años fueron indispensables en mi vida, de las que tanto aprendí y que tanto cariño me dieron. Me visteis iniciar mi doctorado y toda la trayectoria casi hasta su final y me animasteis y apoyasteis más que nadie. Muchas gracias **Pedro, Tatí, Marta, e Iván**. Gracias **Ricardo** por todo lo que me enseñaste tú a mí aun siendo yo tu veterana

bióloga, por ser compañero de poyata tantas veces sin tener por qué, por el grandísimo apoyo y por todas aquellas experiencias vividas. Nunca os olvidaré.

Gracias **Celia, Sandra, Graysi, Paula, Ana** y **Ahinoa** por cruzaros en mi vida durante mi estancia en Münster y hacer que aquellos casi 5 meses fueran sin duda una de las mejores experiencias de mi vida, fuisteis apoyo indispensable. Gracias al **rocódromo Montaña Mágica** y a todo lo que ha traído consigo. Gracias a mis amigos de allí con los que casi cada tarde he compartido tan buenos momentos tanto dentro de él, como en el monte o en los bares. Ha supuesto sin duda la mayor desconexión posible de todo lo académico que a veces tan necesaria era, sobre todo durante los últimos meses. Gracias **Sergio, Abraham, Mariajo, Isa, Elena, Paloma, Soler, Alba, Diego, Marina, Macarena** y **todos los demás** que compartís conmigo un rato de vuestro tiempo. En especial, a **Mar** por todos estos años en los que no solo has sido una doctora ejemplo, sino sobre todo una grandísima amiga, gracias por el cariño a tu manera, las conversaciones tan enriquecedoras y todos los buenos momentos que hemos disfrutado. Gracias **Boris** por todos esos martes y jueves de clases de escalada durante años que me apagaban la mente y por todos los ratos en compañía. Gracias al resto de mis amigos por el interés que mostráis y por los buenos ratos juntos.

Quiero hacer una mención especial a toda mi familia, ya que el mayor motivo de mi felicidad sin duda es tenerlos a ellos conmigo. Por un lado, quiero agradecer a esa familia que no es de sangre pero que a día de hoy quiero y me quieren como si lo fueran. Gracias **Pepi y Juanin** y también a mis cuñados **Cristian, Eva y Dimitri** por demostrarme tanto cariño durante este último año que realmente ha sido el más difícil para llegar aquí. Por otro lado, quiero agradecer a mis **abuelos, titos, titas** y **primos** que siempre están a mi lado, se interesan por mí y me dan tanta felicidad cuando los veo. En especial, quiero agradecer a mi madrina **Emilia** y a mi tito **Luis**, por hacerme sentir tan valorada y querida, por el enorme cariño que como si fueran mis padres siempre me han dado, y por su gran interés por cada paso que doy. Os quiero mucho a los dos, no podría imaginar una vida sin vosotros a mi lado. Aunque ya no esté conmigo, quería agradecer a mi **abuela Sole** ya que fue una de las personas más importantes de mi vida y mucho de ella se quedó conmigo. Ojalá poder contarte tantas cosas como hacía cada noche en el sofá cuando llegaba de la universidad. Te quiero abuela, gracias por haberme visto crecer y haberme hecho sentir la persona más querida del mundo.

No puedo dejar de agradecer a un animalito que aunque no habla, hace más compañía y da más cariño que muchas personas y que quiero como una hija. Gracias a mi **Firu**, que durante toda la etapa de escritura de esta tesis doctoral ha estado sobre mis piernas o a mis pies, dándome los ánimos necesarios para pasar horas, días y meses aquí sentada y obligándome a hacer esas pequeñas pausas tan necesarias. Gracias pequeña, como siempre te digo, esta tesis la hemos escrito juntas y parece que por fin está terminada. Te debo mucho.

No puedo dejar de agradecer a las personas más importantes de mi vida. A mi padre y mi madre, **Pepe** y **Pili**, por absolutamente todo. Desde la educación que me han dado, hasta todos los esfuerzos que han tenido que hacer para que yo hoy haya podido llegar hasta aquí, y todos los valores que me han transmitido. Gracias por el amor incondicional y por formar esta familia tan unida. A mi hermana **Amanda**, porque no recuerdo un momento de mi vida sin ella a mi lado, gracias por ser mi mayor confidente, mi mejor amiga y la persona que mejor me entiende del mundo. Esta tesis doctoral supone hoy mi mayor logro académico y os la dedico a vosotros tres. Me siento la persona más afortunada del mundo por teneros como padres y hermana. Gracias.

Por último, quiero agradecer a esa persona torbellino que comparte conmigo cada día y que ha hecho que el último año casi y medio haya sido increíble a pesar de que lo que conllevaba la finalización de esta tesis doctoral poco se prestase a serlo. Gracias por llenar mis días de color con tu compañía, tu amor y tus ocurrencias, y gracias por demostrarme tu cariño y apoyo, sobre todo en los momentos de máxima frustración cuando no veía luz por ninguna parte. Gracias **Abraham** por acompañarme en la vida y hacer que esta sea la aventura que siempre había querido vivir.

A todos, ¡muchas gracias de corazón!

12. 05. 2023

Índice

Resumen	23
Abstract	25
Abreviaturas	27
Índice de figuras	31
Índice de tablas	35
I. INTRODUCCIÓN	39
1. Cambio climático y problemática del estrés abiótico	39
2. Impacto de los estreses abióticos	39
3. Mecanismos de tolerancia a estreses abióticos	42
3.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía	42
3.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad.	44
3.3. Respuesta al estrés nutricional inducido por estreses abióticos	47
3.4. Respuesta al estrés oxidativo inducido por estreses abióticos	51
3.5. Respuesta al estrés térmico inducido por altas temperaturas	53
3.6. Cambios anatómicos como respuesta a estrés abiótico	57
4. El tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	58
4.1. Importancia económica y distribución geográfica del tomate	60
4.2. El tomate como planta modelo	63
4.3. Estrategias para aumentar la tolerancia a estreses abióticos	66
5. Genes involucrados en la tolerancia a estrés abiótico de tomate a largo plazo	70
5.1. Genes de señalización	72
5.2. La ruta SOS en tomate. Papel del gen <i>SISOS1</i>	74
5.3. Genes reguladores. Factores de transcripción.	75
5.4. Genes de respuesta a estrés involucrados en la homeostasis iónica	77
6. Papel de los sensores de calcio y ROS ‘<i>CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (SICBL10)</i>’ y ‘<i>RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SLRBOHG)</i>’	81
6.1. Localización de <i>SICBL10</i> en la membrana plasmática y/o en la vacuola	83
6.2. Interacciones directas con función de represión	87
6.3. Papel clave de <i>SICBL10</i> y <i>SIRBOHG</i> en la señalización por estrés	88
II. OBJETIVOS	91
III. MATERIAL Y MÉTODOS	95
1. Material vegetal	95
2. Cultivo <i>in vitro</i>	96
2.1. Esterilización de semillas y germinación <i>in vitro</i>	96

2.2. Condiciones de la cámara de cultivo <i>in vitro</i>	96
3. Cultivo <i>in vivo</i> de plantas. Condiciones del estrés salino e hídrico.	96
3.1. Condiciones de cultivo para los ensayos a corto y medio plazo	97
3.2. Ensayos en sustrato	97
3.3. Ensayos en cultivo hidropónico	98
3.4. Condiciones de cultivo para los ensayos a largo plazo en invernadero.....	100
3.4.1. Invernadero de condiciones no-controladas (NC).....	100
3.4.2. Invernadero de condiciones semi-controladas (SC).....	103
3.5. Generación de plantas injertadas.....	105
4. Determinación de parámetros fisiológicos	106
4.1. Desarrollo de biomasa.....	106
4.2. Determinación del contenido de agua	106
4.3. Parámetros de intercambio gaseoso: conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración foliar (E), y tasa de fotosíntesis neta (Pn)	106
4.4. Termografía infrarroja	107
4.5. Preparación de extracto vegetal crudo.....	108
4.6. Potencial hídrico.....	108
4.7. Potencial osmótico	108
4.8. Determinación del contenido de clorofila y eficiencia fotosintética (Fv/Fm).....	109
4.9. Contenido de iones inorgánicos	110
4.10. Determinación de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos mediante 1H-RMN ..	110
4.11. Determinación de hormonas vegetales mediante UPLC-espectrometría de masas...111	
4.12. Determinación cuantitativa de la concentración de H ₂ O ₂ por espectrofotometría mediante el método e-FOX.	111
4.13. Determinación cualitativa del contenido en H ₂ O ₂ por emisión de fluorescencia.	112
4.14. Medida de la firmeza del fruto	112
5. Generación de construcciones para los experimentos en células HEK y localización subcelular en <i>Nicotiana benthamiana</i>.	113
5.1. Material de partida para la generación de las construcciones	113
5.2. Medios para el cultivo de bacterias	113
5.2.1. Medio de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	113
5.2.2. Medio de cultivo para el cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	113
5.3. Diseño de cebadores.....	114
5.4. Vectores utilizados.....	114
5.5. Métodos de biología molecular empleados en la clonación	115
5.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	115
5.5.2. Electroforesis en gel de agarosa	117
5.5.3. Aislamiento y purificación de ADN.....	117

5.5.4. Digestión de restricción.....	117
5.5.4. Ligación de fragmento de ADN.....	118
5.5.5. Precipitación de ADN.....	118
5.5.6. Transformación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes.....	118
5.5.7. Transformación de células electrocompetentes de <i>A. tumefaciens</i>	119
5.5.8. Aislamiento de plásmidos.....	119
5.5.9. Generación de reservas de dimetilsulfóxido (DMSO).....	119
5.5.10. Secuenciación y relaciones filogenéticas.....	119
5.6. Construcciones utilizadas.....	120
6. Ensayos de producción de ROS utilizando el sistema HEK293T.....	121
6.1. Subcultivo de células HEK293T.....	121
6.2. Preparación de placas de 96 pocillos para ensayos de producción de ROS.....	121
6.3. Transfección de las células HEK.....	122
6.4. Ensayo de producción de ROS.....	122
6.5. Preparación del luminómetro y medición de la producción de ROS.....	123
7. Localización subcelular de SIRBOHG en <i>Nicotiana Benthamiana</i>.....	123
7.1. Construcciones de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilizadas.....	123
7.2. Transformación transitoria de hojas de <i>N. benthamiana</i>	123
8. Análisis de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB). 125	
8.1. Determinación de la densidad y apertura estomática (MEB).....	125
8.2. Determinación del diámetro y densidad celular (MO).....	125
9. Análisis de expresión génica mediante PCR.....	126
9.1. Extracción de RNA.....	126
9.2. Síntesis de ADNc.....	127
9.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	128
10. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo.....	131
10.1. Evaluación de rasgos fenotípicos.....	131
10.2. Tasas de cuajado y abscisión.....	131
10.3. Evaluación de la producción (rendimiento en gramos y número de frutos).....	132
10.4. Evaluación del porcentaje de BER y detección de fisiopatías.....	132
11. Tratamientos estadísticos.....	133
11.1. Análisis de diferencias significativas entre medias.....	133
11.2. Diferencias significativas entre interacciones de factores.....	133
IV. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>SICBL10</i> EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO.....	137
1. Antecedentes.....	137
2. Metodología específica.....	138

2.1. Diseño experimental de los ensayos en invernadero SC y NC	138
2.2. Diseño experimental de los ensayos de injertos en hidropónico	139
2.2.1. Ensayo a corto plazo con injertos recíprocos entre WT y mutante <i>Slcbl10</i>	139
2.2.2. Ensayo a corto-medio plazo con plantas WT injertadas en portainjertos que silencian o sobreexpresan el gen <i>SICBL10</i>	139
3. Resultados	140
3.1. Estudiar el papel de <i>SICBL10</i> en el desarrollo reproductivo de tomate	140
3.2. Determinar la respuesta a la salinidad inducida por la sobreexpresión de <i>SLCBL10</i> . 146	
3.2.1. Tolerancia a la salinidad en base al rendimiento en fruto	146
3.3. Comprobar si el gen <i>SICBL10</i> funciona como regulador negativo de la tolerancia a salinidad en raíz.....	151
3.3.1. La pérdida de función de <i>SICBL10</i> confiere tolerancia a la sal cuando es utilizado como portainjerto mientras que la sobreexpresión induce sensibilidad	151
3.3.2. La modulación de la expresión de <i>SICBL10</i> en el portainjerto altera la homeostasis iónica de plantas injertadas y la expresión de los principales genes implicados en el transporte de Na ⁺ y K ⁺	156
3.3.3. <i>SICBL10</i> interacciona directamente con el canal LKT1	160
3.3.4. El silenciamiento de <i>SICBL10</i> en el portainjerto mejora el rendimiento en fruto de plantas injertadas bajo estrés salino	161
3.4. Identificar el papel de <i>SICBL10</i> en la tolerancia del tomate a estrés por sequía y altas temperaturas	165
4. Discusión	169
4.1. Papel del gen <i>SICBL10</i> en el desarrollo reproductivo.....	169
4.2. La sobreexpresión del gen <i>SICBL10</i> aumenta el número de frutos en condiciones salinas	172
4.3. Líneas silenciadas del gen <i>SICBL10</i> pueden ser utilizadas como portainjertos para incrementar la producción bajo estrés salino	174
4.3.1. El gen <i>SICBL10</i> presenta distinta función en parte aérea y en raíz.	174
4.3.2. La función del gen <i>SICBL10</i> en raíces bajo condiciones de estrés salino está relacionada con la absorción de K ⁺ y Na ⁺ y afecta la relación Na ⁺ /K ⁺ en toda la planta de tomate.....	174
4.3.3. La función de <i>SICBL10</i> en el portainjertos está coordinada con la función de los transportadores necesarios para lograr los equilibrios homeostáticos de Na ⁺ /K ⁺ en la planta	175
4.3.4. <i>SICBL10</i> interactúa directamente de manera independiente de CIPK con LKT1, lo que dificulta la absorción de K ⁺ desde la raíz	176
4.3.5. El uso de portainjertos silenciados <i>SICBL10</i> mejora la tolerancia a la salinidad de cultivares de tomate tanto a nivel vegetativo como agronómico	177
4.4. Similitudes y diferencias respecto al papel de <i>SICBL10</i> en la tolerancia del tomate a diferentes estreses abióticos	178

V. PAPEL DEL GEN <i>SIRBOHG</i> EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD DEL TOMATE	183
1. Antecedentes	183
2. Metodología específica	185
2.1. Diseño experimental de ensayo de estrés salino <i>in vitro</i>	185
2.2. Diseño experimental del ensayo de estrés salino en cultivo hidropónico	185
2.3. Diseño experimental del tratamiento salino combinado con DPI en cultivo en mini hidropónico	186
2.4. Diseño experimental de los ensayos de estrés salino en invernadero	186
3. Resultados	187
3.1. Resultados previos obtenidos por los grupos que colaboran en el proyecto, IBMCP y UAL), sobre la caracterización genética de los mutantes <i>sodgat1</i> y <i>sodgat2</i> e identificación del gen	187
3.2. Dilucidar el mecanismo de acción del gen en relación con la homeostasis osmótica e iónica en condiciones de salinidad y determinar el papel del H ₂ O ₂ en la tolerancia.	190
3.2.1. Caracterización <i>in vitro</i>	190
3.2.2. Caracterización fenotípica y fisiológica <i>in vivo</i>	191
3.2.3. Caracterización molecular. Genes implicados en el transporte de agua y en la homeostasis Na ⁺ /K ⁺	195
3.2.4. Cambios inducidos por la anulación de <i>SIRBOHG</i> en la producción de H ₂ O ₂ en condiciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	198
3.3. Determinar el papel del gen <i>SIRBOHG</i> en la tolerancia a la salinidad a lo largo del desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta	200
3.3.1. Efectos en el desarrollo vegetativo inducidos por la anulación del gen <i>SIRBOHG</i>	203
3.3.2. Efectos en el desarrollo reproductivo inducidos por la anulación del gen <i>SIRBOHG</i>	207
3.3.3. Influencia de las condiciones ambientales	215
Respuesta comparativa en invernadero de condiciones no controladas y semi-controladas de plantas desarrolladas en control y sal (50 mM NaCl)	220
3.3.4. Caracterización del mutante <i>sodgat1</i> a largo plazo	224
3.4. Estudio de la localización subcelular de AtRBOHG y SIRBOHG y las interacciones SICBL-SICIPK en la activación de SIRBOHG.	236
3.4.1. Complejos CBLs-CIPKs que median la activación de SIRBOHG dependiente de Ca ²⁺ en células HEK293T	238
3.4.2. Localización subcelular de SIROBHG en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	244
4. Discusión	247
4.1. Papel del gen <i>SIRBOHG</i> en la tolerancia a corto-medio plazo	247
4.1.1. El papel principal del gen <i>SIRBOHG</i> es la regulación del transporte de Na ⁺ desde la raíz a la parte aérea	247

4.1.2. ¿La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca un cotransporte agua – Na ⁺ ?	248
4.1.3. La producción de H ₂ O ₂ es crítica para la tolerancia al estrés salino	249
4.2. Papel del gen <i>SIRBOHG</i> en la tolerancia a largo plazo	250
4.2.1. El gen <i>SIRBOHG</i> es clave en la tolerancia a la salinidad a lo largo del ciclo vegetativo de tomate	250
4.2.2. El principal efecto provocado por la disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> a nivel reproductivo es el alto porcentaje de abscisión de flores inducido por la salinidad	252
4.2.3. El alto porcentaje de abscisión de flores inducido por la salinidad en el mutante está asociado a alta acumulación de Na ⁺ y agua en la zona de abscisión	254
4.3. Los genes <i>SICBL10</i> y <i>SIRBOHG</i> podrían jugar un papel clave en el diálogo cruzado Ca ²⁺ -ROS con función de señalización de estrés	256
VI. CONCLUSIONES	261
1. FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE TOMATO <i>CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (SICBL10)</i> GENE	261
2. ROLE OF THE <i>RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SIRBOHG)</i> GENE IN SALINITY TOLERANCE OF TOMATO	261
VII. BIBLIOGRAFÍA	265

Resumen

El cambio climático está teniendo dramáticas consecuencias en la agricultura a nivel mundial debido a los múltiples estreses abióticos. En Europa, el área Mediterránea es la más afectada por el cambio climático, donde se han intensificado los diferentes estreses abióticos como salinidad debido a la escasez de aguas de buena calidad, sequía y la frecuencia e intensidad de altas temperaturas. Ante los efectos negativos del cambio climático sobre la productividad de los cultivos de interés agronómico como tomate (*Solanum lycopersicum*) y las predicciones del aumento de la población a nivel mundial con el consiguiente incremento de la demanda de alimentos, un objetivo prioritario en la actualidad es avanzar en el conocimiento de los mecanismos y genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos. Los objetivos propuestos en este trabajo son avanzar en el conocimiento sobre el **papel de dos genes claves de tomate involucrados en la tolerancia a estreses abióticos a lo largo del ciclo de desarrollo de las plantas: *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN CBL10 (SICBL10)* y *RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SLRBOHG)***. Para el logro de estos objetivos, se han combinado análisis fenotípicos y agronómicos de plantas cultivadas en diferentes condiciones experimentales, incluyendo condiciones controladas, semi-controladas y no controladas, así como análisis a niveles anatómicos, fisiológicos y moleculares.

El gen *SICBL10* tiene un papel importante en el desarrollo reproductivo de tomate, ya que la anulación del gen reducía significativamente el rendimiento en fruto cuando el cultivo se realizaba en condiciones óptimas. Además, también está involucrado en la incidencia de Blossom End Rot (BER); los efectos del silenciamiento del gen *SICBL10* sobre esta fisiopatía están relacionados con las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} ya que se observa una reducción en el transporte de Ca^{2+} hacia los órganos sumidero que necesitan este nutriente para su desarrollo. Una característica muy interesante del gen *SICBL10* es el papel opuesto en parte aérea y raíz cuando el cultivo se realiza en condiciones salinas. El silenciamiento de *SICBL10* induce hipersensibilidad a la sal en parte aérea, y por tanto es un regulador positivo de la tolerancia en esta parte de la planta, mientras que es un regulador negativo de la tolerancia a salinidad en raíz puesto que la pérdida de función del gen confiere tolerancia a la sal cuando se utiliza como portainjerto. Interesantemente, los portainjertos que tienen silenciado el gen *SICBL10* son capaces de aumentar el rendimiento en fruto de las plantas sin transformar (WT) utilizadas como genotipo parte aérea, y la tolerancia a la salinidad de las plantas injertadas está relacionada con cambios en la homeostasis de Na^+ y K^+ y en la expresión de los principales genes implicados en el transporte de ambos iones claves en la tolerancia. Además, los primeros resultados sobre el papel de *SICBL10* en la tolerancia del tomate a otros estreses abióticos, como sequía y estrés por altas temperaturas, muestran que la sobreexpresión del gen induce sensibilidad al estrés térmico, contrariamente a la respuesta observada para estrés salino. Estos resultados son de gran interés para avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos predominantes en una combinación de estreses abióticos, lo que es clave dados los múltiples estreses abióticos que afectan al desarrollo de las plantas en condiciones mediterráneas.

Los avances en el conocimiento sobre el papel del gen *SIRBOHG* involucrado en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se han llevado a cabo mediante la caracterización de dos mutantes que tienen anulada la expresión del gen, denominados *sodgat1-2* (del inglés *sodium gatherer*) por el transporte masivo de Na^+ desde la raíz hasta la parte aérea. La anulación del gen *SIRBOHG* provoca una alta sensibilidad a la salinidad asociada con un alto transporte de agua y Na^+ desde la raíz a la parte aérea, respuesta observada tanto en condiciones no transpirantes (*in vitro*) como transpirantes (*in vivo*). Estas alteraciones fisiológicas están principalmente asociadas a los cambios de expresión de los transportadores iónicos en las raíces de los mutantes y, especialmente, a la reducción de la expresión de *SIHKT1;2*, el más importante gen implicado en

el control de la homeostasis de Na^+ en tomate. Esta respuesta es dependiente de la producción de H_2O_2 en condiciones salinas, como los mutantes no acumulan H_2O_2 con la salinidad, contrariamente a la mayor producción de H_2O_2 en plantas WT. Interesantemente, la alta sensibilidad a la salinidad provocada por la disrupción del gen *SIRBOHG* se mantiene a lo largo del ciclo de cultivo y en diferentes condiciones ambientales, lo que demuestra que *SIRBOHG* es un gen clave en el desarrollo vegetativo y, especialmente, reproductivo donde la pérdida de función provoca importantes pérdidas de producción. Además, por primera vez se demuestra que el principal efecto provocado por la disrupción del gen *SIRBOHG* a nivel reproductivo es el alto porcentaje de abscisión de flores inducido por la salinidad, donde se producen importantes cambios en la zona de abscisión (ZA) del pedicelo de la flor. Entre los procesos afectados en la abscisión, se observan alteraciones hormonales inducidas por la disrupción del gen *SIRBOHG*, como los niveles reducidos de auxina y ABA en hoja y flor del mutante, y alteraciones en los metabolitos primarios, especialmente los azúcares que reducen su transporte desde la hoja fuente hacia la flor y fruto bajo salinidad. Pero la abscisión parece estar principalmente relacionada con el alto transporte de Na^+ a la ZA del mutante, puesto que la acumulación de Na^+ en la ZA es incluso mayor que los valores encontrados en las flores. Estos resultados servirán como base para avanzar en la identificación de los procesos implicados en la abscisión prematura de órganos reproductivos, ya que la abscisión es un carácter agronómico de gran importancia para mantener la producción frente a las condiciones de cambio climático. Finalmente, ensayos de coexpresión simultánea de los genes *SICBL10* y *SIRBOHG* con diferentes CIPKs en cultivos celulares HEK, mostraron que el módulo SICBL10-SICIPK23 es capaz de activar a SIRBOHG, dando un lugar a un aumento significativo de ROS en presencia de Ca^{2+} , lo que pone de manifiesto, que los dos genes de estudio de esta tesis doctoral, *SICBL10* y *SIRBOHG*, pueden tener una función conjunta clave en el diálogo cruzado entre Ca^{2+} y ROS para la señalización del estrés en tomate.

Abstract

Climate change has dramatic consequences on agriculture worldwide because of the intensified impact of multiple abiotic stresses on crops. In Europe, the Mediterranean area is the most affected by climate change, where frequency, intensity and duration of stresses such as drought, high temperatures and salinity have been increasing, and in the particular case of the last one because of use by farmers of water with high levels of salts due to scarcity of good quality water sources. Given the negative effects of these stresses on the productivity of crops of such agro-economic importance as tomato (*Solanum lycopersicum*), which is the horticultural species supplying most of the functional compounds to the human diet due to its so high *per capita* consumption, and considering the predictions of a rising world population driving an increase in food demand, a priority research objective in agrarian science is to advance in the knowledge of the mechanisms and genes involved in tolerance to abiotic stresses, particularly in crops of such agronomic interest as it is tomato. **The objective of this thesis is to advance in the knowledge of the role of two key tomato genes involved in tolerance to abiotic stresses throughout the plant development cycle: *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN CBL10 (SICBL10)* and *RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SIRBOHG)*.** To achieve these objectives, phenotypic and agronomic analyses of plants grown under different experimental conditions have been combined, including controlled, semi-controlled and uncontrolled growth conditions, as well as analyses fulfilled at anatomical, physiological and molecular levels.

Regarding the study on *SICBL10* gene, it has been verified that it plays a very important role in reproductive development of tomato, since the knockout mutation of this gene significantly reduces fruit yield when plants are grown under optimal conditions. In addition, it is also involved in the incidence of Blossom End Rot (BER). Effects of knockout mutation or silencing of the gene are very much related to alterations in Ca^{2+} homeostasis, since it is observed a reduction in Ca^{2+} transport to sink organs that required this nutrient for their development. A very interesting characteristic of *SICBL10* is its opposite role in shoot and root when the plant is grown in saline conditions. Thus, disruption or silencing of the gene induces hypersensitivity to salt stress in the shoot and therefore it is a positive regulator of tolerance in this part of the plant, while it is a negative regulator of such tolerance in the root since plant material with loss-of-function of the gene confers salt tolerance when used as a rootstock. Interestingly, the rootstock carrying the silencing *SICBL10* gene are capable of increasing fruit yield of untransformed plant (WT) used as scion, and salinity tolerance of grafted plants is related to changes in Na^+ and K^+ plant homeostasis, and of expression of the main genes encoding transporters of both cations. Furthermore, the first results on the role of *SICBL10* in tomato tolerance to other abiotic stresses are presented, such as drought and high temperatures, and they hint at the fact that show that *SICBL10* overexpression induces sensitivity to heat stress, contrary to the response observed for salt stress. These results have a great interest to advance in the knowledge about the predominant mechanisms triggered in the plant response to a combination of abiotic stresses, which has a key importance given the

multiple abiotic stresses that affect crop growth and production in Mediterranean environmental conditions.

Advances in the knowledge about the role of the *SIRBOHG* tomato gene, involved in the production of reactive oxygen species (ROS), have been carried out via the characterization of two mutants showing inhibition of the gene expression, called *sodgat1-2* (*sodium gatherer 1-2*). These two mutants are characterized by the massive transport of Na^+ from the roots to the shoot when grown in saline conditions. The knockout mutation of *SIRBOHG* causes a high sensitivity to salinity associated with a high transport of water and Na^+ from root to shoot, a response observed both in non-transpiration (*in vitro*) and transpiration (*in vivo*) conditions. This physiological alteration is mainly associated with changes in the expression of ion transporters in mutant roots, in particular with the reduction of the expression of *SIHKT1;2*, one of the most important genes involved in regulation of Na^+ homeostasis in tomato. This response depends on the production of H_2O_2 under saline conditions, since the *sodgat1-2* mutants do not accumulate it with salinity, contrary to WT plants. Interestingly, the high sensitivity to salinity caused by disruption of the *SIRBOHG* is maintained throughout the plant cycle and in different environmental conditions, which hints at *SIRBOHG* as a key gene in vegetative development and, especially, in reproductive development, where loss-of-function causes major production losses. In addition, for the first time it is shown that the main effect caused by disruption of *SIRBOHG* at the reproductive level is a high degree of flower abscission induced by salinity, where important changes occur in the abscission zone (AZ) of the flower pedicel. Among the processes affected in the induced abscission under salinity, we have observed hormonal alterations such as reduced levels of auxin and ABA in leaves and flowers of the mutants and alterations in the levels of primary metabolites, especially sugars that experience a reduction of their transport from the source leaf towards sink flower and fruit. But abscission seems to be mainly linked to high transport of Na^+ to the AZ in the mutants, since the accumulation of this cation in the AZ is even higher than the values detected in the flowers. These results will serve as a basis to advance in the identification of the key processes involved in premature abscission of reproductive organs, since flower abscission is an agronomic trait of critical importance to maintain production in climate change conditions. Finally, simultaneous co-expression tests of *SICBL10* and *SIRBOHG* genes with different CIPKs in HEK cells cultures showed that the *SICBL10*-*SICIPK23* module is capable of activating *SIRBOHG*, leading to a significant increase in ROS in the presence of Ca^{2+} . This last result evidence that these two genes, objectives of study in this PhD thesis, *SICBL10* and *SIRBOHG*, may have a key joint function in the crossover dialogue between Ca^{2+} and ROS for stress signalling in tomato.

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
Abs	Absorbancia
ACTI	Área Científica y Técnica de Investigación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AF	Abscisión floral
AG	Sociedad anónima
AIA	Ácido indolacético
ANOVA	Análisis de varianza
AQPs	Acuaporinas
Ar	Argón
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ATP	Adenosin trifosfato
bar	bares
BER	<i>Blossom-end root</i> o pudrición apical del fruto
BiFC	Complementación de fluorescencia bimolecular
BR	Brasinoesteroides
Ca⁺²	Calcio
CaMs	Calmodulinas
CBLs	Proteínas tipo calcineurina B
CDPKs	Proteínas quinasa dependientes de Ca ²⁺
CDS	Región de codificación del gen
CE	Conductividad eléctrica
CEBAS	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
CSIC	Comité Superior de Investigaciones Científicas
Chl	Clorofila
Cl⁻	Cloro
cm	Centímetros
cm²	Centímetros cuadrados
CO₂	Dióxido de carbono
CR	Crisper
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
CT	Ciclo umbral
cv.	Cultivar
D₂O	Óxido de deuterio
DCF	2'-7'diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
ddH₂O	Agua destilada desionizada
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
DPI	Difenil yodinio
dS	Decisiemens

dT	Desoxitimidina
DTS	Días de tratamiento salino
E	Tasa de transpiración foliar
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EE	Error Estándar
EH	Estrés hídrico
ET	Evapotranspiración
ET	Estrés térmico
F0	fluorescencia mínima
F1	Variedad Jaguar de <i>Solanum lycopersicum</i>
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	Organización para la agricultura y la alimentación de las naciones unidas
Fe	Hierro
Fm	fluorescencia máxima
FOX	Oxidación férrica del xilenol Orange
Fv	Fluorescencia variable
g	Gramos
g	Unidades de fuerza centrífuga
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFP	Proteína verde fluorescente
g_s	Conductancia estomática
h	Horas
H	Humedad
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃BO₃	Ácido bórico
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
HCIO₄	Ácido perclórico
HEK	Riñón embrionario humano
HNO₃	Ácido nítrico
HO·	Radical hidroxilo
HSE	Elemento de estrés por calor
HSF	Factores de choque térmico
HSPs	Proteínas de choque térmico
IBBP	Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología
IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
ICP	Espectrometría de plasma acoplado inductivamente
IPBES	Plataforma Intergubernamental sobre Biodiversidad y Servicios de los Ecosistemas
IPCC	Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
JA	Ácido jasmónico
K⁺	Potasio
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico
KOH	Hidróxido de potasio
Kr	Kriptón
kV	Kilovoltio

L	Litro
LB	Lysogeny Broth
LSD	Diferencia menos significativa
LTPs	Proteínas de transferencia de lípidos
m	Metros
M	Molar
Mb	Megabases
mb	Milibares
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEM	Medio esencial mínimo mejorado
MeOH	Metanol
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
Mg⁺²	Magnesio
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimol
mm	Milímetros
mm⁻²	Milímetros cuadrados
mmol	Milimol
MO	Microscopía óptica
mOsmol	MiliOsmoles (mmol de soluto osmóticamente activo·Kg ⁻¹)
MPa	Megapascales
MS	Murashige y Skoog
mS	Milisiemens
N₂	Nitrógeno
Na⁺	Sodio
NaCl	Cloruro sódico
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	No controladas
ng	Nanogramos
nM	Nanomoles
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
NO₃⁻	Nitrato
O₂^{·-}	Anión superóxido
°C	Grados centígrados
OE	Sobreexpresión
P	P- valor
p/v	Peso/volumen
PAR	radiación fotosintéticamente activa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
PIP	Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática
Pn	Tasa de fotosíntesis
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
PS	Peso seco
PSII	Fotosistema II

PSK	Fitosulfokina
QTLs	Locus de rasgos cuantitativos
RAERM	Red de Agroecología y Ecodesarrollo de la Región de Murcia
RBOHs	<i>Respiratory Burst Oxidase Homologs</i>
RE	Retículo endoplasmático
RLT	lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación
RLU	Unidades de Luz Relativa
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de hidrógeno
RT-qpCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s	Segundos
SB	Borato de sodio
SC	Semicontroladas
SEAF	Servicio de experimentación agroforestal de la Universidad de Murcia
SNP	Polimorfismos de nucleótido simple
SPAD	<i>Soil Plant Analysis Development</i> o Desarrollo de Análisis Suelo-Planta
T^a	Temperatura
TAE	Tris, acetato y EDTA
TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
T-DNA	<i>Transferred DNA</i> o ADN transferido
TE	Equivalentes trolox
TF	Factores de transcripción
TIP	proteínas intrínsecas del tonoplasto
U	Unidad
UAL	Universidad de Almería
UBI10	Ubiquinona-10
UBQ10	Ubiquinona-10
UDP	Uridina Difosfato
UM	Universidad de Murcia
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento
UPV	Universidad politécnica de Valencia
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
V	Volumen
v/v	Volumen/volumen
W	váticos
WT	Tipo salvaje (Wild type)
YEB	<i>Yeast Extract Broth</i>
ZA	Zona de abscisión
β -ME	Beta mercaptoetanol
Δ	Incremento
μg	microgramos
μL	microlitros
μM	micromolar
μmol	Micromoles
Ψ_w	Potencial hídrico
Ψ_π	Potencial osmótico

Índice de figuras

Figura 1. El estrés abiótico afecta los procesos fisiológicos clave para el desarrollo de las plantas, incluido el estrés osmótico, el estrés oxidativo, el estrés iónico y nutricional, así como los cambios anatómicos.....	41
Figura 2. Esquema de los efectos del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas. Las condiciones de salinidad y sequía causan un estrés osmótico y un estrés iónico.....	45
Figura 3. Sistemas de transporte de Ca ²⁺ en las células de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
Figura 4. Principales fuentes de ROS en células vegetales.....	52
Figura 5. Las temperaturas altas moderadas o extremas afectan el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos	55
Figura 6. Aspecto del porte (a), ápice (b), hojas (c), racimos florales (d), flores (e) y racimos de frutos (f) del cultivar de tomate Moneymaker.....	61
Figura 7. Valor exportado por país y su participación en las exportaciones mundiales	62
Figura 8. El tomate es un buen modelo para estudiar el transporte a larga distancia del ión tóxico Na ⁺	64
Figura 9. Desarrollo del fruto de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)..	66
Figura 10. Estructura esquemática de CBL y CIPK y el complejo CBL-CIPK. a) Molécula CBL con cuatro manos EF y el sitio de fosforilación PFPF en el extremo C-terminal.	73
Figura 11. Modelo de la ruta SOS para las respuestas de estrés salino	74
Figura 12. Principales proteínas de transporte implicadas en la absorción, transporte y compartimentación de Na ⁺ en la planta.....	79
Figura 13. Representación esquemática del funcionamiento de la proteína RBOH en plantas durante una respuesta de estrés	82
Figura 14. Modelo propuesto para la función de CBL10.....	84
Figura 15. Visión general de los sistemas de cultivo hidropónico empleados en la cámara de cultivo de condiciones controladas del CEBAS – CSIC	99
Figura 16. Visión general del cultivo en el invernadero de condiciones no controladas	102
Figura 17. Visión general del cultivo en el invernadero de condiciones semi controladas.....	104
Figura 18. Generación de plantas injertadas.	105
Figura 19. Desarrollo vegetativo y reproductivo de plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen <i>SICBL10</i> desarrolladas en invernadero de condiciones no-controladas durante primavera-verano	140
Figura 20. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas en los invernaderos de condiciones no-controladas y semi-controladas (SC) durante primavera-verano	142
Figura 21. Desarrollo reproductivo de plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen <i>SICBL10</i> desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano.....	143
Figura 22. Alteraciones fenotípicas de las plantas que tienen silenciado el gen <i>SICBL10</i> desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano....	144

Figura 23. Concentraciones de Ca ²⁺ en las plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen <i>SICBL10</i> desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano.	145
Figura 24. La sobreexpresión del gen <i>SICBL10</i> aumenta el número de frutos con la salinidad.	147
Figura 25. Efecto de la salinidad sobre los caracteres relacionados con la pérdida de agua a través de las hojas y los contenidos de agua en diferentes partes de la planta.....	149
Figura 26. Cambios inducidos por el silenciamiento y sobreexpresión de <i>SICBL10</i> en las concentraciones de Na ⁺ , K ⁺ y relación Na ⁺ /K ⁺	150
Figura 27. La sensibilidad a la sal de las plantas injertadas solo se observa cuando el mutante <i>Slcbl10</i> se usa como parte aérea pero no como portainjertos.....	152
Figura 28. Expresión relativa del gen <i>SICBL10</i> en raíces de mutantes <i>Slcbl10</i> , líneas RNAi y OE. Los valores son la media de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una.....	153
Figura 29. Las plantas injertadas no muestran sensibilidad a la sal cuando se utilizan líneas silenciadas <i>SICBL10</i> como portainjertos, mientras que se observa una alta sensibilidad a la sal cuando se sobreexpresa	154
Figura 30. La regulación a la baja del gen <i>SICBL10</i> en portainjertos aumentó la producción de frutos, mientras que se observó lo contrario cuando se sobreexpresó <i>SICBL10</i>	155
Figura 31. La regulación a la baja del gen <i>SICBL10</i> en el portainjertos redujo el contenido de Na ⁺ y aumentó el contenido de K ⁺ en las plantas injertadas, mientras que la sobreexpresión de <i>SICBL10</i> mostró la respuesta opuesta	157
Figura 32. Cambios inducidos en el patrón de expresión de genes clave implicados en la homeostasis de Na ⁺ y K ⁺ cuando se utilizaron portainjertos que silenciaban y sobreexpresaban el gen <i>SICBL10</i>	158
Figura 33. Cambios inducidos en los niveles de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na ⁺ en hojas de plantas WT autoinjertadas y WT injertadas en mutante <i>Slcbl10</i> y línea OE.	159
Figura 34. <i>SICBL10</i> interactúa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con LKT1	160
Figura 35. Temperaturas máximas y mínimas diarias en los experimentos de invernadero realizados en condiciones no controladas (NC) y semicontroladas (SC). Los valores medios se calcularon antes y durante el período de cosecha.....	162
Figura 36. El injerto de plantas WT en portainjertos <i>Slcbl10</i> o RNAi mejoró el rendimiento de frutos con respecto a las plantas no injertadas	163
Figura 37. La tolerancia a la sal inducida por el portainjerto <i>SICBL10</i> en un híbrido comercial (F1) en términos de rendimiento de frutos es mayor en condiciones de cultivo más extremas.	164
Figura 38. El rendimiento en fruto de las plantas que sobreexpresan el gen <i>SICBL10</i> está afectado por las condiciones ambientales del invernadero	166
Figura 39. La sobreexpresión del gen <i>SICBL10</i> reduce el rendimiento bajo estrés por alta temperatura (ET) y aumenta con la combinación de ET y estrés hídrico.....	167
Figura 40. Cambios en los contenidos de agua inducidos por la expresión del gen <i>SICBL10</i>	169
Figura 41. Las mutaciones <i>sodgat</i> afectan al gen <i>SIRBOHG</i>	189
Figura 42. La sensibilidad a la sal mostrada por los mutantes <i>sodgat1</i> y <i>sodgat2</i> está relacionada con una mayor acumulación de Na ⁺ y alta relación Na ⁺ /K ⁺ en la parte aérea de las plantas cultivadas <i>in vitro</i>	191

Figura 43. El fenotipo de hipersensibilidad a la sal de los mutantes <i>sodgat1</i> y <i>sodgat2</i> se observa rápidamente cuando las plantas se desarrollan en cultivo hidropónico.....	192
Figura 44. Expresión espacial y temporal del gen <i>SIRBOHG</i>	193
Figura 45. Efecto de la salinidad sobre los contenidos de agua en diferentes partes de la planta y los caracteres relacionados con la pérdida de agua a través de las hojas	194
Figura 46. La disrupción de <i>SIRBOHG</i> promueve un transporte masivo de Na ⁺ desde la raíz a la parte aérea bajo condiciones salinas.....	195
Figura 47. Expresión de genes de acuaporinas en WT y mutantes <i>sodgat1</i> y <i>sodgat2</i>	196
Figura 48. Cambios inducidos por la salinidad en la expresión de genes de acuaporinas en WT y mutantes <i>sodgat1</i> y <i>sodgat2</i>	197
Figura 49. La disrupción de <i>SIRBOHG</i> altera la expresión de genes involucrados en la homeostasis Na ⁺ /K ⁺	198
Figura 50. Producción de H ₂ O ₂ en condiciones <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	199
Figura 51. Fenotipo de las plantas de tomate (WT) y mutante <i>sodgat1</i> desarrolladas en invernadero durante primavera-verano de 2020.....	201
Figura 52. A nivel reproductivo, la sensibilidad a la sal del mutante <i>sodgat1</i> se refleja principalmente en el alto porcentaje de abscisión de los frutos, lo que provoca indirectamente la reducción del cuajado del fruto	202
Figura 53. Fenotipo y estado de desarrollo de las plantas WT y mutante <i>sodgat1</i> cuando se trasplantan a invernadero y se inicia la aplicación de los tratamientos salinos durante primavera-verano de 2022	204
Figura 54. La clorosis inducida por la salinidad en el mutante <i>sodgat1</i> se incrementa con el nivel de estrés salino.	205
Figura 55. A nivel vegetativo, la mayor altura del mutante se debe a la mayor distancia entrenudos y no al mayor n° de hojas	206
Figura 56. Las flores del mutante <i>sodgat1</i> muestran mayor grado de clorosis e incluso quemaduras en algunos órganos debido a la salinidad.....	208
Figura 57. Las flores del mutante <i>sodgat1</i> muestran cambios en el pedicelo de la flor y en la zona de abscisión provocados por la salinidad	209
Figura 58. Los cambios en la zona de abscisión de las flores del mutante <i>sodgat1</i> se deben a una degradación celular en la parte distal inducida por la salinidad.....	210
Figura 59. A nivel reproductivo, el principal efecto inducido por la salinidad en el mutante <i>sodgat1</i> es la elevada abscisión de las flores.....	211
Figura 60. La salinidad induce un adelanto de la maduración en los frutos del mutante <i>sodgat1</i>	213
Figura 61. El mutante <i>sodgat1</i> reduce el rendimiento en fruto.....	214
Figura 62. La resistencia a la compresión es menor en el mutante <i>sodgat1</i> en condiciones de salinidad	215
Figura 63. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas de tomate (WT) y mutante <i>sodgat1</i>	217
Figura 64. El contenido en clorofila en WT y mutante <i>sodgat1</i> es independiente del año de cultivo.....	218
Figura 65. La abscisión de flores en WT y mutante <i>sodgat1</i> es independiente del año de cultivo.	219

Figura 66. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas de tomate (WT) y mutante <i>sodgat1</i>	220
Figura 67. El contenido de clorofila en WT y mutante <i>sodgat1</i> es independiente de las condiciones de cultivo	221
Figura 68. Las condiciones de cultivo influyen en el porcentaje de abscisión de flores del mutante <i>sodgat1</i> cuando las plantas se desarrollan en sal.....	223
Figura 69. Cantidad de sal (mmol NaCl/planta) adicionada a través de la disolución de riego en los invernaderos de condiciones semi-controladas (SC) y no-controladas (NC)	224
Figura 70. El mutante <i>sodgat1</i> altera la morfología de la hoja (aumenta el tamaño celular de la hoja y disminuye la densidad celular) tanto en control como en estrés salino.....	226
Figura 71. El mutante <i>sodgat1</i> reduce el potencial osmótico y la pérdida de agua por transpiración en condiciones salinas.	227
Figura 72. El mutante <i>sodgat1</i> reduce la pérdida de agua foliar vía reducción de la apertura y densidad estomática	228
Figura 73. La disrupción de <i>SIRBOHG</i> promueve un transporte masivo de Na ⁺ y agua desde la raíz a la parte aérea en condiciones salinas	230
Figura 74. La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca un aumento del contenido de agua y Na ⁺ en salinidad a nivel reproductivo	231
Figura 75. La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca alteraciones en los contenidos de AIA y ABA en hoja y flor	232
Figura 76. La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca un aumento de azúcares en hoja y reducción en flor y fruto verde.....	233
Figura 77. La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca un aumento de ácidos orgánicos en hoja y reducción en flor y fruto verde.....	234
Figura 78. La disrupción del gen <i>SIRBOHG</i> provoca un aumento de aminoácidos en hoja y reducción en flor y fruto verde.....	235
Figura 79. Genes ortólogos a <i>SICBL1</i> , <i>SICBL9</i> y <i>SICBL10</i> en <i>Arabidopsis</i>	236
Figura 80. Genes ortólogos a <i>SICIPK6</i> , <i>SICIPK11</i> , <i>SICIPK17</i> , <i>SICIPK20</i> , <i>SICIPK23</i> y <i>SICIPK24</i> en <i>Arabidopsis</i>	237
Figura 81. Coexpresión de CIPKs de tomate con <i>SICBL1</i>	240
Figura 82. Coexpresión de CIPKs de tomate con <i>SICBL9</i>	242
Figura 83. Coexpresión de CIPKs de tomate con <i>SICBL10</i>	243
Figura 84. Localización subcelular de la proteína RBOHG de <i>Arabidopsis</i> y tomate en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> bajo control del promotor inducido por β -estradiol, sXVE	245
Figura 85. Localización subcelular de la proteína <i>SIRBOHG</i> de <i>Arabidopsis</i> y tomate en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> bajo control del promotor constitutivo UBQ10	246

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio de germinación de semillas.....	96
Tabla 2. Composición de la solución nutritiva utilizada para el riego en cámara de cultivo.	97
Tabla 3. Composición de la solución nutritiva usada para el riego en el invernadero.....	101
Tabla 4. Plásmidos cedidos por el grupo de la UAL.	113
Tabla 5. Primers usados almacenados en el lab. AG Kudla.....	114
Tabla 6. Esqueletos de vectores empleados para el clonaje de los genes de interés.....	115
Tabla 7. Composición de la mezcla de PCR.....	116
Tabla 8. Mezcla de digestión de restricción	117
Tabla 9. Reacción de ligación.....	118
Tabla 10. Números de accesión de las secuencias de nucleótidos.....	120
Tabla 11. Componentes usados en la transfección de células HEK	122
Tabla 12. Tampones de reacción e inyección	123
Tabla 13. Combinaciones de cultivos coinfiltrados en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	124
Tabla 14. Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de ADNc.....	128
Tabla 15. Programa del termociclador para la síntesis de ADNc.	128
Tabla 16. Mezcla de reacción final para la RT-qPCR.	128
Tabla 17. Condiciones programadas en el termociclador para la reacción de RT-qPCR.....	129
Tabla 18. Parejas de cebadores empleados en las RT-qPCRs.....	130
Tabla 19. Número de racimos y de flores de WT y mutante <i>Sodgat1</i> a los 50 días	207
Tabla 20. Análisis multivariante univariado para clorofila en hojas de WT y mutante <i>sodgat1</i>	218
Tabla 21. Análisis de la multivariante univariado para abscisión de flores (%) en plantas WT y mutante <i>sodgat1</i>	219
Tabla 22. Análisis multivariante univariado para clorofila en hojas de WT y mutante <i>sodgat1</i>	221
Tabla 23. Análisis multivariante univariado para la abscisión de flores de los cuatro primeros racimos de WT y mutante <i>sodgat1</i>	222

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Cambio climático y problemática del estrés abiótico

A lo largo de la historia de nuestro planeta, el sistema climático terrestre ha experimentado cambios graduales o abruptos debido a los fenómenos ambientales y procesos naturales internos. Sin embargo, el cambio climático actual se atribuye principalmente a causas antropogénicas que alteran la composición de la atmósfera y el uso del suelo. El aumento del efecto invernadero es debido a la emisión de gases contaminantes que absorben la radiación solar y la irradian en todas direcciones, lo cual está desencadenando un calentamiento global que aumenta a un ritmo sin precedentes imposible de achacar únicamente a causas naturales (Zhao et al., 2022). Además de un calentamiento global, el cambio climático también trae consigo una gran inestabilidad y fenómenos meteorológicos extremos de muchos tipos que ya afectan perjudicialmente a todos los seres vivos del planeta en mayor o menor medida.

Las plantas sufren un aumento de la frecuencia y la severidad de los estreses abióticos únicos, combinados e incluso secuenciales, siendo los efectos más evidentes unas temperaturas más cálidas, episodios más frecuentes de calor extremo, mayores condiciones de sequía y desertificación, y tormentas e inundaciones más frecuentes y extremas en algunas regiones, además del aumento del CO₂ que también influye directamente en la forma en que las plantas hacen frente a estos estreses (IPCC, 2019; Eckardt et al., 2023). Además, la mayor frecuencia de eventos climáticos extremos se ve agravada por posibles aumentos o cambios en la distribución de plagas y enfermedades en muchas regiones (Pangga et al., 2011; Juroszek y von Tiedemann, 2013).

Por si fuera poco, las Naciones Unidas estiman que la población humana que ahora es de 7.700 millones de personas alcanzará los 9.700 millones para 2050 (Naciones Unidas, 2019). Este enorme aumento de la población en tan poco tiempo sumado a la problemática ambiental actual compromete seriamente a la agricultura siendo necesaria una producción un 70% superior con recursos cada vez más escasos (FAOSTAT, 2020). Este preocupante escenario se agudiza en zonas áridas y semiáridas como la cuenca del Mediterráneo, actualmente una de las zonas más densamente pobladas del planeta y un conocido polo agrícola a nivel mundial. Para garantizar tanto la seguridad alimentaria como la del ecosistema, es imperativo diseñar y generar futuros cultivos para la agricultura sostenible maximizando la producción y minimizando los impactos adversos en el medio ambiente (Tian et al., 2022). Es por ello, que la investigación para comprender cómo responden las plantas a los estreses abióticos como salinidad, sequía, altas temperaturas, congelación, inundaciones, etc. será vital para satisfacer las necesidades alimentarias de las futuras generaciones.

2. Impacto de los estreses abióticos

Conforme los eventos de frío tardío y calor temprano se superponen, junto con el mayor riesgo de lluvias extremas o déficit de agua, aumenta la probabilidad de que ocurran

múltiples eventos de estrés juntos o en rápida sucesión (Eckardt et al., (2023). De hecho, en algunas localidades geográficas, las mejoras genéticas en el rendimiento no están compensando las pérdidas atribuidas al cambio climático (Hochman et al., 2017). Para comprender mejor los efectos causados por los estreses abióticos, debemos conocer los riesgos individuales planteados, así como la naturaleza integradora de los estreses y las respuestas que las plantas llevan a cabo. El estrés abiótico altera la homeostasis de las plantas, afectando a diferentes procesos fisiológicos involucrados en el desarrollo de la planta, induciendo estrés osmótico, estrés oxidativo, estrés iónico y estrés nutricional, así como cambios anatómicos entre otros (**Figura 1**).

Se estima que la sequía es responsable de aproximadamente la pérdida del 45% de producción agrícola a nivel global (Hein et al., 2021). La producción de trigo caerá hasta un 7% en un escenario de calentamiento de 1,5°C y hasta un 11% en un escenario de 2°C (Liu et al., 2019; Zaveri y Lobell, 2019), mientras que las pérdidas en rendimiento para el maíz a finales de siglo se estiman un 6% superiores que el riesgo histórico (especialmente en india), superiores al 16% en soja, y al 19,5% en arroz (Leng y Hall, 2019). Por otro lado, un 40% del área mundial está afectada por la salinidad, que se caracteriza por la presencia de una alta concentración de sales solubles en el suelo o el agua de riego cuando la conductividad eléctrica (CE) es igual o superior a 4,0 dS·m⁻¹, equivalente aproximadamente a 40 mM NaCl (Munns y Tester, 2008). Especialmente zonas altamente productivas como California, sur de Asia y gran parte del área Mediterránea (incluyendo el Valle del Ebro, Alicante, Murcia y Almería) y la franja atlántica de la costa marroquí ya se ven especialmente afectadas (FAOSTAT, 2016) y se espera que las tasas de salinización del suelo se incrementen por los eventos climáticos extremos actuales, llegando a provocar la pérdida del 30% de la tierra de cultivo en los próximos 25 años, y hasta el 50% para el año 2050 (Wang et al., 2003; IPBES, 2018). El aumento del riesgo de sequía en las regiones con niveles freáticos poco profundos conducirá a una mayor salinidad superficial debido a la evapotranspiración (ET) y al ascenso capilar en los suelos. Por el contrario, los eventos extremos de humectación aumentan las tasas de meteorización, elevando los niveles de sal en los ríos y arroyos, y posteriormente en los campos de frecuente irrigación. El aumento de las precipitaciones también hará que aumenten los niveles freáticos, lo que traerá sal a la superficie y aumentará la salinidad al secarse. La mayor necesidad de agua de riego en suelos cada vez más áridos basada en acuíferos también plantea un riesgo al aumento de la salinidad; el exceso de extracción de agua de pozos y la sobreexplotación de estos en áreas costeras o adyacentes a acuíferos salinos aumenta el movimiento de agua de estas fuentes subsuperficiales salinas, salinizando los acuíferos. Esto se ve exacerbado en las regiones costeras por aumentos esperados del nivel del océano y debido al uso de elevadas cantidades de fertilizantes (Munns, 2005; Corwin, 2021).

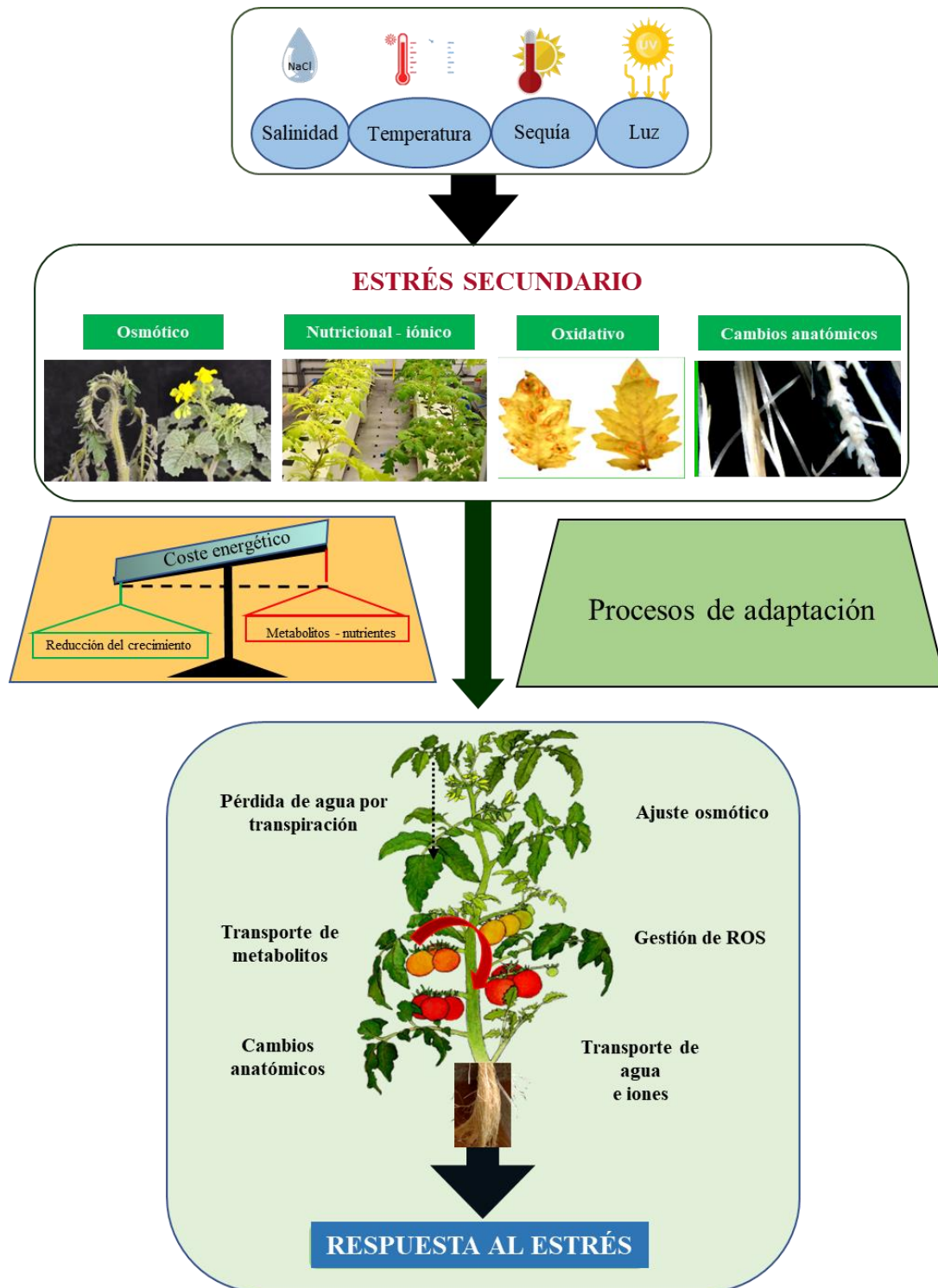


Figura 1. El estrés abiótico afecta los procesos fisiológicos clave para el desarrollo de las plantas, incluido el estrés osmótico, el estrés oxidativo, el estrés iónico y nutricional, así como los cambios anatómicos. Son necesarios diferentes procesos de adaptación para recuperar el crecimiento de las plantas, lo que implica un gasto energético provocado por el uso parcial de metabolitos y nutrientes para la recuperación de la homeostasis en lugar de la recuperación del crecimiento. La respuesta de la planta al estrés abiótico se puede observar a lo largo del ciclo de vida de la planta, reflejándose principalmente en la reducción del rendimiento de los frutos después del estrés a largo plazo.

En cuanto al estrés térmico, la forma en que responde el rendimiento de los cultivos es compleja, ya que un aumento moderado de la temperatura puede causar cambios

rápida y reversiblemente, mientras que los episodios severos de temperaturas elevadas son irreversibles y pueden resultar en pérdidas severas de producción (Mesa et al., 2022). Además, para algunos cultivos la disminución de producción ocurre cuando la temperatura supera un nivel específico, mientras que esto puede aumentar el rendimiento de otros cultivos en climas más fríos donde la temperatura óptima no se alcanza frecuentemente (Porter y Gawith, 1999; Teixeira et al., 2013; Sánchez et al., 2014; Asseng et al., 2015; Zhao et al., 2016). No obstante, en el escenario actual, generalmente, la alta temperatura causa una reducción a nivel mundial en el rendimiento de los principales cultivos. Wang et al. (2020) cuantificaron con más del 95% de certeza una reducción del rendimiento en arroz, maíz y soja estimado en 5,6%, 7,1% y 10,6% de pérdidas, respectivamente, por cada 1°C de calentamiento global, y 89% de probabilidad de pérdida en trigo del 2,9% por cada 1°C. Bajo un escenario de calentamiento global de 2°C, el efecto neto de la temperatura en la producción de cultivos principales se estimó en una pérdida que oscila entre el 3 % y el 13 %. Por otro lado, el aumento de la variación de la temperatura también ocasionará mayor riesgo de heladas para algunos cultivos, especialmente en Europa y Asia (Zohner et al., 2020).

3. Mecanismos de tolerancia a estreses abióticos

Los estreses en las plantas causan cambios físicos o químicos en las biomoléculas de la célula vegetal, lo que desencadena la respuesta y los mecanismos de tolerancia al estrés celular. Cuando el estrés es percibido, se producen variaciones en los segundos mensajeros como el Ca^{2+} , las ROS, el óxido nítrico y los fosfolípidos y se activan cascadas enzimáticas de señalización que culminan en la activación de proteínas diana involucradas en la protección de la célula o factores de transcripción que regulan genes de respuesta al estrés (Zhang et al., 2022). Esa señalización coordina la reprogramación metabólica necesaria para alcanzar la homeostasis hídrica, iónica, nutricional así como la estabilidad celular.

3.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía

Tanto la sequía como la salinidad causan una reducción del potencial hídrico del suelo, que afecta a la planta como un estrés osmótico y esta pierde su capacidad de absorción por la raíz (**Figura 2**). En estas circunstancias, las plantas necesitan contar con distintos procesos de adaptación para mantener su crecimiento en situaciones de estrés abiótico, entre ellos la restauración de la homeostasis osmótica. Las respuestas a nivel morfológico, fisiológico y molecular incluyen la reducción del turgor, del volumen de células, la alteración de la actividad enzimática, la alteración de la fotosíntesis, la producción de ROS (que a su vez causa un estrés oxidativo) y deficiencias nutricionales (estrés nutricional).

Un mecanismo clave para evitar el estrés osmótico es la capacidad de reducir las pérdidas de agua a través de las hojas inhibiendo la transpiración estomática y cuticular. La transpiración de las hojas parece estar regulada no solo por el cierre estomático sino también por el control de la densidad estomática. El cierre estomático está mediado por

el ácido abscísico (ABA), una fitohormona sintetizada en condiciones de estrés por déficit hídrico. La síntesis, acumulación y transporte desde otros tejidos de ABA a las células guarda de los estomas es inducida por el estrés osmótico y promueve el cierre estomático al regular los componentes de señalización aguas abajo (Liu et al., 2022). Como consecuencia del cierre estomático también disminuye la asimilación de CO₂, lo que causa una reducción de la tasa fotosintética. Además, debido a que los poros cuticulares se concentran principalmente en el área alrededor de los estomas, un menor número de estomas completamente abiertos es una mejor estrategia para prevenir la pérdida de agua que tener muchos parcialmente cerrados, ya que no se puede controlar la transpiración a través de los poros cuticulares (Franks et al., 2015). En *Solanum pennelli*, una especie de tomate silvestre tolerante, Albaladejo et al. (2017) demostraron que la pérdida de agua estaba regulada no solo por el cierre estomático sino también por la densidad estomática.

Además de la regulación de la transpiración, otros mecanismos importantes tienen como objetivo regular el movimiento del agua a través de las membranas celulares. Las acuaporinas se consideran los principales canales de proteínas para el transporte de agua y otras moléculas pequeñas a través de las membranas de las células vegetales (Moshelion et al., 2015). La expresión de las isoformas de acuaporina, especialmente aquellas que pertenecen a las subfamilias de proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIP) y proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), se modula en respuesta al estrés abiótico (Qian et al., 2015; Ahmed et al., 2021). Curiosamente, se encontró una mayor expresión basal de acuaporina PIP2;1 en hojas de *S. pennelli* tolerantes a la sal, lo que podría explicar su mejor estado hídrico en condiciones de salinidad (Albaladejo et al., 2017). De hecho, la sobreexpresión de PIP2;1 se ha relacionado con un mayor contenido de agua en las hojas de plantas de tomate transgénicas (Li et al., 2016). Dado que el agua es esencial para la reproducción de las plantas y para mantener la turgencia y el crecimiento de las células, es fundamental aclarar si el suministro de agua se prioriza hacia los tejidos vegetativos o reproductivos durante el estrés abiótico. En el tomate, el agua representa más del 90% de la masa de frutos maduros, y el crecimiento volumétrico de sus frutos se debe principalmente a la acumulación de agua. Cualquier agua que se suministre a los tejidos reproductivos debe suministrarse a través del xilema o del floema, aunque la contribución relativa de estos dos tipos de tejidos vasculares a la absorción de agua de las flores y los frutos aún no está resuelta y es controvertida. Recientemente, Harrison-Day et al. (2021) demostraron que las plantas de tomate priorizan el suministro de agua a los tejidos reproductivos, asegurando que el desarrollo del fruto continúe en condiciones de sequía.

El ajuste osmótico es otro mecanismo vital que permite el mantenimiento de la absorción de agua y la turgencia celular en condiciones de crecimiento estresantes (**Figura 2**). Bajo estrés por sequía, los solutos orgánicos, junto con K⁺ y NO₃⁻, son los más importantes que contribuyen al ajuste osmótico, mientras que bajo estrés por salinidad los osmolitos más importantes son los solutos inorgánicos, especialmente los iones salinos Na⁺ y Cl⁻ debido a su acumulación dentro de la planta (Muñoz-Mayor et al., 2012), sin embargo cuando se acumulan en altas concentraciones dan lugar a un efecto citotóxico, por lo que la planta sintetiza y acumula diferentes metabolitos en el citoplasma para aumentar su tolerancia

osmótica frente a la pérdida de agua, disminuyendo el potencial osmótico para mantener la turgencia celular. Entre ellos se incluyen numerosos solutos orgánicos: alcoholes (glicerol, inositoles metilados), polioles, azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), monosacáridos o azúcares solubles (fructosa y glucosa), ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, málico, etc.) aminoácidos y compuestos de amonio cuaternario (prolina, glicina, alanina betaína) (Caretto et al., 2015). A diferencia iones salinos, estos solutos no son tóxicos para la célula ni interfieren con el metabolismo, acumulándose en el citosol donde además estabilizan proteínas y estructuras celulares, pero debemos considerar que energéticamente es mucho más caro utilizar solutos orgánicos para el ajuste osmótico que los iones inorgánicos provenientes del sustrato o de la solución de fertirrigación (Munns et al., 2019).

Aparte de los osmolitos, existen otras familias de proteínas sintetizadas en condiciones de estrés y asociadas a la tolerancia a este. Las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) y las dehidrininas (una subfamilia de proteínas LEA) se acumulan en los tejidos vegetativos de las plantas en respuesta a estrés, actuando como chaperonas previniendo la desnaturalización de otras proteínas (Muñoz-Mayor et al., 2012). Otras proteínas sintetizadas en situación de estrés osmótico son las osmotinas, cuya función es similar a la de las proteínas LEA (Tester y Davenport, 2003), poliaminas, proteasas, fosfatasas, kinasas y enzimas involucradas en la eliminación de ROS, factores de transcripción, proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs), proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) (Leisner et al. 2023).

La alta demanda de energía para producir los osmolitos puede alterar la compensación entre el crecimiento de la planta y la tolerancia, de tal manera que es compensada con una reducción en el crecimiento de la planta. La teoría de la asignación en fisiología vegetal supone que los individuos tienen un suministro limitado de recursos esenciales, que deben dividir entre diferentes funciones fisiológicas en competencia, como el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción (Caretto et al., 2015). Este uso múltiple de recursos limitados inevitablemente genera compensaciones en la asignación de recursos.

3.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad.

El principal efecto inducido por la salinidad a largo plazo tras el estrés osmótico es el estrés iónico (**Figura 2**) (Hasegawa, 2013). La toxicidad iónica por exceso de Na^+ ocurre en la mayoría de las plantas, ya que este catión interfiere directamente con los sitios de unión de K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} . El desplazamiento del K^+ es uno de los efectos más importantes debido a la alta similitud química entre el Na^+ y el K^+ , de modo que ante un exceso de Na^+ suele ocurrir una deficiencia de K^+ que interfiere en su absorción y movimiento mediado por los transportadores de K^+ , tanto de alta como de baja afinidad (Nieves-Cordones et al., 2010).



Figura 2. Esquema de los efectos del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas. Las condiciones de salinidad y sequía causan un estrés osmótico y un estrés iónico. De ellos se derivan varios efectos secundarios para los que las plantas desarrollan respuestas adaptativas con el fin de hacer frente a los estreses.

El exceso de iones de Na^+ tiene un efecto negativo en varios procesos metabólicos y enzimáticos dentro de una planta, incluyendo la fotosíntesis y la absorción de dióxido de carbono a través de los estomas, además de la producción de estrés oxidativo, y la inhibición del crecimiento general de la planta que en caso de severidad extrema puede provocar incluso la muerte de la planta (Munns y Tester, 2008). La capacidad de una planta para mantener un equilibrio adecuado de iones en su interior es crucial para su

supervivencia en situaciones de estrés iónico. Ni las plantas glicófitas, ni las halófitas pueden tolerar altas concentraciones de Na^+ en el citosol (Hasegawa, 2013).

Las plantas presentan tres estrategias diferentes para enfrentarse al exceso de iones salinos. La primera de estas estrategias, conocida como ‘exclusión’, es típica de las plantas glicófitas, que son más sensibles a la presencia del ion Na^+ y su acumulación en la parte aérea de la planta. La estrategia consiste en reducir la acumulación de iones salinos mediante su eliminación hacia el exterior (hasta el 95% de los iones Na^+ absorbidos) o su almacenamiento en las vacuolas presentes en las raíces. La capacidad de exclusión se debe a la regulación del flujo neto de absorción de Na^+ (que depende del equilibrio unidireccional entre la entrada y la salida de iones al exterior) y a la regulación de su transporte hacia la parte aérea de la planta, lo que restringe la acumulación de Na^+ a las vacuolas o a las células proximales del tallo en orgánulos celulares para evitar concentraciones tóxicas en el citoplasma de las células de las hojas (Egea et al., 2022). La segunda estrategia es utilizada por plantas glicófitas tolerantes y halófitas, y se conoce como ‘inclusión’. Esta estrategia implica la capacidad de acumular iones de Na^+ en los tejidos de la parte aérea de la planta, como tallos y hojas. Para lograr esto, se requiere una regulación adecuada de la absorción de iones por la raíz y su transporte a la parte aérea, donde la compartimentación subcelular previene la toxicidad iónica y ayuda a mantener el equilibrio osmótico (Albaladejo et al., 2017). Por último, una tercera estrategia observada en algunas especies halófitas implica el almacenamiento de grandes cantidades de sal en células especializadas externas similares a los tricomas, llamadas células epidérmicas vesiculares. Estas células son capaces de almacenar hasta 1,000 veces más iones de Na^+ que una vacuola normal de la célula de la hoja y tienen un diámetro aproximadamente 10 veces mayor que una célula epidérmica típica (Shabala et al., 2014).

La existencia de diferentes estrategias permite la mejor respuesta al estrés iónico en función de la especie y las condiciones ambientales que esta soporta. Así, la exclusión de Na^+ de la hoja puede ser una estrategia que funciona bien en lugares con mucha lluvia, donde hay poca limitación de agua y se excluye el Na^+ para evitar cualquier daño a la planta. Sin embargo, en áreas de poca lluvia, donde el agua es limitada, una mayor concentración de Na^+ en el tejido de la hoja ayudará a reducir el potencial hídrico de la hoja y ayudará con la absorción de agua del ambiente de poca lluvia, promoviendo el crecimiento (ver respuesta al estrés osmótico en apartado 3.1). Recientemente se ha descubierto que las accesiones de trigo harinero, cebada y *Arabidopsis* acumulan altas concentraciones de Na^+ en las hojas sin penalizar la biomasa o el rendimiento (An et al., 2017; Busoms et al., 2018; Borjigin et al., 2020; Houston et al., 2020), y una acumulación moderada de Na^+ en el tejido de la hoja puede mejorar la producción de biomasa (Genc et al., 2019). Además, se ha observado que la absorción de Na^+ en genotipos tolerantes no era proporcional a la salinidad externa, sino que se reducía a niveles altos de salinidad o durante una exposición prolongada al estrés salino (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008). Es necesario considerar que los mecanismos para tolerar niveles potencialmente tóxicos de Na^+ en los tejidos foliares son eficientes hasta cierto nivel de

salinidad, hasta que se excede el límite de tolerancia al Na^+ citoplasmático (Flowers et al., 2010).

Independientemente de la naturaleza de la planta, la homeostasis iónica se regula mediante transportadores de membrana con el fin de evitar que se exceda la concentración de Na^+ citoplasmático tóxica. Entre estos transportadores se encuentra SOS1 (*Salt Overly Sensitive 1*), que extruye Na^+ fuera de la raíz y facilita su carga en el xilema, y HKT1 (transportador de K^+ de alta afinidad 1), involucrado en la recuperación de Na^+ del xilema bajo estrés salino, así como NHX1 (Na^+/H^+ intercambiador 1), involucrado en la compartimentación vacuolar de Na^+ (Munns et al., 2012; Nieves-Cordones et al., 2016; Jaime-Pérez et al., 2017). La acumulación de Na^+ provoca una importante alteración en la homeostasis del K^+ , de tal forma que la relación Na^+/K^+ ha sido considerada como un índice de la tasa de tolerancia a la sal no solo en glicófitas sino también en halófitas (Cai y Gao, 2020; Kiani-Pouya et al., 2020).

Recientemente se han descrito nuevos aspectos de la vía de hipersensibilidad a la sal (SOS). Fu et al. (2023) muestran que las proteínas fosfatasa del Clado D inhiben el antiportador SOS1 Na^+/H^+ en ausencia de estrés salino, pero se eliminan en respuesta a la sal para permitir que SOS1 se active por fosforilación. Parque et al. (2023) muestran que la S-acetilación y la importación nuclear de SOS3 (CBL4) estabiliza y promueve la localización nuclear del regulador del tiempo de floración Gigantia (GI) y, por lo tanto, acelera la floración durante el estrés salino. Estos resultados proporcionan un nuevo mecanismo molecular que subyace al antiguo concepto de escape del estrés. En este caso, la floración más temprana puede permitir que las plantas escapen de algunos de los efectos perjudiciales del estrés salino al completar la floración y la producción de semillas antes de que la sal induzca el daño.

A pesar de los numerosos estudios relacionados, los mecanismos que rigen la respuesta al estrés salino no están completamente caracterizados, especialmente porque estos mecanismos de tolerancia pueden variar ampliamente durante el desarrollo de la planta y posiblemente también estén influenciados por el nivel de estrés salino (Egea et al., 2023).

3.3. Respuesta al estrés nutricional inducido por estreses abióticos

Como se ha mencionado, la problemática ambiental actual que acentúa otros estreses abióticos, también ocasiona la variación en los nutrientes disponibles para las plantas en el suelo. Los nutrientes minerales tienen un papel muy importante en numerosos aspectos metabólicos, en el crecimiento y el desarrollo de la planta, y determinados rangos de concentraciones de cada uno de ellos son indispensables para el correcto desarrollo de la planta, por lo que existe un amplio espectro de respuestas que las plantas ponen en marcha para hacer frente al estrés por nutrientes. El estrés por nutrientes puede resultar por bajos niveles de disponibilidad del elemento o por la presencia de concentraciones excesivas. En algunos casos, la presencia de un elemento en concentraciones excesivas puede inducir la deficiencia de otro elemento, como ocurre en el caso del estrés salino que los iones Na^+ desplazan al K^+ y Ca^{+2} .

Papel del K⁺ en la planta

Una mayor eficiencia en el uso de K⁺ en los cultivos es especialmente fundamental para la futura agricultura de bajos insumos en un contexto de calentamiento global continuo y una población en aumento (Rodenas et al., 2021). El K⁺ es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas que se encuentra en grandes cantidades en las células de las plantas y es necesario para la fotosíntesis, la regulación del equilibrio hídrico, la síntesis de proteínas y la resistencia a enfermedades, por lo que las alteraciones de los niveles de K⁺ afecta la fisiología y el metabolismo de las plantas. Además, este macronutriente también contribuye a la tolerancia al estrés abiótico. La deficiencia de K⁺ puede afectar la actividad de ciertas enzimas que son importantes para el metabolismo de las plantas. Kim et al. (2016) demostraron que la deficiencia de K⁺ afectaba la actividad de las enzimas implicadas en la fotosíntesis y la respiración en *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, también puede afectar a la absorción de otros nutrientes por las plantas, como la absorción de Ca²⁺ y Mg²⁺ por las raíces (Peuke et al., 2015). Además, la deficiencia de K⁺ puede afectar la expresión de ciertos genes, como por ejemplo genes relacionados con la síntesis de proteínas y la regulación del crecimiento de las plantas (Wang et al., 2018), así como aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) conllevando un daño celular y un estrés oxidativo (Kiani-Pouya et al., 2018).

Hay numerosos estudios que han investigado el efecto negativo de la deficiencia de K⁺ en el ámbito productivo de diferentes cultivos. Por ejemplo, un estudio realizado en maíz (*Zea mays*) encontró que la deficiencia de K⁺ redujo la tasa de crecimiento de la planta y afectó negativamente la producción de grano (Gupta et al., 2018). Otro estudio realizado en arroz (*Oryza sativa*) encontró que la deficiencia de K⁺ afectó la calidad del grano y redujo la resistencia de la planta a la enfermedad de la pudrición de la raíz (Liu et al., 2018). Además, la deficiencia de K⁺ también puede afectar la eficiencia del uso del agua por las plantas. Un estudio en algodón (*Gossypium hirsutum*) encontró que la deficiencia de K⁺ redujo la tasa de transpiración de la planta y aumentó la eficiencia del uso del agua (Wang et al., 2019). Esto sugiere que la deficiencia de K⁺ puede tener efectos complejos en el equilibrio hídrico de las plantas

Tanto la captación como la distribución de K⁺ implican su movimiento a través de las membranas celulares, que dependen de la operación integrada de sistemas específicos de transporte de K⁺. Aunque se describen con más profundidad más adelante (ver apartado 5.4. de Introducción), existen diferentes familias de sistemas de transporte de K⁺ en plantas: los canales *Shaker-like* (AKT/KAT), de poro en tándem y de dos poros, los transportadores de K⁺ de las familias HKT y HAK/KUP/KT, y el antiportador K⁺/H⁺ de la familia CPA (Nieves-Cordones et al., 2019). Los transportadores de tipo HAK5 contribuyen a la captación de K⁺ en concentraciones más bajas que los canales de K⁺ dependientes de voltaje de tipo AKT1, lo que se relaciona con sus distintos mecanismos de transporte de K⁺. Además, la contribución relativa de estos dos sistemas a la absorción de K⁺ parece variar mucho entre las especies de plantas, con los canales de K⁺ controlados por voltaje asumiendo un papel más destacado en la absorción de K⁺ que los

transportadores de HAK en *Arabidopsis*, y viceversa en el arroz (Nieves-Cordones et al., 2016).

Papel del Ca^{+2} en la planta

El calcio es otro elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya sea en condiciones estresantes o no estresantes (Kudla et al., 2018). Es esencial para el crecimiento, densidad y longitud de los pelos radiculares, altamente necesarios en la absorción de nutrientes (Jaunin y Hofer, 1988) y tiene un importante papel en la estabilización de la membrana celular, manteniendo la permeabilidad selectiva y la integridad de esta (Marschner, 2011). El Ca^{+2} es un componente importante de la pared celular, necesario para mantener la firmeza de los frutos, ya que actúa sobre las cadenas de pectina formando puentes entre ellas (Contreras-Angulo et al., 2011; Pérez y Quintero, 2015). El Ca^{+2} se almacena principalmente en orgánulos en el interior de la célula, o en el apoplasto en el exterior de esta, mientras que en el citoplasma se encuentra en concentraciones mínimas (alrededor de 100-200 nM en condiciones de reposo) (Robertson, 2013). Se encuentra tan compartimentalizado y reducido en el citoplasma para evitar su precipitación con el fosfato inorgánico y la competencia por los sitios de unión con el Mg^{+2} citosólico (White y Broadley, 2003).

El Ca^{2+} ingresa a través del extremo de las raíces y se mueve hacia los vasos del xilema por dos vías distintas, una apoplástica y otra simplástica (White et al., 2002; Cholewa y Peterson, 2004). La vía apoplástica es por la que se produce principalmente el movimiento de Ca^{2+} debido al flujo de agua movido por la transpiración. En esta vía, el apoplasto ofrece poca resistencia eléctrica y permite el libre intercambio de iones Ca^{2+} (Robertson, 2013). No obstante, la Banda de Caspary de la endodermis, que contiene suberina, restringe el paso de solutos a través del apoplasto, promoviendo la vía simplástica. En la ruta simplástica, los iones Ca^{2+} ingresan al simplasto a través de canales permeables al Ca^{2+} de la membrana plasmática, y luego son bombeados hacia los tejidos a través de las Ca^{2+} -ATPasas y los intercambiadores $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (White y Broadley, 2003). Estos transportadores de Ca^{2+} son los más importantes en las células vegetales, pero deben ser regulados cuidadosamente para evitar interferir con las vías de señalización (**Figura 3**).

Entre los orgánulos celulares donde se acumula, la vacuola es el mayor depósito, aunque la mayoría del Ca^{+2} vacuolar está ligado a aniones orgánicos como oxalato, citrato, malato, etc., formando complejos poco solubles que precipitan en forma de cristales (principalmente oxalato de calcio) (Stael et al., 2011; Hedrich y Marten, 2011). El segundo depósito intracelular es el retículo endoplasmático (RE). Se ha sugerido que el Ca^{+2} se mueve desde las hojas (con alta tasa de transpiración), hasta los meristemos (necesarios para el crecimiento vegetal) mediante un mecanismo alternativo a través del RE (Heinlein, 2002; Bayer et al., 2004). En otros orgánulos, como mitocondrias, cloroplastos y núcleo, la concentración libre en reposo de Ca^{2+} es menor que la estimada para la vacuola y RE, aunque presentan elevaciones en respuesta a diversos estímulos (Logan y Knight, 2003).

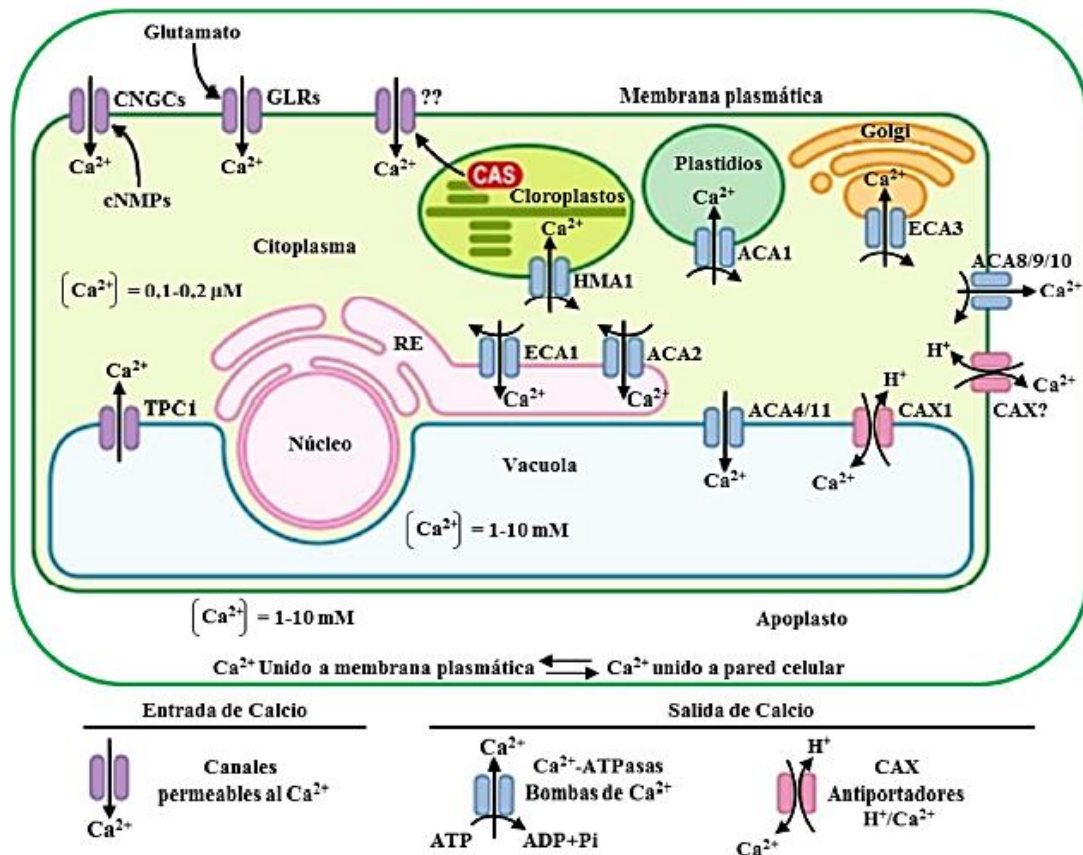


Figura 3. **Sistemas de transporte de Ca^{2+} en las células de *Arabidopsis thaliana*.** Las vías de flujo del catión Ca^{2+} que han sido identificadas a nivel molecular son: Canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs), Receptores de Glutamato (GLRs), Canales de dos poros 1 (TPC1), Receptor sensor de Ca^{2+} (CAS), ATPasa autoinhibida por Ca^{2+} , ATPasa de calcio tipo RE (ECA), ATPasa de metales pesados 1 (HMA1), y el intercambiador catiónico $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (CAX). Figura modificada de Kudla et al. (2010).

Por lo tanto, son estos los principales depósitos en hoja donde el Ca^{+2} se retiene y desde donde la planta lo moviliza en función de sus necesidades fisiológicas o en situaciones de déficit de dicho ion. Por el contrario, el Ca^{+2} disponible en raíz y hojas más jóvenes es menor y principalmente (el 60% del Ca^{+2}) se encuentra formando parte de la pared celular, desde donde no se puede movilizar, por lo que el Ca^{+2} en general presenta una movilidad reducida en la planta (Conn y Gilliam, 2010). Es por ello que los síntomas de su deficiencia principalmente se manifiestan en aquellos tejidos en los que su requerimiento es mayor (órganos sumidero), como las hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemos apicales. Un claro ejemplo de esto es el caso de la proteína ATPasa 1 transportadora de Ca^{2+} , la cual está involucrada en una variedad de procesos esenciales en el desarrollo de las plantas y en las respuestas al estrés (Costa et al., 2017). Sin embargo, la identificación y caracterización de estas proteínas en todo el genoma se ha limitado principalmente a *Arabidopsis*, dejando atrás los avances en especies de cultivos con fruto como el tomate.

El Ca^{+2} como segundo mensajero tiene un importante papel en la apertura y cierre estomáticos y en otras importantes reacciones metabólicas (Wang et al., 2011). Por ello, el estudio de los canales iónicos permeables de Ca^{+2} que son los principales componentes que permiten la entrada y el aumento del nivel de Ca^{+2} en el citoplasma es de suma

importancia para comprender el funcionamiento de la señalización por calcio (Robertson, 2013). La gran diferencia en la concentración de Ca^{+2} anteriormente mencionada entre el citoplasma, y el apoplasto y los compartimentos intracelulares probablemente es la razón del uso de las señales de Ca^{+2} como vínculo entre los estímulos extracelulares y las respuestas intracelulares (Costa et al., 2017; Dong et al 2022)

Los síntomas por deficiencia de Ca^{+2} incluyen el retraso en el crecimiento, la necrotización de tejidos y clorosis foliar marginal, una reducción en la biomasa reproductiva y puede ocasionar la muerte de la yema terminal (Kennelly et al., 2012; Robertson, 2013). La reducción en la transpiración provoca mayores deficiencias de Ca^{2+} en los diferentes órganos sumidero u órganos en desarrollo, como ápices y frutos, dado que el transporte de Ca^{2+} se produce mayoritariamente vía xilema (Uozumi et al., 2012; Tonetto de Freitas et al., 2014). La adición externa de Ca^{+2} o enmiendas (aplicación al suelo de sulfato de calcio) reduce los síntomas causados por su deficiencia.

En fruto, el síntoma clásico de deficiencia de Ca^{2+} es Blossom End Rot (BER) causado por el colapso de las paredes celulares (Topcu et al., 2022). Generalmente, los síntomas de BER aparecen externamente sobre la parte distal del pericarpo, pero después de la inducción de BER las áreas se expanden y se vuelven necróticas cubriendo una proporción del fruto y en algunos casos afecta al fruto entero. Respecto a la relación entre la incidencia de BER y los niveles de Ca^{2+} , son numerosos los estudios que muestran que la concentración diferencial de Ca^{2+} entre la zona proximal y distal del fruto está correlacionada con la aparición del BER (Topcu et al., 2022 y referencias citadas). Sin embargo, otros estudios sugieren que la alteración en el patrón de distribución de Ca^{2+} dentro de la planta así como en los diferentes compartimentos celulares (citoplasma, apoplasto, vacuola, etc) es una consecuencia y no puede ser la causa del BER (Rached et al., 2018; Matsumoto et al., 2021).

3.4. Respuesta al estrés oxidativo inducido por estreses abióticos

El estrés oxidativo surge típicamente como un estrés secundario tras un estrés abiótico primario (**Figura 2**). Cuando las plantas están expuestas a estrés abiótico se produce un exceso de energía de excitación en sus fotosistemas debido a que disminuye la disponibilidad y fijación de CO_2 y la producción de ATP en la fase oscura de la fotosíntesis, lo que provoca una disminución en la concentración del aceptor final de electrones en la fase luminosa, el NADPH. Este exceso de energía puede disiparse mediante un enfriamiento no fotoquímico (ciclo de xantofila) o procesos alternativos como el metabolismo fotorrespiratorio. Si no se disipan, los electrones se acumulan en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y se transfieren al oxígeno (reacción de Mehler), generando ROS, entre ellos el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), que son muy reactivas y dañan muchos componentes celulares, desencadenando el estrés oxidativo (**Figura 4**) (Decros et al., 2019). Las clorofilas excitadas (Chl) también pueden exacerbar la formación de ROS principalmente por el centro de reacción del fotosistema II (PSII) mediante la activación fotodinámica del oxígeno en estado fundamental (Fischer et al., 2013). El exceso de ROS puede

inactivar el centro de reacción fotoquímica del PSII, lo que resulta en fotoinhibición. El impacto negativo asociado en los constituyentes celulares de ROS ha sido un foco importante de los esfuerzos de investigación de décadas para mejorar la resiliencia al estrés oxidativo al impulsar la maquinaria antioxidante en especies de plantas modelo y de cultivo (Lodeyro et al., 2021).

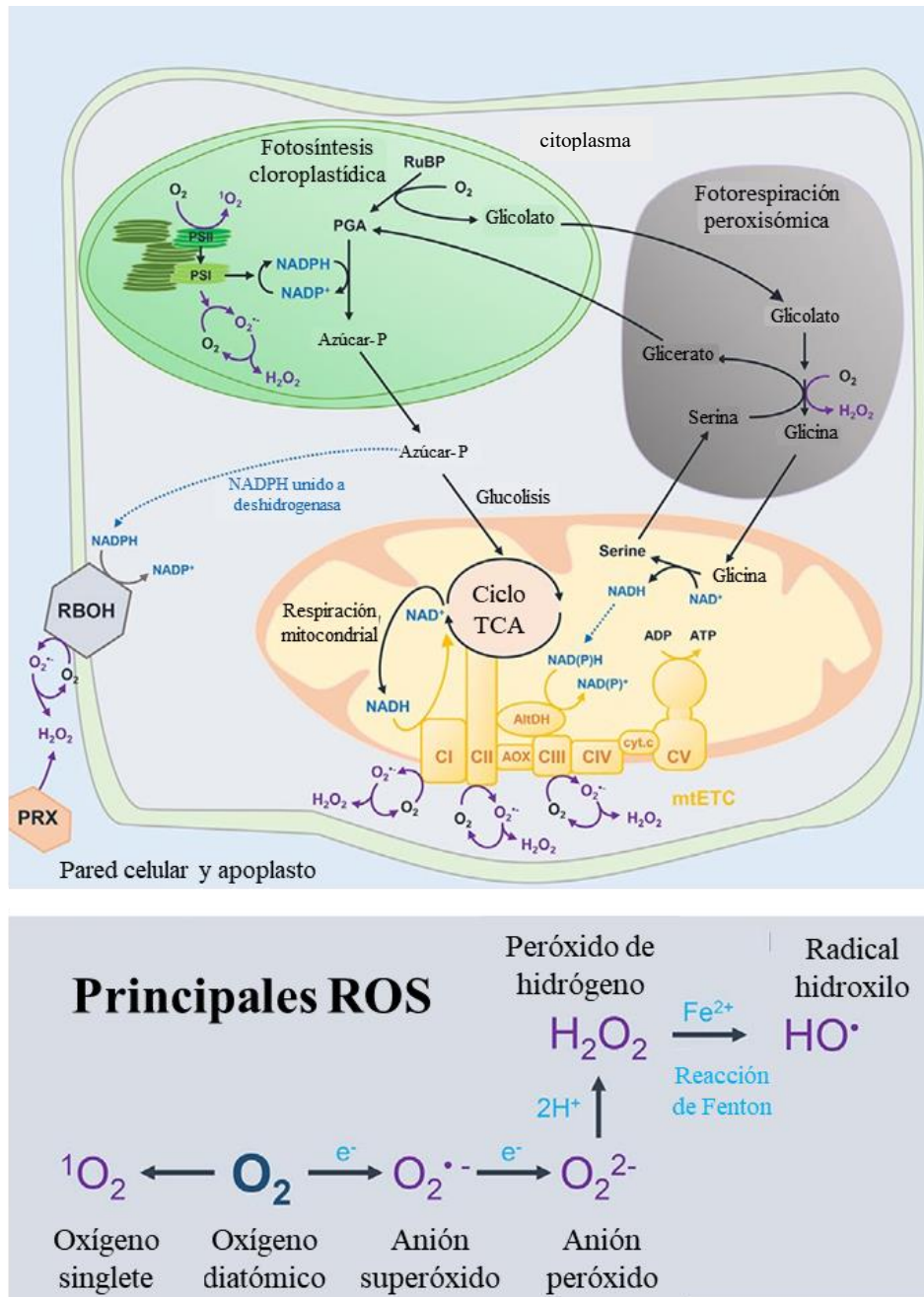


Figura 4. Principales fuentes de ROS en células vegetales. Figura modificada de Decros et al., 2019.

Para superar el estrés oxidativo mediado por el estrés abiótico, las plantas se basan en diferentes estrategias bioquímicas, sintetizando un conjunto de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como carotenoides, ascorbato, glutatión y tocoferoles. Además, aumentan la expresión de enzimas antioxidantes como catalasas, superóxido dismutasa,

ascorbato peroxidasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa y fenol peroxidasa (Pang y Wang, 2008). Recientemente, Kerchev y Van Breusegem (2022) revisaron los esfuerzos a largo plazo destinados a reforzar la tolerancia al estrés oxidativo en los cultivos mediante el aumento de su maquinaria antioxidante, destacando los pros y los contras de varias estrategias y proponiendo nuevas vías para futuras investigaciones. Desde la perspectiva de la salud humana, el metabolismo redox del fruto ha recibido mucha atención en los últimos años, probablemente porque las frutas y las verduras son las principales fuentes de metabolitos antioxidantes esenciales y, en consecuencia, son muy recomendables en la dieta humana. En este contexto, aunque aún no se ha dilucidado el funcionamiento preciso de los reguladores redox, actualmente se están explorando algunas aplicaciones prácticas para modificar la biología redox del fruto (Decros et al., 2019).

En contraste con la connotación negativa que normalmente se atribuye a una mayor producción de ROS, la función principal de las ROS es como moléculas de transducción de señales que regulan diferentes vías durante la aclimatación de las plantas al estrés abiótico (Miller et al., 2009). Por lo tanto, el H₂O₂ parece modular las actividades de muchos componentes que contribuyen a la señalización celular, incluidos los canales de Ca²⁺ y K⁺ (Kudla et al. 2018). Aunque las fuentes de ROS en condiciones estresantes son relativamente bien conocidas, los mecanismos de desintoxicación de ROS y el papel de ROS en la señalización del estrés son áreas muy activas de investigación actual; aunque se han estudiado y revisado ampliamente, aún se necesitan más estudios antes de poder llegar a conclusiones definitivas sobre la señalización de células ROS (Considine and Foyer, 2021).

3.5. Respuesta al estrés térmico inducido por altas temperaturas

Las plantas son conocidas por su habilidad para adaptarse a una amplia variedad de climas y ocupar prácticamente todos los nichos ecológicos, desde los trópicos hasta las regiones polares y las aguas termales. Para lograrlo, han desarrollado respuestas a la temperatura a diversas escalas de tiempo, desde minutos hasta meses, que permiten la activación de una serie de respuestas biológicas celulares y de desarrollo, para maximizar su supervivencia. Entender cómo las plantas logran adaptarse a diferentes climas es una pregunta importante y actual, especialmente durante el periodo de calentamiento global sin precedentes en el que nos encontramos (Ludwig et al., 2021; Fonseca de Lima et al., 2021).

El estrés abiótico por altas temperaturas depende a su vez de tres parámetros que indican el grado de intensidad: la duración del estrés, la velocidad de aumento de la temperatura y la temperatura máxima. Cada especie vegetal presenta temperaturas máximas y mínimas necesarias para su supervivencia, así como una temperatura óptima para un desarrollo adecuado (Porch y Hall, 2013). En general, para la mayoría de las especies, esta temperatura óptima se encuentra por debajo de los 50 °C, ya que por encima de esta temperatura se pueden producir daños graves.

Las consecuencias producidas por el aumento de la temperatura en el desarrollo de los cultivos incluyen un menor tiempo de crecimiento, senescencia acelerada en los órganos fotosintéticos respuestas de enfriamiento, establecimiento temprano o limitado de semillas y frutos entre otras. Por otro lado, entre las consecuencias fisiológicas y bioquímicas se producen cambios en el rendimiento y en el tamaño de las semillas y frutos, desnaturalización, agregación y degradación de las proteínas y de la clorofila, aumento de la fluidez de los lípidos y de la permeabilidad de la membrana, además de la alteración de la función de los orgánulos celulares y de la fotosíntesis y la respiración, inhibición de la síntesis de proteínas, y muerte celular (Zhu et al., 2021). Estas consecuencias son variables en función del grado del estrés térmico. La temperatura moderadamente alta provoca cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que contribuyen juntos a la aclimatación térmica adaptativa en gran medida no perjudiciales (Quint et al., 2016; Vu et al., 2019). Por el contrario, la temperatura extremadamente alta o el estrés térmico por encima de un umbral crítico durante un período que es suficiente para causar daños a menudo irreversibles en el crecimiento, el desarrollo y la fisiología de las plantas, causando incluso la muerte (Wang et al., 2020). Además, otra de las respuestas fisiológicas conservada en todas las plantas terrestres es la respuesta evitativa del calor mediante la apertura de los estomas para mejorar la transpiración y enfriar sus hojas, contrario a la respuesta que ocurre en sequía y estrés salino en el que los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua (Kostaki et al., 2020; Rivero et al., 2022).

Tras la exposición a altas temperaturas dentro de un rango moderado, las plantas se aclimatan y aseguran su aptitud mediante tres estrategias principales: evitación, escape y tolerancia. En cuanto a las respuestas de evitación, en condiciones de temperatura moderadamente alta, las plantas pueden acelerar su crecimiento para mejorar el enfriamiento por evaporación en las partes altas (**Figura 5a**) o para alejar las partes susceptibles del flujo de calor del suelo (**Figura 5b**) mediante respuestas termonásticas y cambios arquitectónicos (termomorfogénesis) (Zhu et al., 2021). En *Arabidopsis*, la temperatura ambiente moderadamente alta induce una elongación del hipocótilo y del etiolo, así como hiponastia de la hoja (Quint et al., 2016; Casal y Balasubramanian, 2019; Vu et al., 2019). De manera similar, la hoja y el coleóptilo de las monocotiledóneas (trigo, cebada, arroz y maíz) o el hipocótilo de las dicotiledóneas (soja y tomate o repollo) se alargan a temperaturas moderadamente altas para cubrir y reducir la tasa de evaporación de las anteras de la panoja; el tomate muestra hiponastia foliar (Vu et al., 2021). Aunque ahora está claro que los rasgos de termomorfogénesis de los tejidos aéreos son inducidos para promover la capacidad de enfriamiento de la planta (Crawford et al., 2012; Park et al., 2019), bajo tierra los efectos de las temperaturas levemente elevadas son mucho menos conocidos. Fonseca de Lima et al. (2021) proponen que, en términos generales, las temperaturas templadas conducen a una mayor elongación de las raíces, mientras que el estrés por calor inhibe el crecimiento de las mismas. Aunque no es específico de las raíces, un tipo particular de respuesta de la raíz es el termotropismo, siendo una respuesta direccional de crecimiento de la raíz lejos de una señal de temperatura propuesta como una estrategia adaptativa para explorar suelos 'vírgenes' que no están cubiertos por vegetación superficial (van Zanten et al., 2021).

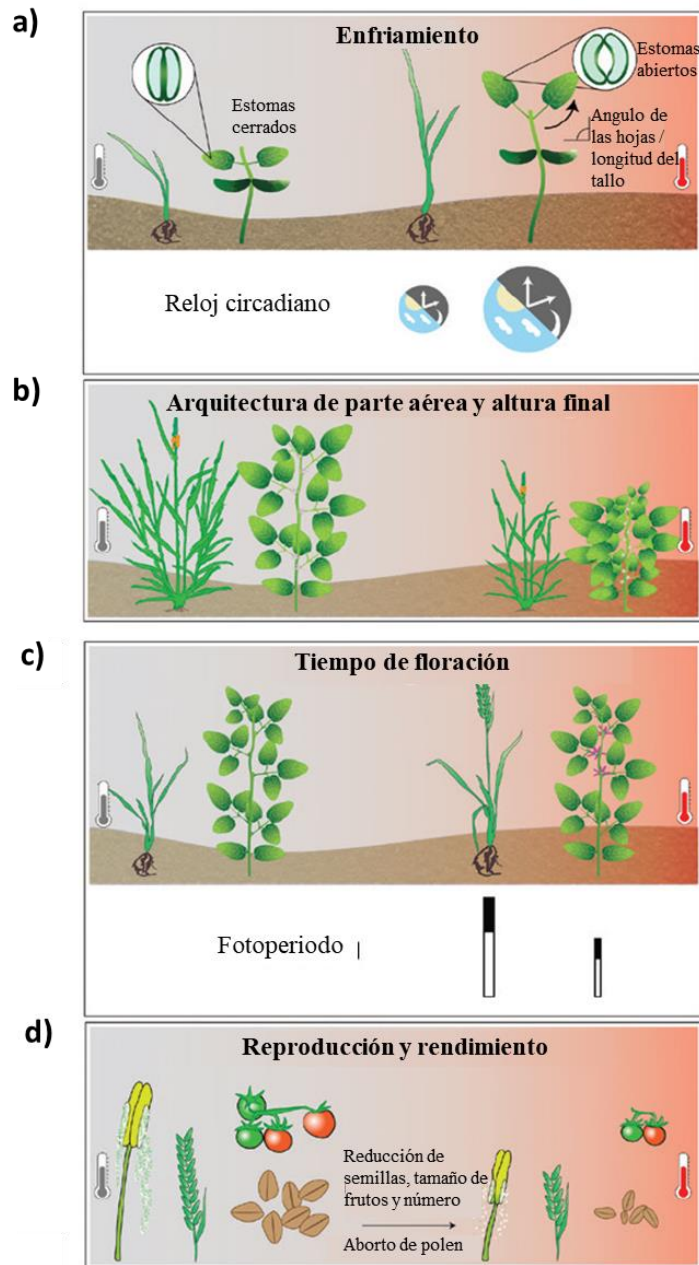


Figura 5. Las temperaturas altas moderadas o extremas afectan el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos. Se ilustran diferentes procesos para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los termómetros gris y rojo representan temperatura óptima y alta, respectivamente. Para la barra de fotoperíodo, el blanco y el negro representan las condiciones diurnas y nocturnas, respectivamente. El tamaño del reloj circadiano o los íconos del fotoperíodo ilustran el grado de dependencia durante el crecimiento inducido por temperaturas moderadamente altas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Figura modificada de Zhu et al. (2021).

En contraste con las estrategias descritas anteriormente para evitar el estrés por temperatura asociado con los órganos vegetativos, los órganos reproductivos muestran un mecanismo efectivo de escape de calor (Jagadish, 2020). Por ejemplo, algunos cultivos de secano como trigo y sorgo pueden optimizar su anthesis durante la mañana o los períodos más frescos de la noche (Aiqing et al., 2018; Chiluwal et al., 2020). Además, la temperatura moderadamente alta puede variar la duración de las fases de desarrollo para

proteger las etapas sensibles de los efectos negativos del aumento de la temperatura de forma dependiente o independiente del fotoperiodo, por ejemplo adelantar la fase reproductiva (como la transición floral y el desarrollo del polen) (**Figura 5c**), y retrasar la etapa generativa tardía (cuajado y desarrollo de semillas y frutos) (**Figura 5d**) (Heschel et al., 2007; Parent y Tardieu, 2012; Capovilla et al., 2014; Del Olmo et al., 2019). En este contexto, la temperatura moderadamente alta induce la expresión de genes de floración y posteriormente desencadena la transición floral en *Arabidopsis* (Vu et al., 2019) o promueve la expresión de activadores florales e inhibe los reguladores negativos aguas arriba en la soja (No et al., 2021) en condiciones de fotoperíodo no inductivas.

Tras las respuestas de evitación y escape, la capacidad de tolerancia de una planta al estrés térmico es su capacidad para llevar a cabo un crecimiento normal y mantener los niveles productivos en condiciones de alta temperatura. Cuando las temperaturas aumentan aún más y se alcanza un nivel de umbral en el que está en juego la supervivencia (a largo plazo), se inducen los mecanismos de tolerancia al estrés por calor. Mantener una tasa fotosintética elevada durante un estrés térmico se asocia con una mayor tolerancia al calor (Cao et al., 2003). Además, entre otros mecanismos de tolerancia se encuentran la modificación de la integridad y plasticidad (fluidez) de las membranas y su composición lipídica alterando su estructura y la actividad de proteínas (canales iónicos o aniónicos, etc.) localizadas en ella, ya que la membrana de la célula vegetal representa la primera línea de defensa contra el estrés por calor (Ding y Yang, 2022). Otra importante estrategia para la tolerancia al estrés térmico por parte de las plantas ha sido el desarrollo a lo largo de la evolución de vías activas de respuesta y detección de la temperatura que permiten tanto la anticipación a los cambios de temperatura, como las tensiones térmicas a corto plazo a nivel molecular. Los factores de choque térmico (HSF) en las plantas regulan la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs) en respuesta al estrés térmico, mediante la activación de la transcripción de los genes que codifican estas proteínas o interactuando directamente con ellas y regulando su función y estabilidad (Verslues et al., 2023). Los HSFs han experimentado una notable expansión en plantas, existiendo 21 miembros en *Arabidopsis* en comparación con de 1 a 3 familias en levaduras y mamíferos (Baniwal et al., 2004). Las HSPs son chaperonas que facilitan el replegamiento de proteínas mal plegadas o afectadas por estrés térmico, revirtiéndolas a proteínas nativas funcionales. Estas proteínas son de suma importancia en la respuesta al estrés térmico, habiéndose observado que la falta de función de estas chaperonas causa sensibilidad al estrés térmico y que su sobreexpresión reduce esta sensibilidad (Lee et al., 2007; Guan et al., 2013; Lin et al., 2014; Chen et al., 2019). Por ejemplo, la HSP21 localizada en plastos tiene un importante papel en el mantenimiento de la memoria al estrés térmico, de modo que su degradación disminuye la memoria del estrés por calor y su reciclaje a través de la autofagia controla la recuperación y la memoria del estrés por calor (De Smet et al., 2021).

Por otro lado, se ha descubierto recientemente un mecanismo regulador altamente conservado en las plantas con flores (comprobado en tomate y *Arabidopsis*): Tras el estrés por calor, los HSF se expresan a niveles ligeramente más altos y esto a su vez induce la expresión de miR169, ya que presentan en su promotor un elemento de estrés por calor

(HSE) que es reconocido por los HSFs. A su vez, los miR169 reducen la expresión del Factor Nuclear NF-YA (regulador negativo de los genes HSFs), lo que permite aún más expresión de HSFs y, por lo tanto, más expresión de miR169, generando un ciclo de retroalimentación que inicia una respuesta fisiológica y/o química al estrés por calor (Rao et al., 2020; 2022).

Además del papel crucial de las chaperonas moleculares en la protección y reparación de las proteínas termolábiles inducidas por el calor (Cabrera et al., 2020), la tolerancia al estrés térmico también se vale de enzimas metabólicas que producen metabolitos termoprotectores y captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS), proteínas de señal inducidas por calor y factores de transcripción (Chen et al., 2019; Ding et al., 2020; Ran et al., 2020; Zheng et al., 2022). Se cree que las ROS, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), pueden desempeñar un papel importante en la señalización en la respuesta al estrés (Mittler, 2017), pero altos niveles de ROS pueden volverse críticos para garantizar una señalización adecuada y causar estrés oxidativo por lo que en su respuesta actuarían los mecanismos antioxidantes anteriormente mencionados (ver apartado 3.4., respuesta al estrés oxidativo). Aunque se han identificado varios sensores y reguladores clave en la percepción de la temperatura y la termomorfogénesis (Jung et al., 2016; Sureshkumar et al., 2016; Casal y Balasubramanian, 2019), los factores que influyen en el número de órganos, la identidad y la función en respuesta a la temperatura siguen siendo en gran parte desconocidos. Los avances recientes en la identificación de factores involucrados en el mantenimiento de la fertilidad de los cereales con aumentos de temperatura incluyen la identificación de una proteína de caja MADS integral para la conformación normal de la inflorescencia de los cereales (K. Li et al., 2021) y una quinasa similar a un receptor que mantiene la fertilidad masculina (Yu et al., 2017).

Por último, algunas especies vegetales presentan cierta termotolerancia que mejora el desarrollo de las plantas expuestas al estrés por calor (no excesivo). Se sabe desde hace mucho tiempo que exponer las plantas a una exposición no letal a altas temperaturas, lo que se denomina "*priming*", induce la termotolerancia adquirida, lo que aumenta el rendimiento y la supervivencia de las plantas en un episodio de choque térmico posterior (Charng et al., 2007; Lin et al., 2014; Yonghui et al., 2018), fenómeno no limitado a eventos de choque térmico a corto plazo. De hecho, tanto las olas de calor simuladas como los estudios de calentamiento climático a largo plazo han encontrado que las plantas expuestas a temperaturas más cálidas tienen una mayor tolerancia térmica a un evento posterior de estrés por calor (Zhu et al., 2021).

3.6. Cambios anatómicos como respuesta a estrés abiótico

Se ha destacado la particular pertinencia de las estrategias de adaptación anatómica en cultivos sometidos a diferentes estreses abióticos. Galmés et al. (2013) estudiaron las respuestas de las hojas a la sequía en accesiones mediterráneas de tomate, encontrando adaptaciones anatómicas en relación con los parámetros de intercambio gaseoso; por ejemplo, bajo estrés por sequía, los valores máximos de conductancia del mesófilo se

alcanzaron con hojas delgadas con células del mesófilo densamente empaquetadas y paredes celulares delgadas.

También se han observado importantes adaptaciones anatómicas en condiciones de estrés salino. Por ejemplo, un mayor grosor de hoja bajo estrés salino en la especie WT tolerante *S. pennellii* explicaba su capacidad para prevenir la pérdida de agua, ya que el mayor grosor de hoja estaba asociado con la succulencia (Albaladejo et al., 2017). Además, se observaron cambios destacados en las células del mesófilo de la hoja, como el aumento del tamaño de las células del mesófilo esponjoso en las hojas de las especies silvestres bajo estrés por salinidad. Es interesante destacar que las células de las hojas de *S. pennelli* tratadas con sal estaban casi completamente ocupadas por una vacuola gigante. Las marcadas diferencias en el tamaño de las células detectadas en *S. pennelli*, respecto al cv. Moneymaker de tomate, resultaban en una mayor capacidad de acumulación de Na^+ de sus hojas y, más concretamente, de sus vacuolas que constituyen la gran mayoría de su volumen foliar, por lo que las concentraciones tisulares de Na^+ reflejarán en gran medida las concentraciones de iones vacuolares (Flowers et al., 2015).

Por otro lado, las raíces son los principales determinantes del estado nutricional equilibrado de las plantas ya que exploran el suelo en busca de agua y nutrientes. Por lo tanto, la anatomía de la raíz es fundamental para el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como para la forma en que las plantas se adaptan a condiciones de estrés abiótico. Sin embargo, el fitomejoramiento se ha centrado en gran medida en potenciar rasgos cuantitativos como el rendimiento, pasando a menudo por alto a las raíces a pesar de su papel crucial en la fisiología de toda la planta, probablemente debido a la dificultad de acceder al sistema de raíces intacto para el análisis particularmente en condiciones de campo. Es por ello que la termomorfogénesis se comprende relativamente bien para los órganos de la parte aérea, mientras que en las raíces solo recientemente ha comenzado a recibir la atención en investigación que merece (Fonseca de Lima et al., 2021). Actualmente, varios autores han enfatizado que la arquitectura de la raíz es de vital importancia para abordar el gran desafío agrícola del siglo XXI (Lombardi et al., 2021; Lynch, 2022). Un enraizamiento más profundo, que mejore el acceso al agua y a la absorción de nitrógeno y otros nutrientes se ve facilitado por ángulos de crecimiento de raíces más pronunciados, menos raíces axiales, por una ramificación lateral reducida y otros fenotipos anatómicos que reducen el coste metabólico neto del crecimiento del tejido radicular. Además, un número creciente de mutantes y estudios de diversidad genética llevados a cabo en varios cultivos en diferentes condiciones ambientales están revelando las funciones clave de los pelos radiculares en el mantenimiento de la aptitud de las plantas en un contexto ecológico más amplio (Marín et al., 2021).

4. El tomate (*Solanum lycopersicum*)

Antes de que los españoles llegaran a América, los mesoamericanos ya conocían y utilizaban el tomate, científicamente conocido como *Solanum lycopersicum* L. Se cree que el género *Lycopersicum* tuvo su origen en la región de los Andes, que abarca desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile, y desde la costa del Pacífico, incluyendo las

islas Galápagos, hasta las regiones orientales de los Andes, que incluyen Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Rick, 1973; Taylor, 1986). Esta conclusión se ha basado principalmente en la existencia de una amplia variedad de especies silvestres endémicas en áreas no afectadas por la actividad humana en estas zonas de Sudamérica, ausentes en gran medida en otras localizaciones en el mundo. No obstante, parece ser que el cultivo del tomate tuvo su origen en México, muy posiblemente a partir de la variedad cerasiforme de *L. esculentum*, que es la única especie silvestre de *Lycopersicum* que crece como una planta invasora en las regiones tropicales y subtropicales de América y que se encuentra fuera del área de distribución natural del género (Nuez *et al.*, 1996; Nesbitt y Tanksley, 2002). Otras investigaciones basadas en secuencias genéticas proponen como alternativa que la variedad cerasiforme original podría haber resultado de una serie continua de hibridaciones entre poblaciones de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* Jusl. Es decir, esta variedad cerasiforme original se habría desarrollado después de la domesticación del tomate, y por lo tanto, no sería la especie ancestral del tomate cultivado, siendo *S. pimpinellifolium* el candidato ancestral con más probabilidades en este caso (Nesbitt y Tanksley, 2002). Se han registrado casos de hibridación natural entre *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* y la antigua variedad cerasiforme en zonas donde estas poblaciones se encuentran en cercanía y son capaces de intercambiar genes (Peralta *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2005). No obstante, el origen de la domesticación del tomate no se ha resuelto hasta la fecha, a pesar de que se ha informado que los tomates procedentes de Europa y América del Norte muestran una similitud en cuanto a isoenzimas y marcadores moleculares con los tomates de México y Centroamérica, lo que sugiere que estos últimos fueron la fuente de introducción del tomate en Europa y América del Norte (Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012). Sin embargo, no se ha establecido una hipótesis clara sobre el origen de la domesticación del tomate, y no se puede concluir con certeza que una región haya sido la única responsable de la domesticación. Es posible que la domesticación se haya producido de manera independiente en ambas regiones. El tomate está clasificado como *Solanum lycopersicum* L., tal y como fue clasificado por Carl Linneo originalmente (Linnaeus, 1753), aunque su clasificación ha sido tema de debate y temporalmente fue clasificado por Miller (1754) como *Lycopersicon esculentum*.

Un estudio reciente que se basó en la observación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP), confirma que la variedad cerasiforme de *S. lycopersicum* no es el antecesor del tomate cultivado. Además, esta investigación respalda la teoría de que hubo un proceso de pre-domesticación del tomate en la región andina (hipótesis del Perú), seguido de su domesticación en Mesoamérica (hipótesis de México), y posteriormente, su introducción en Europa por los españoles, desde donde se expandió a todo el mundo (Blanca *et al.*, 2012).

Actualmente su taxonomía es la siguiente: I. Clase: Dicotyledoneas; II. Orden: Solanales (Personatae); III. Familia: Solanaceae; IV. Subfamilia: Solanoideae; V. Género: Solanum; VI. Especie: *Lycopersicum*. Se trata de una planta de porte arbustivo cultivada como anual. Hay dos tipos diferentes según su crecimiento: determinado e indeterminado. En

la variedad indeterminada, los tallos tienen segmentos uniformes con tres hojas (con yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo. Por otro lado, la variedad determinada tiene tallos con segmentos que tienen progresivamente menos hojas por inflorescencia y terminan en una inflorescencia, limitando su crecimiento. La planta tiene tallos gruesos y angulosos, y la planta presenta tallos secundarios que salen de las axilas de las hojas. El sistema radicular tiene una raíz principal corta y débil y raíces secundarias que son numerosas y potentes. Las hojas son compuestas anchas, planas con 7-11 folíolos peciolados, lobulados y borde dentado. Las flores son hermafroditas, simétricas, regulares e hipóginas, y la inflorescencia está compuesta de 4 a 12 flores. La corola está formada por 5 o más pétalos amarillos, lanceolados y fusionados en la base. Los sépalos son más pequeños que los pétalos. La flor contiene cinco estambres fusionados a la corola por sus filamentos. Las anteras largas de color amarillo están unidas lateralmente, formando un cono estaminal que envuelve el gineceo. El pistilo está formado por un ovario bi- o plurilocular, de estilo delgado y el estigma cubierto por una secreción lipídica. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor. El fruto es una baya que varía en tamaño y forma, generalmente roja, bilocular o multilocular, de gruesa placenta con numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginosa. El fruto está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que es la zona de abscisión (ZA). Contiene una semilla discoidal lenticular comprimida y un embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme. En la **Figura 6** se muestran: el aspecto del porte (a), ápice (b), hojas (c), racimos florales (d), flores (e) y racimos de frutos (f) del cultivar de tomate Moneymaker.

4.1. Importancia económica y distribución geográfica del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es el segundo cultivo hortícola más importante a nivel mundial, después de la patata, con cerca de 100 millones de toneladas de fruta fresca cultivadas en 3,7 millones de hectáreas (FAO 2021) y los países en desarrollo de Asia contribuyen con más de 1/3 del rendimiento total (FAO 2020).

El patrón de comercio de tomate en 2018 muestra que los principales exportadores son Países Bajos, España, Francia, Bélgica e Italia en la Unión Europea; Marruecos, Túnez, Egipto, Burkina Faso y Senegal en África; y México, Canadá, Estados Unidos, Guatemala y República Dominicana en América. A nivel mundial, los tres principales exportadores de tomates en términos de valor son México, Países Bajos y España, y junto con Marruecos, representan el 62,6% de las exportaciones mundiales de tomates (Figura 7). En 2018, los principales países de la Unión Europea que importaron tomates españoles son Alemania, Francia, Países Bajos, Polonia y Reino Unido, lo que representa el 98% de las exportaciones de tomate de España. Sin embargo, a medida que España aumentó sus exportaciones a estos países, también disminuyó sus exportaciones a otros países como Lituania, Finlandia, Bélgica, Suecia, Italia, Reino Unido, Letonia, República Checa, Austria, Suiza, Países Bajos, Alemania y Francia (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019)



Figura 6. Aspecto del porte (a), ápice (b), hojas (c), racimos florales (d), flores (e) y racimos de frutos (f) del cultivar de tomate MoneyMaker.

Debido a su importancia económica, los científicos han prestado especial atención a las características agronómicas que afectan directamente el rendimiento final del fruto, como el patrón de ramificación, la arquitectura de la inflorescencia y el desarrollo del fruto (Mata-Nicolás et al., 2020). Se han identificado numerosos genes involucrados en características relacionadas con el rendimiento en el tomate (Mata-Nicolás et al., 2020, Ye et al., 2021). Además, el tomate tiene muchas características nutricionales, lo que lo hace popular entre personas de todo el mundo. Según las estadísticas del USDA, es una de las verduras bajas en calorías (extremadamente baja en grasas y cero colesterol), con solo 18 calorías por cada 100 g (USDA, 2022). Su importancia nutricional se deriva del hecho de que es el cultivo hortícola que proporciona el mayor aporte de nutrientes a la población mundial dado su alto consumo per cápita, pues se consume tanto fresco como producto procesado en puré, sopas y productos enlatados. En cuanto a su calidad nutricional e interés como alimento funcional, el bajo aporte calórico combinado con su

alto contenido en fibra dietética, minerales, vitaminas y antioxidante hacen del tomate un componente muy apreciado de la dieta humana. La vitamina E (α -tocoferol), los carotenoides, el licopeno en particular y varios compuestos fenólicos se encuentran entre los principales componentes del fruto del tomate que tienen propiedades beneficiosas para la salud (Egea et al., 2022). El tomate tiene una capacidad de absorción de radicales de oxígeno total de 367 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$, atribuida a los altos niveles de vitamina A y antioxidantes flavonoides, como α y β -carotenos, xantinas y luteína. Estos antioxidantes tienen una eficacia potente para eliminar los radicales libres de oxígeno dañinos, mejorando así la visión nocturna de las personas y protegiéndolas del envejecimiento, los tumores y otros problemas relacionados con la salud (USDA, 2022)

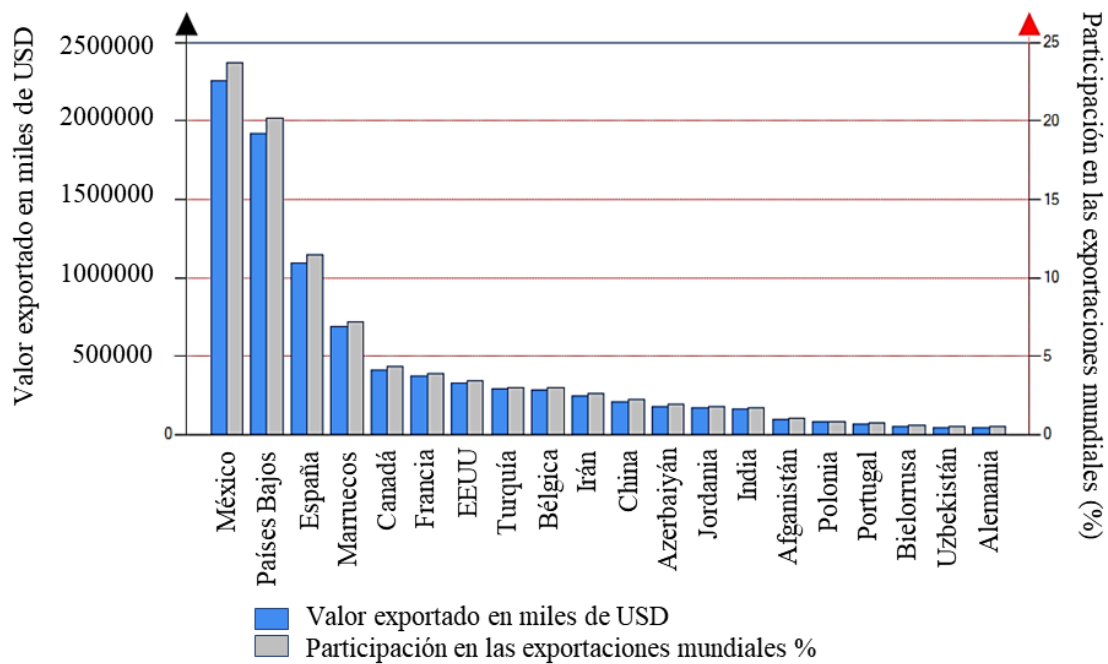


Figura 7. Valor exportado por país y su participación en las exportaciones mundiales. Figura obtenida del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2019).

El primer genoma del tomate se secuenció hace una década y la secuencia se encuentra ahora en su quinta iteración con 100 muestras de secuencias genómicas de un amplio espectro de parientes de cultivos de especies silvestres y variedades cultivadas (Seymour and Rose, 2022). Cabe señalar que la domesticación y el mejoramiento genético del tomate durante las últimas décadas han resultado en una disminución de la diversidad genética y una pérdida inesperada de algunos rasgos importantes, como el sabor, aroma y características de resistencia a los estresores (Zhu et al., 2018; Szymański et al., 2020). Con el cambio continuo en el estilo y nivel de vida, las personas se han esforzado por reintroducir los rasgos perdidos de los parientes salvajes en cultivares comerciales (Ye et al., 2021; Eshed et al., 1992; Eshed et al., 1994).

4.2. El tomate como planta modelo

Los avances más importantes en la identificación de genes involucrados en la tolerancia al estrés abiótico se han logrado en la planta modelo *Arabidopsis* y en menor medida en ciertas especies cultivadas como el tomate. Sin embargo, aquí resaltamos la importancia del tomate como planta modelo, ya que su importancia económica y nutricional, su naturaleza diploide, la amplia gama de mutantes de un solo gen existente, su genoma relativamente pequeño (~900 Mb), su ciclo de vida relativamente corto, sus antecedentes genéticos bien conocidos, y la existencia de procedimientos experimentales para la transformación genética bien desarrollados lo convierten en un cultivo excelente para el avance del conocimiento en ciencias de la vida y ciencias de los alimentos, especialmente en la agricultura (Seymour y Rose, 2022; Lu et al., 2018; Chen et al., 2020)

Con diferencia de *Arabidopsis*, sus características fisiológicas y anatómicas (tejidos adultos y jóvenes bien diferenciados y producción de un fruto grande y de interés comercial), el tomate es un excelente modelo por ejemplo para el estudio del transporte de iones salinos a larga distancia en condiciones de estrés salino. Un ejemplo de esto se comprueba con el estudio del gen *SISOS1*, el cual juega un papel crítico en el reparto de Na^+ entre los tejidos de la planta de tomate (Olías et al., 2009a, 2009b), lo que no se observa en *Arabidopsis* debido probablemente a su menor tamaño y similitud en los tejidos de parte aérea. Es por ello que, gracias al estudio de este gen en tomate, se ha demostrado que, aparte de su función principal de extruir Na^+ de la raíz al igual que se observa en *Arabidopsis*, *SISOS1* retiene Na^+ en las partes adultas de la planta de tomate evitando que llegue a las hojas jóvenes fotosintéticamente activas. Otro ejemplo interesante en el que el tomate como planta modelo ha jugado un papel importante es el gen *CBL10*. Dicho gen está involucrado en la protección del ápice de la planta de tomate en condiciones de estrés salino, y los mutantes de *CBL10* muestran una alta susceptibilidad a la toxicidad de iones en la parte más joven de la parte aérea. Se ha descubierto que la baja acumulación de Na^+ en los mutantes en realidad se debe a una distribución alterada de Na^+ en la parte aérea, y no a una acumulación menor de Na^+ en general (**Figura 8**). Además de avances en estrés salino, el tomate ha permitido grandes avances en el conocimiento de cómo la maquinaria vegetal responde a otros estreses abióticos, como diferentes intensidades lumínicas, sequía o estrés por frío (Kissoudis et al., 2016).

En cuanto a los estreses bióticos, El tomate se ve significativamente afectado por una variedad de patógenos (incluyendo bacterias, hongos, oomicetos, virus y nematodos) durante el cultivo y en la etapa de poscosecha (Arie et al., 2007). Los rápidos avances en las técnicas ómicas integradoras y otras técnicas novedosas que emplean el tomate como material vegetal han facilitado una aclaración completa de la maquinaria molecular que subyace en la interacción entre el tomate y ciertos patógenos (Szymański et al., 2020; Chen et al., 2021). Es importante destacar que la interacción fruto-patógeno del tomate es un excelente sistema para investigar la transición de la resistencia a la susceptibilidad en las plantas (Arie et al., 2007; Blanco-Ulate et al., 2013; Silva et al., 2021). Se han empleado técnicas transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas para documentar las

respuestas globales del tomate a las infecciones (Szymański et al., 2020, Blanco-Ulate et al., 2013; Silva et al., 2021). Por lo general, los frutos de baja madurez son más resistentes a los patógenos, pero gradualmente se vuelven susceptibles cuando se activa el programa de maduración (Silva et al., 2021). Acompañada de variaciones bioquímicas y fisiológicas sustanciales, la maduración del fruto está coordinada por eventos de señalización complejos a nivel transcripcional, postranscripcional y epigenético (Chen et al., 2020; Zhou et al., 2022)

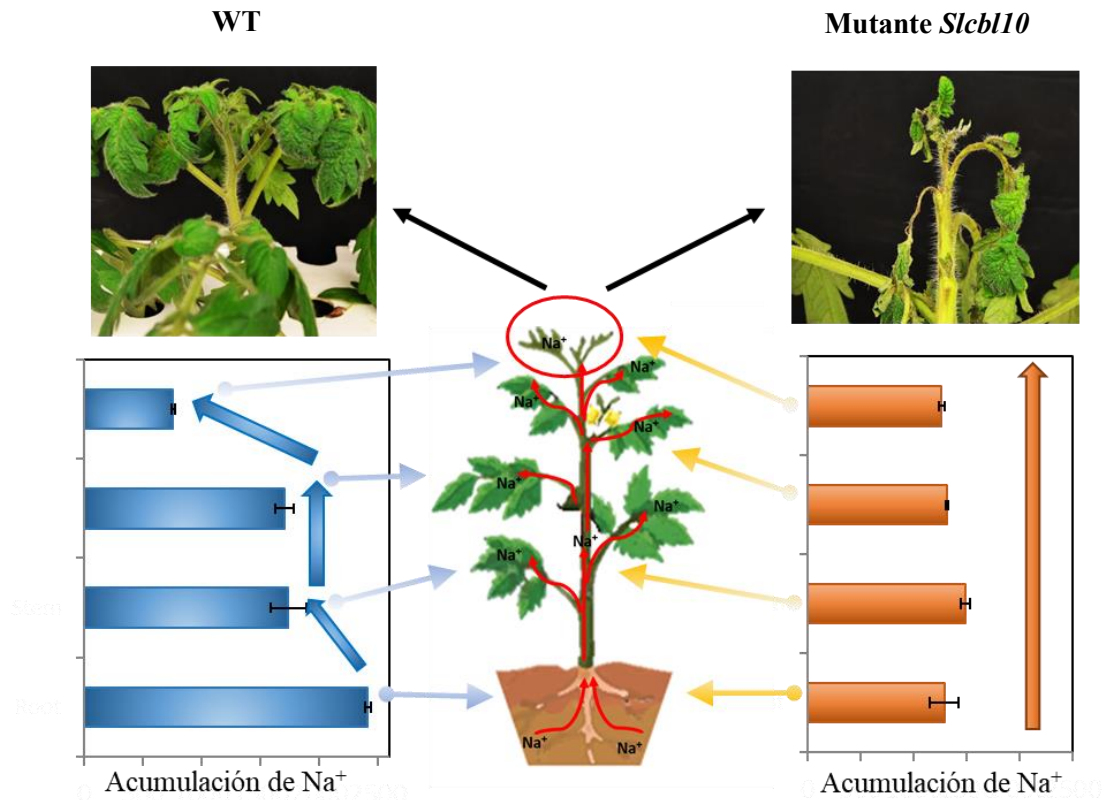


Figura 8. El tomate es un buen modelo para estudiar el transporte a larga distancia del ion tóxico Na^+ , como se demostró en el mutante *Slcb110* de pérdida de función (Egea et al. 2018). La alta sensibilidad a la sal del mutante *Slcb110* de tomate no se debió a una mayor acumulación de Na^+ , sino a la alteración del patrón de acumulación de Na^+ , ya que no se retiene Na^+ ni en la raíz ni en las partes adultas de la planta, llegando así a las partes jóvenes y ápice de la planta.

Por otro lado, el fruto de tomate es el modelo más utilizado para la investigación de la regulación del desarrollo de la maduración en especies con frutos carnosos, y existe un conjunto profundo de recursos para ayudar a diseccionar los eventos bioquímicos, moleculares y genéticos relacionados con el control de la maduración de los frutos de tomate (Seymour and Rose, 2022). Algunos frutos, especialmente los frutos climatéricos, se cosechan en una madurez más baja y se utilizan como alimentos para los consumidores en la madurez adecuada mediante procesamiento postcosecha durante la cosecha, el almacenamiento, la entrega y la comercialización. Por lo tanto, es necesario la manipulación del procesamiento de maduración para mantener la calidad del fruto y proporcionar alimentos con las mejores propiedades organolépticas en el momento adecuado para los consumidores (Chen et al., 2020; Lu et al., 2018). El desarrollo del fruto del tomate se puede clasificar en dos procesos de desarrollo principales: desarrollo

temprano del fruto y maduración del fruto, mientras que la estructura morfológica y el tamaño del fruto se determinan principalmente en la etapa temprana de desarrollo del fruto. El desarrollo temprano del fruto del tomate se puede dividir en tres etapas: (1) desarrollo del ovario y cuajado del fruto; (2) división rápida de las células y aumento significativo en el número de células; (3) desencadenante del crecimiento y desarrollo del fruto del tomate. La maduración del fruto del tomate tiene características de etapa relacionadas con el color y firmeza, por lo que el proceso de maduración se clasifica como: verde inmaduro (IMG), verde maduro (MG), rompedor o ‘*breaker*’ (Br), naranja (Or) y rojo maduro (RR) (Klee y Giovannoni, 2011) (**Figura 9**). La maduración del fruto está acompañada por la formación de muchos rasgos relacionados con la calidad, como la firmeza, el color, el aroma, las vitaminas y otros. El silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS) ha demostrado ser una técnica eficaz para el examen rápido de las funciones de los genes en las plantas, en particular para el color del fruto y otros fenotipos obviamente visibles (Becker, 2013). En términos de frutos de tomate, VIGS ofrece una alternativa rápida para eliminar la expresión de un gen específico sin la tediosa transformación genética a través del cultivo de tejidos (Ji et al., 2020). El sistema VIGS basado en TRV se puede introducir eficientemente mediante la infiltración en frutos de tomate por inyección en el fruto unido a la planta huésped (Fu et al., 2005). Como ejemplos definitivos, VIGS-SIPDS, SIEIN2, SICTR1 y SIEILs (los genes relacionados con la biosíntesis del licopeno y la señalización del etileno) dieron como resultado fenotipos de color no uniforme similares a los observados más tarde por transformación estable con constructos de ARNi o CRISPR-Cas9 (Fu et al., 2005), acortando significativamente el tiempo requerido para la identificación preliminar de las funciones génicas. De manera similar, esta técnica también se ha aplicado para desarrollar un sistema de reportería visual en algunas líneas específicas de tomate transgénico basado en la acumulación de antocianinas (Orzaez et al., 2009). A su vez, el estudio de mutantes como el mutante *Rin* (que presenta defectos en la suavidad del fruto y no muestra el pico respiratorio y de etileno característico) o el mutante *Cnr* (que tiene un fenotipo de maduración parcial), han permitido mediante el uso de las ciencias ‘ómicas’ el avance en el conocimiento acerca de la maquinaria reguladora aguas arriba de los sistemas de señalización relacionados con etileno y la maduración.

Además, el tomate se ha utilizado ampliamente como un material excelente para investigar los mecanismos que subyacen a la ramificación de la inflorescencia, la floración y la determinación del destino del meristemo apical del brote o SAM (por sus siglas en inglés, *shoot apical meristem*) ya que es una especie con crecimiento simpodial, en el cual la actividad de las células madre determina la arquitectura de la planta, el tiempo de floración, la estructura de la inflorescencia, el tamaño del fruto, el índice de cosecha y el rendimiento final del fruto (Thouet et al., 2008; Park et al., 2014).

Por último, como componente importante en las dietas humanas, el tomate también ha sido un excelente material experimental para la ciencia de los alimentos debido a sus abundantes nutrientes beneficiosos y antioxidantes (Bai et al., 2007; Ye et al., 2021). Además de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y otros metabolitos primarios, el

tomate también es abundante en pigmentos, flavonoides, volátiles y otros metabolitos secundarios. Por otro lado, el tomate también tiene algunos metabolitos secundarios específicos que se acumulan en niveles milimolares, que muestran actividad antimicrobiana, como la α -tomatina (You y van Kan, 2017). El tomate y sus productos procesados siempre contienen altos niveles de licopeno y β -caroteno, por lo que se los considera fuentes importantes de licopeno y provitamina A en la dieta humana (Zhu et al., 2018). Debido a la presencia de fitoquímicos que promueven la salud, como los tocoferoles y los flavonoides en el tomate, el tomate y sus productos procesados se catalogan como alimentos funcionales (USDA, 2022). Se han generado cultivares de tomate y líneas transgénicas con niveles más altos de licopeno, β -caroteno, zeaxantina y luteína después de la domesticación y el mejoramiento genético (Fraser y Bramley, 2004).

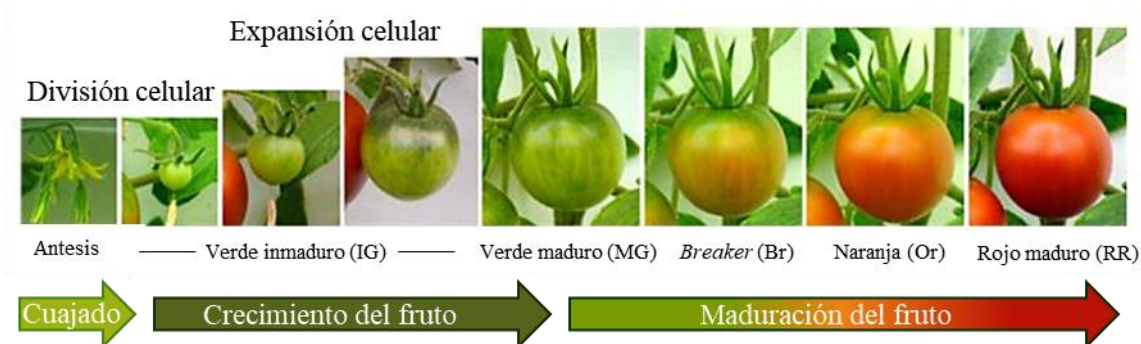


Figura 9. Desarrollo del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*). Figura obtenida de Liu et al. (2022).

4.3. Estrategias para aumentar la tolerancia a estreses abióticos

La tolerancia al estrés abiótico en plantas es un desafío cada vez más importante en un mundo que se enfrenta a un cambio climático constante. Para garantizar la seguridad alimentaria a largo plazo, es crucial comprender mejor los mecanismos de respuesta y adaptación de las plantas a estos estreses. Una de las estrategias clave para aumentar la tolerancia a los estreses abióticos en las plantas es la mejora genética, mediante la identificación y selección de variedades más tolerantes a estos factores. La investigación en biotecnología y la ingeniería genética ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías que permiten la modificación genética de las plantas para aumentar su tolerancia al estrés abiótico, aspecto en el que se hace clave el estudio de genes de interés mediante el análisis de mutantes (Eckart et al 2023; Verslues et al., 2023).

Mejora genética del tomate

El tomate ha sido una de las especies que ha recibido mayor inversión en la mejora genética, logrando grandes progresos en las últimas décadas. En la actualidad se han recolectado y catalogado más de 83,000 accesiones de tomate que han sido conservadas meticulosamente en bancos de semillas ubicados en distintas partes del mundo (Bauchet y Causse, 2012; Schwarz et al., 2014). Actualmente, los cultivares disponibles cuentan

con resistencias a numerosos patógenos (Bai y Lindhout, 2007) pero en el contexto de cambio climático actual, uno de los objetivos prioritarios de mejora es el desarrollo de cultivos tolerantes a estreses abióticos. En nuestro país, gran parte de la producción de tomate se obtiene en áreas con problemas de sequía y salinidad, especialmente en Andalucía y Murcia. Por lo tanto, los programas de mejora que permitan aumentar la tolerancia del tomate a dichos estreses ambientales tendrán un impacto positivo en la economía de estas zonas productoras.

Para llevar a cabo un programa de mejora genética eficiente, es fundamental contar con fuentes de diversidad genética dentro de la especie, así como que exista la capacidad de heredar los rasgos de interés. La mejora genética tradicional o clásica implica el cruce de variedades de élite cuidadosamente seleccionadas dentro de la misma especie, o el cruce de una variedad de élite con una especie filogenéticamente cercana. La obtención de nuevas variedades a través de esta estrategia es un proceso muy laborioso, y la elección adecuada de los parentales es un paso crucial que requiere un conocimiento detallado del germoplasma disponible (Causse et al., 2006).

Uno de los principales cuellos de botella en los programas de mejora es la fuerte reducción de la diversidad fenotípica y genética en los germoplasmas modernos, debido por un lado a la domesticación (ya que históricamente los programas de mejora se enfocaban en obtener altos rendimientos, con frutos de gran calidad organoléptica y nutricional, reduciendo los costos de producción, pero dejando atrás aspectos importantes como la resistencia a las condiciones ambientales adversas), y por otro al desarrollo de cultivares comerciales, lo que ha llevado al fenómeno de erosión genética (Gascuel et al., 2017; Yolcu et al., 2020). Por lo tanto, la agricultura moderna ahora depende de un número relativamente pequeño de híbridos uniformes y cultivares comerciales de los principales cultivos. No obstante, las especies silvestres pueden considerarse reservorios primarios de diversidad genética y merecen una gran atención en la exploración de genes vinculados a sus rasgos de tolerancia al estrés. En comparación con los cultivos modernos, sus ancestros silvestres podían tolerar y prosperar de manera efectiva en una amplia variedad de estreses ambientales, como se observó en las especies silvestres de tomate (Bolarín et al., 1991, 2001; Albaladejo et al., 2017). Un ejemplo de ello es la especie *S. pennellii*, que crece en hábitats extremadamente secos del Perú Occidental y tiene una gran tolerancia a la salinidad y sequía. Por otro lado, *S. habrochaites* puede tolerar el frío y las heladas, mientras que algunas variedades de *S. lycopersicum* L. *cerasiforme* tienen tolerancia a la humedad. Estas características hacen que las especies silvestres de tomate sean valiosas para la mejora genética del tomate cultivado (Cuartero et al., 2010). Es posible cruzar todas las variedades silvestres de tomate con la variedad cultivada, siempre y cuando se utilice esta última como receptor de polen, aunque la eficacia de este proceso puede variar (Bedinger et al., 2011). Por lo tanto, una estrategia prometedora para mejorar el rendimiento de los cultivos actuales en condiciones desfavorables es identificar los factores que confieren tolerancia a diferentes tipos de estrés en las especies silvestres, y eventualmente transferir estos factores a las especies cultivadas que están filogenéticamente relacionadas.

Además de las especies silvestres, las variedades tradicionales o variedades locales también son importantes fuentes de variabilidad genética. Se refieren a variedades seleccionadas y desarrolladas por agricultores locales durante cientos o algunos miles de años, para satisfacer sus necesidades de adaptación a sus entornos locales, que pueden exhibir especificidades en la calidad del fruto, por lo que constituyen un excelente material de mejoramiento para fortalecer la tolerancia al estrés y aumentar la calidad del fruto (Gascuel et al., 2017). Para la tolerancia al estrés abiótico, se han recolectado variedades relevantes de áreas semiáridas y áridas, como la cuenca del Mediterráneo, donde las plantas están expuestas a múltiples factores estresantes ambientales que interactúan, como la sequía, el calor, la salinidad y el exceso de radiación lumínica. Bajo estas condiciones estresantes, las plantas alteran su metabolismo y perfil de expresión génica hacia la adaptación fisiológica y morfológica y la biosíntesis de metabolitos particulares (Balestrini et al., 2021).

Nuestro grupo lleva varios años trabajando con una colección de variedades tradicionales recolectada por la Red de Agroecología y Ecodesarrollo de la Región de Murcia (RAERM) y conservadas y registradas en el banco de semillas del Servicio de Experimentación Agrícola y Forestal de la Universidad de Murcia (SEAF-UM) (Egea-Fernandez et al., 2015). Estas variedades están adaptadas a las diferentes condiciones de clima y suelo adversas, en algunos casos extremas, de sus respectivas localidades de origen (escasez de precipitaciones, alto contenido de sales en los suelos, altas o bajas temperaturas en el ambiente...). Por todo ello dicha colección constituye un excelente material para abordar la selección y caracterización de variedades con un óptimo balance tolerancia a salinidad vs productividad vs calidad de fruto. Los avances obtenidos hasta el momento quedan recogidos en la reciente revisión Egea et al. (2022). Brevemente, se ha analizado conjuntamente la tolerancia a estrés abiótico y la calidad del fruto de variedades que tenían características morfológicas muy diferentes entre ellas, y comparado con el cultivar comercial Moneymaker (utilizado como referencia). Los resultados son muy prometedores, como hemos comprobado que son capaces de mantener la producción y a la misma vez incrementar la calidad del fruto con la salinidad incluidos los metabolitos secundarios (Massaretto et al., 2018; Meza et al., 2020).

La investigación en biología molecular y genómica han brindado a los mejoradores herramientas eficaces para la mejora genética. Un caso es la selección asistida por marcadores moleculares. El desarrollo de estos marcadores ha permitido la creación de mapas genéticos de alta densidad en el genoma del tomate, lo que ha facilitado la identificación de los caracteres cuantitativos en QTLs y ha allanado el camino para el mapeo físico y el clonaje molecular de los factores genéticos responsables de estos caracteres (Causse et al., 2006; Bauchet y Causse, 2012; Capel et al., 2015; Capel et al., 2017). Además, la secuenciación completa del genoma del tomate ha sido un gran avance hacia la comprensión de las bases genéticas y moleculares que regulan el desarrollo, la maduración del fruto y las respuestas a diversos tipos de estrés (The Tomato Genome Consortium, 2012). Por otro lado, el avance de la ingeniería genética en las últimas décadas ha permitido superar la limitación de la capacidad de entrecruzamiento entre

especies, lo que no era posible en la mejora tradicional. De esta forma, es posible introducir un carácter específico en un cultivar de interés agronómico mediante transformación vegetal y regeneración *in vitro* de plantas transformadas, en un período de tiempo mucho más breve que el requerido por la mejora tradicional o la asistida por marcadores (Bergougnoux, 2014). Además, las tecnologías de edición genómica han revolucionado la ingeniería genética en los últimos años, especialmente el sistema CRISPR-Cas9, que consta de la nucleasa Cas9 y un ARN guía que se dirige a la secuencia genómica de interés, permitiendo la modificación del ARN de forma rápida, directa y precisa, incluso de múltiples genes simultáneamente (Voytas y Gao, 2014). Esta técnica innovadora se ha utilizado con éxito no solo en plantas modelo, sino también en especies agronómicas de interés, como el tomate, el arroz, el trigo, el maíz o la patata (Voytas y Gao, 2014; Schaart et al., 2016). En el caso del tomate, CRISPR-Cas9 se ha utilizado con éxito para obtener avances como frutos partenocárpicos, frutos de mejor calidad nutricional con un mayor contenido de licopeno o de ácido ascórbico, así como acelerar el tiempo de floración del tomate, producir tomates con mayor tiempo de vida útil, y producir tomates resistentes al virus del mosaico del tabaco (TMV) o al mildiú vellosa (Ueta et al., 2017; Li et al., 2018; Wu et al., 2020; Cai et al., 2021; Liu et al., 2021; Zhao et al., 2021; Yang et al. 2023). Es importante destacar que algunos de estos avances aún no se han comercializado a gran escala, y su aplicación en la industria agrícola está en proceso de evaluación y regulación por parte de las autoridades correspondientes.

Análisis de mutantes como herramienta para la identificación de genes

Por otro lado, el análisis de mutantes es una técnica comúnmente usada para investigar los mecanismos de tolerancia a los estreses abióticos e identificar los genes que los controlan. La mutagénesis insercional con T-ARN es una estrategia comúnmente utilizada para generar colecciones de mutantes, como se ha demostrado en varias especies, incluyendo *Arabidopsis*, arroz, maíz, soja y tomate. Provoca la interrupción o modificación de la expresión de los genes al insertar una secuencia invasora de ARN en las regiones codificantes del gen o en las regiones reguladoras adyacentes (Atkinson y Urwin, 2012). Debido a que se conoce la secuencia del elemento insertado, se puede clonar fácilmente el gen afectado mediante técnicas de PCR. La caracterización del mutante resultante de la inserción no solo proporciona información valiosa sobre la función del gen mutado, sino que además, la presencia del T-ARN etiqueta el gen, facilitando su aislamiento. La identificación de los genes implicados en la tolerancia a la salinidad puede proporcionar la base científica para abordar los programas de mejora genética en los años venideros. Los estudios que analizan mutantes han proporcionado un gran conocimiento en la actualidad sobre los muchos genes que controlan rasgos agronómicos complejos, particularmente en tomate (Pérez-Martín et al., 2017; Rothan et al., 2019; Salava et al., 2021).

Esta tesis doctoral se enmarca en un proyecto de investigación liderado por los profesores M^a Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC), Vicente Moreno (IBMCP-UPV) y Rafael Lozano (Universidad de Almería) en el que se ha creado la primera colección de mutantes

insercionales del cultivar comercial de tomate (cv. Moneymaker) y una accesión de la especie silvestre *Solanum pennellii* (PE47) (Atarés et al., 2011; Pérez-Martín et al., 2017). El análisis de esta colección ha permitido la identificación y caracterización de algunos genes clave implicados en la respuesta a la salinidad en tomate. Un ejemplo de mutante T-ADN de *S. lycopersicum*, es el mutante *Slcbl10*, estudiado en esta tesis doctoral, capítulo I). No obstante, no todos los mutantes con un fenotipo de interés de la colección son insercionales, sino que algunos pueden ser de tipo somaclonal. Esto ocurre cuando se producen alteraciones en algún gen durante el proceso de regeneración *in vitro* de las plantas transformadas. El gen alterado no queda identificado por el inserto T-ADN (Mohan Jain, 2001; Bairu et al., 2011), y a pesar de que identificar el gen alterado en estos mutantes es más difícil, algunos de ellos tienen un interés fenotípico significativo, lo que muestra la importancia del gen responsable de dicho fenotipo. Un ejemplo de un mutante somaclonal es el mutante *rbohG* de *S. lycopersicum*, renombrado como *Sodgat* y estudiado en esta tesis doctoral, Capítulo II).

Aunque las prácticas de mejora genética y el análisis de mutantes son estrategias clave para aumentar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico y han aportado grandes avances, aún existe en la actualidad una serie de aspectos pendientes y urgentes que requieren de más investigación. Entre ellos se incluyen la comprensión detallada de los mecanismos celulares y moleculares que regulan las respuestas de las plantas al estrés abiótico, la identificación de los principales genes y redes de genes que controlan la tolerancia al estrés abiótico en diferentes especies de plantas, y la identificación de marcadores moleculares que permitan la selección rápida y precisa de plantas más tolerantes a los estreses abióticos. También se hace esencial comprender cómo el cambio climático afectará la distribución geográfica de las plantas y cómo esto afectará la producción de alimentos y la biodiversidad (Verslues et al., 2023). Para abordar estas necesidades prioritarias, se requiere no solo de una mayor inversión en la investigación, sino además de una mayor colaboración interdisciplinaria entre científicos de diferentes campos y una mejora en la disponibilidad y accesibilidad de datos y recursos genéticos para apoyar la investigación.

5. Genes involucrados en la tolerancia a estrés abiótico de tomate a largo plazo

A pesar de los muchos genes manipulados a través de la ingeniería genética con el objetivo de fomentar plantas tolerantes al estrés abiótico aún queda mucho pendiente por conocer (Kotula et al., 2020). Una de las razones de ello es que la respuesta al estrés abiótico ha sido generalmente estudiada a corto/medio plazo pero no a largo plazo, y se sabe que la variación en la tolerancia al estrés abiótico puede depender fuertemente de las condiciones impuestas, el nivel de estrés, la duración del tratamiento y las condiciones de cultivo, así como la etapa de crecimiento estudiada (Cuartero et al., 2009). En consecuencia, la utilidad de las pruebas *in vitro*, a menudo utilizadas para evaluar la tolerancia a la sal, puede no ser tan útil porque las condiciones de transpiración tienen una gran influencia en el transporte y la tolerancia de Na^+ . En condiciones *in vivo*, es evidente que, entre otros factores, la humedad relativa del ambiente es un factor

primordial que afecta al cierre estomático y al estado hídrico de la planta (Driesen et al., 2022). En consecuencia, los mecanismos de tolerancia predominantes destinados a mantener un equilibrio óptimo entre la tolerancia y el crecimiento vegetativo o reproductivo pueden ser diferentes. Por ejemplo, el mecanismo de evasión utilizado por las plantas contra el estrés osmótico causado por sequía, salinidad u otros factores estresantes puede tener efectos negativos a largo plazo porque una menor pérdida de agua inducida por el cierre estomático eventualmente afectará la fotosíntesis y, por lo tanto, al crecimiento de la planta y a la producción (Ruiz-Lozano et al., 2010).

Las diferencias encontradas en el grado de tolerancia de ciertos genotipos en la etapa vegetativa o reproductiva se asocian principalmente al coste energético debido al uso parcial de metabolitos y nutrientes para la recuperación de la homeostasis en lugar de usarlos para el crecimiento (Verslues et al., 2023). Por lo tanto, es necesario tener en cuenta que el crecimiento y el desarrollo de las plantas dependen de la disponibilidad de recursos ambientales esenciales como la luz, el agua y los nutrientes, mientras que las limitaciones ambientales como la sequía, el calor, la salinidad, el frío y la luz intensa pueden afectar negativamente al crecimiento y rendimiento de las plantas. Para hacer frente a estas condiciones, el metabolismo de la planta debe modificarse para que sea posible producir los compuestos necesarios para hacer frente al estrés; por lo tanto, las plantas deben dividir estos recursos entre diferentes funciones fisiológicas en competencia, como el crecimiento, el mantenimiento y la reproducción, siendo estas funciones mutuamente excluyentes. Este uso múltiple de recursos limitados implica compensaciones inevitables en la asignación de recursos (Munns et al., 2020; Verslues et al., 2023), lo que plantea la cuestión de si la tolerancia del genotipo puede diferir según la etapa de desarrollo, vegetativa o reproductiva. Un ejemplo es el caso del gen *HAL1* en tomate, capaz de reducir la absorción y acumulación de Na^+ en las plantas. La sobreexpresión de este gen no mejoró el rendimiento del fruto bajo estrés salino a pesar de una menor acumulación de Na^+ , debido a la necesidad de síntesis de osmolitos que penalizó el crecimiento y afectó negativamente el rendimiento del fruto (Gisbert et al., 2000; Muñoz-Mayor et al., 2008). Esto demuestra la importancia de diferentes mecanismos de tolerancia para el crecimiento óptimo de la planta y explica los resultados heterogéneos en estudios de tolerancia al estrés abiótico.

En los últimos años, los avances en técnicas de fenotipado de alto rendimiento en condiciones controladas y en el campo han permitido progresos valiosos en la evaluación de la tolerancia a estrés abiótico (Kuromori et al., 2022) y el uso de análisis de imágenes y el aprendizaje automático han mejorado la precisión y eficiencia de los estudios de manera significativa (Singh et al., 2021). Aunque se precisa de estudios bajo condiciones ambientales controladas, el fenotipado moderno de alto rendimiento permite la adquisición de datos temporales y espaciales más allá del fenotipo terminal con menos esfuerzo y tiempo que el fenotipado manual (Z. Li et al., 2021). Esto facilitará una mejor comprensión del papel de los genes clave en la tolerancia de las plantas y la realización de experimentos a largo plazo bajo diferentes condiciones ambientales. Esto debería facilitar un progreso más rápido en la aclaración del papel de los genes clave implicados

en la tolerancia de las plantas a nivel de producción y en la realización de experimentos a largo plazo bajo diferentes condiciones ambientales.

Para conseguir genotipos de tomate capaces de mantener la productividad y el rendimiento frente a las condiciones estresantes esperadas por el cambio climático, una prioridad es la identificación de genes clave involucrados en la tolerancia del tomate al estrés abiótico, tanto a corto/medio como a largo plazo.

5.1. Genes de señalización

La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, tonoplasto y/o retículo endoplasmático a través de los canales catiónicos genera cambios en el nivel de Ca^{2+} del citoplasma y activa las cascadas de señalización. Estos aumentos transitorios de Ca^{2+} son percibidos por proteínas efectoras reguladas por Ca^{2+} , como las calmodulinas (CaMs), las proteínas tipo calcineurina B (CBLs) y las proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) (White y Broadley, 2003; Cheong et al., 2007). Las CaMs son proteínas altamente conservadas que se unen al Ca^{2+} y regulan una amplia variedad de proteínas efectoras, mientras que las CBLs y CDPKs son importantes para la regulación de la absorción de nutrientes y el mantenimiento de la homeostasis de iones (White y Broadley, 2003; Cheong et al., 2007).

Las CBLs (Calcineurin B-Like protein), ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal, son similares a la subunidad reguladora B de la calcineurina y a los sensores neuronales de Ca^{2+} (Liu y Zhu, 1998; Kudla *et al.*, 1999) y un dominio de unión a calcio altamente conservado que se encuentra en la región N-terminal y está compuesto por cuatro estructuras en forma de hélice-bucle-hélice conocido como “*EF-hand*” que les permite actuar como sensores de calcio y detectar cambios en los niveles intracelulares de calcio. Además, presentan un dominio de interacción con la quinasa asociada a CBL (CIPK) que les permite activarlas formando un complejo CBL-CIPK que juega un papel importante en la regulación de procesos fisiológicos y respuestas a estrés en la planta. Por último, presenta un dominio en la región C-terminal en el que se encuentran secuencias variables que determinan la especificidad de interacción con diferentes proteínas y participan en la función específica de cada miembro de la familia CBL (Guo *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2002). Las proteínas CBL se localizan principalmente en la membrana plasmática y en menor medida en otros orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico y el núcleo.

Por otro lado, las proteínas CIPK son reguladores importantes en la señalización de calcio y la respuesta a estímulos ambientales en las plantas y se localizan en diferentes partes de la célula, incluyendo la membrana plasmática, el citosol, el núcleo y las mitocondrias, dependiendo de su función específica en la señalización celular y las respuestas a los estímulos ambientales. (**Figura 10**) (Batistic y Kudla, 2009). Constan de un dominio de quinasa, un dominio de interacción CBL y un dominio regulador. Ambas proteínas pueden interactuar con una variedad de proteínas diferentes además de entre sí, lo que sugiere

que estas proteínas tienen una función diversa en la regulación de la señalización celular en las plantas (Pandey et al., 2008; Weinl et al., 2009; Geiger et al., 2010).

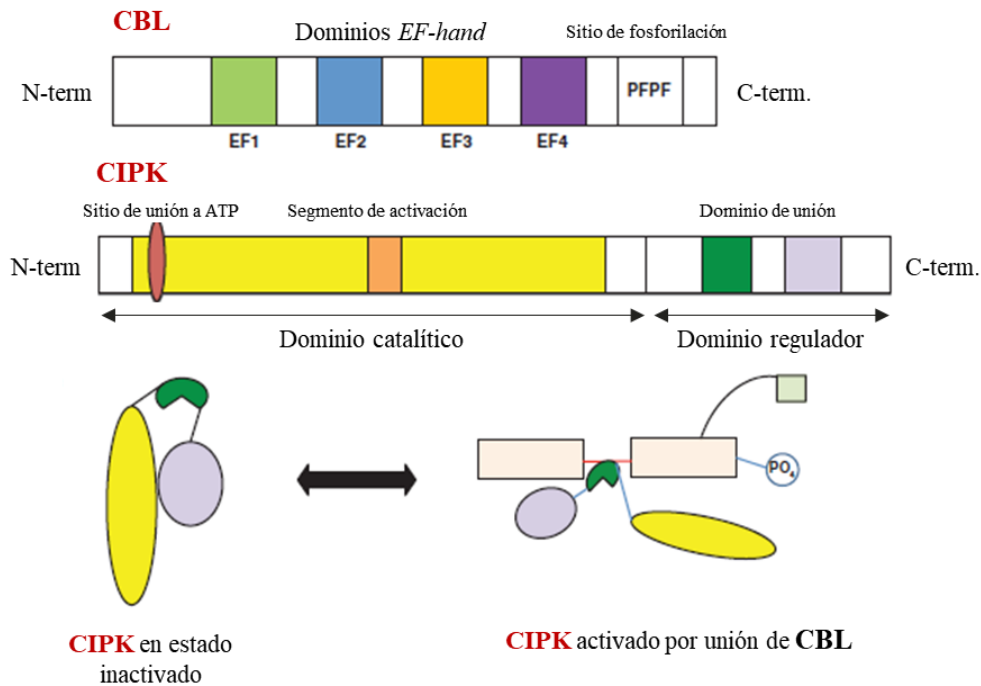


Figura 10. Estructura esquemática de CBL y CIPK y el complejo CBL-CIPK. a) Molécula CBL con cuatro manos EF y el sitio de fosforilación PFPF en el extremo C-terminal. b) Estructura CIPK con dominio catalítico N-terminal y dominio regulador C-terminal. c) CIPK individual permanece en un estado inactivo y la unión de CBL lo libera de la autoinhibición. La eliminación de CBL puede hacer que vuelva a estar inactivo. Figura modificada de Sanyal et al. (2015).

A través de estudios con mutantes de *Arabidopsis*, se descubrió que los complejos CBL-CIPK están involucrados en la mediación de señales de Ca^{2+} en respuesta a diferentes estímulos ambientales, como frío, ABA, salinidad, estrés osmótico, baja concentración de K^+ y pH alto (Kim, 2013). La combinación de diferentes complejos CBL-CIPK puede generar señales específicas de Ca^{2+} temporal y espacialmente distintas (Guo et al., 2001). Además, se ha sugerido que las proteínas CBL también pueden interactuar directamente con una proteína diana, regulando negativamente su actividad de manera independiente a CIPK (Ren et al., 2013). Las proteínas CBL también influyen en la localización de los complejos CBL-CIPK en diferentes regiones celulares (generalmente en la membrana celular) lo que contribuye a la especificidad espacial en el reconocimiento del objetivo (Batistič et al., 2010; Tang et al., 2014), siendo clave para ello la modificación lipídica. Las CBLs presentan un sitio de modificación lipídica en la región N-terminal para la prenilación y uno de miristoilación en la región C-terminal. La prenilación es esencial para la localización de la proteína CBL en la membrana plasmática y su interacción con quinasas CIPK, lo que es importante en la señalización de estrés abiótico. La miristoilación no es esencial para la localización de CBL en la membrana, pero puede tener un papel en la regulación de la actividad de la proteína (Sanyal et al., 2015).

Son cada vez más frecuentes los estudios realizados para conocer el papel de las interacciones CBLs-CIPKs en la respuesta de tomate para diferentes tipos de estrés abiótico, en la regulación de la apertura y cierre estomático y en la absorción de nutrientes a través de señales de Ca^{2+} .

5.2. La ruta SOS en tomate. Papel del gen *S/SOS1*

La ruta SOS tiene un papel central en la detección y señalización de la tolerancia a la sal. Es una vía muy conservada evolutivamente, que consiste en el intercambiador de Na^+/H^+ SOS1 y las proteínas reguladoras SOS2 y SOS3, descubiertas durante la selección genética de tres mutantes hipersensibles a la sal (*sos*) en *Arabidopsis* (Steinhorst y Kudla, 2019). Los niveles elevados de Na^+ intracelular pueden inducir la señalización de Ca^{2+} como segundo mensajero, activando el componente SOS3 de la vía (también conocido como CBL4, *calcineurin B-like protein 4*), que se une y activa a la proteína quinasa SOS2 (también conocida CIPK24, *CBL-interacting protein kinase 24*), una proteína quinasa de serina/treonina que pertenece a la familia SnRK3 (*sucrose non-fermenting-1 (SNF1)-related protein kinases*). A continuación, el complejo SOS2/SOS3 fosforila y activa el antiportador de Na^+/H^+ SOS1 de la membrana plasmática, que expulsa los iones Na^+ fuera de la célula limitando su acumulación en el citoplasma (Figura 11) (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002).

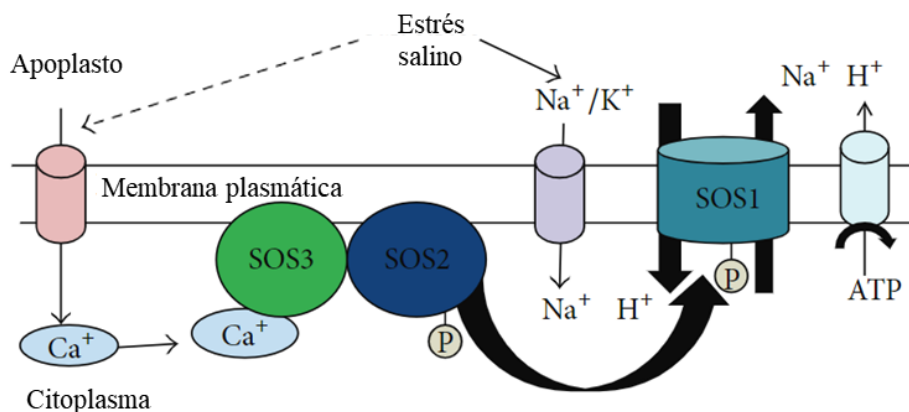


Figura 11. Modelo de la ruta SOS para las respuestas de estrés salino. Una alta concentración externa del sal dispara una señal de Ca^{2+} en el citosol que activa a SOS3 (CBL4), que a su vez interacciona con SOS2 (CIPK24). El complejo SOS2/SOS3 fosforila y activa a SOS1, que es un antiportador Na^+/H^+ de membrana que extruye Na^+ al apoplasto. La activación de SOS1 requiere el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3 a través de la miristoilación del extremo N-terminal de SOS3. Figura de Gupta and Huang (2014).

La sobreexpresión de *AtSOS1* conduce a una acumulación reducida de Na^+ tanto en el xilema como en los brotes de *Arabidopsis* (Shi et al., 2003) y los genes pertenecientes a la ruta SOS en tomate son homólogos a los de *Arabidopsis* (Oliás et al., 2009a, 2009b). Belver et al. (2012) demostraron que la secuencia de nucleótidos de tomate similar a *SOS2* aislada es el verdadero ortólogo de *AtSOS2* y, por lo tanto, la proteína codificada debería operar en la ruta de transducción de señales de sal de SOS de tomate. La expresión de SOS1 es específica de ciertas partes de la planta, como la epidermis de la raíz y las células

del parénquima del xilema en raíces y tallos (Wu et al., 1996). En el ápice de la raíz, la función principal de SOS1 es evitar la acumulación excesiva de Na^+ en las células radiculares, ya que estas carecen de un sistema vacuolar bien desarrollado para contener el exceso de este catión (Shi et al., 2002). Sin embargo, como ya se mencionó, las diferencias morfológicas entre *Arabidopsis* y tomate pueden explicar los papeles no compartidos de estos genes ortólogos en la parte aérea, por lo que SISOS1 retiene Na^+ en los tejidos adultos de la parte aérea impidiendo que llegue a los tejidos jóvenes fotosintéticamente activos (Olías et al., 2009a). En consecuencia, SISOS1 tendría un papel importante evitando la acumulación de Na^+ en las hojas jóvenes, mientras que probablemente tendría un papel menos relevante en las hojas adultas. Esto se debe a que el sistema de salida de Na^+ en la membrana plasmática no es esencial para prevenir la toxicidad de Na^+ en células que tienen un mecanismo eficiente de compartimentalización de dicho ion en vacuolas, como ocurre en las hojas adultas en comparación con las jóvenes.

Curiosamente, cuando Albaladejo et al. (2017) estudiaron los mecanismos utilizados por la especie de tomate silvestre tolerante a la sal *S. pennellii* para enfrentar el estrés salino, encontraron niveles más altos de transcritos de *SpSOS1* en el primer conjunto de hojas verdaderas a pesar del carácter de inclusión de Na^+ de esta especie. Estos resultados sugieren que SOS1 tiene un papel importante para conferir tolerancia a la sal a esta especie silvestre, como también se observó en la halófita *Thellungiella* estrechamente relacionada con *Arabidopsis*, donde la reducción de la expresión de SOS1 hizo que la planta fuera tan sensible al Na^+ como *Arabidopsis* (Oh et al., 2009). Como *S. pennellii* depende del Na^+ para el ajuste osmótico, esto implica que sus hojas requerían un suministro constante de Na^+ a través del flujo de transpiración, según lo determinado para otras especies halófitas con un comportamiento de inclusión de Na^+ (Katschnig et al., 2015). De esta forma, ese mayor nivel de expresión de *SpSOS1* detectado en hojas de *S. pennellii* parecería indicar que SOS1 puede coordinar la (re)dirección de Na^+ a tejidos específicos que dependen de Na^+ para el ajuste osmótico. En resumen, el papel de SOS1 en la parte aérea de tomate cultivado y silvestre está asociado con la dirección de Na^+ hacia diferentes tejidos para la acumulación efectiva de iones y el ajuste osmótico ante el estrés.

5.3. Genes reguladores. Factores de transcripción.

Los genes que codifican para factores de transcripción (TF) son uno de los grupos más importantes de genes reguladores relacionados con el estrés abiótico. Entre ellos, los factores de transcripción MYB constituyen una de las mayores familias. Estos genes deben su nombre al motivo de unión al ARN que codifican, llamado “MYB domain”, compuesto de tres repeticiones de hélice-asa-hélice que es responsable de la función de unión al ARN de estas proteínas. La información sobre su papel en el tomate es muy limitada (Yang et al., 2014; Z. Li et al., 2016). Entre los 121 genes de tomate R2R3-MYB, solo se demostró que el gen *SLAIM1* inducido por ABA responde a condiciones de estrés abiótico (AbuQamar et al., 2009). Estos autores observaron una conexión previamente no caracterizada entre ABA, homeostasis de Na^+ , estrés oxidativo y una respuesta patógena,

lo que sugiere que *SLAIMI* funciona en las respuestas de estrés biótico y abiótico y que existe una interferencia entre estas respuestas de estrés en tomate (AbuQamar et al., 2009).

Mediante un análisis de mutantes se ha identificado un gen de tomate MYB de tipo R1 implicado en la tolerancia a la sal (Campos et al., 2016). En el cribado de una colección de mutantes de tomate T-ARN en condiciones de estrés salino, se identificó el mutante de respuesta alterada al estrés salino 1 (*ars1*), cuyo análisis genético reveló que una única inserción de T-ARN en el gen *ARSI* era responsable del fenotipo mutante. *ARSI* codifica para un TF tipo R1-MYB y su expresión es inducida por la salinidad en las hojas en tomate WT. Curiosamente, el mutante *ars1* había reducido el rendimiento del fruto bajo estrés salino, pero este rasgo agronómico clave no se vio afectado en ausencia de estrés. La caracterización de líneas transgénicas de tomate ya sea silenciando o sobreexpresando *ARSI* demostró cómo el producto de dicho gen contribuye a la regulación del cierre estomático en condiciones de estrés salino, lo que reduce la transpiración y el transporte de Na^+ a las hojas, manteniendo así la respuesta completa a largo plazo de la aclimatación al estrés salino (Campos et al., 2016).

Otra familia importante de factores de transcripción son los genes WRKY. En tomate se identifican 83 genes WRKY, pero el conocimiento sobre su implicación en las respuestas al estrés abiótico aún es escaso (Phukan et al., 2016; Bai et al., 2018). Recientemente, Karkute et al. (2018) realizaron un análisis de expresión de todo el genoma de los genes WRKY en tomate en condiciones de estrés por sequía. Los perfiles de expresión revelaron una regulación al alza significativa de nueve genes WRKY principales, con la mayor regulación al alza inducida por la sequía detectada para *SIWRKY58*. Otro gen WRKY que participa en las respuestas al estrés abiótico es *SIWRKY39*, un homólogo de *AtWRKY40* de *Arabidopsis*, que fue inducido por sal, sequía y diversas fitohormonas como ABA, SA y JA, todas ellas implicadas en las respuestas de las plantas al estrés abiótico (Huang et al., 2012; Sun et al., 2015). Curiosamente, *SIWRKY39* fue fuertemente inducido por estrés salino en hojas del mutante de tomate *res* (*restored cell structure by salinity*) (Albaladejo et al., 2018), que afecta a la actividad de SIDEAD39 (helicasa de ARN de caja DEAD) (Capel et al., 2020). Este mutante exhibió un conjunto de alteraciones morfológicas cuando se cultivó sin ningún estrés impuesto y, sorprendentemente, normalizó el desarrollo de la planta y aumentó la producción de frutos cuando esta planta se cultivó bajo estrés salino (García-Abellán et al., 2015; Capel et al., 2020). En cualquier caso, los posibles roles de estos genes *SIWKRY* en el fomento de la tolerancia del tomate al estrés abiótico merecen una mayor investigación mediante análisis funcionales.

Los factores de transcripción NAC también están muy extendidos en los genomas de las plantas, incluido el tomate, y varios genes de esta familia fueron inducidos transcripcionalmente por estrés abiótico, aunque solo unos pocos de ellos están funcionalmente caracterizados (Zhu et al., 2014). Recientemente, Thirumalaikumar et al. (2018) identificaron el *NAC TF Junghbrunnen1 (JUB1)* en tomate como un regulador de la tolerancia a la sequía, pero la expresión de *SIJUB1* también fue fuertemente inducida

en respuesta a tratamientos con H₂O₂, NaCl, PEG y deshidratación, lo que sugiere un papel para este TF en la regulación de cómo responde el tomate a otros estreses abióticos. Además, estos autores demostraron que dos genes DREB (*dehydration-responsive element-binding*) de tomate, *SIDREB1* y *SIDREB2*, son genes diana de *SIJUB1*. Con respecto a la participación de estos genes que codifican DREB en la tolerancia al estrés abiótico, la sobreexpresión de *SIDREB2* mejora significativamente la tolerancia a la salinidad al afectar múltiples procesos celulares (Hichri et al., 2016). Sin embargo, aún no se han caracterizado las funciones de *SIDREB1* y *SIDREB2* en la respuesta del tomate al estrés por sequía (Thirumalaikumar et al., 2018).

En conclusión, existe una necesidad urgente de identificar y caracterizar funcionalmente los genes reguladores de la codificación de TF relacionados con el estrés abiótico en el tomate, para evaluar su uso potencial en la mejora de las plantas de tomate para la tolerancia al estrés abiótico.

5.4. Genes de respuesta a estrés involucrados en la homeostasis iónica

Genes implicados en la homeostasis de Na⁺

En cuanto a los mecanismos de transporte de Na⁺ en las células vegetales, se ha observado que no se han identificado sistemas de transporte específicos, sino que su captación ocurre a través de distintos canales y transportadores no selectivos (**Figura 12**) como los canales de cationes no selectivos NSCC, activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) y glutamato (GLR) (Leng et al., 2002). Por otra parte, se ha observado que los transportadores de alta afinidad de K⁺ de la familia KUP/HAK/KT también parecen mediar el transporte de Na⁺ de baja afinidad (Santa-Maria et al., 1997). Ejemplos de estos transportadores son AtHAK5 y AtKUP1, los cuales tienen la capacidad de discriminar entre K⁺ y Na⁺, aunque disminuyen su actividad de transporte de K⁺ en presencia de altas concentraciones de Na⁺ (Martínez-Cordero et al., 2005). Asimismo, se ha observado que AtAKT1, un canal de K⁺ de la familia Shaker tipo KIR (K⁺ *Inward-Rectifying channel*), disminuye su capacidad de transporte de K⁺ en presencia de concentraciones elevadas de Na⁺ (Nieves-Cordones et al., 2010; Rubio et al., 2010). Por otro lado, los transportadores de K⁺ de la familia HKT (*High affinity K⁺ transporter*) juegan un papel importante en el transporte de Na⁺. Según distintos estudios, los transportadores HKT tienen dos mecanismos diferentes para la absorción de Na⁺, lo que los clasifica en dos subgrupos según su preferencia por el uniporte de Na⁺ (clase 1) o el simporte de Na⁺/K⁺ (clase 2) (Horie et al., 2009; Yao et al., 2010; Ali et al., 2012).

Además de la ruta SOS anteriormente descrita, que limita la entrada de Na⁺ en las células y promueve su extracción hacia el exterior de las células (ver apartado 5.1.), los transportadores HKT1 ocupan un lugar destacado en la tolerancia a la sal. Se encargan de eliminar Na⁺ del xilema a nivel de la raíz y, por lo tanto, evitar su acumulación en la parte aérea de la planta, e indirectamente mejoran la acumulación de K⁺ (Davenport et al., 2007). En la parte aérea, las proteínas tipo HKT1 están involucradas en la eliminación de Na⁺ del xilema, lo que refuerza indirectamente la acumulación vacuolar de Na⁺ en tallos

y hojas, en cooperación con otros transportadores, así como posiblemente asistiendo en su redistribución a otros tejidos sumideros a través de la floema (Munns et al., 2016).

En tomate, Asins et al. (2013) identificaron dos genes estrechamente vinculados que codifican transportadores similares a HKT1, SIHKT1;1 y SIHKT1;2, como candidatos para un QTL importante asociado con la homeostasis de Na^+/K^+ de los brotes, mediante el uso de dos poblaciones de líneas endogámicas recombinantes (RIL) derivadas de *S. lycopersicum* cv. *Cerasiforme* y las especies silvestres tolerantes a la sal *S. pimpinellifolium* y *S. Chesmaniae*. Estos autores encontraron que el gen HKT1;2 que codifica el transportador de Na^+ subyace funcionalmente al principal QTL que controla la homeostasis de Na^+/K^+ en parte aérea, mientras que los alelos HKT1;1 tienen poco efecto en esos tejidos (Jaime-Pérez et al., 2017). Esto también se observó en otros estudios de mecanismos de tolerancia a la sal en tomate y sus parientes silvestres (Almeida et al., 2014; García-Abellán et al., 2014; Albaladejo et al., 2017). Por lo tanto, la principal isoforma del gen codificador de HKT1 involucrada en el transporte de Na^+ en los brotes es HKT1;2, cuyos niveles de expresión aumentados en raíces están relacionados con una mayor recuperación de Na^+ del xilema que disminuye la acumulación de Na^+ en las hojas.

En conjunto, la función de transporte de SOS1 en tomate, al igual que se había sugerido previamente en *Arabidopsis* por Pardo et al. (2006), se coordina estrechamente con la de HKT1 para regular la homeostasis de Na^+ y K^+ (**Figura 12**) (Oliás et al., 2009a). SOS1 sería responsable de transferir el Na^+ desde el parénquima xilemático al xilema, principalmente en las raíces, mientras que SIHKT1 facilitaría el flujo inverso, permitiendo la descarga de Na^+ desde el xilema a las células y favoreciendo su posterior acumulación en las vacuolas (Møller et al., 2009; Craig Plett y Møller, 2010). De esta manera, la acción coordinada de ambos transportadores determinaría la cantidad de Na^+ que se almacena en las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas.

Por otro lado, el papel clave del transportador de Na^+ SIHKT1;2 se ejecuta no solo en los órganos vegetativos sino también en los reproductivos. Romero-Aranda et al. (2020) detectaron una sobreacumulación de Na^+ en flores de líneas HKT1;2 silenciadas con ARNi tratadas con sal y, en consecuencia, una mayor relación Na^+/K^+ , que se asoció con una fuerte reducción en el rendimiento de frutos en las líneas silenciadas en condiciones de salinidad. Estos hallazgos demuestran que el transportador de Na^+ HKT1;2 protege la flor contra la toxicidad de Na^+ y mitiga la reducción en el rendimiento de frutos de tomate bajo condiciones de estrés salino.

La compartimentación de Na^+ en las vacuolas evita su acumulación en el citoplasma, lo que ayuda a mantener una proporción adecuada de Na^+/K^+ citoplasmático y, por lo tanto, contribuye al ajuste osmótico celular por parte de la vacuola (**Figura 12**). El transporte de Na^+ desde el citoplasma a la vacuola se produce a través de los antiportadores Na^+/H^+ del tonoplasto, NHX; por lo tanto, estos antiportadores de cationes son críticos para la tolerancia a la salinidad. El efecto beneficioso sobre la tolerancia a la sal de la sobreexpresión de un gen NHX se demostró por primera vez en *Arabidopsis* a través de la sobreexpresión de AtNHX1 (Apse et al., 1999); sin embargo, los transportadores NHX

también participan en el transporte de K^+ vacuolar. Por lo tanto, las plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan AtNHX1 han aumentado la actividad antiportadora de K^+/H^+ , lo que conduce a un alto almacenamiento de K^+ en sus vacuolas que disminuye el K^+ en el citoplasma, un efecto nocivo revelado por los síntomas de deficiencia de K^+ en las plantas, incluso cuando la concentración de K^+ en las hojas fue mayor en las plantas transgénicas que en las WT (Leidi et al., 2010). Se han identificado cuatro isoformas de NHX en tomate, de las cuales LeNHX3 y LeNHX4 exhiben la inducción más fuerte en respuesta a la salinidad (Rodríguez-Rosales et al., 2008; Gálvez et al., 2012). Además, la capacidad tan alta de la especie de tomate silvestre tolerante a la sal *S. pennellii* para secuestrar Na^+ en las vacuolas de las células de la hoja se asoció con una mayor expresión de NHX3 y NHX4 (Gálvez et al., 2012; Albaladejo et al., 2017). Mientras tanto, se sabe que LeNHX2 está involucrado en la homeostasis de K^+ (Huertas et al., 2013) y LeNHX1 está asociado con un QTL para la concentración de Cl^- (Villalta et al., 2008).

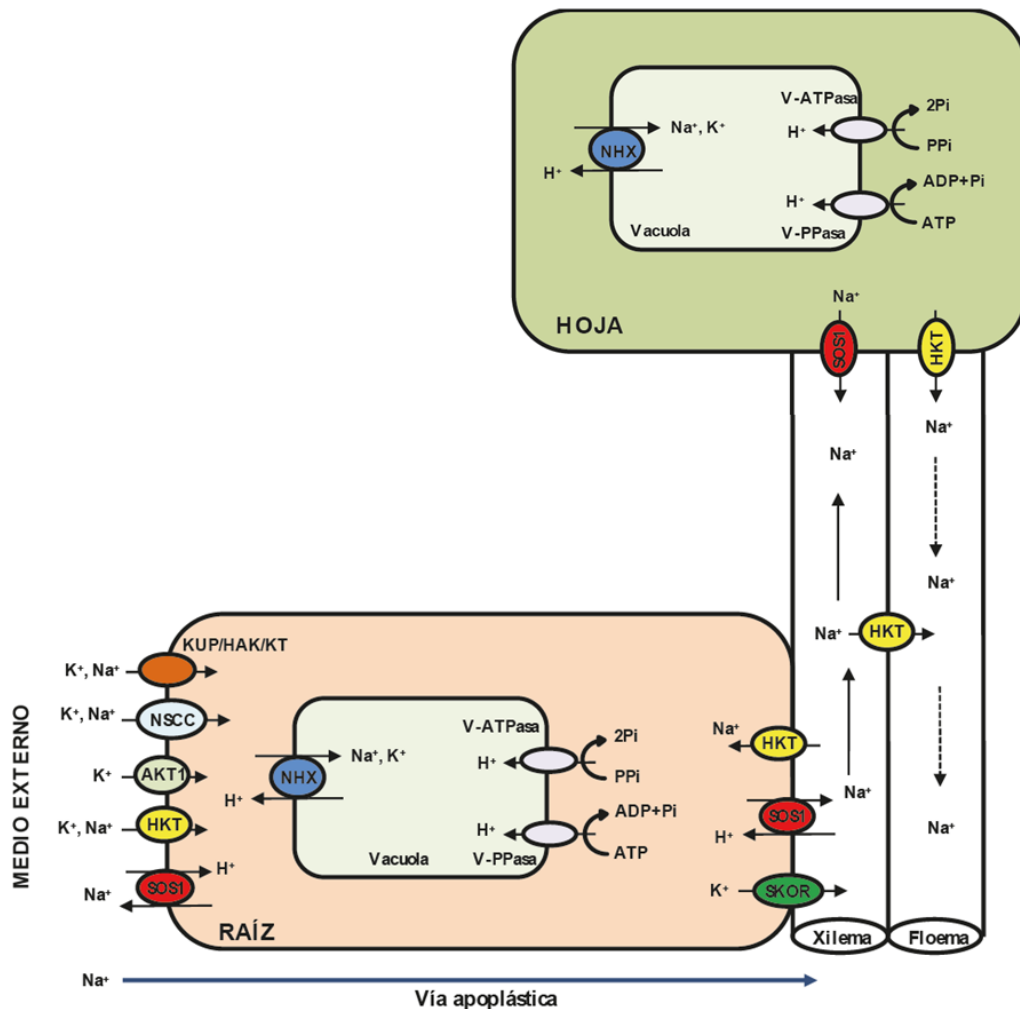


Figura 12. Principales proteínas de transporte implicadas en la absorción, transporte y compartimentación de Na^+ en la planta. El Na^+ es captado en las células de la raíz siguiendo la vía apoplástica o a través de distintos canales y transportadores de membrana, y posteriormente es transportado a lo largo de la planta. AKT1: canal de entrada de K^+ ; KUP/HAK/KT: transportadores de K^+ de alta afinidad; HKT: transportador de K^+ de alta afinidad; NHX: intercambiador vacuolar de Na^+/H^+ ; SOS1: antiportador de Na^+/H^+ ; SKOR: canal de transporte de K^+ a la parte aérea; V-ATPasa y V-Ppasa: bombas de H^+ necesarias para la acción de NHX; NSCC: canal no selectivo de cationes. Figura adaptada de Hanin et al. (2016).

Genes implicados en la homeostasis del K⁺

Las plantas absorben K⁺ mediante el uso de dos familias de transportadores: HAK/KUP/KT y canales de K⁺ dependientes de voltaje, aunque la contribución relativa de cada uno probablemente varía entre las especies (Nieves-Cordones et al., 2016). En tomate, HAK5 es el principal sistema de transporte de K⁺ que opera en las células de la raíz a concentraciones de K⁺ ≤ 0,1 mM, mientras que LKT1 se convierte en el principal contribuyente a la absorción de K⁺ a > 0,1 mM (Amo et al., 2021). Por lo tanto, estos autores demostraron que LKT1 es un actor crucial en la nutrición de tomate K⁺ al contribuir con aproximadamente el 50% de la absorción de K⁺ por la raíz en condiciones de crecimiento óptimas de K⁺.

Diferentes estudios han demostrado por qué el transportador de K⁺ de alta afinidad HAK5 es importante para la absorción de K⁺ de la raíz en condiciones de estrés abiótico (Nieves-Cordones et al., 2010; García-Abellan et al., 2014). El gen *SIHAK5* no solo es fundamental para la nutrición de K⁺ a niveles bajos de K⁺, sino también para aumentar la aptitud de la planta a partir de la sustitución fisiológica de K⁺ por Na⁺ durante el estrés salino. Además, parece que *SIHAK5* también es importante en el desarrollo reproductivo, como demostraron recientemente Nieves-Cordones et al. (2020). Mediante el uso de líneas mutantes de *Slhak5* generadas por la tecnología CRISPR-Cas9, estos autores demostraron que *SIHAK5* es necesario para la acumulación de K⁺ en los granos de polen, la germinación y la elongación del tubo, lo que constituye un determinante vital de la producción de semillas y frutos. A pesar de la baja viabilidad de los granos de polen *Slhak5*, las plantas *Slhak5* produjeron frutos de tomate casi sin semillas, lo que puede ser de gran interés para la industria procesadora de tomate.

Las proteínas involucradas en la homeostasis del K⁺ parecen estar reguladas por los mencionados complejos CIPK/CBL (Lara et al., 2020). Recientemente, Amo et al. (2021) mostró que CIPK23 de tomate era responsable de prácticamente el 100% de actividad del transportador LKT1 y del 40% de la actividad de HAK5 en planta. Curiosamente, SlCIPK23 también estuvo involucrado en la acumulación de Na⁺ de las plantas de tomate con deficiencia en K⁺. Debido a que tal papel no se comparte con el ortólogo de *Arabidopsis* AtCIPK23, sugiere que las redes CIPK-CBL están involucradas en mecanismos específicos de especie que mejoran las respuestas de tolerancia al estrés.

Otros sistemas alternativos también pueden operar cuando el K⁺ está presente por encima de cierto nivel, especialmente en ausencia de HAK5 y AKT1, como se observa en *Arabidopsis* (Rubio et al., 2010). El principal contribuyente a la translocación de K⁺ a parte aérea es el canal SKOR, que participa en la carga de K⁺ en el xilema (Nieves-Cordones et al., 2014). Pero una deficiencia de nutrientes que no sea K⁺ también puede causar tasas más bajas de absorción de K⁺. Por ejemplo, Rodenas et al. (2017) observaron que las deficiencias nutricionales en nitrato y fosfato llevaron a reducciones en los niveles de transcripción de genes que codifican los principales sistemas para la captación de K⁺ de baja afinidad y la translocación de K⁺ en tomate, como *LKT1* y *SISKOR*. Estos resultados sugieren la existencia de una diafonía entre cascadas de señalización para la

regulación transcripcional involucrada en las respuestas de las plantas en condiciones de disponibilidad alterada de diferentes nutrientes.

6. Papel del sensor de calcio ‘*CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (SICBL10)*’ y de la proteína productora de ROS ‘*RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SIRBOHG)*’.

CALCINEURINA B-LIKE PROTEIN 10 (CBL10), también conocida como *SOS3-like Ca²⁺ binding protein8 (SCABP8)*, se identificó inicialmente en *Arabidopsis* (Kim et al., 2007; Quan et al., 2007). La identificación y caracterización de los dos primeros mutantes *cbl10* de T-DNA (mutantes *Atcbl10*) por parte de estos grupos de investigación mostró que el gen *CBL10* es un regulador crucial de la tolerancia a la sal en *Arabidopsis*, ya que la alteración de este gen provocaba fenotipos hipersensibles a la sal en los brotes de las plantas mutadas para este gen. Tras estos estudios pioneros, *CBL10* se ha identificado en otras especies como un regulador crucial en la respuesta de la parte aérea a la toxicidad de la sal, como se observó a partir de dos genes homólogos de *CBL10* en álamos (*Populus trichocarpa*), *PtCBL10a* y *PtCBL10b* (Li et al., 2013; Tang et al., 2014). Además, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión heteróloga de homólogos de *CBL10* de diferentes especies como el tabaco en *Arabidopsis* mejora la tolerancia a la sal (Dong et al., 2015).

Tras la identificación de los mutantes *cbl10* de *Arabidopsis*, el único otro mutante *cbl10* identificado y caracterizado ha sido un mutante de T-DNA de tomate (mutante *Slcbl10*), identificado por nuestro grupo de investigación. Según nuestro estudio, el gen *SICBL10* se expresa principalmente en tejidos aéreos de plantas de tomate y la actividad transcripcional de *SICBL10* en este tejido específico está críticamente involucrada en la respuesta adaptativa de las plantas de tomate al estrés salino, ya que protege los meristemas apicales de los brotes y los tejidos en crecimiento del daño fisiológico causado por la salinidad (Egea et al., 2018). Además, los ensayos de complementación molecular demostraron que *SICBL10* es ortólogo al gen *CBL10* de *Arabidopsis* y que rescata el fenotipo sensible a la sal del brote del mutante *cbl10* de *Arabidopsis*.

El gen *CBL10* también ha sido estudiado en la halófito *Eutrema salsugineum* como modelo para comprender la adaptación de las plantas a la salinidad del suelo (Monihan et al., 2019). En este estudio se encontró que la duplicación del gen *CBL10* en *Eutrema* (*EsCBL10a* y *EsCBL10b*) se vinculó con la alta tolerancia a la sal de la especie. La regulación a la baja de cualquiera de los genes *EsCBL10* redujo el crecimiento en condiciones de estrés salino y la combinación de la regulación a la baja de ambos genes produjo una disminución aún mayor en el crecimiento. Además, se encontraron niveles similares de transcritos de *EsCBL10a* en toda la planta, mientras que el perfil de expresión de *EsCBL10b* fue más similar al de *AtCBL10* en *Arabidopsis*. Se encontró que *EsCBL10b* se acumula en hojas y flores por igual, mientras que *AtCBL10* se detectó principalmente en hojas y débilmente en flores. En plantas de tomate, *CBL10* tiene el mayor nivel de expresión en flores. Los mutantes *cbl10* de tomate y *Arabidopsis* presentaron un desarrollo floral alterado en condiciones de estrés salino, lo que puede estar implicado en la reducción de la producción de frutos y su calidad (Egea et al., 2018; Monihan et al.,

2016). En conjunto, *CBL10* es un gen clave involucrado en la protección del brote, de los órganos vegetativos y reproductivos en condiciones salinas, y esta función parece conservarse entre las especies. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar la función específica de *CBL10* en el desarrollo de las flores, ya que esto se ha atribuido a un efecto indirecto de la función alterada de *CBL10* en tejidos vegetativos.

Las ROS funcionan principalmente como moléculas de transducción de señales que regulan diferentes vías durante la aclimatación de las plantas al estrés abiótico (Castro et al., 2021). Los RBOHs (*Plant respiratory burst oxidase homologs*), también conocidos como oxidasas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), son componentes clave de la tolerancia al estrés abiótico (Wang et al., 2018). Por lo tanto, los mutantes knockout de *Arabidopsis AtrbohF* presentaron una mayor sensibilidad a la sal y una homeostasis alterada de Na^+/K^+ (Jiang et al., 2012). En tomate, el gen *SIRBOHG*, un homólogo del *RBOHF* de *Arabidopsis* tiene la mayor abundancia de transcritos dentro de la familia *RBOH* (Zhou et al., 2014). Este gen, anteriormente conocido como *SIRBOHI* (Sagi et al., 2004), está involucrado en la tolerancia al estrés oxidativo y al estrés por altas temperaturas, así como en el movimiento estomático mediado por ácido abscísico (ABA) y brasinoesteroides (BR) (Xia et al., 2014; Zhou et al., 2014). En cuanto al estrés salino, Yi et al. (2015) estudiaron el impacto de las altas concentraciones atmosféricas de CO_2 en las respuestas de las plantas de tomate al estrés salino, centrándose particularmente en el papel de *SIRBOHI*. Estos autores demostraron que niveles elevados de CO_2 pueden contrarrestar el impacto negativo del estrés salino en la fotosíntesis y la producción de biomasa de forma apoplástica dependiente de H_2O_2 en plantas de tomate (**Figura 13**). Además, la regulación de H_2O_2 también contribuyó a la regulación del transporte de Na^+ desde las raíces a la parte aérea, un proceso influenciado por el movimiento de los estomas, así como el transporte de Na^+ desde el xilema a las células de las hojas.

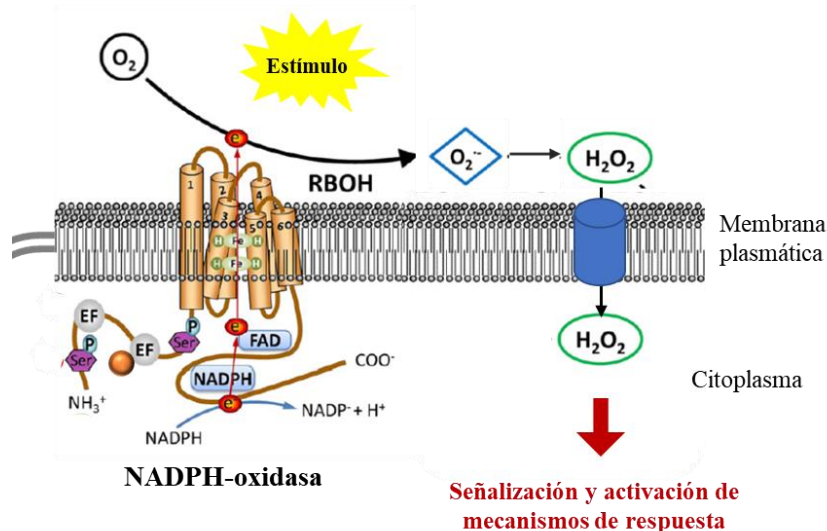


Figura 13. Representación esquemática del funcionamiento de la proteína RBOH en plantas durante una respuesta de estrés. La RBOH se encuentra en la membrana plasmática de la célula vegetal y se activa en respuesta a un estímulo estresante, lo que desencadena una cascada de señalización que resulta en la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 producido actúa como molécula señalizadora y desempeña un papel clave en la activación de diferentes vías de respuesta al estrés.

A partir de una colección de mutantes de tomate, en nuestro grupo se identificó un mutante de tomate hipersensible a la sal, denominado inicialmente *salt hypersensitive 1* (*she1*), cuyo análisis fisiológico reveló un alto nivel de transporte de Na⁺ desde las raíces a los brotes, junto con una baja expresión de *SIHKT1;2* en raíces (Plasencia et al., 2014). Usando un enfoque de mapeo por secuenciación, identificamos el gen mutado *SIRBOHG* y su aparente papel clave en la tolerancia a la sal del tomate (Yuste-Lisbona et al., 2019). Además, observamos que este papel se muestra predominantemente en las raíces bajo condiciones de estrés salino, ya que un experimento de injertos recíprocos entre tomate WT (cv. 'Moneymaker') y las plantas mutantes condujo a la sensibilidad a la sal en el primero solo cuando el mutante se utilizó como portainjertos y no como vástago (Plasencia, 2015). Curiosamente, la interrupción de *SIRBOHG* también afecta en gran medida al rendimiento del fruto; por lo tanto, este gen podría tener una función agronómica muy relevante en condiciones de crecimiento de estrés abiótico.

6.1. Localización de *SICBL10* en la membrana plasmática y/o en la vacuola

En la clásica ruta SOS las proteínas SOS2 (CIPK24) y SOS3 (CBL4) interaccionan activando al antiportador Na⁺/H⁺ SOS1, lo que permite la extrusión de Na⁺ de las células (ver apartado 5.1.) El primer estudio que involucró a CBL10 en la vía SOS fue realizado por Quan et al. (2007), demostrando que AtCBL10 interaccionaba con AtCIPK24 (SOS2) *in vivo* e *in vitro* y que AtCBL10 reclutaba a AtCIPK24 hacia la membrana plasmática, siendo el dominio N-terminal de AtCBL10 crucial para esta localización subcelular. Además, determinaron que AtCIPK24 fosforilaba AtCBL10 a nivel de membrana en condiciones de estrés salino y que esto mejoraba la actividad de AtSOS1 (Quan et al., 2007; Lin et al., 2009) (**Figura 14**). Puesto que *AtSOS3* se expresa solo en las raíces y *AtCBL10* se expresa principalmente en parte aérea, ambas proteínas CBL deben estar involucradas en diferentes funciones reguladoras en la respuesta de la planta al estrés salino en *Arabidopsis*. Por otro lado, recientemente se ha demostrado la activación por parte de CBL10 del antiportador Na⁺/H⁺ SOS1 en la membrana plasmática cuando interacciona con CIPK8 en lugar de CIPK24 (Yin et al., 2020), por lo tanto, parece que el complejo CBL10-CIPK8 regula positivamente la actividad de SOS1 y que la vía CBL10-CIPK8-SOS1 es capaz de extruir eficientemente el exceso de Na⁺ en células de levadura sometidas a salinidad (**Figura 14**). En este caso, la activación de SOS1 en *Arabidopsis* ocurre en los mismos sitios del dominio C-terminal que para la misma reacción producida por CBL10-SOS2. Además, también se ha comprobado que principalmente la proteína homóloga EsCBL10b a AtCBL10 de *Eutrema* puede mejorar la activación de la vía SOS, observándose en dobles híbridos de levadura la interacción de este regulador con AtSOS2 a un nivel similar al de AtCBL10 (Monihan et al., 2019), mientras que la homóloga EsCBL10a parece estar implicada en otras funciones.

A pesar de todos estos estudios que involucran a CBL10 con la vía SOS, la relación funcional *in vivo* de SOS y los procesos regulados por CBL10 siguen sin estar claros. Se ha observado que cuando cualquier mutación SOS (*sos3* o *sos1*) se combina con la mutación *cb110*, se produce una menor acumulación de Na⁺ en comparación con la mutación *sos1* simple bajo salinidad, a pesar de que los mutantes dobles exhibieron

fenotipos sensibles a la sal similares a *sos1* en toda la planta (Yang et al., 2019). Si CBL10 solo estuviera implicado en la extrusión de Na^+ fuera de la célula a través de la vía SOS, se esperaría una mayor acumulación de Na^+ en la planta, como ocurre en cualquiera de los mutantes *sos*, pero no al contrario, lo que sugiere que CBL10 regula otros procesos de transporte además de los implicados en la vía SOS.

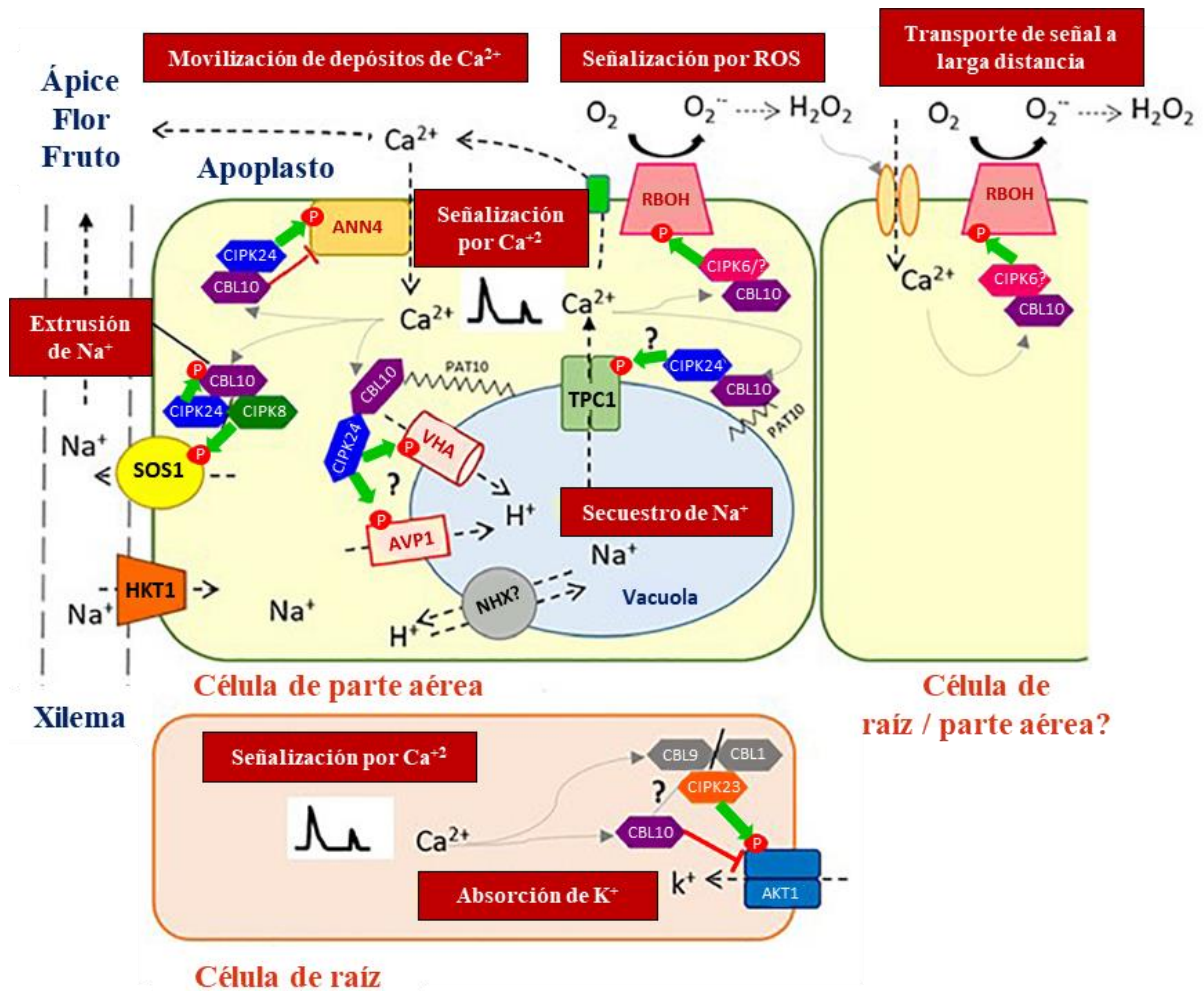


Figura 14. Modelo propuesto para la función CBL10. CBL10 funciona como un regulador crucial en la homeostasis de Na^+ en condiciones de estrés salino, interactúa con CIPK24 (SOS2) y CIPK8, y activa la vía SOS1 en la membrana plasmática para la extrusión de Na^+ a apoplasto y puede estar interactuando con bombas vacuolares de H^+ (AVP1, VHA) que facilitan Na^+ secuestro en la vacuola. CBL10 también juega un papel clave en la homeostasis de Ca^{2+} como un regulador clave de la señalización del estrés en las plantas, involucrado en la generación y el ajuste fino de las firmas de Ca^{2+} en el citoplasma, a través de la coordinación de diferentes canales de Ca^{2+} en diferentes localizaciones celulares, como la membrana plasmática (AtANN4) y probablemente el tonoplasto (TPC1), así como en la comunicación cruzada entre Ca^{2+} y ROS, a través de la regulación de la actividad de RBOH, para una transmisión rápida de señales a larga distancia. CBL10 también parece estar involucrado en la movilización de Ca^{2+} almacenado en la vacuola hacia los tejidos exigentes para compensar la deficiencia de Ca^{2+} causada por la salinidad y, por lo tanto, permitir el desarrollo del meristema y los órganos reproductivos. Finalmente, las funciones de CBL10 en la raíz se han asociado con la captación de K^+ mediante la regulación negativa del canal AKT1. Las flechas verdes indican activación por fosforilación; la línea roja indica represión por interacción directa; las flechas grises indican activación por Ca^{2+} y el signo de interrogación indica procesos de señalización hipotéticos que aún no se han verificado. Figura obtenida de Plasencia et al. (2021)

El primer estudio que involucró a CBL10 en la compartimentalización del exceso de Na^+ en la vacuola sugirió que la alta sensibilidad a la sal del mutante *Atcbl10* se debía a una alteración en el secuestro vacuolar de Na^+ en las hojas (Kim et al., 2007). Así, cuando el almacenamiento en vacuolas fue menor, la cantidad de iones salinos que penetrarían en las células vegetales antes de que éstas mueran por toxicidad salina fue menor, explicando por qué el mutante *Atcbl10* contiene menos Na^+ que el WT, aunque el primero es mucho más sensible al estrés salino. SOS2-CBL10 se localizó en el tonoplasto en lugar de la membrana plasmática en el estudio de Kim et al. (2007) y Waadt et al. (2008b) confirmaron esta localización subcelular por complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). En otras especies como *Populus*, también se observó la interacción de CBL10 y CIPK24 a nivel vacuolar (Tang et al., 2014). Los estudios de modificación postraduccional de la proteína CBL10 respaldan dicha localización subcelular en el tonoplasto, por la S-acilación de CBL10 en la Cys-38 en el extremo N-terminal. No obstante, la mutación puntual en este residuo de cisteína determinó una localización intracelular en el citoplasma (Chai et al., 2020) y mejoró el crecimiento del mutante *cbl10*, sugiriendo que el papel de esta proteína en respuesta a sal puede estar involucrado en ubicaciones distintas al tonoplasto. Dado que la S-acilación es un proceso reversible, esta modificación podría estar involucrada en la regulación del reparto de CBL10 entre diferentes membranas-compartimentos celulares (membrana plasmática, tonoplasto, membrana cloroplástica, etc.). Aún no se sabe cómo la S-acilación modula el tráfico de una proteína específica entre diversas membranas aunque algunos estudios sugieren que el grado de S-acilación puede ser importante (Chamberlain y Shipston, 2015).

La identificación de proteínas diana de CBL10 en el tonoplasto para el secuestro de Na^+ vacuolar sigue precisando investigación. Inicialmente se sugirió que el complejo CBL10-CIPK24 podía regular los transportadores vacuolares de los intercambiadores de Na^+/H^+ (NHX) para el secuestro de Na^+ por fosforilación. He et al. (2015) apoyaron esta hipótesis ya que una variedad tolerante a sal de soja presentaba una mayor acumulación de Na^+ que la sensible y esto estaba asociado con una mayor expresión de los genes CBL10, CIPK24 y NHX, mientras que algunos estudios muestran que los NHX del tonoplasto están principalmente involucrados en el almacenamiento de K^+ , con poca influencia en el secuestro de Na^+ (Bassil et al., 2011; Barragán et al., 2012; Andres et al., 2014). Otros estudios con los transportadores NHX1-4 de *Arabidopsis* confirmaron su actividad con Na^+ pero con una contribución pequeña y sugieren la existencia de otros transportadores para Na^+ en el tonoplasto (Bassil et al., 2019).

Por otro lado, la caracterización del mutante de tomate *Slcbl10* por parte de nuestro grupo (Egea et al., 2018), encontró una alteración en la expresión de los principales genes responsables de la distribución y compartimentación de Na^+ (*LeNHX4*, *SISOS1* y *SISOS2*, *SIHKT1;2*). Tanto bombas de H^+ vacuolar *SlAVP1* (H^+ -Pyrophosphatase) y *SlVHA-A1* (vacuolar H^+ -ATPases, V-ATPase), como el transportador *NHX4* disminuyeron su expresión en el mutante con respecto a WT en las hojas cercanas a los tejidos jóvenes apicales en crecimiento. Estas bombas de H^+ son responsables de generar la fuerza impulsora necesaria para la compartimentación del Na^+ en la vacuola lo que revela que la

mutación de *SICBL10* afecta a la capacidad de las hojas de tomate para secuestrar Na^+ en las vacuolas. Además, *SISOS1* aumentó su expresión y *SIHKT1;2* la disminuyó en el mutante, causando una mayor extrusión de Na^+ desde el citoplasma al apoplasto y menor entrada a la célula, evitando acumulación de Na^+ en el citoplasma debido posiblemente a la dificultad de acumulación el Na^+ en la vacuola. Estos patrones de expresión génica tuvieron como resultado una carga reducida de Na^+ al xilema, lo que permitió que los iones tóxicos alcanzaran el ápice, induciendo su colapso y la posterior muerte de la planta (Egea et al., 2018), demostrando la implicación del gen *SICBL10* en la regulación de la homeostasis de Na^+ a través de la compartimentación de Na^+ en vacuolas (**Figura 14**); de acuerdo con la primera hipótesis postulada por Kim et al. (2007). Aunque se necesitan más estudios para llegar a una conclusión definitiva, nuestros resultados revelaron dos bombas H^+ vacuolares, *SlAVP1* y *SIVHA-a1*, como objetivos potenciales de *SICBL10* en plantas de tomate.

Otros estudios presentes apoyan hipótesis propuestas anteriormente y/o han abierto nuevas posibilidades. Las aportaciones de Batelli et al. (2007), Maeshima (2000) y Hasegawa (2013) clarifican la controversia de los transportadores NHX como objetivo del complejo CBL10-SOS2, ya que indican que SOS2 activa la bomba vacuolar de H^+ V-ATPasa, y que para que los antiportadores Na^+/H^+ sean capaces de compartimentalizar Na^+ a la vacuola se necesita un gradiente electroquímico de H^+ generado por las bombas vacuolares de H^+ AVP1 y V-ATPasa. Por otro lado, Krebs et al. (2010) mostró que la V-ATPasa (isoformas VHA-a2, VHA-a3) en *Arabidopsis* no parece estar involucrada directamente con el secuestro de Na^+ en la vacuola, siendo AVP1 suficiente para este proceso, y que la isoforma localizada en el endosoma temprano de la red trans-Golgi (VHA-a1) parece desempeñar un papel clave en la desintoxicación de Na^+ , lo que propone un papel importante del sistema endosomal en la absorción de Na^+ . En este sentido, sería interesante comprobar si se produce una localización subcelular de CBL10 en el retículo endoplásmico y el golginosomal, ya que la S-acilación también le confiere la capacidad de adherirse a las membranas que limitan los compartimentos del RE y Golgi (Chamberlain y Shipston, 2015).

En resumen, CBL10 juega un papel fisiológico clave en la protección de diferentes tejidos y órganos contra el estrés salino, requiriendo la distribución adecuada de Na^+ a través de tejidos y órganos, y el transporte desde el citosol a las vacuolas. Una posibilidad podría ser, al menos para el tomate, que la participación de CBL10 en ambos procesos de transporte de Na^+ sea dependiente del tejido. Así, en tejidos jóvenes en crecimiento, poco vacuolados CBL10 pudiera ser activo en la membrana plasmática, implicado en la extrusión de Na^+ fuera de la célula (lo que explicaría por qué la pérdida de función de CBL10 en tomate provoca una mayor acumulación de Na^+ en estos tejidos), y en células de hojas maduras que presentan vacuolas gigantes podría estar asociado principalmente al tonoplasto secuestrando Na^+ a la vacuola (por lo que la pérdida de su función provocaría una menor acumulación de Na^+) (**Figura 14**) (Egea et al., 2018). Sin embargo, además de ambas membranas, la membrana plasmática y el tonoplasto, CBL10 también se ha asociado con otras localizaciones subcelulares. *Translocon of the Outer Membrane*

of the Chloroplasts 34 (TOC34) se identificó como un nuevo compañero de interacción de CBL10 que ocurre en la membrana externa de los cloroplastos (Cho et al., 2016), una evidencia de la capacidad de CBL10 para transmitir señales de Ca^{+2} en más ubicaciones subcelulares más diversas de lo que se conocía actualmente.

6.2. Interacciones directas con función de represión

CBL10 ejerce su papel como represor por interacción directa en varias proteínas, como por ejemplo AtANN4 además de activarla en conjunto con CIPK24 (Ma et al., 2019). Por otro lado, aunque la actividad del canal de K^+ AKT1 es inducida por CIPK23 junto con CBL1 y CBL9 (Li et al., 2006; Xu et al., 2006), Ren et al. (2013) demostraron que CBL10 puede interactuar directamente con AKT1, en la membrana plasmática de las células de la raíz en *Arabidopsis*, lo que afecta las corrientes de K^+ internas mediadas por AKT1. Este estudio concluyó que existe una competencia entre CBL10 y CIPK23 por unirse a AKT1, modulando negativamente su actividad en *Arabidopsis* (**Figura 14**). Otro estudio en algodón mostró CBL10 de esta especie también es capaz de interactuar con CIPK23 (Lu et al., 2017). Teniendo en cuenta estos resultados y los precedentes en el caso de la regulación de la actividad de ATANN4, queda por comprobar si CBL10 podría participar en ambos procesos: la activación del canal K^+ a través de su interacción con CIPK23 y la represión del mismo por interacción directa, modulando el flujo de K^+ en las raíces (**Figura 14**). Otra interacción directa de CBL10 con función represiva es la descrita para la proteína TOC34 (Cho et al., 2016). Como se ha mencionado en el apartado anterior, TOC34 es un miembro del complejo TOC (*translocon of the outer membrane of the chloroplasts*) localizado en la membrana del cloroplasto con actividad GTPasa, que regula la importación de proteínas a los cloroplastos.

Dada la capacidad demostrada de CBL10 para activar (a través de una forma dependiente de CIPK) o reprimir (por interacción directa) la actividad de una variedad de proteínas diana, es lógico que la pérdida de función de *CBL10* pueda tener efectos positivos o negativos contra diferentes tipos de estrés. Aunque el papel de *CBL10* como regulador positivo del estrés salino está mejor establecido, se han descrito efectos opuestos para otros estreses, como inundaciones durante la germinación del arroz en el trabajo de investigación de Ye et al. (2018), donde una menor expresión del gen *CBL10* constitutivo de arroz se relacionó con una mayor tolerancia a la hipoxia y donde se observó que las líneas de sobreexpresión de *OsCBL10* presentaban una susceptibilidad significativa a la inundación y la hipoxia durante la germinación. Bajo déficit de K^+ la sobreexpresión de AtCBL10 provocó un fenotipo más sensible con menor acumulación de K^+ que en las plantas WT (Ren et al., 2013). Otro estrés descrito en la literatura en el que *CBL10* parece estar implicado como un regulador negativo es la sequía: la pérdida de función de *CBL10* en *Arabidopsis* mejoró la reanudación del crecimiento de las plantas después de un período de deshidratación en comparación con WT, mientras que las plantas CBL10-OE no recuperaron dicho crecimiento (Kang y Nam, 2016).

6.3. Papel clave de *SICBL10* y *SIRBOHG* en la señalización por estrés

El mencionado papel de Ca^{+2} como mensajero crítico en la transducción de señales que coordina numerosas respuestas a los desafíos ambientales es clave en el estrés abiótico (Kudla et al., 2018). Las señales de Ca^{+2} se producen en patrones específicos en el citosol debido a la estricta regulación de su liberación y captación en los diversos depósitos intracelulares, como la vacuola, que es la que acumula más Ca^{+2} movilizable en la mayoría de las células vegetales. TPC1 es el único canal vacuolar permeable al Ca^{+2} conocido hasta ahora, involucrado en la activación y expansión de la onda de Ca^{+2} en el citoplasma. Los resultados del análisis del mutante de tomate *Slcbl10* sugieren que CBL10 podría estar directa o indirectamente relacionado con la regulación del canal TPC1 y por tanto con la liberación vacuolar de Ca^{+2} al citoplasma con una función de señalización (Egea et al., 2018).

Además, estudios recientes han demostrado que la señalización de la planta está respaldada por un mecanismo inducido por Ca^{+2} y asistido por ROS que involucra la producción de ROS por proteínas RBOH (*Respiratory Burst Oxidase Homolog*). Existe una conexión directa entre la producción de ROS y las vías de señalización de Ca^{+2} que permite la comunicación de célula a célula como una transmisión rápida de señales a larga distancia en las plantas. Algunos estudios relacionan CBL10 con RBOH, por ejemplo en la planta de tomate, CBL10 se ha relacionado con la activación de un RBOH de la membrana plasmática implicado en la producción de ROS (**Figura 12**) en respuesta al estrés biótico (**Figura 14**) (de la Torre et al., 2013). CBL10 interactúa y recluta CIPK6 en la membrana plasmática, donde el complejo CBL10-CIPK6 activa por fosforilación a la proteína RBOHB que contribuye a la generación de ROS durante la inmunidad desencadenada por efectores que ocurre en la interacción de *Pseudomonas syringae* y *Nicotiana benthamiana*.

Otros estudios sugieren una relación entre CBL10 y la generación y ajuste fino de firmas específicas de Ca^{+2} en el citoplasma en condiciones de estrés. Así, en arroz, se ha encontrado que CBL10 está involucrado en el aumento citoplasmático de Ca^{+2} en respuesta a la hipoxia como consecuencia de inundaciones (Ye et al., 2018). Un estudio en *Arabidopsis* también determinó que CBL10, junto con CIPK24, inducía y mediaba el ajuste fino de una firma de Ca^{+2} dependiente de AtANNEXIN4 (AtANN4) bajo estrés salino (Ma et al., 2019). Estas proteínas dependientes de Ca^{+2} median su entrada inducida por sal al citoplasma, y como resultado de esta señal se activa la ruta SOS en respuesta a salinidad (**Figura 14**). Dada esta función demostrada de CBL10 en *Arabidopsis*, sería necesario probar si los cambios en la expresión de TPC1 observados en el mutante de tomate *Slcbl10* podrían ser una consecuencia más que la causa del Ca^{+2} citoplasmático alterado (Egea et al., 2018). En conjunto, estos resultados sugieren que CBL10 y RBOH pueden ser reguladores claves de la señalización del estrés en las plantas mediante una comunicación cruzada entre Ca^{+2} y ROS a través de la regulación de la actividad de RBOH. Sin embargo, más estudios son necesarios para dilucidar la transmisión rápida de señales a larga distancia y avanzar en esta compleja línea de investigación.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El trabajo recogido en esta tesis doctoral ha sido realizado en el grupo de Salinidad del CEBAS en colaboración con los grupos de genética y mejora biotecnológica (UAL e IBMCP), y el objetivo principal es avanzar en el conocimiento sobre **el papel de dos genes claves de tomate involucrados en la tolerancia a estreses abióticos a lo largo del ciclo de desarrollo de las plantas.**

OBJETIVO 1: Análisis funcional del gen de tomate *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (SICBL10)*

Para ello se han abordado los siguientes objetivos parciales.

- Estudiar el papel de *SICBL10* en el desarrollo reproductivo de tomate
- Determinar la respuesta a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *SICBL10*
- Comprobar si el gen *SICBL10* funciona como regulador negativo de la tolerancia a salinidad en raíz
- Identificar el papel de *SICBL10* en la tolerancia del tomate a estrés por sequía y altas temperaturas.

OBJETIVO 2: Papel del gen *RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SIRBOHG)* en la tolerancia a la salinidad del tomate.

Los objetivos parciales han sido los siguientes:

- Dilucidar el mecanismo de acción del gen en relación con la homeostasis osmótica e iónica en condiciones de salinidad y determinar el papel del peróxido de hidrogeno en la tolerancia.
- Determinar el papel del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a la salinidad a lo largo del desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta.
- Estudiar las interacciones SICBL-SICIPK en la activación de SIRBOHG y la localización subcelular de AtRBOHG y SIRBOHG.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal

El material vegetal que se ha empleado en esta tesis doctoral es el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.). Como cultivar sin transformar y genotipo *wild type* (WT) se ha empleado el cultivar Moneymaker, que es una de las principales variedades comerciales de tomate cultivada en la Región de Murcia caracterizada por un hábito de crecimiento indeterminado y frutos lisos, redondos de calibre mediano y con buena formación en ramillete.

Dentro de la colección de mutantes obtenida a partir de la transformación genética del cv. Moneymaker, en este trabajo hemos utilizado tres mutantes (Pérez-Martín et al., 2017). Dicha colección de mutantes se ha obtenido en el marco de un proyecto coordinado entre nuestro grupo de investigación dirigido por la Prof. M^a Carmen Bolarín (CEBAS-CSIC), el grupo del Prof. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y el grupo del Prof. Vicente Moreno (IBMCP- PVCSIC).

Los mutantes seleccionados para esta tesis doctoral han sido:

- a) El mutante ***Slcbl10*** de tomate, cuya identificación y caracterización funcional del gen mutado *SICBL10*, fue publicada por el grupo de investigación en 2018 en la revista *Plant Physiology* (Egea et al., 2018) y en esta tesis doctoral se ha avanzado en el papel que desempeña este gen en la tolerancia al estrés por salinidad y sequía, y se ha completado su caracterización en el desarrollo reproductivo.
- b) El mutante ***sodgat1***, (*sodium gatherer 1*), inicialmente nombrado como *she-1* (*salt hypersensitive esculentum*), cuya identificación y caracterización fisiológica y fenotípica se recoge en una tesis anterior del grupo de investigación (Plasencia, 2015) y en esta tesis doctoral, tras la identificación del gen mutado *SIRBOHG* por el grupo de la Universidad de Almería, se ha ampliado la caracterización fisiológica y fenotípica en cuanto al desarrollo reproductivo, y se ha llevado a cabo la caracterización funcional del gen en estrés salino a corto y largo plazo.
- c) El mutante ***sodgat2***, (*sodium gatherer 2*), identificado previamente como un mutante sensible a la salinidad por el grupo del IBMCP. Posteriormente se comprobó que su gen mutado era el mismo que *sodgat1*, el gen *SIRBOHG*, y por tanto eran mutantes alélicos.

Junto al mutante *Slcbl10* mencionado, en esta tesis doctoral se han empleado dos líneas transgénicas de silenciamiento y sobreexpresión del gen *SICBL10*:

- d) Línea de silenciamiento del gen *SICBL10* (RNAi) obtenida mediante tecnología de ARN de interferencia y descrita por Egea et al (2018).

- e) Línea de sobreexpresión (OE), obtenida por el grupo de la Universidad de Almería como se describe en Ribelles et al. (2019).

Además del cv. Moneymaker, también se ha utilizado el híbrido de tomate comercial Jaguar (suministrado por Ramiro Arnedo S.A.) como genotipo parte aérea para estudiar el papel de la raíz en la tolerancia a la sal a largo plazo.

2. Cultivo *in vitro*.

2.1. Esterilización de semillas y germinación *in vitro*

Las plántulas WT y mutantes empleadas en los experimentos *in vitro* se obtuvieron a partir de semillas que previamente fueron esterilizadas. Para su esterilización, las semillas se sumergieron durante 30 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 20%, a la que se le añaden 3 gotas de Triton X-100 para romper la tensión superficial, lo que mejora el contacto entre el tejido y la solución esterilizante. Seguidamente, se eliminó la solución mediante tres lavados sucesivos a los 5, 10 y 15 minutos con agua destilada estéril. Una vez esterilizadas, las semillas se depositaron en frascos estériles que contenían medio MS* (Tabla 1).

Tabla 1. Composición del medio de germinación de semillas.

Medio de germinación	g L ⁻¹
Solución mineral MS*	4,3
Sacarosa	10,0
Agar	8,0

* MS: Medio Murashige y Skoog (1962).

2.2. Condiciones de la cámara de cultivo *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo con las plantas crecidas a partir de la germinación de semillas en frascos estériles en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz ($76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa) y 8 h de oscuridad a 25 °C durante todo el ciclo. Para la iluminación se emplearon tubos fluorescentes GroLux de 58 W (Sylvania). Una vez las plantas alcanzaron el estado de 2-3 hojas verdaderas se realizaron los muestreos de material vegetal para los análisis posteriores.

3. Cultivo *in vivo* de plantas. Condiciones del estrés salino e hídrico.

Para evaluar la respuesta de las plantas a los estreses estudiados en esta tesis se llevaron a cabo ensayos a corto-medio plazo (en cámara de cultivo de condiciones controladas y de unas semanas de duración) y a largo plazo (en invernadero o de condiciones semi-controladas o de condiciones no-controladas llegando a la fase de producción).

3.1. Condiciones de cultivo para los ensayos a corto y medio plazo

Las semillas para realizar todos los ensayos en las cámaras de cultivo se pregerminaron durante 48 h en agua destilada y agitación en placas de cultivo en oscuridad durante 48-72 h para conseguir su máxima hidratación y facilitar la germinación. Una vez que las semillas estaban pregerminadas (aparecía la radícula), se pasaban a semilleros de plástico de dimensiones 60 x 40 x 12 cm y 96 pocillos por bandeja con una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 y condiciones de temperatura y humedad de 28°C y 80% de humedad relativa (HR), respectivamente hasta que los cotiledones empezaban a emerger. Las condiciones de cultivo de las plantas creciendo en semilleros en la cámara de cultivo se controlaba mediante un programa informático, de forma que se mantuviera una HR entre el 50 y 80% y una temperatura entre 26°C (día) y 18°C (noche), con un fotoperiodo de 16 h/luz y 8 h/oscuridad (que reproduce en lo posible un ciclo de día natural).

La disolución nutritiva empleada tanto para el riego de los semilleros como para el posterior cultivo fue la solución Hoagland diluida al 50% (½) (Hoagland, 1950) (Tabla 2). La disolución consta de tres componentes preparados por separado que son mezclados y diluidos en agua destilada para obtener la disolución de riego.

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva utilizada para el riego en cámara de cultivo.

Solución A	g·L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	8,0
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	82,6
KNO ₃	35,7

Hierro (Fe)	g·L ⁻¹
Fe-EDDHA 6%	1,87

Solución B	g·L ⁻¹
KNO ₃	5,0
KH ₂ PO ₄	27,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,053
H ₃ BO ₃	0,140
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,015
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,060

Las plantas se mantenían en los semilleros hasta que alcanzaban un desarrollo de 1-2 hojas, momento en el cual se transferían al medio de cultivo definitivo donde se llevaba a cabo el experimento.

3.2. Ensayos en sustrato

Las plántulas en estado de desarrollo de 2-3 hojas verdaderas se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro empleando como sustrato la mezcla de turba y perlita anteriormente descrita. Para ello, primero se humedecía el sustrato y se insertaba el cepellón procedente del semillero y las macetas se mantenían al menos una semana sin aplicar ningún tratamiento, con el fin de amortiguar el estrés sufrido en el trasplante y permitir el desarrollo de la raíz. Para el riego se empleó solución Hoagland diluida ½ y la frecuencia de riego dependía del estado de desarrollo de las plantas y se llevaba a cabo a demanda

con el fin de mantener un crecimiento óptimo y homogéneo, evitando la desecación y el encharcamiento por exceso de riego.

3.3. Ensayos en cultivo hidropónico

El sistema de cultivo hidropónico es idóneo para evaluar la respuesta a corto y medio plazo de las plantas al tratamiento salino en condiciones controladas de cultivo, ya que además permite el fácil acceso y muestreo del sistema radicular y sin interferencias de sustrato sólido.

Los tratamientos salinos se aplicaban utilizando la misma disolución Hoagland al 50% utilizada para el riego, a la que se le añadían distintas concentraciones de NaCl en función del experimento para someter las plantas al estrés salino. La aplicación del tratamiento salino se llevaba a cabo en los periodos de baja iluminación (cuando las plantas tienen una menor tasa de transpiración para evitar el choque osmótico) y se realizaba de forma gradual añadiendo la concentración salina en 2 o 3 veces sucesivas con el fin de que las plantas se aclimataran poco a poco al estrés causado. Durante los experimentos, se llevaba a cabo un control de la solución de riego mediante la medida del pH, conductividad eléctrica (CE) y análisis químicos periódicos para cambiar la solución de riego cuando era necesario y como mínimo, una vez por semana.

Se disponía de dos sistemas de cultivo hidropónico; el sistema de cultivo en mini-hidropónico (**Figura 15a**), para experimentos o tratamientos puntuales en los que utilizar plantas en estado de desarrollo temprano (hasta 3 hojas verdaderas en el momento del tratamiento), y otro sistema de hidropónico de mayores dimensiones para experimentos de mayor duración en los que las plantas utilizadas alcanzaban un mayor desarrollo (**Figura 15b**).

El **sistema de cultivo en mini-hidropónico** constaba de cubetas de vidrio de 3 litros de capacidad (dimensiones 29.5 x 19.5 x 7.5 cm) con tapaderas perforadas de plástico ajustadas herméticamente a la cubeta. Tanto las cubetas como las tapaderas eran opacas para evitar la aparición de algas por la luz (**Figura 15a**). Las plantas procedentes de semillero en estado de desarrollo de 1-2 hojas verdaderas se incluían sobre unos soportes de plástico fabricados con tubos de microcentrífuga de 2 ml de color ámbar cortados, a los que se le colocaba un poco de algodón acrílico o miraguano sintético alrededor del tallo de la planta con el fin de sujetar las plantas y mantenerlas erguidas con la parte aérea por fuera y la raíz en el interior de la cubeta. Una vez transferidas al sistema hidropónico, las plantas se mantenían en disolución Hoagland $\frac{1}{2}$ durante al menos 10 días antes de iniciar el tratamiento salino, con el fin de favorecer la aclimatación de las plantas y el desarrollo del sistema radicular. La disolución nutritiva se aireaba continuamente mediante un burbujeo continuo mediado por un aireador de acuario.

a)



b)



Figura 15. Visión general de los sistemas de cultivo hidropónico empleados en la cámara de cultivo de condiciones controladas del CEBAS – CSIC. a) Sistema de mini-hidropónico para plantas de hasta 3 hojas verdaderas y experimentos de corta duración. b) Sistema de hidropónico para plantas en estado de desarrollo superior y ensayos de mayor duración.

El sistema de cultivo hidropónico para plantas de mayor tamaño constaba de varias cubetas de fibra de vidrio de 50 litros de volumen con tapaderas que presentan huecos en los que se colocan las plantas de forma que la raíz queda sumergida y en oscuridad en la solución Hoagland $\frac{1}{2}$ (dentro de la cubeta), y la parte aérea por encima de la cubeta al descubierto (**Figura 15b**). Para su traspaso al sistema de hidropónico grande, se lavaban

cuidadosamente las raíces de las plantas germinadas en semilleros en estado de desarrollo de 2-3 hojas verdaderas y se introducían en el sistema. Se mantenían en condiciones control hasta que alcanzasen el estado de desarrollo deseado para el experimento en cuestión, lo cual además permitía la aclimatación de las plantas al nuevo sistema de cultivo y un correcto desarrollo del sistema radicular antes de aplicar ningún estrés o tratamiento. En cada cubeta podían incluirse hasta 40 plantas y para sostenerlas y mantenerlas erguidas, se colocaban en unos soportes de plástico ajustados a los huecos de la cubeta y rellenos con algodón acrílico o miraguano sintético alrededor del tallo para permitir su crecimiento sin estrangularlo. El sistema hidropónico permitía el entutorado de las plantas con hilo de rafia a unos soportes situados en la parte superior para mantenerlas erguidas en caso de que alcancen un tamaño mayor. La solución nutritiva se oxigenaba mediante un burbujeo continuo suministrado por un compresor Puska N-150-50, con un caudal de 115 L min⁻¹, presión máxima 10 Kg cm⁻² y capacidad de 50 litros.

3.4. Condiciones de cultivo para los ensayos a largo plazo en invernadero.

Para la evaluación de los efectos de diferentes tratamientos de estrés (salino e hídrico) a largo plazo y en particular sobre la producción de frutos (en condiciones similares a las comerciales) se llevó a cabo un cultivo en invernadero. Se emplearon dos invernaderos diferentes en función de las condiciones de cultivo deseadas en el experimento.

3.4.1. Invernadero de condiciones no-controladas (NC)

El invernadero de condiciones medioambientales no controladas (NC) se encuentra situado en la finca experimental del CEBAS-CSIC en la comarca de La Matanza del término municipal de Santomera (Murcia) (38.105°N, 1.035°W). Es un invernadero de tipo túnel y con cubierta, laterales y parte posterior de policarbonato, de una superficie de 1.000 m² completamente cerrado y dotado de ventiladores en la parte posterior que se activan cuando la temperatura supera los 24°C, generando una circulación de aire en el interior gracias a la parte frontal de malla *antitrips* que permite el paso del aire. De esta forma se consigue que las condiciones medioambientales del interior se aproximen a las condiciones imperantes en el exterior. El espacio interior dispone de líneas de riego independientes, cada una con su programa de fertirrigación, lo que permite establecer filas de plantas con condiciones de fertirrigación distintas (control, diferentes niveles de NaCl, reducción de riego con respecto al control, etc.).

Las plántulas procedentes de la germinación de las semillas en condiciones controladas en cámara de cultivo se trasladaban en sus semilleros al invernadero y se trasplantaban en estado de desarrollo de 7-8 hojas verdaderas. Tras el trasplante se dejaban aclimatar en las nuevas condiciones de cultivo entre 10 y 15 días y posteriormente se iniciaban los tratamientos de estrés salino o hídrico.

Las plantas se cultivaron en sustrato de fibra de coco en contenedores de poliestireno de 32 litros de volumen y con espacio para 3 plantas por contenedor, con un marco de cultivo

resultante de 0,33 m de distancia entre plantas en cada línea de cultivo y 1 m de separación entre líneas (**Figura 16**). La solución nutritiva (**Tabla 3**) se suministraba por riego por goteo programable, mediante goteros de $3 \text{ L} \cdot \text{hora}^{-1}$ de caudal, con un gotero por planta. Las plantas se cultivaban a un solo tallo y se entutoraban hacia lados alternos para mantener su crecimiento, eliminando periódicamente las yemas axilares de las plantas (**Figura 16**). La fertilización se ajustaba para conseguir unos niveles óptimos de nutrientes para el cultivo del tomate (Cadahia, 1995), y la frecuencia y duración de los riegos se programaba en función de la climatología y el estado fenológico de las plantas, para conseguir que las plantas control de los ensayos estuvieran en las mejores condiciones de fertirrigación posibles.

Tabla 3. Composición de la solución nutritiva usada para el riego de las plantas en el invernadero.

Macronutrientes	(mM)	Micronutrientes	(μM)
$\text{N}(\text{NO}_3^-)$	12,0	Fe^{3+}	12,0
$\text{N}(\text{NH}_4^+)$	0,5	Cu^{2+}	0,5
$\text{P}(\text{PO}_4^{3-})$	1,5	Mn^{2+}	7,0
K^+	7,0	Zn^{2+}	4,0
Ca^{2+}	4,0	B^{3+}	2,0
Mg^{2+}	2,0		

Las disoluciones concentradas con macro- y micro-nutrientes se preparaban en depósitos de 2.000 litros y éstas se añadían posteriormente mediante un sistema de mezclado por inyección automática al agua de riego según el equilibrio de abonos establecido por el usuario en el sistema de fertirrigación (Nutritec9000 de la empresa RITEC, Riegos y Tecnología S.L, Águilas, Murcia) para el cabezal de riego, para obtener los niveles de nutrientes deseados en unos depósitos de riego del mismo volumen donde se disponen las soluciones finales de fertirrigación para las plantas. La regulación de la inyección de soluciones madre de abonos se realizaba estableciendo un diferencial de conductividad eléctrica (CE) establecido por el usuario en el sistema, relativo al valor de CE del agua disponible. El agua de riego empleada presentaba una CE alrededor de aprox. $1,0 \text{ dS m}^{-1}$, y el diferencial fijado era de $1,0 \text{ mS m}^{-1}$ para inyectar los abonos en la solución final de fertirrigación, siempre respetando el equilibrio de abonos establecido. Un cuarto depósito contenía ácido nítrico 100 mM para regular el pH de la solución final de fertirrigación, fijado por el usuario en el programa de llenado, que también se añadía a los depósitos de solución de fertirrigación mediante un sistema de mezclado por inyección automática. Periódicamente se realizaba el análisis químico del agua empleada y de las soluciones de fertirrigación, así como del lixiviado producido por el riego, para comprobar que las composiciones de las soluciones de fertirrigación eran las deseadas.



Figura 16. Visión general del cultivo en el invernadero de condiciones no controladas (NC) situado en la finca experimental del CEBAS-CSIC. a) Plantas recién trasplantadas. b) plantas adultas en el transcurso de un ensayo de invernadero.

El invernadero incluía un sistema de sensores de temperatura y de humedad relativa colocados a una altura de 1.5 m sobre la base de las plantas. Todos los valores se registraban periódicamente y se almacenaban en una base de datos.

Tratamiento de estrés salino en invernadero de condiciones NC

El nivel de salinidad empleado en los experimentos en invernaderos fue de 50 y 100 mM de NaCl. Un quinto depósito de solución madre de 2,567 M NaCl se usaba para agregar

la sal a los depósitos con la solución de fertirrigación, mediante inyección automática, pero ajustando el volumen de llenado de la solución de sal mediante la medida de la CE en el depósito de riego con el fin de alcanzar la concentración final deseada. Así, las soluciones de fertirrigación salinas se preparaban ajustando el llenado de tal forma que para obtener un nivel salino de 50 y 100 mM de NaCl éstas presentarían una CE final de aprox. 7,0 y 12,0 dS m⁻¹, respectivamente (teniendo en cuenta que la solución de fertirrigación control tiene una CE aproximada de 2,0 dS m⁻¹ si el agua disponible tiene una CE de aprox. 1,0 dS m⁻¹). Se tomaban muestras del agua y de las soluciones de fertirrigación, control y salinas, para confirmar los niveles de NaCl obtenidos mediante análisis químicos.

Tratamiento de estrés hídrico en invernadero de condiciones NC

El estrés hídrico se impuso por reducción del volumen de riego diario, fijando un % de reducción con respecto al volumen de fertirrigación diario de las plantas dispuestas en las filas de cultivo que se mantenían en condición control, en condiciones óptimas de riego. Como ya se ha mencionado, el programa de fertirrigación, su duración y frecuencia, se modificaba en función de la climatología y el estado fenológico de las plantas, pero siempre respetando el % de reducción de riego diario entre las filas de plantas en condición control y las filas en condición de estrés hídrico.

La reducción del riego en estas últimas se llevó a cabo reduciendo la frecuencia diaria de riegos con respecto a las plantas control, pero no la duración de cada riego, que era el mismo que en las plantas control, con el fin de conseguir que el volumen de riego adicionado cada vez sea suficiente para alcanzar toda la masa radicular.

3.4.2. Invernadero de condiciones semi-controladas (SC).

El invernadero de condiciones semi-controladas (SC) utilizado pertenece al Servicio de Experimentación Agroforestal (SEAF) del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia y está situado en el Campus de Espinardo (Murcia, 38.019°N, 1.167°W). Se trata de un umbráculo de 64 m² de superficie (8 m de largo x 8 m de ancho), totalmente protegido con malla *antitrips*, con sistema de riego por goteo automático programable y pantalla de sombreado practicable controlada en función de las condiciones climatológicas (temperatura y luminosidad exterior). Las condiciones medioambientales (temperatura, humedad, radiación luminosa) de este invernadero están mucho más controladas y no dependen tanto de las condiciones en el exterior. En este invernadero sólo se llevaron a cabo ensayos de estrés salino.

El desarrollo de las plántulas en semillero y su trasplante se llevó a cabo de la forma antes descrita en el apartado del cultivo en el invernadero de condiciones no controladas (NC), pero en este caso el trasplante se hacía a macetas (una planta por maceta). Las macetas tenían una altura de 28 cm y un diámetro interior de 30 cm, y su volumen era de 17 L. Se rellenaron de fibra de coco para el establecimiento de la planta, y se dispusieron con un marco de cultivo al tresbolillo formando filas, con una distancia entre las plantas de 1 m



Figura 17. Visión general del cultivo en el invernadero de condiciones semi controladas (SC). Invernadero del Servicio de Experimentación Agroforestal (SEAF) del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia.

El sistema de control y programación de fertirrigación del invernadero de condiciones SC es similar al de condiciones NC, y la preparación de los depósitos de soluciones de fertirrigación, control y salinas con 50 y 100 mM NaCl se realiza de forma análoga, estableciendo un equilibrio de mezclado de abonos con el agua y regulando la inyección de los abonos por CE, manteniendo un valor establecido en el programa de pH mediante la inyección de una solución de ácido nítrico de la misma concentración que en el invernadero de condiciones NC, preparado en un depósito *ad hoc*. La programación del riego y la preparación de la solución de fertirrigación era llevado a cabo por el servicio de experimentación agroforestal según las indicaciones suministradas en función del experimento en cuestión. El marco de cultivo al tresbolillo permite distribuir por filas las plantas y cada fila constituye una línea de riego independiente, por lo que se pueden establecer distintos tratamientos de riego (control, 50 o 100 mM NaCl). La solución nutritiva, de la misma composición que la utilizada en el invernadero de condiciones NC (**Tabla 3**), se suministraba por riego por goteo programable, mediante goteros también de $3 \text{ L} \cdot \text{hora}^{-1}$ de caudal, con un gotero por planta, es decir por maceta. Periódicamente se realizaba el análisis químico del agua empleada y de las soluciones de fertirrigación, así como del lixiviado producido por el riego, para comprobar que las condiciones de cultivo eran las deseadas. Las plantas se cultivaban a un solo tallo y se entutoraban para mantener su crecimiento, eliminando periódicamente las yemas axilares de las plantas. La fertilización se ajustaba para conseguir unos niveles óptimos de nutrientes para el cultivo del tomate (Cadahia, 1995) y la frecuencia y duración de los riegos se ajustaba y programaba en función de la climatología y el estado fenológico de las plantas, para conseguir que las plantas control de los ensayos estuvieran en las mejores condiciones de fertirrigación posibles.

El invernadero incluía un sistema de sensores de temperatura y de humedad relativa y los valores se registraban periódicamente y se almacenaban en una base de datos del mismo modo que en el invernadero de condiciones NC.

3.5. Generación de plantas injertadas

El proceso de germinación de las semillas WT y mutantes, la realización de los injertos y su posterior cultivo hasta que las plantas estaban listas para el trasplante se llevó a cabo por nuestro grupo así como en las instalaciones de Viveros La Sala (Crta. Lo Romero. Km. 5, San Pedro del Pinatar, Murcia).

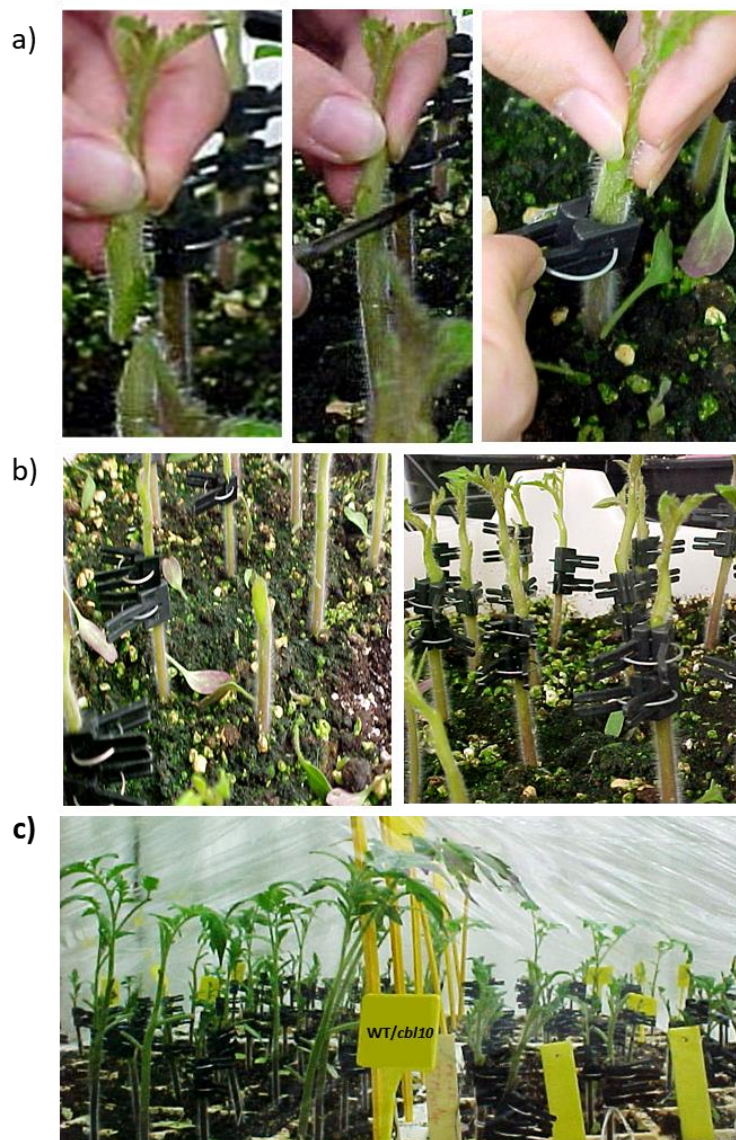


Figura 18. Generación de plantas injertadas. a) Para el esqueje, el corte se realiza por debajo de los cotiledones, mientras que para la parte aérea se realiza por encima, y en ambos casos de forma oblicua para que ambas partes tengan una mayor superficie de contacto para la regeneración de los tejidos. b) La unión del injerto se asegura por medio de una pinza para injertos. c) Las plántulas se mantienen cubiertas con una tapa de plástico transparente para mantener una correcta humedad relativa en el ambiente y facilitar la formación del injerto, y con baja iluminación durante 24 horas. Posteriormente se aclimatan las plantas, abriendo la tapa un poco cada día para ir reduciendo la humedad hasta destaparlas completamente.

En la **Figura 18** se representan las diferentes etapas para obtener las plantas injertadas. Los injertos se llevaban a cabo cuando las plantas se encontraban en estado de 2 hojas desarrolladas. Para el portainjerto, el corte se realizaba por debajo de los cotiledones, mientras que para la parte aérea se realizaba por encima, y en ambos casos de forma oblicua para que ambas partes tuvieran una mayor superficie de contacto para la regeneración de los tejidos. Los injertos se realizaban inmediatamente tras el corte y la unión del injerto se aseguraba por medio de una pinza para injertos. Tras la realización del injerto, las plántulas se mantenían cubiertas con una tapa de plástico transparente para mantener una correcta humedad relativa en el ambiente y facilitar la formación del injerto, y se mantenían con baja iluminación durante 24 horas. Posteriormente se iban aclimatando las plantas, abriendo la tapa un poco cada día para ir reduciendo la humedad hasta destaparlas completamente. Una vez que la unión del injerto era completa, las plantas se trasplantaban al medio de cultivo definitivo para el experimento y se regaban con solución Hoagland $\frac{1}{2}$ hasta la aplicación del tratamiento.

4. Determinación de parámetros fisiológicos

4.1. Desarrollo de biomasa

A lo largo de los distintos ensayos, se estimó el crecimiento de las plantas mediante la determinación del peso fresco o desarrollo de biomasa. Para ello, durante los muestreos del material vegetal, las plantas se separaron en parte aérea y raíz y se pesaron separadamente en una balanza de precisión, obteniéndose el peso fresco (PF) o biomasa fresca.

4.2. Determinación del contenido de agua

Una vez se pesaba el material vegetal en fresco (PF), se introducía en una estufa a 70°C durante 48-72 h hasta su deshidratación completa y se volvía a pesar para obtener el peso seco (PS) o biomasa seca. Para obtener el contenido de agua de los diferentes tejidos se hacía uso de la siguiente relación:

$$\text{Contenido de agua} = (PF - PS) / PS$$

Donde PF y PS son el peso fresco y seco en gramos del tejido, respectivamente.

4.3. Parámetros de intercambio gaseoso: conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración foliar (E), y tasa de fotosíntesis neta (P_n)

La conductancia estomática y la transpiración foliar son dos parámetros importantes que reflejan el estrés de la planta acerca de la regulación de los estomas y la pérdida de agua que la hoja está sufriendo a través de cutícula y estomas. Para medir estos parámetros fisiológicos, se utilizó un sistema portátil de medida de fotosíntesis (CIRAS-2, PP-system, Amesbury, MA 01913 EEUU), tratándose de una técnica directa no destructiva

que emplea una pequeña área de un foliolo ($1,7 \text{ m}^2$ en nuestras medidas para foliolo de tomate).

Las condiciones del equipo CIRAS-2 fueron: el nivel de CO_2 de referencia de 480 ppm, la temperatura de la hoja en la cámara variaba entre $25,7$ y $26,8^\circ\text{C}$, la velocidad del flujo de gas de la hoja en la cámara de medición era de $195 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, se medía a presión ambiental (1.010 mb) y la densidad del flujo de fotones (energía de la radiación fotosintéticamente activa o PAR) era de $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Las medidas se llevaban a cabo en la 1ª hoja completamente desarrollada de plantas intactas en plantas crecidas en cámara de cultivo, mientras que se empleaba una hoja completamente desarrollada entre la 2ª y 3ª hoja en las plantas procedentes de ensayos de invernadero a largo plazo, siempre sobre hojas con un desarrollo similar. Las medidas se llevaban a cabo siempre a la misma hora en los distintos días de muestreo para evitar las posibles variaciones por el ciclo circadiano o el fotoperiodo y que las diferencias solo fueran debidas a los efectos experimentales. Los parámetros que se obtenían eran la conductancia estomática (g_s : $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) que estima el grado de apertura/cierre estomático mediante la tasa de entrada de CO_2 /salida de H_2O por los estomas, la tasa de transpiración foliar (E : $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), y la tasa fotosintética (P_n , $\text{mmol/m}^{-1}\text{s}^{-2}$).

4.4. Termografía infrarroja

La termografía infrarroja (TI) es una técnica no destructiva que se está extendiendo en los últimos años para la monitorización de la pérdida de agua por transpiración (Grant et al., 2006; Sirault et al., 2009). Ha surgido como una alternativa fiable a pesar de una medida indirecta, ya que no se requiere contacto con la superficie foliar, frente a otras técnicas invasivas como los analizadores de intercambio gaseoso los cuales podrían interferir con el comportamiento natural de la hoja (Jones, 1999; Sirault et al., 2009). Las medidas de TI se obtuvieron mediante una cámara infrarroja FLIR T420BX (FLIR Systems, Wilsonville, EEUU), equipada con una lente de 10 mm. Los parámetros de la cámara fueron los siguientes: campo de visión ajustado a 45° , emisividad de la hoja a 0,95, y temperatura (T^a) reflejada de 20°C . La toma de imágenes se llevaba a cabo a la misma hora durante los distintos días de muestreo para evitar las posibles variaciones debidas al ciclo circadiano y que las diferencias solo fueran debidas a los efectos experimentales. Para ello, la cámara se colocaba perpendicular a las plantas a unos 45 cm aproximadamente por encima de la superficie de las hojas con un cartón liso bajo la hoja para mantenerla extendida sin tocarla con los dedos (ya que esto variaría la temperatura). Las medidas se llevaban a cabo en la primera hoja desarrollada en las plantas desarrolladas en cámara de cultivo (más pequeñas), y en una hoja media-superior del mismo grado de desarrollo en las plantas crecidas en invernadero. Tras la adquisición de imágenes, se obtuvieron los datos de la T^a media la hoja empleando el programa FLIR ResearchIRTm.

4.5. Preparación de extracto vegetal crudo

Para la obtención de un extracto vegetal a partir de material fresco, la muestra vegetal se pesaba y se introducía en puntas de pipeta de 5 ml con lana de vidrio en la punta. Estas puntas a su vez se introducían en tubos de 50 ml y se centrifugaban en una centrifuga Haerus labofuge II (Haerus, Alemania) durante 15 minutos a 1.000 g y 4°C. El volumen obtenido se volvía a centrifugar en tubos de 1,5 ml a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C en una centrifuga Sigma 2k15 (B. Braun, Alemania). Se desechara el precipitado (que contiene las impurezas, macromoléculas y restos celulares) y el sobrenadante limpio se almacenaba a -20°C hasta su posterior análisis.

4.6. Potencial hídrico

El potencial hídrico (Ψ_w) de las plantas se estimó mediante una cámara de presión tipo Scholander modelo 3000 (PMS Instrument Company, Corvallis, OR). El método de medida se basa en la medida de la salida de la savia del xilema de un foliolo cuando la presión aplicada es suficiente para forzar la salida del agua de las células vasculares (Scholander et al., 1964). En esta técnica, se escinde el órgano a medir (generalmente se usa para hojas o pequeños brotes, en nuestro caso usábamos foliolos de hoja de tomate desarrollada, ya que esta especie presenta hojas compuestas y utilizar una hoja entera suponía una pérdida de biomasa importante). La muestra vegetal intacta salvo la zona de corte se introduce en la cámara y se sella en una cámara de presión, quedando solamente la zona de corte al exterior (en nuestro caso el peciolo del foliolo). Antes de la escisión, la columna de agua en el xilema está bajo tensión. Cuando la columna de agua se rompe por la escisión del órgano (es decir, su tensión se alivia permitiendo que su presión hidrostática, que es negativa, se eleve a cero), el agua sale rápidamente del xilema hacia las células vivas que rodean el xilema, por ósmosis. La superficie de corte, en consecuencia, se torna más opaca y seca. Para realizar una medición, el investigador presuriza la cámara con gas comprimido hasta que la distribución de agua entre las células vivas y los conductos del xilema retorna a su estado inicial, antes de la escisión. La presión necesaria para llevar el agua de nuevo a su distribución inicial se llama la presión de equilibrio y se detecta fácilmente por el cambio en el aspecto de la superficie de corte, que se torna húmeda y brillante cuando se alcanza esta presión (Taiz y Zeiger, 2007). Para la estimación del potencial hídrico de cada planta se llevaban a cabo tres medidas en foliolos de la 3ª o 4ª hoja completamente desarrollada. Las medidas siempre se realizan en el mismo periodo de tiempo, tres horas a partir del inicio de la fase luminosa. Los resultados obtenidos vienen expresados en bares y se transforman a MPa mediante la equivalencia: 1 bar = 0,1 MPa.

4.7. Potencial osmótico

El potencial osmótico (Ψ_π) se determinó por el método crioscópico de depresión del punto de congelación, utilizando un osmómetro *Osmometer Automatic* (Roebing, Alemania) a partir de un extracto crudo fresco (obtenido como se menciona en el apartado 4.5)

El osmómetro crioscópico determina el potencial osmótico de una solución mediante la medición de su punto de congelación. Las soluciones tienen propiedades coligativas que colectivamente dependen del número de partículas disueltas y no de la naturaleza del soluto. Una de las propiedades coligativas de las soluciones es la disminución en el punto de congelación a medida que la concentración de soluto aumenta. Por lo tanto, una solución que contiene 1 mol de solutos por kilogramo de agua tiene un punto de congelación de $-1,86^{\circ}\text{C}$, en comparación con el agua pura, cuyo punto de congelación es de 0°C (Taiz and Zeiger, 2007).

Para la medida del potencial osmótico se emplearon $100\ \mu\text{L}$ de extracto vegetal crudo (sin diluir para tomate) y se llevaron a cabo 2 medidas por muestra (2 réplicas técnicas). El equipo se calibró en dos puntos: I) agua destilada (que marca el valor 0) y II) NaCl (300 mOsmol). La transformación desde unidades mOsmol ($\text{mmol de soluto osmóticamente activo}\cdot\text{Kg}^{-1}$) que proporciona el equipo a MPa se realizó por la equivalencia tal y como se describe en las especificaciones del fabricante:

$$\Psi_{\pi}(\text{MPa}) = ((-2 \times \text{mmol}\cdot\text{Kg}^{-1})/1000) \times \text{factor de dilución}$$

4.8. Determinación del contenido de clorofila y eficiencia fotosintética (Fv/Fm)

El contenido en clorofila midió en la 1ª hoja completamente desarrollada de las plantas mediante un dispositivo portátil SPAD-502 (Minolta, Kyoto, Japón). Este dispositivo permite calcular de forma semi-cuantitativa el contenido de clorofila mediante la medida de la fluorescencia de la clorofila a dos longitudes de onda distintas: una a la que absorbe la clorofila (650 nm, longitud de onda fotosintéticamente activa) y a otra a la que no absorbe (940 nm) y que permite compensar el grosor de la hoja (Ling *et al.*, 2011). El contenido en clorofila se expresó en unidades relativas SPAD (*Soil Plant Analysis Development*), parámetro descrito por Hoel y Solhaug (1998), relacionado directamente con el contenido en clorofila de la hoja.

Para la determinación de la eficacia fotoquímica del fotosistema II se utilizó un fluorímetro portátil OS-30p (ADC BioScientific, Reino Unido), que determina la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II, estimada según la siguiente fórmula:

$$Fv / Fm = (Fm - F0) / Fm$$

Fv / Fm es la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima, el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II. Fm se trata de la máxima intensidad de fluorescencia en hojas que han sido adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos inducida por una fuente de excitación de luz roja lejana ($3.000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) durante 0,8 segundos. $F0$ representa la intensidad de fluorescencia mínima producida por la exposición de la hoja a una fuente de luz actínica ($400\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) (Maxwell y Johnson, 2000). Estos parámetros se emplean rutinariamente para evaluar el efecto de un estrés sobre la maquinaria fotosintética de las plantas (Sayed, 2003).

Para la determinación de ambos parámetros, se llevaron a cabo 3 medidas en distintas áreas de la primera hoja completamente desarrollada de cada planta y se obtuvo el valor promedio.

4.9. Contenido de iones inorgánicos

La medida de los contenidos en cationes Na^+ , K^+ y Ca^{+2} se realizó a partir de material vegetal seco molido y digerido. Se pesaron 0,1 g y se le añadieron 3 ml de una disolución $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ en proporción 2:1 y esto se introdujo en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante 8 horas a 190°C . Cuando el material estaba totalmente digerido se dejaba enfriar a temperatura ambiente, se enrasaba a 25 ml con agua destilada, se agitaba en vórtex y se almacenaba a 4°C hasta su análisis.

Las medidas se realizaron en la plataforma de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.) en un equipo ICAP 6500 DUO/IRIS Intrepid II XLD (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

4.10. Determinación de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos mediante ^1H -RMN

La determinación de metabolitos polares y semipolares se llevó a cabo mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) por el servicio de metabolómica del CEBAS – CSIC de acuerdo con el protocolo de Choi et al., 2006. Para ello, se tomaron las muestras de tejido fresco congelado (3 réplicas biológicas por cada muestra) y se molieron en mortero con N_2 líquido. Se pesaron 0,05 g de muestra molida en un tubo *ependorf* de 2 ml, seguidamente se añadieron 1.200 μL de mezcla hidrometanólica (1:1, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$) por cada muestra, se vortexearon durante 1 min aproximadamente, se sonicaron durante 3 minutos en intervalos de 1 minuto (repetiendo 3 veces este proceso). A continuación, las muestras se sometieron a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 11.000 g durante 20 min a 4°C . Se tomó la fase superior hidrometanólica con cuidado y se pasó a un tubo *ependorf* limpio (1,5 mL). Seguidamente se sometieron a un proceso de *Speed-Vacuum* a un máximo de 27°C hasta que toda la fase líquida se había evaporado (*overnight*). Tras ello, se resuspendió el sólido soluble obtenido en 800 μL de buffer fosfato potásico (KH_2PO_4) 100 mM a $\text{pH}=6.0$ (disuelto en 100% D_2O) + 0.58 mM de TPS (estándar interno). Por último, se filtró todo el volumen con filtros de 0,45 μm de Nylon, se tomaron 600 μL del volumen filtrado y se pasaron a un tubo de NMR 5 mm para su cuantificación mediante ^1H -NMR. Los metabolitos cuantificados fueron los siguientes: i) azúcares: sacarosa, glucosa, manosa, fructosa, rafinosa, Glucosa-UDP, mio-inositol; ii) ácidos orgánicos: fumarato, malato, succinato, citrato, formato, acetato, ascorbato y quinato; iii) aminoácidos: glutamato, GABA, alanina, asparragina, aspartato, glutamina, isoleucina, leucina, prolina, treonina, valina, tirosina y fenilalanina. En esta tesis doctoral no se han incluido aquellas que fueron determinadas por una baja concentración o superposición de picos.

4.11. Determinación de hormonas vegetales mediante UPLC-espectrometría de masas

La extracción y cuantificación de hormonas se llevó a cabo el Servicio de Cuantificación de Hormonas vegetales del IBMCP (instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, centro mixto UPV-CSIC). Para ello, se tomaron las muestras de tejido fresco congelado (3 réplicas biológicas por cada muestra) y se molieron en mortero con N₂ líquido. El protocolo utilizado en este análisis partía de 0,1 g de muestra molida e incluía la extracción y purificación de las muestras con 2-3 columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), el uso de estándares internos deuterados (excepto para el caso de JA, que se utilizó dihidrojasmonico), y el análisis mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap). Las hormonas cuantificadas fueron el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido abscísico (ABA).

4.12. Determinación cuantitativa de la concentración de H₂O₂ por espectrofotometría mediante el método e-FOX.

El H₂O₂ se cuantificó de acuerdo al protocolo de Cheeseman (2006), por el método del naranja de xilenol (*Ferrous Oxidation-Xylenol Orange*, FOX), basado en la oxidación del Fe (II) a Fe (III) por el H₂O₂, que a su vez forma un complejo coloreado con el xilenol orange [Fe (III)-xilenol orange], lo que permite su determinación espectrofotométrica y cuya concentración es proporcional a la concentración de H₂O₂ presente en la muestra.

La cuantificación se determinó a partir de muestra fresca cortada limpiamente con un bisturí e inmediatamente congelada en N₂ líquido para evitar la liberación de H₂O₂ por el daño mecánico. Seguidamente, la muestra se molió en mortero hasta obtener un polvo grueso y la determinación se llevó a cabo a partir de un extracto de 0,25 mg de material vegetal fresco homogeneizado pesado e introducido en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Seguidamente se añadía 1 ml del medio de extracción (acetona acidificada con H₂SO₄ 25 nM), se vortexeaba durante 2 min y se centrifugaba a 6000 g a 4°C. Posteriormente se desechaba el precipitado pasando el sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml. En una microplaca de cuarzo de 96 pocillos, se mezclaba 15 µl del sobrenadante con 230 µl de la disolución eFOX (25 mM de ácido sulfúrico, 100 µM de xilenol orange, 250 µM de sulfato de hierro, 100 µM de sorbitol y 1% de etanol). Se llevaban a cabo dos réplicas técnicas por réplica biológica, y tres réplicas biológicas por cada muestra. Se dejaba actuar los reactivos en oscuridad durante unos 30 minutos y se medía la absorbancia a 550 nm (absorben los peróxidos) y a 850 nm usando un lector de placas, donde absorben los interferentes, principalmente, compuestos fenólicos. Para cuantificar la concentración de H₂O₂ a partir de la diferencia de absorbancias ΔAbs ($A_{550} - A_{850}$), se realizaba una recta de calibrado llevando a cabo la reacción anteriormente descrita empelando como muestra distintas concentraciones conocidas de H₂O₂ (33% v/v). A partir de la ecuación de la recta, se determinaba la concentración de cada muestra en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot (100 \text{ g PF})^{-1}$ PF.

4.13. Determinación cualitativa del contenido en H₂O₂ por emisión de fluorescencia.

La oxidación de DCFH-DA a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) se emplea ampliamente para la detección de ROS totales por lo que es una técnica que permite determinar cualitativamente la mayor o menor presencia de ROS, entre los que se encuentra el H₂O₂. Mecánicamente, DCFH-DA es absorbido por células donde la esterasa celular escinde los grupos acetilo, dando como resultado DCFH. La oxidación de DCFH por ROS convierte la molécula en DCF, que emite fluorescencia verde a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. En comparación con la detección de fluorescencia con citometría de flujo y otros métodos alternativos, las ventajas de este método que utiliza un microscopio de fluorescencia es que produce imágenes fluorescentes claramente visibles y comparables, y es fácil de realizar, eficiente y rentable.

Para la determinación cualitativa del H₂O₂ por microscopía de fluorescencia se llevó a cabo una adaptación de la técnica empleada por Rejeb et al, 2015. Se tomaron muestras del tejido en cuestión en fresco (secciones de 0,5 mm del extremo final de pelos radiculares, discos de 0,5 mm de diámetro de folíolos, o secciones de 0,5 mm de grosor de tallo). Se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 2 ml ámbar con solución 30 µM de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) en 200 mM de buffer fosfato (pH 7,4) y se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos a 24°C, en campana de vacío para que la solución se infiltrase mejor en los tejidos. Transcurrido el tiempo, se lavaron las muestras con el buffer fosfato 5 veces, desechando el buffer anterior con una pipeta pasteur y añadiendo buffer limpio y manteniendo aproximadamente 3 minutos por cada lavado. Seguidamente, los distintos tejidos se montaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos para su inmediata visualización al microscopio de fluorescencia (Leica DM6B motorizado en X, Y, Z equipado con sistema de fluorescencia con iluminación Led, con una ámara Hamamatsu ORCA-flash 4.0LT), haciendo uso de la plataforma de software *Leica Application Suite X* (LAS X). Se utilizó el filtro L5 de características BP 460-500 (filtro de excitación), 505 (dicróico) y filtro de emisión BP 512-542. Todas las muestras se visualizaron y fotografiaron con los mismos parámetros (fijados para la muestra con menor fluorescencia) con el fin de obtener fotografías comparables entre sí.

4.14. Medida de la firmeza del fruto

La firmeza de los frutos se realizó de acuerdo con Sanchez-Bel et al. (2012) y se midió por compresiometría utilizando el equipo Durofel (Copa-Technologie CTIFL, 13103 St-Etienne du Gres, Francia), mediante el uso de un vástago calibrado de 0,25 cm² y expresando el resultado como porcentaje de la resistencia a la compresión, considerando el 100% como el valor de la resistencia de una superficie indeformable. Para cada fruto se realizaron 3 medidas en la zona ecuatorial del fruto, separadas 120° entre sí, a 1,5 cm del borde exterior del fruto cortado por la zona ecuatorial. Los resultados se expresaron en porcentaje de resistencia a la compresión.

5. Generación de construcciones para los experimentos en células HEK y localización subcelular en *Nicotiana benthamiana*.

5.1. Material de partida para la generación de las construcciones

Para llevar a cabo los experimentos de células HEK y de localización subcelular durante la estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Jörg Kudla (Münster, Alemania), era indispensable contar con los genes de interés clonados en los plásmidos necesarios para los distintos experimentos. Algunas de las construcciones utilizadas fueron directamente rescatadas del estocaje del laboratorio ya generadas previamente, mientras que otras fueron generadas como resultado de esta tesis doctoral, tomando como material de partida esqueletos de vectores del grupo, y los genes a clonar enviados por el grupo de la UAL (*SISOS2* o *SICIPK24* y *SLCBL10*) introducidos en vectores de gran eficiencia de clonaje (**Tabla 4**), empleando las metodologías de biología molecular para clonar genes que se desarrollan a continuación en los apartados siguientes.

Tabla 4. Plásmidos cedidos por el grupo de la UAL.

pGBKT7:SICBL10
D-TOPO:SISOS2 (open)
D-TOPO:SICBL10 (open)
D-TOPO:SICBL10 (stop)

Los plásmidos fueron enviados como purificaciones de ADN plasmídico en papel *Whatman*, por lo que fue necesaria su dilución en agua estéril (10 µl), transformación en *E. coli* y secuenciación para poder generar la reserva de DMSO adecuada con la que trabajar como plásmidos de partida.

Por otro lado, el gen *SICIPK6* fue directamente amplificado a partir del ADNc de *Solanum lycopersicum* tras la realización de una extracción de ARN mediante el kit comercial TriFast™, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

5.2. Medios para el cultivo de bacterias

5.2.1. Medio de cultivo para *Escherichia coli*

El medio *Lysogeny Broth* (LB) (Bertani, 1951) es un medio complejo estándar para el cultivo de *E. coli* tanto en placas como en cultivo líquido. El medio LB contiene 1 % (p/v) de triptona, 0,5 % (p/v) de extracto de levadura, 1 % (p/v) de cloruro de sodio, 0,1 % (p/v) de glucosa y (para medios sólidos) 2 % (p/v) de micro agar disuelto en agua bidestilada (ddH₂O). Para la selección de bacterias que contenían ciertos plásmidos, se añadieron antibióticos después de autoclavar y enfriar. Concentraciones finales de antibióticos: Ampicilina 100 µg/ml, Kanamicina 25 µg/ml, Cloranfenicol 34 µg/ml.

5.2.2. Medio de cultivo para el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

El medio *Yeast Extract Broth* (YEB) es un medio complejo estándar para el cultivo de *A. tumefaciens*. Para la preparación de YEB se utiliza 0,5 % (p/v) de extracto de carne de

res, 0,1 % (p/v) de extracto de levadura, 0,1 % (p/v) de peptona, 0,5 % (p/v) de sacarosa y (para medios sólidos) 2 % (p/v) de microagar disuelto en ddH₂O. El pH se ajustó a 7,4 usando NaOH o HCl. Después de esterilizar en autoclave y enfriar, se añadió MgSO₄ estéril 2 mM y antibióticos para la selección. Concentraciones finales de antibióticos: Kanamicina 25 µg/ml, Gentamicina 25 µg/ml, Rifampicina 100 µg/ml.

5.3. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados durante la estancia se obtuvieron de Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania). Los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de ADN se diseñaron utilizando el software DNASTAR Lasergene 11 core suite (www.dnastar.com). Los cebadores estándar se diseñaron de tal manera que la temperatura de anillamiento fuera de aproximadamente 58 °C en una reacción de PCR estándar y esto se comprobó haciendo uso del siguiente sitio web de acceso gratuito <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. La lista de los cebadores utilizados en este estudio se resume en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Primers usados almacenados en el lab. AG Kudla.

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
SISOS2_SpeI_for	aaaaACTAGTaagaaagtgaagagaagcttggg	SpeI
SISOS2_NotI_rev	ttttGCGGCCGCtcagcgagtccttgcttaag	NotI
Koz_SICBL10_BamH	aaaGGATCCgccgccaccatggattccactcgaaattctctg	BamHI
SICBL10_SpeI_rev	tttACTAGTcaacaaatggattttctcaatgtcttc	SpeI
SICBL10_rev_AvrI	ttttCCTAGGcaacaaatggattttctcaatgtcttc	AvrII
SICIPK6_SpeI_f	aaaaACTAGTgggacagaagaaaaatgtgctg	SpeI
SICIPK6_NotI_Rev	ttttGCGGCCGCtcaagcaattgttgattctcag	NotI
pEF1_Fw	tagggtgacccaagctggc	
T7P_mod_f	ataggagacccaagctggc	
BD_Fw	taatcataagaaattcgcccg	
M13_Rev	cagtccccggagctg	
pGPTV	catctcataaataacgtcatgcattac	
SPYCE(MR)	ttttctagaatggacaagcagaagaacggcatc	XbaI

5.4. Vectores utilizados

Los vectores empleados para clonar los genes de interés y generar las construcciones que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de producción de ROS utilizando el sistema HEK293T y el experimento de localización subcelular de SIRBOHG en *Nicotiana Benthiana* fueron los siguientes (**Tabla 6**).

Tabla 6. Esqueletos de vectores empleados para el clonaje de los genes de interés.

Nombre	Descripción	Selección	Referencia
pEF1-2xStrepII-CS	Expresión de proteínas en mamíferos Cs	Amp (<i>E. coli</i>)	Drerup et al, 2013
pEF1-CS-2xStrepII			Bartel and Fields, 1995
Vector pGTVII	Vector de expresión en plantas (constitutivo)	Kan (<i>E. coli</i>)	Walter et al, 2004

5.5. Métodos de biología molecular empleados en la clonación

En términos generales, para clonar ADN en un vector y generar la construcción (plásmido) de interés, es necesario contar con el vector de interés digerido con las enzimas de digestión con las que se digerirá el gen, aislado y purificado. Además, es necesario contar con el ADN de interés bien purificado, o bien en un plásmido secuenciado con los cebadores adecuados y tener certeza de que no contiene mutaciones con cambio de sentido (que afectarán a la proteína transcrita). Se digiere el plásmido con las enzimas de restricción que solo “cortan” al principio y al final del gen, pero no en medio. Se realiza una PCR para amplificar el gen con los cebadores adecuados que hibridan con ambos extremos y presentan los sitios de restricción, se lleva a cabo la electroforesis en gel para identificar el fragmento amplificado, se recorta el gel y se aísla y purifica la banda del ADN de interés. Se precipita el ADN, se digiere con las enzimas de restricción adecuadas y se lleva a cabo la ligación en el vector. A continuación, se transfecta la cepa de la bacteria correspondiente con el plásmido ligado (ADN de interés ligado en el vector de interés), se crece en placas para obtener colonias independientes. Se lleva a cabo una PCR de colonias con un cebador que hibride con el plásmido y otro que hibride con el inserto de ADN para corroborar que se ha insertado correctamente. Se realiza una electroforesis en gel para visualizar las bandas del tamaño correspondiente y si la ligación ha sido adecuada, se aísla y purifica el plásmido del gel, se genera la reserva de dimetilsulfóxido (DMSO) y se secuencia para comprobar que el inserto tiene la secuencia correcta.

5.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de acuerdo con los siguientes protocolos estándares.

PCR para clonaje con polimerasa de alta fidelidad

El uso de la polimerasa Phusion® (Finnzymes, Inc.) y la ADN polimerasa de alta fidelidad Q5® (New England BioLabs® Inc.) como polimerasa de corrección de pruebas tienen una tasa de error muy baja. Ambas enzimas se caracterizan por su actividad 3'-5'-exonucleasa que exhibe una función correctora. Esto asegura la eliminación de los nucleótidos insertados incorrectamente de la nueva cadena de ADN emergente. El ADN

plasmídico purificado, el ADN genómico o el ADNc se usaron como moldes para la amplificación utilizando el protocolo mencionado en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Composición de la mezcla de PCR (Polimerasa ADN GoTaq® G2 o Polimerasa Q5®) y los respectivos programas estándar

Mix de reacción	Polimerasa ADN GoTaq® G2	Polimerasa Q5®		
Buffer	10 µL 5x Colored/colorless GoTaq® Buffer	10 µL 5x Q5 Buffer		
MgCl ₂	5 µL (25 mM)	-		
Mix dNTP	2 µL (10 mM)	4 µL (10 mM)		
Cebador sentido	1 µL (10 pmol/µL)	1 µL (10 pmol/µL)		
Cebador antisentido	1 µL (10 pmol/µL)	1 µL (10 pmol/µL)		
Molde ADN	100 – 200 ng o 1 colonia	50 – 100 ng de plasmido / 2 µL de ADNc		
Polymerasa	0.1 µL (5 U/µL)	0.5 µL (2 U/µL)		
ddH ₂ O	X µL	X µL		
Volumen final	50 µL	50 µL		
Programa de PCR	Polimerasa ADN GoTaq® G2	Polimerasa Q5®		
	T ^a	Tiempo	T ^a	Tiempo
Paso I (desnaturalización inicial)	95°C	3 min	98°C	1 min
Paso II (Desnaturalización)	95°C	30 – 45 seg	98°C	30 seg
Paso III (Fase de anillado)	58°C	30 – 90 seg	58°C	45 seg
Paso IV (Elongación)	72°C	45 – 60 seg/kb	72°C	15 – 30 seg/kb
Ciclos (Pasos II – IV)	34 – 39 ciclos		34 ciclos	
Paso V (Elongación final)	72°C	5 min	72°C	5 min

PCR de colonias

Las colonias de *E. coli* que se transformaron con un plásmido de interés se identificaron mediante una PCR de colonias utilizando material bacteriano como molde. Se recogieron colonias bacterianas individuales con un palillo y se volvieron a sembrar en una placa con medio LB que contenía los antibióticos adecuados. Posteriormente, cada palillo se colocó en un tubo de PCR que contenía la mezcla de reacción de PCR, se movió ligeramente y se volvió a retirar. Se utilizaron dos cebadores específicos de vector o un cebador específico de vector y un gen. Las PCR de colonias se realizaron de acuerdo con el

protocolo descrito en la **Tabla 7** usando ADN polimerasa GoTaq® G2 (Promega Corporation).

5.5.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para separar fragmentos de ADN y visualizarlos, se prepararon geles de agarosa que contenían el colorante fluorescente HDGreen+™ (Intas Science Imaging Instruments GmbH) siguiendo los pasos siguientes: Paso 1) 1 %-2,5 % (p/v) de agarosa se mezcló con tampón 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Tris/HCl 40 mM, pH 8,0, Acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), y luego la mezcla se calentó en microondas hasta que se disolvió la agarosa. Paso 2) La solución de agarosa se agitó hasta que la temperatura descendió a aproximadamente a 50°C. Posteriormente, se agregaron 5 µL/100 mL de HDGreen+™ y se agitó nuevamente brevemente. Paso 3) Posteriormente, la solución de agarosa se vertió en un portaobjetos de gel y se agregaron peines adecuados para formar los bolsillos de carga y se dejó polimerizar la solución de agarosa a temperatura ambiente. Paso 4) El gel de agarosa se transfirió a un tanque de gel lleno con tampón TAE 1X. Paso 5) Las muestras se mezclaron con tampón de carga 10X (EDTA 1 M, pH 8,0, glicerol al 50 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,25 % (p/v) y luego se cargaron en los bolsillos de carga. Se cargaron 5 µl de marcador de ADN AZUL de 1 Kb (Segetic, Borken, Alemania) como referencia. Paso 6) Los fragmentos de ADN se separaron en un campo eléctrico de 10 V/cm durante 15-20 minutos. El ADN finalmente se visualizó bajo luz ultravioleta y se fotografió.

5.5.3. Aislamiento y purificación de ADN

Los fragmentos de ADN puro deben obtenerse tras la electroforesis en gel o tras la amplificación mediante PCR para aplicaciones posteriores como digestiones o ligaciones. Este paso permite la eliminación de residuos de gel de agarosa, enzimas o sales. Para llevar a cabo este paso de purificación se utilizó el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Alemania) siguiendo instrucciones del fabricante.

5.5.4. Digestión de restricción

Todas las reacciones de digestión de restricción de los fragmentos de ADN y los respectivos vectores se realizaron utilizando enzimas de New England Biolabs® (Ipswich, MA, EE. UU.). La mezcla de reacción se incubó a la temperatura óptima (normalmente 37 °C) durante al menos 2 horas (h) o durante la noche (*overnight* o.n).

Tabla 8. Mezcla de digestión de restricción

ADN	1-5 µg
10x CutSmart™ Buffer (+ BSA)	x µL
Enzimas de restricción 1 y 2	3-5 U/µg DNA
Volumen final	20 - 50 µL

5.5.4. Ligación de fragmento de ADN

Los esqueletos de plásmidos y los fragmentos de ADN que se digirieron con enzimas de restricción compatibles se ligaron utilizando ADN ligasa T4 de Invitrogen™. La reacción de ligación se realizó durante 4 horas a temperatura ambiente o a 15°C.

Tabla 9. Reacción de ligación (20 µL)

ADN plasmídico	1 mol
ADN (inserto)	5 mol
Buffer ligasa 5x	4 µL
Ligasa de ADN T4	1 U

Antes de la transformación (ver apartados 5.5.6. y 5.5.7 de esta sección) de la reacción de ligación, los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol (ver apartado 5.5.5.) y se resuspendieron en 10 µL de ddH₂O.

5.5.5. Precipitación de ADN

La precipitación de ADN es necesaria para obtener ADN purificado y concentrado. Varias aplicaciones, por ejemplo, la transformación de productos ligados en células de *E. coli* requiere la purificación y/o precipitación de los ácidos nucleicos. Para llevar a cabo la precipitación, en primer lugar se añadieron aproximadamente 2,5 volúmenes de etanol enfriado con hielo (99,8%, v/v) a la mezcla de los productos ligados. Seguidamente se incubó durante 30 min a -20 °C. Tras 30 min, la mezcla de ligación se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 20 817 g. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 µl de etanol al 70 % enfriado con hielo. Se centrifugó durante 10 min a 4°C y 20.817 g. Se repitieron 2 veces el paso de lavado y centrifugación y tras la segunda centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a 37°C. Finalmente, el sedimento se volvió a resuspender en 10 µl de ddH₂O.

5.5.6. Transformación de células de *E. coli* electrocompetentes

Se utilizó la cepa electrocompetente XL-1 Blue (Bullock, 1987) y XL10-Gold (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) de *E. coli*. Para la transformación por electroporación, las células bacterianas se expusieron a un campo eléctrico de acuerdo con el siguiente protocolo: Paso 1) En primer lugar, se descongelaron en hielo 50 µl de células competentes. Simultáneamente, se preenfrió una cubeta para electroporación y se tomó 1 ml de medio LB (sin antibióticos) en un tubo de reacción de 1,5 ml. Paso 2) Se mezclaron con las células 10-50 ng de plásmido o 5 µl de reacción de ligación precipitada. Esta mezcla se transfirió a la cubeta y se incubó en hielo durante 3-5 minutos. Paso 3) A las células se les dio un pulso eléctrico corto a 2,5 kV/cm utilizando el electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) Paso 4) Las células se recuperaron después de la electroporación transfiriéndolas inmediatamente a medio LB e incubando durante 30-45 min a 37°C en un termoagitador. Paso 5) Aproximadamente 100-200 µl de células se colocaron en placas en medio LB selectivo, mientras que en el caso de plásmidos con pocas copias, las células se recolectaron mediante centrifugación

a 14.000 g durante 45 segundos. A continuación, el sedimento se volvió a suspender en 50 µl de medio LB y se sembró en medio LB selectivo. Paso 6) Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 10 minutos o.n.

5.5.7. Transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*

Se utilizó la cepa GV3101 pMP90 de *A. tumefaciens* (Koncz y Schell, 1986). El protocolo para la transformación de células electrocompetentes de *A. tumefaciens* (GV3101 pMP90) fue similar al protocolo anterior de *E. coli* con las siguientes diferencias: se usó medio YEB en lugar de medio LB para (GV3101 pMP90); después de la electroporación, las células se incubaron en un medio no selectivo durante 2 horas a 28 °C en un termoagitador, y luego se sembraron en medio selectivo seguido de incubación de las placas durante 2 días a 28 °C.

5.5.8. Aislamiento de plásmidos

El aislamiento de ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* se llevó a cabo utilizando el kit NucleoSpin® Plasmid Easy Pure (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.5.9. Generación de reservas de dimetilsulfóxido (DMSO)

Para el almacenamiento a largo plazo de los cultivos bacterianos, se prepararon reservas de DMSO. Para ello, se mezclaron 930 µl del cultivo líquido con 70 µl de DMSO en un tubo de microcentrífuga. Tras 30 min de incubación en hielo, se vortexeó y posteriormente se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

5.5.10. Secuenciación y relaciones filogenéticas

Para comprobar que la construcción generada (clonaje del gen de interés en el plásmido de interés) se llevó a cabo correctamente, se secuenciaba con los primers sentido y antisentido adecuados y la secuencia obtenida se comparaba con las secuencias almacenadas en las bases de datos. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania, y se analizaron utilizando el paquete central DNASTAR Lasergene 11 (www.dnastar.com). Para alinear las secuencias de ADNc obtenidas con las secuencias presentes en los portales y bases de datos (Solgenomics, Genebank, Phytozome, Plaza 4.03.), se utilizaba el software SeqBuilderPro y para la alineación de secuencias de nucleótidos y construcción de árboles filogenéticos se utilizó el software Clustalw4. Los números de accesoión para las secuencias de nucleótidos (ADNc) se enumeran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Números de accesoión de las secuencias de nucleótidos (ADNc)

Gen	Nº accesoión	Referencia	Gen	Nº accesoión	Referencia
SICBL1	Solyc08g077770	Aljabari, 2021	AtCIPK4	AT4G14580.1	Zhang et al, 2019
SICBL9	Solyc08g007160		AtCIPK5	AT5G10930.1	
SICBL10	Solyc08g065330	Egea et al, 2018	AtCIPK6	AT4G30960.1	
SICIPK6	Solyc12g010130	De la Torre et al, 2013	AtCIPK7	AT3G23000.1	
SICIPK11	JF831201.1	Aljabari, 2021	AtCIPK8	AT4G24400.1	
SICIPK17	Solyc06g082440		AtCIPK9	AT1G01140.1	
SICIPK20	Solyc09g018280		AtCIPK10	AT5G58380.1	
SICIPK23	Solyc11g062410		AtCIPK11	AT2G30360.1	
SICIPK24	Solyc12g009570	Zhang et al, 2019	AtCIPK12	AT4G18700.1	
SIRBOHG	Solyc08g081690	Li et al, 2015	AtCIPK13	AT2G34180.1	
AtCBL1	AT4G17615.1	Weinl y Kudla, 2009	AtCIPK14	AT5G01820.1	
AtCBL2	AT5G55990.1		AtCIPK15	AT5G01810.1	
AtCBL3	AT4G26570.2		AtCIPK16	AT2G25090.1	
AtCBL4	AT5G24270.1		AtCIPK17	AT1G48260.1	
AtCBL5	AT4G01420.1		AtCIPK18	AT1G29230.1	
AtCBL6	AT4G16350.1		AtCIPK19	AT5G45810.1	
AtCBL7	AT4G26560.1		AtCIPK20	AT5G45820.1	
AtCBL8	AT1G64480.1		AtCIPK21	AT5G57630.1	
AtCBL9	AT5G47100.1		AtCIPK22	AT2G38490.1	
AtCBL10	AT4G33000.2		AtCIPK23	AT1G30270.1	
AtCIPK1	AT3G17510.1	Zhang et al, 2019	AtCIPK24	AT5G35410.1	
AtCIPK2	AT5G07070.1		AtCIPK25	AT5G25110.1	
AtCIPK3	AT2G26980.1		AtCIPK26	AT5G21326.1	

5.6. Construcciones utilizadas

Algunas de las construcciones empleadas en esta tesis doctoral fueron generadas previamente (Aljabari, 2021; Drerup, 2013) y se encuentran almacenadas en el laboratorio del grupo AG Kudla (IBBP) de la Universidad de Münster (Alemania) (**Tabla 11**). El resto de las construcciones empleadas en esta tesis doctoral fueron generadas en el grupo alemán como resultado de esta tesis doctoral, siguiendo los métodos de biología molecular descritos en el apartado 5.5 y sus subapartados.

Los CDS de *SICBL10*, *SICIPK6* y *SISOS2* se amplificaron mediante PCR y se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso, se insertaron en pEF1 2xStrepII-N o pEF1 2xStrepII-C (en el caso de *SICBL10*) a su vez digeridos con las enzimas de restricción adecuadas. Las enzimas de restricción utilizadas fueron SpeI/Not I en el caso de *SISOS2* y *SICIPK6*, y BamH/SpeI en el caso de *SICBL10*.

6. Ensayos de producción de ROS utilizando el sistema HEK293T

Para investigar la interacción de complejos SICIPKs/CBLs con SIRBOHG, se utilizó la línea celular HEK-293T. Esta línea celular es especial por presentar niveles insignificantes de actividad NADPH oxidasa endógena y, por lo tanto, es adecuada para estudiar la actividad y la regulación de las NADPH oxidasas heterólogas (como las proteínas RBOH vegetales) en esta línea celular humana (Ogasawara et al., 2008, Drerup et al., 2013).

Los plásmidos pEF1 son los más adecuados para la expresión simultánea de varias proteínas en células HEK293T (Drerup et al., 2013). Por lo tanto, la secuencia de codificación completa (CDS) de los genes *SIRBOHG*, *SICIPK6*, *SICIPK11*, *SICIPK17*, *SICIPK20*, *SICIPK23*, *SICIPK24*, *SICBL1*, *SICBL9* y *SICBL10* se clonó en el vector pEF1, respectivamente. La actividad de las NADPH oxidasas vegetales, como las SIRBOHG en células HEK293T transfectadas, se estimula mediante una concentración elevada de Ca^{2+} citoplasmático mediante la aplicación del ionóforo Ca^{2+} ionomicina (Drerup et al., 2013; Ogasawara et al., 2008; Takeda et al., 2008). La adición de Caliculina A (inhibidora de fosfatasas) bloquea la desfosforilación por las fosfatasas endógenas en las células HEK293T que revierten la fosforilación activadora, lo que permite la detección de una mayor producción de ROS.

6.1. Subcultivo de células HEK293T

Los subcultivos de células HEK293T se llevaron a cabo siguiendo el siguiente protocolo: (1) El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Wako) y la solución de tripsina-EDTA se precalentaron a 37 °C y temperatura ambiente, respectivamente. (2) El matraz se colocó verticalmente y se retiró el DMEM viejo. (3) La capa de células se enjuagó brevemente con 5 ml de solución de tripsina-EDTA. (4) El matraz se colocó verticalmente y luego se retiró la solución de tripsina-EDTA. (5) Se añadió 1 ml de solución de tripsina-EDTA al matraz y se incubó a 37 °C durante 5 min. (6) Se agregaron 5 ml de DMEM y se pipetearon suavemente hacia arriba y hacia abajo 10 veces. (7) Se mantuvo en el matraz una alícuota adecuada de la suspensión celular de 6 ml (generalmente 1,5 ml para un ciclo de subcultivo de 2 días) y el resto se transfirió a una placa de 9 cm. (8) La suspensión celular se mezcló en el matraz hasta 11 ml con DMEM. (9) La suspensión de células se pipeteó suavemente hacia arriba y hacia abajo 10 veces y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂.

6.2. Preparación de placas de 96 pocillos para ensayos de producción de ROS.

La preparación de las placas se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: La suspensión de células se pipeteó suavemente hacia arriba y hacia abajo en la placa de 9

cm 10 veces usando una pipeta de vidrio con una punta de pipeta de 100 μ l (amarilla). Se transfirieron 2 ml de la suspensión a una placa nueva de 9 cm y se mezclaron bien suavemente con 8 ml de DMEM. Se tomaron 10 μ l para contar la densidad celular con un hemocitómetro. La densidad celular se ajustó a $1,5 \times 10^5$ células/ ml, en un volumen de suspensión de 30 ml (se pueden preparar dos placas de 96 pocillos a partir de una suspensión de 30 ml). Se tomaron 10 μ l de las células para confirmar que la densidad celular estaba en el rango de $1,0-2,0 \times 10^5$ células/ ml. Se transfirió una alícuota de 100 μ l a cada pocillo de placas de 96 pocillos utilizando una pipeta de 8 canales. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h.

6.3. Transfección de las células HEK

Para la transfección de células HEK se usaron los componentes mencionados en la **Tabla 11**, siguiendo el siguiente protocolo: (1) Opti-MEM y Gene Juice se mezclaba mediante vórtex y se mantenía 5 min a temperatura ambiente (Ta). (2) Se preparaba en un tubo de reacción la mezcla de ADNs a utilizar en cada reacción (**Tabla 12**). El ADN total por pocillo era de 100 ng, se mezclaba con una pipeta en las proporciones siguientes: 50 ng de pEF1:SIRBOHG, 32 ng de pEF1:SICIPKs y 18 ng de pEF1:SICBL (en caso de probar proteína única o dual, se ajustaba hasta 100 ng añadiendo vector pEF1 vacío) y se mantenía a Ta durante 10-15 min. (3) La mezcla se añadía gota a gota a cada pocillo utilizando una pipeta automática. (4) La placa de 96 pocillos se incubaba a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 48 horas.

Tabla 11. Componentes usados en la transfección de células HEK.

	1 x	15 x
Opti-MEM (Invitrogen)	10 μ l	150 μ l
Gene Juice (Novagen)	0,3 μ l	4,5 μ l
ADN plasmídico	100 ng	1500 ng

6.4. Ensayo de producción de ROS

La producción de ROS se midió mediante una técnica de quimioluminiscencia amplificada dependiente de peroxidasa L-012 que contiene una sonda quimioluminiscente (CL) basada en luminol. La oxidación de L-012 es catalizada por ROS sintetizados por NADPH oxidasa, principalmente H₂O₂, así como por el tampón de reacción. El H₂O₂ puede ser catalizado por la peroxidasa de Horserasish (HRP) para formar $\cdot O^2-$. El radical L-012 reacciona aún más con $\cdot O^2-$ lo que lleva a la formación de un endoperóxido. Esto se convierte en un intermedio de aminoftalato excitado, que emite una luz detectable, que forma la parte principal de la señal de luminiscencia detectada. Las mediciones fueron realizadas en el luminómetro tristar LB941 de la empresa Berthold technologies usando el Software MikroWin 2000.

6.5. Preparación del luminómetro y medición de la producción de ROS.

Para el uso del luminómetro, en primer lugar se encendía junto al PC y se mantenía encendido durante aproximadamente 1 hora, hasta que la temperatura alcanzase los 37°C. Se lavaba el inyector se lavó con agua MilliQ. Luego, el inyector se lavaba con etanol al 70 % (v/v) y se lavaba nuevamente con agua MilliQ, y se vaciaba el inyector.

Para llevar a cabo la medición de la producción de ROS, en primer lugar se eliminaba el medio antiguo de cada pocillo de la placa de 96 pocillos con una pipeta de 8 canales. Seguidamente las células se lavaban suavemente con 100 µl de HBSS que contenía calcio y magnesio usando la pipeta multicanal. A continuación, se eliminaba el HBSS y luego se agregaban 100 µl del tampón de reacción (**Tabla 12**) que contenía calcio y magnesio. Durante la medición, la máquina inyectaba 11 µl de tampón de inyección en cada pocillo (**Tabla 12**) preparado en un tubo falcon aparte e introducido en el aparato). La producción de ROS se observaba y medía haciendo uso del software MikroWin 2000.

Tabla 12. Tampones de reacción e inyección empleados para la medición de ROS por cada placa.

Tampón de reacción	Tampón de inyección
+ 15mL (HBSS-Ca ²⁺ -Mg ²⁺)	+ 4 ml tampón de reacción
+ 45 µl HRP (20mg/ml)	+ 20 µl 1M Inomicina
+ 60 µl L-012 (62.4 mM)	+ 40 µl CaCl ₂ (1M) (solo en los ensayos de Ca ⁺²)
+ 150 µl caliculina A (0.01 mM) solo en los ensayos de inhibición de fosfatasas	

7. Localización subcelular de SIRBOHG en *Nicotiana Benthamiana*

7.1. Construcciones de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas

Para los experimentos de localización subcelular, se utilizaron las construcciones mencionadas en la **Tabla 10** previamente almacenadas en el grupo AG Kudla (Drerup et al., 2013). El CDS de *SIRBOHG* se amplificó mediante PCR, se digirió con las enzimas de restricción SpeI/KpnI y se clonó en dos vectores diferentes (pGPTV-II-KOZ-HYG-UBQ10:sXVE:GFPn::XXX y pGPTV-II-HT-BAR-UBI10-GFP::XXX), haciendo uso de las técnicas de clonaje descritas en el apartado 5.5. a partir de pGPTV-II-HYG-UBI10-sXVE-SPYCE-M::SIRBOHG (todos ellos previamente almacenados en la base del lab AG Kudla), generándose así las dos nuevas construcciones de *Agrobacterium* pGPTV-II-KOZ-HYG-UBQ10:sXVE:GFPn::SIRBOHG y pGPTV-II-HT-BAR-UBI10-GFP::SIRBOHG (**Tabla 10**).

7.2. Transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*

La transformación transitoria de hojas de tabaco utilizando *Agrobacterium* es un método bien establecido que se utiliza para la expresión transitoria de proteínas en plantas, por ejemplo, de construcciones marcadas con fluorescencia para la interacción proteína-proteína o estudios de localización de proteínas. Se requiere la coinfiltración de la cepa

supresora de silenciamiento 19K con cada muestra para la expresión eficiente de las proteínas de interés. Para los resultados que se presentan en esta tesis, se utilizó un protocolo adaptado de Waadt y Kudla, 2008a.

Día 1: Se sembraron en placa todos los cultivos de *Agrobacterium* para la investigación (ver apartado 7.1.).

Día 2: Se inoculó *Agrobacterium* transformadas en 5-10 ml de medio YEB y se cultivaron a 28°C y 200 rpm.

Día 3: Se midió la DO₆₀₀ de los cultivos (usando dilución 1:10), se calculó la cantidad necesaria de cultivo requerida para la infiltración. Teniendo en cuenta que para 19K → DO₆₀₀ = 0.3 y para CIPK y CBL → DO₆₀₀ = 0.5, en la equivalencia (V1 x DO1 = V2 x DO2; V2 = V1 x DO1 /DO2) se obtuvo que eran necesarios al menos 3 ml de volumen final para infiltrar cada hoja.

Para la transformación de plantas se utilizaron las construcciones descritas en la **Tabla 11** generadas en la cepa GV3101 pMP90 de *A. tumefaciens* (Hoekema et al., 1983). Para una expresión de proteína transitoria más eficiente, las construcciones empleadas se coinfiltraron adicionalmente con la cepa supresora de silenciador p19 (también llamada 19K) (Voinnet et al., 2003). Además, se coinfiltró también el marcador de membrana plasmática CBL1n:OFP (Batistič et al., 2008). La combinación de cultivos que se infiltraría a cada planta de *Nicotiana benthamiana* (descritas en la **Tabla 13**) se añadieron en un falcon de 15 ml y se centrifugaron durante 15 min a TA y 5000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón de activación (MES/KOH 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM, Acetosiringona 150 μM). Seguidamente, las células se incubaron en tampón de activación durante al menos 2 horas a temperatura ambiente y finalmente, los cultivos se infiltraron empleando una jeringa de 1 ml en hojas de plantas de *N. benthamiana* cultivadas durante 5-6 semanas en maceta con sustrato. Para la infiltración se hizo una pequeña incisión en el lado abaxial de la hoja (idealmente se lesionó solo la capa de células epidérmicas) y se infiltró la suspensión utilizando una jeringa sin aguja en el punto de la lesión hasta que se expandió por toda la hoja. Las plantas se cultivaron bajo luz continua durante 2-6 días.

Tabla 13. Combinaciones de cultivos coinfiltrados en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

P19 + CBL1n-OFP + sXVE-GFP
P19 + CBL1n-OFP + sXVE-GFP-AtRBOHF
P19 + CBL1n-OFP + sXVE-GFP-SIRBOHG
P19 + CBL1n-OFP + UBI10-GFP
P19 + CBL1n-OFP + 35S-GFP-AtRBOHG
P19 + CBL1n-OFP + UBI10-GFP -SIRBOHG

Día 5-9: Se usaron discos de hojas de las hojas infiltradas para los estudios microscópicos. La microscopía de fluorescencia se realizó con un microscopio invertido (Leica DMIRE2) equipado con el dispositivo de escaneo láser Leica TCS SP2 (Leica Microsystems). La detección de fluorescencia se realizó como sigue: GFP, excitación a

488 nm (láser Ar/Kr), exploración a 500 a 535 nm; proteína fluorescente amarilla (complementación de fluorescencia bimolecular), excitación a 514 nm (láser Ar/Kr), barrido a 525 a 600 nm; OFP, excitación a 543 nm (láser He/Ne), barrido a 565 a 595 nm. La autofluorescencia de los plástidos se detectó a 650 a 720 nm. Todas las imágenes se adquirieron con un objetivo de inmersión en agua de 633/1,20 (HCX PL Apo CS) de Leica. Todas las micrografías confocales de escaneo láser son secciones ópticas de la posición media en la celda.

8. Análisis de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

8.1. Determinación de la densidad y apertura estomática (MEB)

El número de estomas así como el grado de apertura de los mismos se determinó sobre secciones de tejido epidérmico de unos 0,5 cm² de hoja de tomate en el mismo estado de desarrollo (entre la 2 y 3ª hoja completamente desarrollada). Las secciones se fijaron durante al menos 8 h en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). Seguidamente se lavaron durante toda la noche en tampón fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar (pH 7,2). Después, se incubaron durante 2 h en tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2) y se lavaron de nuevo en tampón fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar (pH 7,2) durante toda la noche. A continuación, las muestras se deshidrataron progresivamente en disoluciones seriadas de acetona de concentración creciente (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) durante 10 minutos en cada disolución. Después, las muestras se desecaron al punto crítico con CO₂ líquido y acetona al 100% y se adherieron exponiendo la superficie abaxial sobre discos de cobre con cemento conductor. Seguidamente, se recubrieron con oro con el metalizador Bio-Rad Polaron Division 200, y se observaron usando un microscopio electrónico de barrido JSM-6100 (JEOL, Japón), a un voltaje de 15 kV (Olmos y Hellín, 1998). Finalmente, se obtuvieron al menos 20 imágenes digitales al azar por cada sección.

El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el programa de análisis digital ImageJ desarrollado por el *National Institutes of Health* (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). La densidad estomática (estomas · mm⁻²) se obtuvo a partir del conteo de estomas por área conocida a partir de 15 imágenes al azar tomadas de cada sección. La apertura estomática (µm) se determinó haciendo uso de la herramienta de medida del software (previamente calibrada con la escala de la imagen microscópica) como el grado de apertura promedio de todos los estomas presentes en 15 fotografías por sección de cada muestra.

8.2. Determinación del diámetro y densidad celular (MO)

Para la determinación del diámetro y la densidad celular, se obtuvieron secciones longitudinales de hoja de aproximadamente 0,5 x 0,25 mm² y de la zona de abscisión (ZA) de flores en postantesis. Estas secciones se fijaron durante 2,5 h a 4°C en una

solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). Seguidamente, se lavaron tres veces durante 15 minutos en tampón fosfato sódico 0,1 M más sacarosa isosmolar y se post-fijaron durante 2 h en una solución de tetraóxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,2). A continuación, se llevaron a cabo otros tres lavados con tampón fosfato 0,1 M más sacarosa isosmolar, dos de ellos durante 15 min y el último durante toda la noche. Las muestras fijadas se deshidrataron progresivamente en disoluciones seriadas de etanol de concentración creciente (35%, 50%, 70%, 96% y 100%), durante 20 min en cada una. Tras la deshidratación, las muestras se incluyeron en resina Spurr (Spurr, 1969), sometiéndose a dos incubaciones de 30 minutos en óxido de propileno, seguidas de otra incubación en una mezcla de óxido de propileno y resina Spurr (1:1) durante 1,5 h, y finalmente en resina Spurr durante 24 h a 4°C. Tras ello, las muestras se colocaron en moldes pre-tallados y rellenos con la misma resina, y se solidificaron a 68°C en estufa durante 24 h. A partir de estos bloques polimerizados se obtuvieron las secciones semifinas (0,5 – 0,7 μm de grosor) haciendo uso de un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Mikrosysteme, Viena, Austria). Las secciones se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina 1% (p/v) durante 5 min a 60°C, y después se lavaron con agua desionizada. Finalmente, las muestras teñidas se observaron en un microscopio Olympus BX40 en campo claro (Olympus Corporation, Tokio, Japón) y se obtuvieron imágenes digitales.

A partir de las imágenes, mediante el software anteriormente mencionado (ImageJ) se determinó el diámetro medio celular (μm) de las células del mesófilo como el promedio del diámetro de 15 células medidas al azar por la zona más ancha de 10 imágenes tomadas al azar por cada muestra. Por otro lado, la determinación de la densidad celular ($\text{cel}\cdot\text{mm}^{-2}$) se obtuvo a partir del conteo de células dentro de 3 áreas conocidas de 15 imágenes tomadas al azar por cada muestra.

9. Análisis de expresión génica mediante PCR

9.1. Extracción de RNA

Para la extracción del ARN total se utilizó material vegetal congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta el momento de la extracción. Para cada muestra se realizaban tres extracciones independientes de ARN (réplicas biológicas). El material vegetal se trituró con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y homogéneo. La extracción de ARN se llevó a cabo haciendo uso del kit comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante a partir de 100 mg de material vegetal homogeneizado y congelado. A este se le añadían 450 μL de tampón de lisis RLT (contiene tiocianato de guanidina, cuya principal función es la de lisar las células y desnaturalizar las proteínas - y por tanto inhibir ARNasas y ADNasas del extracto. El buffer RLT se acondicionaba previamente con β -mercaptoetanol (10 μL β -ME por 1 mL tampón RLT) para inactivar eficazmente las ARNasas del lisado. El lisado se transfería posteriormente a una columna QIAshredder y se centrifugaba a 14.000 rpm durante 2 min para eliminar el material

insoluble y homogenizar el extracto. Al sobrenadante resultante se le añadía 1 volumen de etanol para promover la unión selectiva del ARN a la membrana de sílice de la segunda columna del Kit RNeasy en condiciones óptimas. Una vez que el ARN se unía a la membrana de sílice se llevaba a cabo un primer lavado con 350 μ L del tampón RW1 (que contiene sales de guanidina y etanol, empleadas para eliminar eficientemente biomoléculas contaminantes como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos etc., que no se unen específicamente a la membrana de sílice). Tras ese primer lavado y antes de continuar con los siguientes, se trataba la membrana con ADNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen), con el fin de degradar el ADN genómico que pudiera haber unido a la membrana. Posteriormente, la membrana se lavaba primero con 350 μ L de tampón RWI y seguidamente dos lavados sucesivos con 500 μ L de tampón RPE. El tampón RPE contiene etanol, con la función de eliminar cualquier traza de sal de la membrana proveniente de los tampones utilizados. Una vez purificado el ARN, se procedía a la elución del mismo con 45 μ L de agua pura libre de ARNasa y ADNasa (Qiagen), conservando la elución a -80°C hasta su posterior análisis.

La cantidad y calidad del ARN extraído se estimó por espectrofotometría (Nanodrop® Spectrophotometer - Nanodrop Technologies) tomando los valores de absorbancia (Abs) a las longitudes de onda de 280 nm y 260 nm. La relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ se usaba para estimar la contaminación del extracto de ARN por proteínas y fenoles y la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ por polisacáridos. Generalmente, se consideraba que una extracción de ARN era de alta pureza cuando el valor del ratio $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ se encontraba próximo a 2,0 pero no inferior a 1,8 y el del ratio $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$ se encontraba entre 2,0-2,2.

La ausencia de degradación y de contaminación por ADN genómico se comprobaba mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón SB 1x (10 mM NaOH, 48 mM H_3BO_3 , pH 8,2).

9.2. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se llevaba a cabo a partir del ARN extraído, utilizando el Kit comercial iScript™ Reverse Transcription Super Mix para RT-qPCR (BioRad) el cual contiene en un solo mix todos los componentes necesarios, excepto el ARN, para la síntesis de la primera hebra de ADNc: transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus Retro Transcriptase; M-MLV-RT), inhibidor de ARNasa, dNTps, oligo (dT), cebadores randomizados, tampón, MgCl_2 y estabilizadores. La reacción se llevaba a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, empleando para una reacción simple de síntesis de ADNc la mezcla de reacción final descrita en la **Tabla 14**.

La mezcla de reacción se incubaba en un termociclador (Corbett Research PCR Palm Cycler; Qiagen, Sydney (Australia)) utilizando el programa descrito en la **Tabla 15**. El ADNc sintetizado se conservaba a 4°C hasta su posterior análisis.

Tabla 14. Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de ADNc.

Componentes	Volumen de reacción (µL)
5x iScript Supermix	4
ARN (200ng/ µL)	5 (1 µg de ARN)
Agua libre de ARN-ADNasa	11
Volumen total	20

Tabla 15. Programa del termociclador para la síntesis de ADNc.

Paso	Temperatura	Tiempo
Hibridación de cebadores	25°C	5 min
Transcripción inversa	42°C	30 min
Inactivación de la RT	85°C	5 min
Mantenimiento	4°C	∞

9.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Una vez obtenido el ADNc, se estimaba el nivel de expresión relativa de los genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). En esta técnica, la amplificación y detección del nivel de expresión se producen de manera simultánea en el mismo vial sin necesidad del procesamiento post-PCR de los productos amplificados, lo que incrementa el rendimiento y reduce la posibilidad de contaminación (Bustin y Nolan, 2004). La PCR a tiempo real está basada en la detección y cuantificación de DNA empleando una sonda fluorescente. Mediante la detección de fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA sintetizado, lo que permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). Las sondas fluorescentes empleadas pueden ser agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos (Bustin y Nolan, 2004). El fluoróforo específico de DNA bicatenario más usado en RT-qPCR es el SYBR Green PCR (Qiagen), y es el que se ha utilizado en este caso. La RT-qPCR se llevaba a cabo en un RotorGen 3000 (Qiagen). La mezcla de reacción final, descrita en la **Tabla 16**, se llevaba a cabo en un volumen final de 25 µL.

Tabla 16. Mezcla de reacción final para la RT-qPCR.

Componentes	Volumen de reacción	Concentración (µL)
MasterMix 2x *	11,5	1X
Cebador Sentido (20 µM)	2	0,47 µM
Cebador Anti-sentido (20 µM)	2	0,47 µM
ADNc	1	1 µg/µL
Agua libre de nucleasas	8,5	-
Volumen total	25	-

* Rotor-Gene SYBRGreenMix (Qiagen).

La expresión relativa de los genes analizados se calculó mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001), en el que se comparan directamente los Ct_s de los genes que se analizan y del gen endógeno usado como normalizador ($\Delta Ct = Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen normalizador}$) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔCt de la muestras problemas con respecto a la muestra usada de referencia ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ problema} - \Delta Ct \text{ referencia}$) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión génica relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ct es el ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra sobrepasa el valor umbral elegido (el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal por un aumento exponencial del producto de PCR durante la fase lineal logarítmica, y cuyo valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc inicial). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por comparación con la muestra de referencia en cada caso (generalmente WT en condiciones control) a cuyo nivel de expresión se le asignaba el valor de 1. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y para cada ensayo de PCR se obtuvieron las curvas de fusión (*melting*) de los productos amplificados con el fin de identificar posibles amplificaciones inespecíficas. El protocolo de amplificación empleado en el termociclador de RT-qPCR se describe en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Condiciones programadas en el termociclador para la reacción de RT-qPCR.

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1 (1X)	Activación polimerasa	95°C	5 min
	Desnaturalización		30 seg
2 (35X)	Hibridación	55°C	45 seg
	Extensión	72°C	45 seg
3 (1X)	<i>Melting</i>	95°C	1 min
4 (1X)		70°C	1 min
5 (60X)			10 seg

Como gen normalizador se empleó el factor de elongación 1 alfa (*SIEF1a*, accesión de GenBank AB061263), que presenta una expresión constitutiva en tomate que no se ve modificada por los tratamientos de estrés aplicados a las plantas. Los cebadores se diseñaban a partir de las secuencias disponibles para tomate en Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). El resto de cebadores empleados en esta tesis doctoral se detallan en la **Tabla 18**, y todos ellos fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU).

La eficiencia de cada par de cebadores se calculó mediante el método de diluciones seriadas con las muestras de ADNc, siendo la eficiencia de la reacción con esos cebadores el valor de la pendiente de la recta obtenida al representar el ciclo umbral (CT) de cada muestra frente al logaritmo en base 10 de la dilución usada de la muestra. Un valor de pendiente de -3,33 implicaba una eficiencia del 100 %, por lo que cuanto más próximo a dicho valor se encuentre, mayor fiabilidad tendrá el ensayo con los cebadores empleados.

Para calcular la eficiencia (E) de un ensayo de RT-qPCR se utiliza la siguiente fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$$

Tabla 18. Parejas de cebadores empleados en las RT-qPCRs para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes.

Gen	Secuencia del Cebador (5' – 3')
SICBL10	Sentido: 5'-CCATTATTGCACTCATTGAAGC-3' Antisentido: 5'-AGCAAGGTCCGTGTATTTCGT-3'
SISOS1	Sentido: 5'-TCGAGTGATGATTCTGGTGG-3' Antisentido: 5'-ATCACAGTGTGGAAAGGCTC-3'
LeNHX1	Sentido: 5'-GACAGTCCTGGAAAATCT-3' Antisentido: 5'-GGTATCAGCCCAAACACC-3'
LeNHX3	Sentido: 5'-CTCAAGAGTCACCACCAAGCA-3' Antisentido: 5'-CCAACCAAAACAAGACCCAACA-3'
SIHKT1;1	Sentido: 5'-TCTAGCCCAAGAACTCAAAT-3' Antisentido: 5'-CTAATGTTACAACCTCCAAGGAATT-3'
SIHKT1;2	Sentido: 5'-TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG-3' Antisentido: 5'-AGAGAGAACTAACGATGAACC-3'
SIEF1α	Sentido: 5'-GACAGGCGTTCAGGTAAGGA-3' Antisentido: 5'-GGGTATTCAGCAAAGGTCTC-3'
SIPIP1;3	Sentido: 5'-AAGGATTACAAAGAGCCACC-3' Antisentido: 5'-ACCAAAGCCCAAGCAAC-3'
SIPIP1;5	Sentido: 5'-TATCTGTCTTTAAACAATGGGATTCT-3' Antisentido: 5'-GAACCTCATTGATAAGGTACATTAC-3'
SIPIP1;7	Sentido: 5'-ACAAGCATGGAAGGACCCC-3' Antisentido: 5'-GCGGCAATTACATACATGCTTC-3'
SIPIP2;1	Sentido: 5'-GGTTCACTTGGCTACAATTCCT-3' Antisentido: 5'-AAGTGCCAAACATCCAACACA-3'
SIPIP2;7	Sentido: 5'-ATGACGCACCCATACAAC-3' Antisentido: 5'-TGCTAACAATGCTCCCAC-3'
SIPIP2;10	Sentido: 5'-CACTTGGTTCATTCAGGAGCA-3' Antisentido: 5'-ATACTCAAACAAAGCATAGTGA-3'
SIPIP2;12	Sentido: 5'-ATATTAATCCAGCAGTGACCTT-3' Antisentido: 5'-CAACGCCCTAGTATAGCC-3'
SITIP1;1	Sentido: 5'-AACCTGCTGTTACCTTCGG-3' Antisentido: 5'-CCCATGGTGAGTCCAGGTC-3'
SITIP2;2	Sentido: 5'-CCTACCCATGCTTCCAAGAG-3' Antisentido: 5'-GCTGCTGCTGTAGCAACATTTA-3'
SIRBOHG	Sentido: 5'- TGGAGCTCCAGCACAAAGATT-3' Antisentido: 5'- TTGCAAGCACTCATGTCCGAG -3'
SIHAK5	Sentido: 5'- GTATGATGTGACCGTTGTTACG-3' Antisentido: 5'- TCAGATCCTGTGATGCAAAGG-3'
SISKOR	Sentido: 5'-CTATAAGGCTGTTGGCAGCAAA-3' Antisentido: 5'- TGCCCTGCTCAACCGAAT-3'

10. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo

10.1. Evaluación de rasgos fenotípicos

La evaluación de los caracteres fenotípicos del desarrollo vegetativo y reproductivo se llevó a cabo en plantas cultivadas en condiciones de invernadero, mediante un seguimiento minucioso de su evolución al menos una vez por semana. Se observaron y anotaron los rasgos diferenciales entre plantas WT y mutantes tanto en control como en los distintos tratamientos, y se tomaron fotografías generales y en detalle. Puntualmente, en los momentos clave en los que se percibían rasgos diferenciales entre genotipos y/o tratamientos, se llevaron a cabo una serie de medidas:

a) La **medida de la altura** y la **distancia entre nudos de las hojas** se llevaba a cabo con una cinta métrica de tela para poder amoldarla a la curvatura irregular del tallo de la planta. Para la medida de la altura total de planta, se medía desde la base en contacto con el sustrato, hasta el entrenudo más apical. Para la medida de los entrenudos se procedió del mismo modo, pero solo se midieron los 5 primeros entrenudos empezando por las hojas basales. Se tomaron medidas de las 9 plantas por genotipo y tratamiento y se calculó el valor promedio y el error estándar para cada parámetro independiente.

c) El **grosor del pedicelo floral** se determinó con un pie de rey automático. Para ello se ajustó perfectamente a 15 pedicelos florales al azar de cada planta. Se obtuvieron medidas de 9 plantas por genotipo y tratamiento y se calculó el valor promedio y el error estándar.

d) El **conteo de las hojas y racimos florales** se determinó semanalmente planta a planta y se anotó en plantillas preparadas para dicho fin. Se contaron las hojas y racimos florales de 6 plantas por genotipo y tratamiento y se calculó el valor promedio y el error estándar para cada uno de los parámetros.

e) Cuando los frutos comenzaron a madurar, se llevó a cabo el **seguimiento de los frutos en distinto estado de maduración**, diferenciando entre **frutos verdes, naranjas o rojos**. Se anotó el número de frutos de cada tipo tanto por racimo y totales de 9 plantas y se calculó el valor promedio y el error estándar.

f) Las medidas del **diámetro ecuatorial y polar del fruto** de tomate se llevaban a cabo con un pie de rey automático empleando al menos 15 frutos rojos seleccionados arbitrariamente, y se expresaban en milímetros (mm).

10.2. Tasas de cuajado y abscisión

Para evaluar la tasa de cuajado y de abscisión, se llevó a cabo el conteo de las flores cuajadas y escindidas respectivamente, así como las flores totales de cada racimo por separado (los 4 primeros) y de 9 plantas por genotipo y tratamiento, en los distintos invernaderos.

El cálculo de los porcentajes de cuajado y abscisión por racimo se obtuvo en base al número total de flores en cada racimo por planta individual atendiendo a las fórmulas siguientes por cada planta individual.

$$\% \text{ abscisión } R_1 = (100 \times n \text{ flores escindidas } R_1) / n \text{ flores } R_1$$

$$\% \text{ cuajado } R_1 = (100 \times n \text{ flores cuajadas } R_1) / n \text{ flores } R_1$$

Donde *n flores escindidas* o *cuajadas R1* se refiere a las flores escindidas o cuajadas en el racimo 1 en cada caso, y *n flores R1* se refiere al número total de flores en el racimo 1. Se procedió del mismo modo para los racimos 1, 2, 3 y 4. Posteriormente se calculó el valor promedio de los porcentajes de abscisión y cuajado de las 9 plantas analizadas, así como su error estándar.

Para el cálculo de los porcentajes de cuajado y abscisión totales, se procedió del mismo modo, pero a partir de la suma total de flores y las sumas de flores abscindidas y cuajadas de los 4 racimos por planta, mediante las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ abscisión Total} = (100 \times T \text{ flores escindidas}) / T \text{ flores}$$

$$\% \text{ cuajado Total} = (100 \times T \text{ flores cuajadas}) / T \text{ flores}$$

Donde *T flores escindidas* o *cuajadas* se refiere al sumatorio de flores cuajadas o escindidas de los 4 racimos por planta, y *T flores* se refiere al número total de flores en los 4 racimos de la planta. Posteriormente, se obtuvo el promedio de los valores porcentuales de cada planta y su error estándar.

10.3. Evaluación de la producción (rendimiento en gramos y número de frutos)

La evaluación de la producción se llevó a cabo en plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Para la evaluación de la producción y rendimiento de las líneas de estudio se recolectó la producción total. El seguimiento de la campaña se centró en el recuento del número de frutos y el peso de los mismos por racimos independientes de las plantas estudiadas por genotipo y tratamiento. El rendimiento total y el número de frutos total se obtuvo de la suma de los valores de cada racimo independiente de cada planta individual.

10.4. Evaluación del porcentaje de BER y detección de fisiopatías

Los frutos en los que se identificaba algún defecto visual, como signos de rajado o de pudrición apical del fruto (*blossom-end root*, BER) en el momento de recolección, eran debidamente identificados y descontados de los frutos cosechables (sanos).

En el caso de los frutos que presentaban BER, se obtenía el porcentaje que representaban del total de frutos recolectados por cada planta:

$$\% \text{ BER} = (100 \times \text{frutos BER}) / T \text{ frutos}$$

Donde *Tfrutos* se refiere al sumatorio de frutos por planta, y *frutos con BER* se refiere al número total de frutos que presentaban signos de BER por cada planta. Posteriormente, se obtenía el promedio de los valores porcentuales de cada planta y el error estándar.

11. Tratamientos estadísticos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo siguiendo los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 21.0.

11.1. Análisis de diferencias significativas entre medias

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (EE) y se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si había diferencias entre las medias de los distintos factores (parámetro medido, genotipo, tratamiento...). Una vez rechazada la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA, se llevó a cabo el test de comparaciones múltiples *LSD (Least significant difference)* de Fisher, que permitía comparar las medias de los t niveles de un factor ($P < 0,05$).

11.2. Diferencias significativas entre interacciones de factores

Para estudiar si había diferencias significativas entre las interacciones de varios factores (genotipo - tratamiento - año de cultivo / genotipo - tratamiento - tipo de invernadero) y una variable dependiente (el parámetro analizado en cada caso), se llevó a cabo un análisis multivariante univariado.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

RESULTADOS. CAPÍTULO I.

IV. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *SICBL10* EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO

1. Antecedentes

La identificación del gen *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (CBL10)* en tomate fue llevada a cabo por de la Torre et al (2013), que estudiaron el papel de *SICBL10* en la respuesta a patógenos, pero no se conocía el papel de este gen en la tolerancia a estreses abióticos. Hasta ese momento, se había demostrado que *CBL10* está implicada en la regulación de la respuesta a estrés salino en *Arabidopsis* (Kim et al., 2007; Quan et al. 2007), y el grupo de Salinidad donde se encuadra esta Tesis fue el primero en demostrar que el sensor de Ca^{2+} *SICBL10* regula la tolerancia al estrés salino en tomate (Egea et al., 2018).

Los trabajos llevados a cabo hasta ahora se han realizado en colaboración con el grupo del IBMCP (UPV-CSIC), dirigido por el Prof. V. Moreno, y de la Universidad de Almería (UAL), dirigido por el Prof. Lozano, como queda demostrado con los sucesivos proyectos de investigación coordinados entre los tres grupos (Refs. AGL2006-15290-C03; AGL2009-13388-C03; AGL2012-40150-C03; AGL2015-64991-C3); PID2019-110833RB-C33). El objetivo de los tres grupos era generar una colección de mutantes de inserción de tomate para identificar genes implicados en el desarrollo vegetativo y reproductivo, así como genes implicados en la tolerancia a la salinidad, puesto que el análisis de mutantes es una de las estrategias más interesantes para dilucidar el papel de un gen (Campos et al., 2016; Pérez-Martin et al., 2017; Meco et al., 2019; Capel et al., 2020). En el actual proyecto coordinado, el título del subproyecto del grupo de salinidad es: “regulación del calcio y especies reactivas de oxígeno para mejorar la tolerancia a estrés abiótico y la calidad de fruto en tomate”. En esta Tesis Doctoral se abordan precisamente ambos objetivos, y dentro de la regulación del Ca^{2+} en la mejora de la tolerancia a estrés abiótico, el primer objetivo propuesto es avanzar en el conocimiento sobre el papel del gen de tomate *CBL10*.

Los trabajos sobre este gen se iniciaron tras la identificación de un mutante de inserción con alta sensibilidad a la salinidad por el grupo del IBMCP; la identificación del gen por el grupo de la UAL y la caracterización fenotípica, fisiológica y molecular del mutante por nuestro grupo, cuyos resultados constituyeron parte de la Tesis Doctoral del Dr. Plasencia (Plasencia, 2015) y se recogen en la primera publicación sobre el papel de este gen en la tolerancia del tomate a la salinidad (Egea et al., 2018). Recientemente, nuestro grupo ha publicado una revisión titulada “The Ca^{2+} Sensor Calcineurin B-Like Protein 10 in Plants: Emerging New Crucial Roles for Plant Abiotic Stress Tolerance” (Plasencia et al., 2021), donde se recogen las diferentes funciones en las que podría estar involucrado este gen de señalización de calcio pero que aún están sin demostrar. El trabajo realizado

tiene por objetivo dilucidar el papel de *CBL10* de tomate en diferentes procesos implicados en el desarrollo y tolerancia a estreses abióticos.

2. Metodología específica

2.1. Diseño experimental de los ensayos en invernadero SC y NC

Se llevaron a cabo ensayos simultáneos en condiciones control y de salinidad en campañas de distinto año durante la época de primavera – verano en los invernaderos NC y SC, de acuerdo con los procedimientos descritos previamente en la sección III Materiales y métodos, apartado 3.4.

Por un lado, se llevaron a cabo simultáneamente un ensayo de estrés hídrico en el invernadero NC y un ensayo de estrés salino (100 mM de NaCl) en el invernadero SC, ambos ensayos a largo plazo y empleando en ellos las líneas WT, *Slcbl10*, RNAi y OE de *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker. Para ello se utilizaron 20 plantas por cada genotipo, y se mantuvieron la mitad en control y la otra mitad en el tratamiento en cuestión (EH en el invernadero NC y salinidad en el invernadero SC) como se ha indicado en la sección III. A lo largo de los ensayos se llevó a cabo el fenotipado visual y la toma de fotografías representativas, la medida de los parámetros de intercambio gaseoso se recolectó muestra para analizar el contenido de agua (80 días) y se evaluaron caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo (biomasa vegetativa y reproductiva, nº de flores, nº de racimos, diámetro polar y ecuatorial de los frutos, % de frutos no cosechables, rendimiento en fruto (peso y número de frutos) y % de BER).

Por otro lado, se llevaron a cabo simultáneamente dos ensayos a largo plazo de estrés salino (100 mM de NaCl) con plantas injertadas, uno en el invernadero NC y otro en el invernadero SC. La realización de los injertos se llevó a cabo tal y como se ha descrito en la sección III, apartado 3.5. En estos ensayos se emplearon dos cultivares de tomate con mecanismos de tolerancia a la sal muy diferentes como parte aérea, cv. Moneymaker y el híbrido de tomate comercial Jaguar (F1) (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008). Puesto que, en ensayos anteriores a largo plazo, se comprobó que las plantas no injertadas y las autoinjertadas producían rendimientos de fruto idénticos durante todo el período de cosecha; no se utilizaron en estos ensayos plantas autoinjertadas como control (Estan et al., 2005). En el ensayo en invernadero NC, se utilizaron plantas no injertadas de WT (cv. Moneymaker), plantas no injertadas del híbrido de tomate comercial Jaguar (F1), el mutante *Slcbl10* y la línea RNAi junto con plantas injertadas WT/*Slcbl10*, WT/RNAi y F1/*Slcbl10*. En el invernadero SC, solo se emplearon plantas del híbrido Jaguar y plantas injertadas de esta variedad como parte aérea y el mutante *Slcbl10* como portainjertos (F1/*Slcbl10*). En ambos ensayos, 8 plantas por genotipo o combinación de injertos fueron sometidas a estrés salino, mientras que otras 8 se mantuvieron creciendo como control en ausencia de sal. Los frutos maduros de cada planta se recolectaron entre los días 40 y 80 de tratamiento y se registró el peso total de frutos por planta (rendimiento), el número de frutos por planta y el peso medio de frutos para estimar la

producción. Al final del experimento, también se recogieron todos los frutos inmaduros (verdes).

A lo largo de todos los experimentos de invernadero se controlaron minuciosamente las condiciones ambientales mediante los sensores de los invernaderos con el fin de poder comparar los resultados atendiendo a las mismas.

2.2. Diseño experimental de los ensayos de injertos en hidropónico

Cuando las plántulas del material vegetal empleado habían desarrollado dos hojas verdaderas, se realizaron los injertos y se llevaron a cabo dos ensayos en hidropónico para plantas de mayor tamaño como se ha descrito anteriormente en la sección III de Material y Métodos. Ambos ensayos se desarrollaron en la cámara de cultivo de condiciones controladas (ver apartados 3.1 y 3.3 de la misma sección). El tratamiento de estrés salino (150 mM de NaCl) se adicionó en ambos casos cuando las plantas presentaban un estado de desarrollo de 6-7 hojas verdaderas. Se llevaron a cabo dos experimentos de diferente duración empleando distinto material vegetal.

2.2.1. Ensayo a corto plazo con injertos recíprocos entre WT y mutante *Slcbl10*

Una vez establecido el injerto, se transfirieron plantas de cada combinación genotipo/injerto al medio hidropónico en la cámara de ambiente controlado. Siete días tras la transferencia al cultivo hidropónico, se aplicó el tratamiento salino en dos pasos: 75 mM de NaCl durante 24 horas y luego 150 mM de NaCl durante 15 días. El ensayo en hidropónico tuvo 5 días de duración (150 mM de NaCl) y se emplearon líneas WT (cv. MoneyMaker) y la línea mutante *Slcbl10*, así como autoinjertos de WT y *Slcbl10* (WT/WT; WT/*Slcbl10*, *Slcbl10*/WT y *Slcbl10*/*Slcbl10*). Se obtuvo la biomasa de raíz y parte aérea al final del experimento (5 DTS), y se midió el contenido de iones Na⁺ y K⁺, así como la relación entre ambos (ratio Na⁺/K⁺) al inicio del tratamiento (0 días, condición control), y a los 2 DTS.

2.2.2. Ensayo a corto-medio plazo con plantas WT injertadas en portainjertos que silencian o sobreexpresan el gen *SICBL10*

Una vez establecido el injerto tal y como se ha descrito previamente en el apartado 3.5. de la sección III, se transfirieron 12 plantas de cada combinación genotipo/injerto al medio hidropónico en la cámara de ambiente controlado. En este ensayo, WT se injertó en el mutante *Slcbl10* y las líneas RNAi y OE, y se emplearon plantas WT autoinjertadas como controles (WT/*Slcbl10*; WT/RNAi; WT/OE; WT/WT). Siete días después de la transferencia al cultivo hidropónico, se aplicó el tratamiento salino a la mitad de las plantas, manteniendo la otra mitad en la solución control. El tratamiento con sal se aplicó en dos pasos: primero 75 mM de NaCl durante 24 horas y luego 150 mM de NaCl durante 15 días. Se obtuvo la biomasa de parte aérea, raíz y de los frutos verdes que se habían llegado a desarrollar, así como la eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) en hojas de las plantas control y las que se sometieron a salinidad a los 15 días. Además, se obtuvo el contenido en Na⁺ y K⁺ de raíz, tallo y hoja y se midió la expresión en hoja y raíz de los

transportadores de Na⁺ (*SISOS1*, *SIHKT1;2*, *LeNHX3* y *LeNHX4*), y solo en raíz de los transportadores de K⁺ (*LKT1*, *HAK5* y *SKOR*) en las plantas autoinjertadas (WT/WT) y en las plantas injertadas en portainjertos que silenciaban (WT/*Slcbl10*) o sobreexpresaban el gen (WT/OE) a los 0 y 2 DTS.

3. Resultados

3.1. Estudiar el papel de *SICBL10* en el desarrollo reproductivo de tomate

Los resultados previos mostraban que la anulación del gen *SICBL10* provocaba una reducción del rendimiento en fruto cuando las plantas se desarrollaban sin estrés salino (Egea et al., 2018). Sin embargo, los experimentos se habían realizado en el invernadero situado en la finca experimental del CEBAS de condiciones no-controladas (NC) y en cultivo de primavera-verano, donde generalmente se alcanzan temperaturas muy elevadas a lo largo del desarrollo reproductivo.

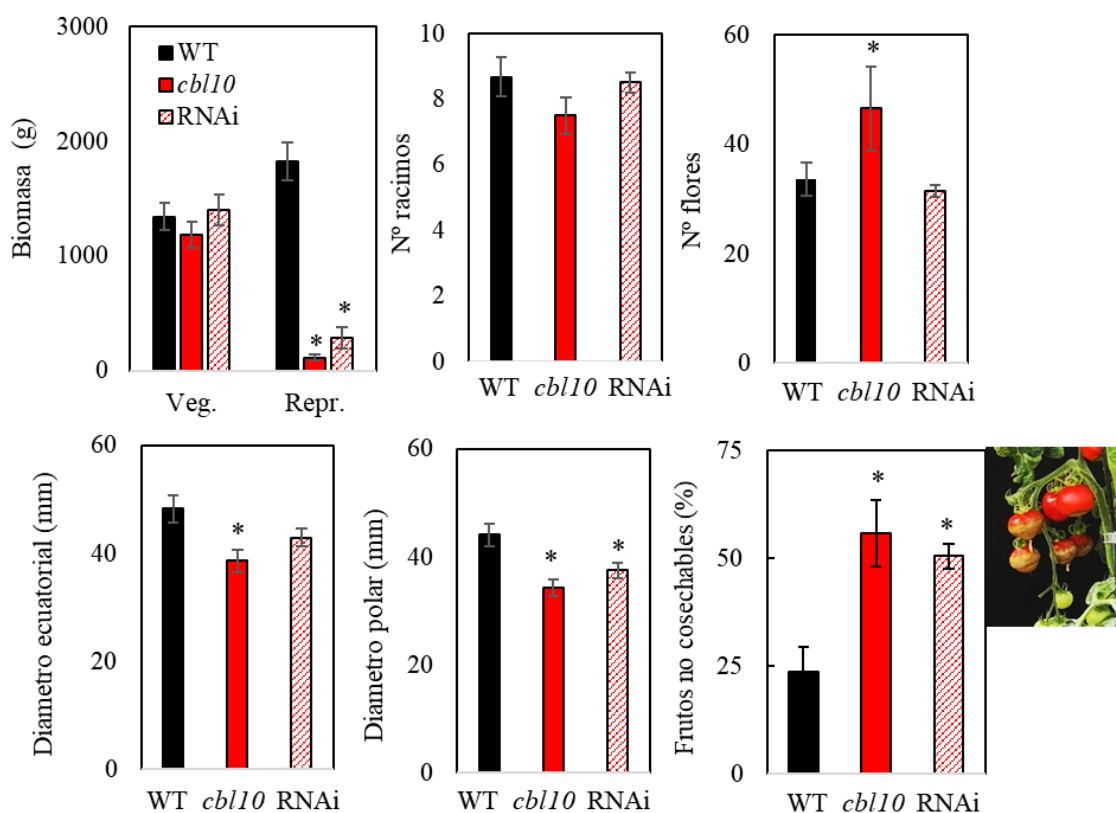


Figura 19. Desarrollo vegetativo y reproductivo de plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen *SICBL10* desarrolladas en invernadero de condiciones no-controladas durante primavera-verano. Biomasa de la parte aérea y de los frutos maduros cosechables (rojos y sin fisiopatías), número de racimos y número de flores, diámetro de los frutos cosechables así como el porcentaje de frutos no cosechables por incidencia de BER. A la derecha fotografía representativa de estos frutos. Las plantas se desarrollaron durante 5 meses (desde mitad de febrero a mitad de julio) en condiciones óptimas de cultivo. Valores medios + EE (n = 9). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT ((Student's *t*-test, *p* < 0.05).

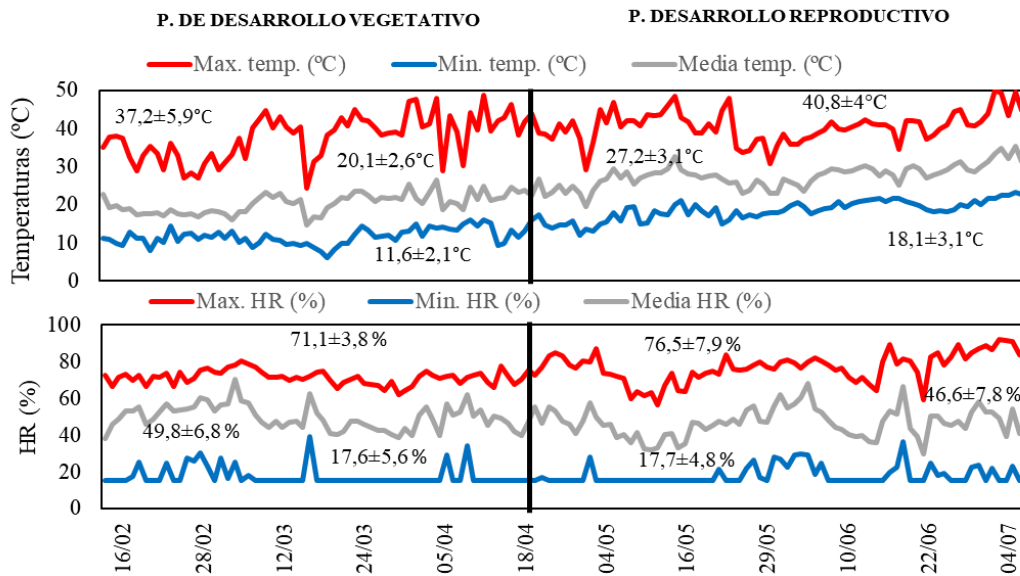
Con el fin de comprobar si este gen está implicado en el desarrollo reproductivo de tomate, plantas WT junto con plantas con el gen silenciado (el mutante *Slcbl10* y una línea de silenciamiento, RNAi) fueron desarrolladas en el mismo invernadero de condiciones NC utilizado en los estudios previos y en la misma época de cultivo. A lo largo del desarrollo de las plantas se controlaron los caracteres reproductivos, como el número de racimos, número de flores por racimo y número de frutos, y al final se cortaron las plantas y se calculó la biomasa vegetativa de la parte aérea. Los resultados muestran que los pesos de la parte aérea de las plantas son similares en el mutante *Slcbl10* y RNAi y a su vez similares a WT (**Figura 19**). Sin embargo, la biomasa reproductiva se reducía más del 80% en las plantas con el gen silenciado, respecto a las plantas WT. Estos resultados confirman los obtenidos previamente por Egea et al., (2018), e indican que la disrupción de *SICBL10* no afecta al desarrollo vegetativo pero sí al reproductivo, al menos en las condiciones de cultivo en que se ha realizado el experimento.

Además, la menor biomasa de frutos en las plantas con el gen silenciado no era debida a un menor número de racimos ni de flores: la línea RNAi mostraba valores similares al WT para ambas características, y la disminución no significativa del nº de racimos en el mutante se veía compensada por el aumento del nº de flores (**Figura 19**). Una característica observada en los frutos del mutante *Slcbl10* y RNAi era la menor expansión del fruto, reflejada especialmente en el diámetro polar, que se reducía en los frutos sin fisiopatías de ambas líneas respecto a WT (**Figura 19**). En los estudios previos se observó que la anulación del gen provocaba alta incidencia de *Blossom End Rot* (BER) (Egea et al. (2018). Es destacable el alto porcentaje de frutos no cosechables debido a la incidencia de BER que aparecía no solo en la parte distal sino distribuida por la mayoría del fruto (**Figura 19**).

Dado que los experimentos anteriores se habían realizado en condiciones NC durante la época primavera-verano, los resultados obtenidos podrían ser una consecuencia de las altas temperaturas (T) alcanzadas dentro del invernadero durante el desarrollo de las plantas. Para comprobar si el efecto sobre el desarrollo reproductivo de las plantas silenciadas de *SICBL10* era debido al estrés por T, se realizaron nuevos experimentos en un invernadero de condiciones climáticas semi-controladas (SC) ubicado en la UM, donde no se alcanzaba estrés por alta temperatura, y las plantas se cultivaron incluso en el mismo año y época de cultivo en ambos invernaderos. En la **Figura 20** se muestra la evolución de la T y H durante el cultivo en ambos invernaderos. El invernadero NC se caracteriza por el elevado estrés por T, siendo la media de los valores máximos alcanzados a lo largo del día durante los periodos vegetativo y reproductivo de 37,2 y 40, 8°C, respectivamente, mientras que en el invernadero SC estos valores eran 24,3 y 25°C, valores óptimos para el cultivo de tomate. Respecto a los porcentajes de humedad, estos eran mayores en el invernadero SC que en NC, especialmente al considerar los valores medios y mínimos alcanzados en cada periodo, con incrementos próximos al 200% en la

media de los valores mínimos puesto que eran 49,6 y 51,6 en los periodos vegetativo y reproductivo del invernadero SC, respecto a 17,6 y 17,7 en el invernadero NC. Al calcular el déficit de presión de vapor (DPV) en ambos invernaderos, parámetro directamente relacionado con la transpiración, se comprueba que estos valores eran mucho menores en el invernadero SC (**Figura 20**) puesto que las T^as alcanzadas en este invernadero (SC) eran muy inferiores a las del invernadero NC y los niveles de humedad eran superiores.

Invernadero condiciones no controladas (CEBAS)



Invernadero condiciones semi-controladas (UMU)

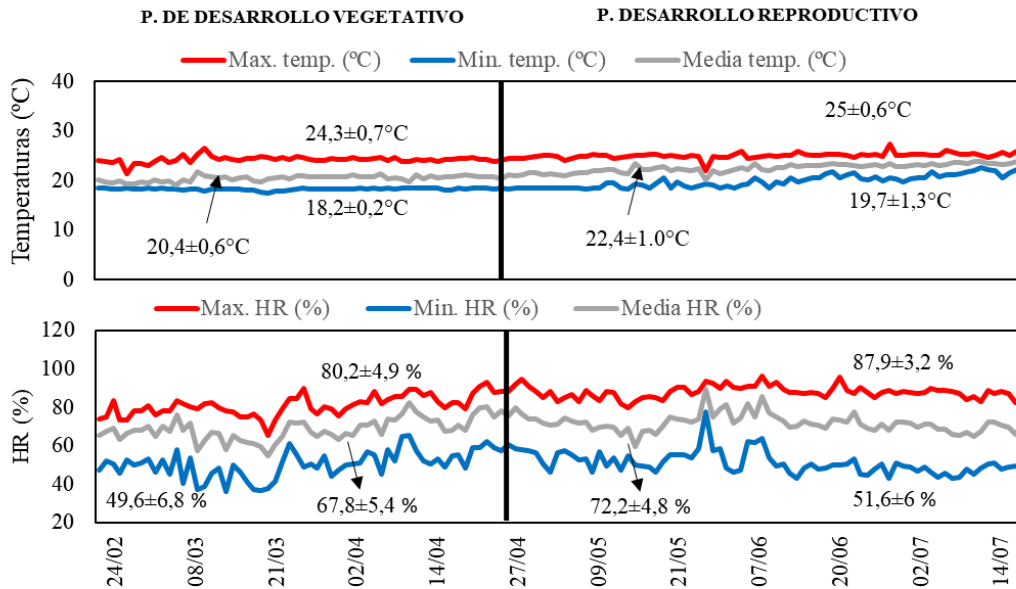


Figura 20. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas en los invernaderos de condiciones no-controladas y semi-controladas (SC) durante primavera-verano. Se representan los valores medios ± EE para el periodo de desarrollo vegetativo y reproductivo (durante el periodo de recogida de cosecha).

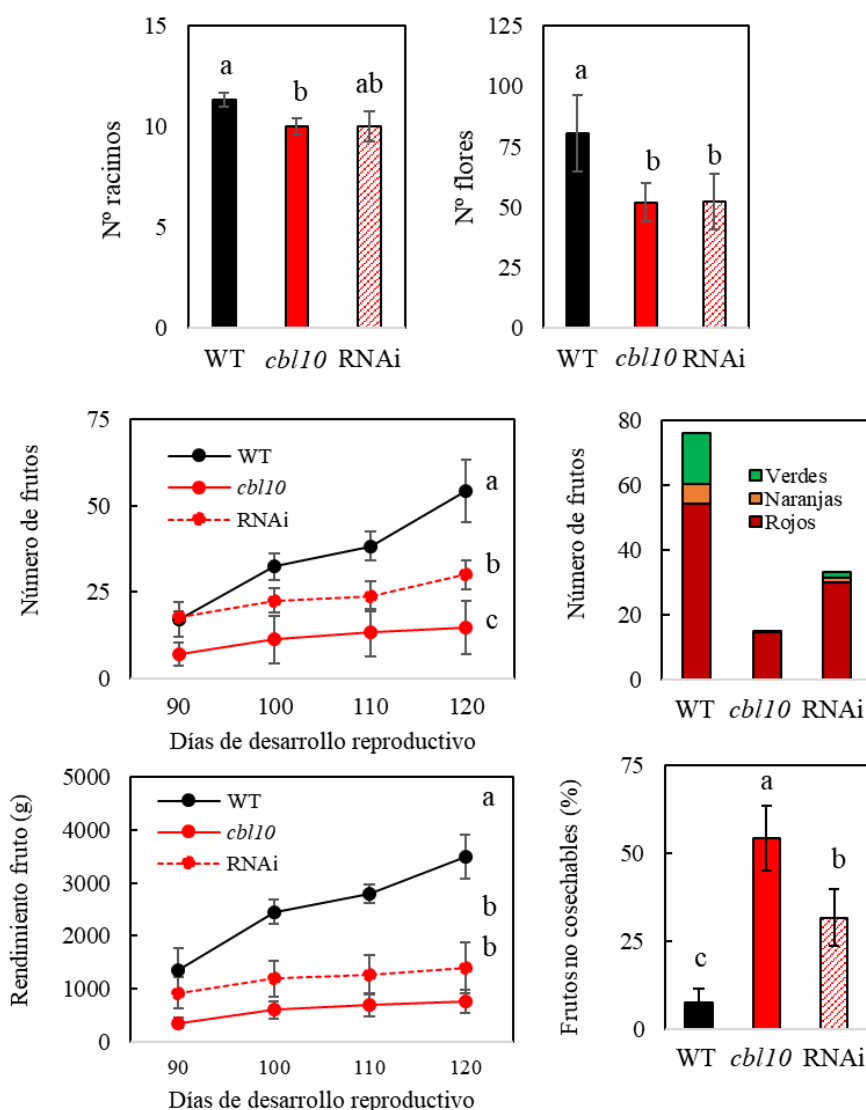


Figura 21. Desarrollo reproductivo de plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen *SICBL10* desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano. Número de racimos y nº de flores, así como la evolución de la producción de los frutos cosechables (rojos y sin fisiopatías). También se representa la distribución de frutos en diferentes estados de maduración y el porcentaje de frutos no cosechables por incidencia de BER. Las plantas se desarrollaron durante 5 meses (desde mitad de febrero a mitad de julio) en condiciones óptimas de cultivo. Valores medios \pm EE (n = 9). Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

En la **Figura 21** se muestran los caracteres de desarrollo reproductivo de las plantas cultivadas en el invernadero de condiciones SC. Se observaba una tendencia a disminuir el nº de racimos en ambas líneas con el gen silenciado, que llega a ser significativa respecto al control en nº de flores. Sin embargo, la reducción en el porcentaje del nº de frutos cosechables (rojos y sanos) es mayor que la reducción del nº de flores en el mutante y RNAi respecto a WT (reducciones del 45 y 70% en RNAi y el mutante, respectivamente), a pesar de que no ha habido estrés por alta T durante el cultivo. Estas reducciones son incluso superiores en base al rendimiento en fruto. Además, la menor producción no era debida a un retraso en la maduración, como se observa en la distribución de frutos en diferentes estados de maduración (**Figura 21**), donde el mutante

y RNAi no tienen prácticamente frutos verdes y naranjas. Estos resultados confirman que el gen *SICBL10* está implicado en el desarrollo reproductivo de tomate.

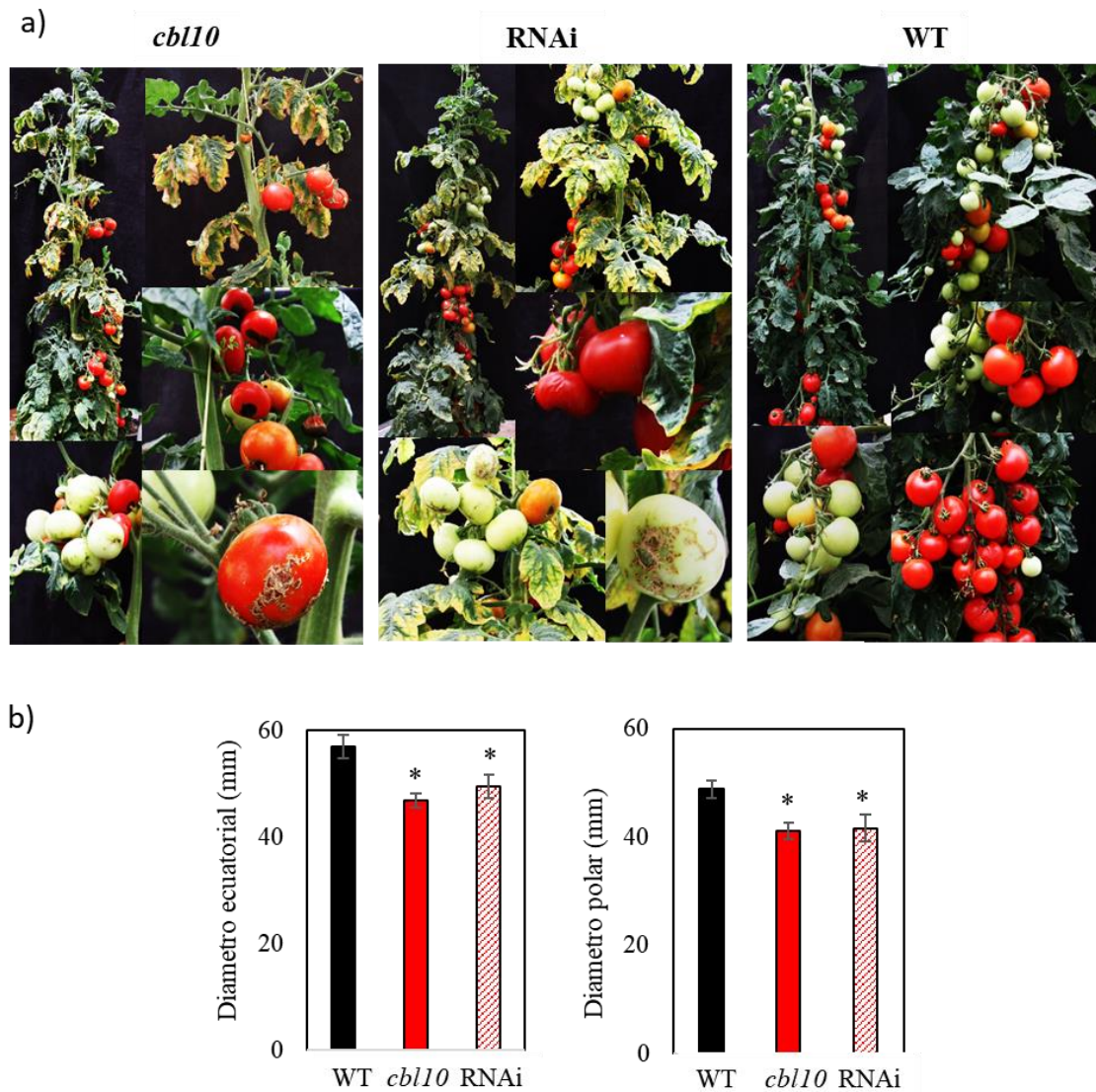


Figura 22. Alteraciones fenotípicas de las plantas que tienen silenciado el gen *SICBL10* desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano. Las plantas se desarrollaron durante 5 meses (desde mitad de febrero a mitad de julio) en condiciones óptimas de cultivo. a) Fotos representativas de WT, mutante y RNAi a lo largo del cultivo, donde se observan claros síntomas de deficiencia de Ca^{2+} en las hojas superiores del mutante y RNAi, así como la alta incidencia de BER en los frutos desde antes de la maduración. b) Diámetro polar y ecuatorial de los frutos rojos. Valores medios \pm EE (n = 6). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT ((Student's *t*-test, $p < 0.05$).

Respecto a la incidencia de BER (Egea et al., (2018), fisiopatía relacionada con la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} que hace que los frutos no sean cosechables, es interesante resaltar la alta incidencia en el mutante *Slcb110*, que tiene anulada la función del gen *SICBL10*, y algo menor en la línea RNAi, que tiene reducida la expresión del gen pero no anulada (Figura 21b). Interesantemente, si comparamos los valores de condiciones SC con los obtenidos en el invernadero de condiciones NC se observa que las mayores diferencias se dan en WT, con porcentaje muy superior en condiciones NC

que SC (Figuras 19 y 21), lo que puede ser una consecuencia del estrés térmico al que están sometidas las plantas. Sin embargo, los porcentajes alcanzados en ambos invernaderos para el mutante y RNAi son muy similares, cuando *a priori* se esperaría un menor efecto en este invernadero SC como se observa en el WT. Esto podría ser debido a que el efecto provocado por estrés de T en el invernadero NC puede verse compensado por la mayor H del invernadero SC.

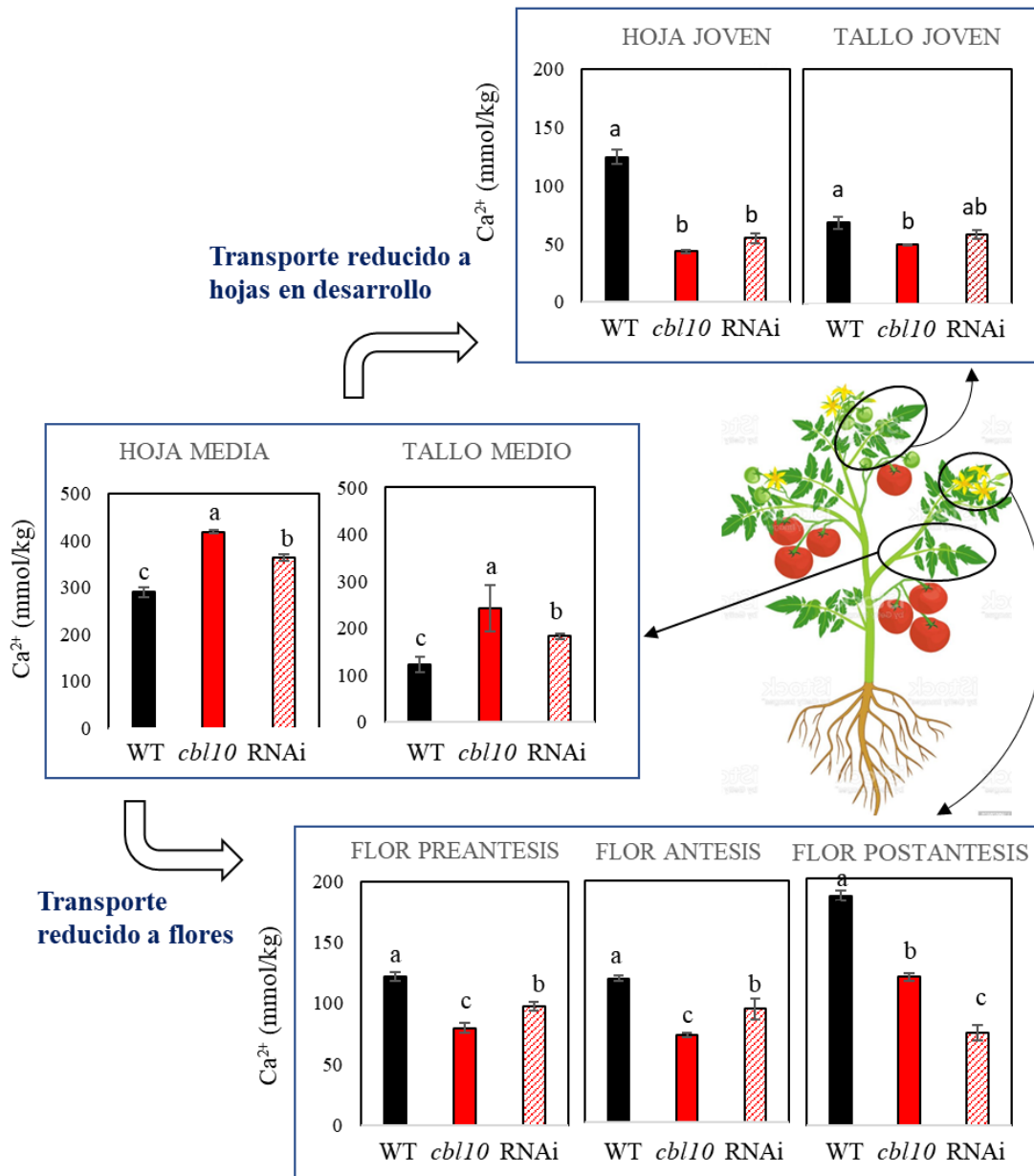


Figura 23. Concentraciones de Ca²⁺ en las plantas del cv. de tomate (WT) y plantas que tienen silenciado el gen *SICBL10* desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano. Los contenidos de Ca²⁺ se analizaron en zona no necrosada de órganos fuente (Hoja y tallo medio) y sumidero (Hoja y tallo joven a nivel vegetativo y flores en diferente estado de desarrollo a nivel reproductivo) a los 4 meses de cultivo (mitad de junio). Valores son las medias ± EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

La menor transpiración de los frutos debida a la alta humedad puede provocar síntomas de deficiencia de Ca^{2+} . Efectivamente, los síntomas de deficiencia de Ca^{2+} eran visibles no solo a nivel reproductivo sino también vegetativo, como es evidente en las fotografías representativas de las plantas y frutos (**Figura 22**). Así, las hojas muestran el típico fenotipo de clorosis foliar y alteraciones en el desarrollo de las hojas, debido a que los bordes de las hojas no pueden crecer tan rápidamente como la parte central y terminan necrosándose. Los frutos, no solo muestran los típicos síntomas de BER por la parte distal con necrosamiento de la zona, sino que hay alteraciones distribuidas por todo el fruto, llegando incluso a afectar a la expansión del fruto. Así, los diámetros polar y ecuatorial se reducían en los frutos del mutante y RNAi respecto a WT (**Figura 22**).

Finalmente, se analizaron los niveles de Ca^{2+} en la hoja fuente (hoja media) y su tallo correspondiente (en la parte no necrosada evitando los bordes), así como en órganos sumidero, concretamente en hoja y tallo joven (en desarrollo) a nivel vegetativo y en flores de diferentes estados de desarrollo a nivel reproductivo (**Figura 23**). Efectivamente, los niveles de Ca^{2+} estaban alterados en el mutante y RNAi respecto a WT, incrementando significativamente en las hojas fuente mientras que la respuesta opuesta era observada en los órganos sumidero, como hojas jóvenes y flores a diferentes estados, preantesis, antesis y post-antesis. Estos resultados confirman que los efectos provocados por el silenciamiento del gen *SICBL10* se deben a la alteración provocada en la homeostasis del Ca^{2+} .

3.2. Determinar la respuesta a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *SLCBL10*

Hasta ahora solo se había demostrado que la anulación del gen *SICBL10* induce hipersensibilidad al estrés salino (Egea et al. (2018), pero no cuál es la respuesta a la salinidad cuando el gen está sobreexpresado. Para completar el papel del gen en parte aérea, se ha estudiado la respuesta al estrés salino a largo plazo en una línea de sobreexpresión (OE) del gen junto al mutante nulo *Slcbl10*. Los ensayos se realizaron en el invernadero de condiciones semi-controladas (SC) con el fin de que no se alcanzaran temperaturas elevadas durante el cultivo.

3.2.1. Tolerancia a la salinidad en base al rendimiento en fruto

En la **Figura 24a** se representa la evolución de la producción de frutos maduros de plantas WT y las líneas con niveles alterados del gen desarrolladas sin sal (control) y a 100 mM NaCl (sal) durante 90 DTS. Como se esperaba, el mutante mostraba un menor rendimiento que WT en control y la salinidad anulaba prácticamente la producción, lo que confirma los resultados obtenidos previamente (**Figura 21**). En la línea de OE, aunque hay una tendencia a reducir el rendimiento a lo largo del cultivo en control, al final no se alcanzan diferencias significativas entre el rendimiento en fruto de WT y OE. En sal, las curvas de rendimiento de WT y OE se solapan a lo largo del cultivo, reduciéndose ambas significativamente respecto al control. Sin embargo, la línea de OE muestra mayor tolerancia a la salinidad que WT en relación al número de frutos, ya que

se alcanza un incremento del 37% en sal respecto al control en OE a los 90 DTS, mientras que en WT se reduce un 25%. Teniendo en cuenta las dos componentes de rendimiento, n° de frutos y peso medio, el aumento del n° de frutos en la línea de OE está asociado a una reducción del peso medio del fruto (**Figura 24a**).

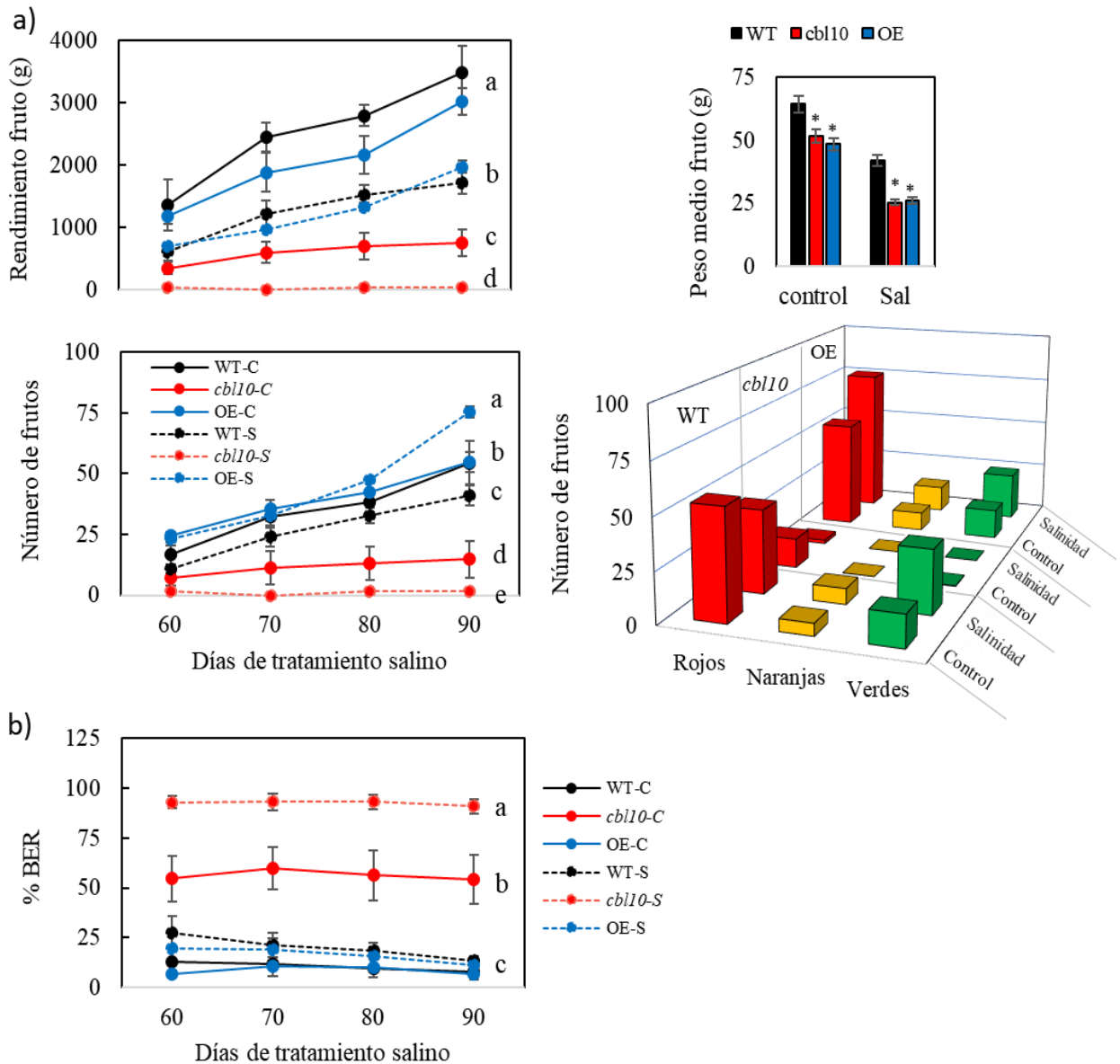


Figura 24. La sobreexpresión del gen *SICBL10* aumenta el número de frutos con la salinidad. Plantas del cv. de tomate (WT), del mutante *Slcbl10* y de una línea que tiene sobreexpresado (OE) el gen *SICBL10* eran desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano en control y sal (100 mM NaCl) durante 90 días. a) Evolución de la producción de frutos cosechables (rojos y sin fisiopatías) durante los 90 DTS y el peso medio de los frutos, así como la distribución de frutos a los diferentes estados de maduración. b) Evolución de la incidencia de BER en los frutos. Valores medios \pm ES (n = 9). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT ((Student's *t*-test, $p < 0.05$)).

Al final del experimento, además de los frutos maduros (rojos) se recolectó el resto de frutos cuajados (naranjas y verdes) para comprobar si el balance cambiaba al considerar

el total. Los resultados muestran que el mayor n° de frutos de la línea OE en sal no se invierte al considerar verdes + naranjas, ya que se alcanzó un total de 112 frutos frente a los 80 en WT (**Figura 24a**). Estos resultados indican una mejor tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *SICBL10* en base al número de frutos.

Como se observó en el apartado anterior, la anulación del gen provocaba alta incidencia de BER en las plantas desarrolladas sin sal. En este estudio, se corroboran los resultados anteriores y se observa que la incidencia aumenta con la salinidad en el mutante *Slcbl10*, donde se alcanzan valores próximos al 100% en las diferentes recogidas de cosecha a lo largo del cultivo (**Figura 24b**). Sin embargo, la incidencia de BER en los frutos de las plantas WT y OE era muy baja, tanto en condiciones control como salinas, y además eran similares lo que sugiere que la OE no afecta a esta fisiopatía a pesar de que pueda verse alterada la homeostasis del Ca^{2+} .

3.2.2. Alteraciones fisiológicas inducidas por el silenciamiento y sobreexpresión de *SICBL10*

El primer efecto inducido por la salinidad es el estrés osmótico provocado por la dificultad de la planta para absorber y transportar agua hasta las hojas. Ante este estrés, uno de los mecanismos de tolerancia es evitar la pérdida de agua a través de las hojas. En este estudio se analizó conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración (E) y fotosíntesis (Pn) a los 45 DTS (**Figura 25a**). El mutante *Slcbl10* mostraba una tendencia a aumentar g_s respecto a WT mientras que la línea OE mostraba la tendencia opuesta, aunque las diferencias solo llegaban a ser significativas en control. Respecto a E, los valores eran similares tanto en control como en sal, lo que indica que las diferencias entre el silenciamiento y OE no están asociadas a la pérdida de agua a través de las hojas.

Respecto a los contenidos de agua, el mutante y la línea de OE muestran comportamientos opuestos en raíz y parte aérea (**Figura 25b**). Así, *Slcbl10* reduce sus contenidos de agua respecto a WT en raíz mientras que la línea OE los aumenta. En la parte aérea, el mayor contenido de agua del mutante respecto a WT se observa en hoja desarrollada así como en la parte en desarrollo de la planta (hoja y tallo joven). La línea de OE mantiene los contenidos de agua similares al WT tanto en hoja desarrollada como en desarrollo y solo los reduce significativamente en tallo joven de plantas control y sal.

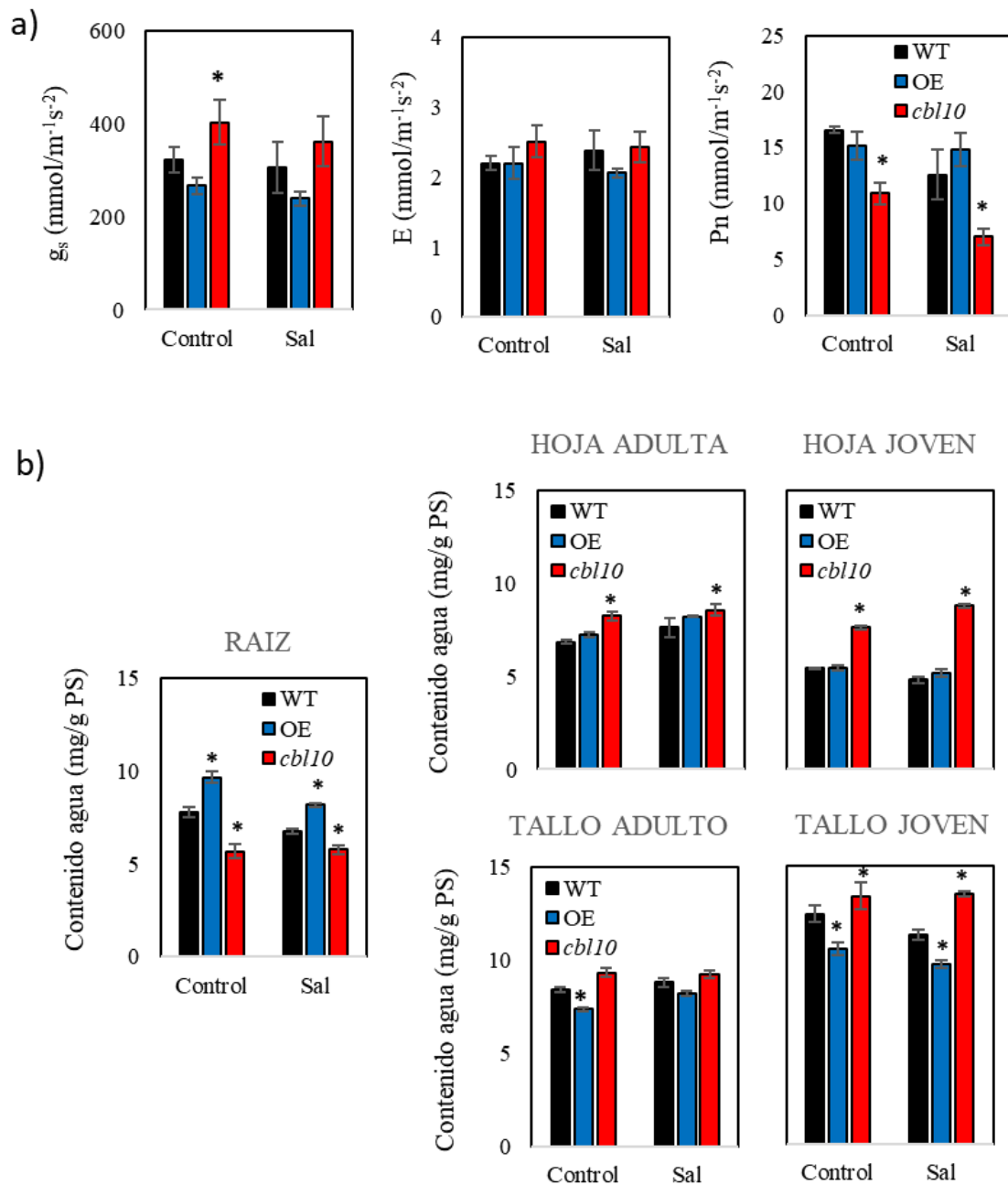


Figura 25. Efecto de la salinidad sobre los caracteres relacionados con la pérdida de agua a través de las hojas y los contenidos de agua en diferentes partes de la planta. Plantas del cv. de tomate (WT), del mutante *Slcbl10* y de una línea que tiene sobreexpresado (OE) el gen *SlCBL10* desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano en control y sal (100 mM NaCl). a) Conductancia estomática (g_s), transpiración (E) y fotosíntesis (Pn) medida en hoja desarrollada tras 45 DTS. b) Contenidos de agua en raíz, hoja adulta y hoja joven y los tallos desarrollados. Valores son las medias \pm EE de tres repeticiones. Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

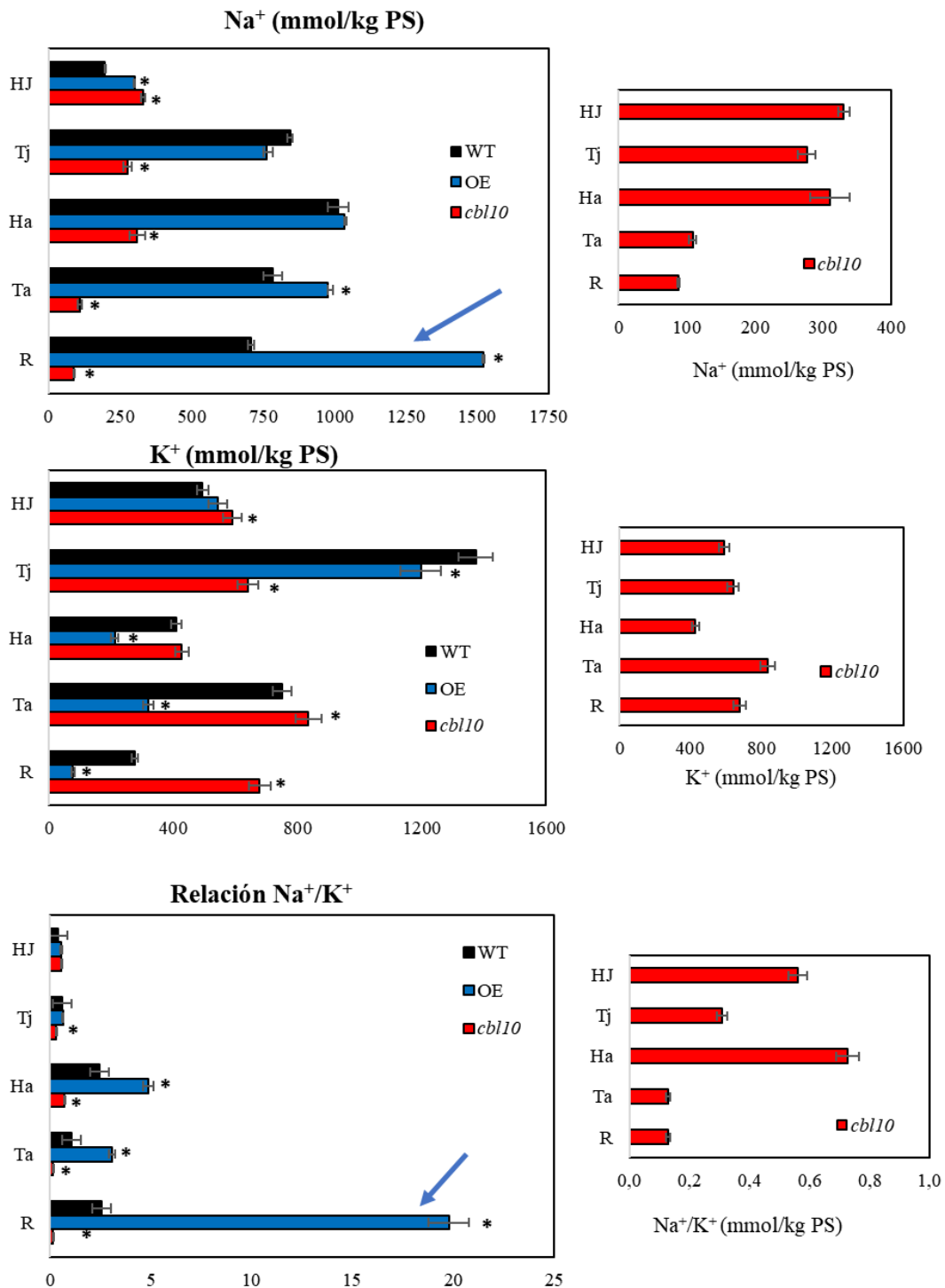


Figura 26. Cambios inducidos por el silenciamiento y sobreexpresión de SICBL10 en las concentraciones de Na⁺, K⁺ y relación Na⁺/K⁺. Plantas del cv. de tomate (WT), del mutante *Slcbl10* y de una línea de sobreexpresión (OE) desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas durante primavera-verano en sal (100 mM NaCl). Los contenidos iónicos se analizaron en raíz, hoja adulta y hoja joven y los tallos correspondientes a los 50 DTS. A la derecha, patrón de distribución iónica del mutante *Slcbl10*. Valores son las medias ± EE de tres repeticiones. Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT (Student's t-test, $p < 0.05$).

Las concentraciones de Na^+ y K^+ se analizaron a los 50 DTS en raíz y en los distintos tejidos de la parte aérea (**Figura 26**). Los cambios inducidos en el mutante y la línea de OE eran muy diferentes, tal como se observó para los contenidos de agua. En raíz, el mutante presenta una acumulación de Na^+ mucho menor que el WT mientras que la línea de OE duplica la acumulación de Na^+ . En parte aérea, la acumulación de Na^+ seguía siendo menor en el mutante que en WT en todas las partes analizadas excepto en hoja joven, donde era mayor en el mutante. Es evidente que el patrón de distribución de Na^+ está alterado en el mutante (Figura ampliada a la derecha), tal como se había demostrado anteriormente (Egea et al., 2018), ya que es en las hojas jóvenes o en desarrollo donde debería alcanzarse la menor acumulación de Na^+ . La línea de OE, a pesar de la alta acumulación de Na^+ en raíz, no acumula Na^+ en parte aérea, puesto que solo incrementa su contenido en tallo adulto y en hoja joven respecto a WT, con niveles similares a los del mutante. Sin embargo, la sobreexpresión del gen no provoca alteraciones en el patrón normal de distribución de Na^+ en tomate, donde la mayor acumulación se produce en raíz y la menor en la hoja joven para evitar su efecto tóxico en los tejidos en crecimiento.

Respecto a los contenidos de K^+ , el mutante muestra una alta acumulación de K^+ en raíz respecto a WT, mientras que en parte aérea o bien mantiene niveles similares a WT o incrementa ligeramente, aunque el incremento en hoja joven es a expensas de una importante reducción en el tallo joven (**Figura 26**). La línea de OE reduce los contenidos de K^+ en raíz y órganos desarrollados de la parte aérea, pero es capaz de mantener niveles similares al WT en hoja joven. Los cambios en la relación Na^+/K^+ reflejan los cambios en ambos iones, de forma que el mutante mantiene alterado el patrón de distribución ya que muestra los valores más altos en los órganos jóvenes de la parte aérea, mientras que la línea de OE muestra la respuesta opuesta, destacando el altísimo valor alcanzado de la relación Na^+/K^+ en raíz (**Figura 26**). En resumen, la tolerancia a la salinidad de la línea de OE está asociada a la capacidad para retener Na^+ en la raíz sin transportarlo a la parte aérea.

3.3. Comprobar si el gen *SICBL10* funciona como regulador negativo de la tolerancia a salinidad en raíz

El siguiente objetivo a abordar era comprobar el papel del gen en raíz. En base a los resultados previos obtenidos con el mutante, se pretendía comprobar si la anulación del gen *CBL10* en raíz induce tolerancia al genotipo parte aérea al mejorar la homeostasis de Na^+ y K^+ en condiciones de salinidad. Para ello, se utilizan plantas injertadas con genotipos de cultivares comerciales como parte aérea, y líneas que tienen silenciado el gen *SICBL10* como portainjertos. El interés es evidente, ya que podría ser una estrategia válida para mejorar la tolerancia a la salinidad del genotipo parte aérea.

3.3.1. La pérdida de función de *SICBL10* confiere tolerancia a la sal cuando es utilizado como portainjerto mientras que la sobreexpresión induce sensibilidad

En un primer experimento de injertos recíprocos con plantas mutantes WT y *Slcbl10*, el fenotipo de la parte aérea WT injertado en el portainjertos mutante *Slcbl10* (WT/*Slcbl10*)

fue bastante similar al de las plantas WT autoinjertadas (WT/WT) tras 5 DST (150 mM de NaCl); de hecho, la hoja completamente desarrollada de las plantas WT/*Slcb110* mostró síntomas de clorosis menos severos en comparación con las plantas WT autoinjertadas (**Figura 27a**). Sin embargo, las plantas *Slcb110/Slcb110* y *Slcb110*/WT mostraron fenotipos de hipersensibilidad a la sal, similares a los observados previamente en el mutante *Slcb110* (Egea et al., 2018), con hojas hinchadas y curvadas, clorosis en los bordes de los folíolos y colapso apical (**Figura 27a**). Se observó claramente el diferente grado de tolerancia a la sal de las combinaciones injertadas en base al crecimiento de la planta, con una reducción de la biomasa de raíces y brotes de casi un 50 % en plantas que presentaban el mutante *Slcb110* como parte aérea, mientras que la biomasa de plantas WT/*Slcb110* fue similar a la de las plantas WT/WT (**Figura 27b**).

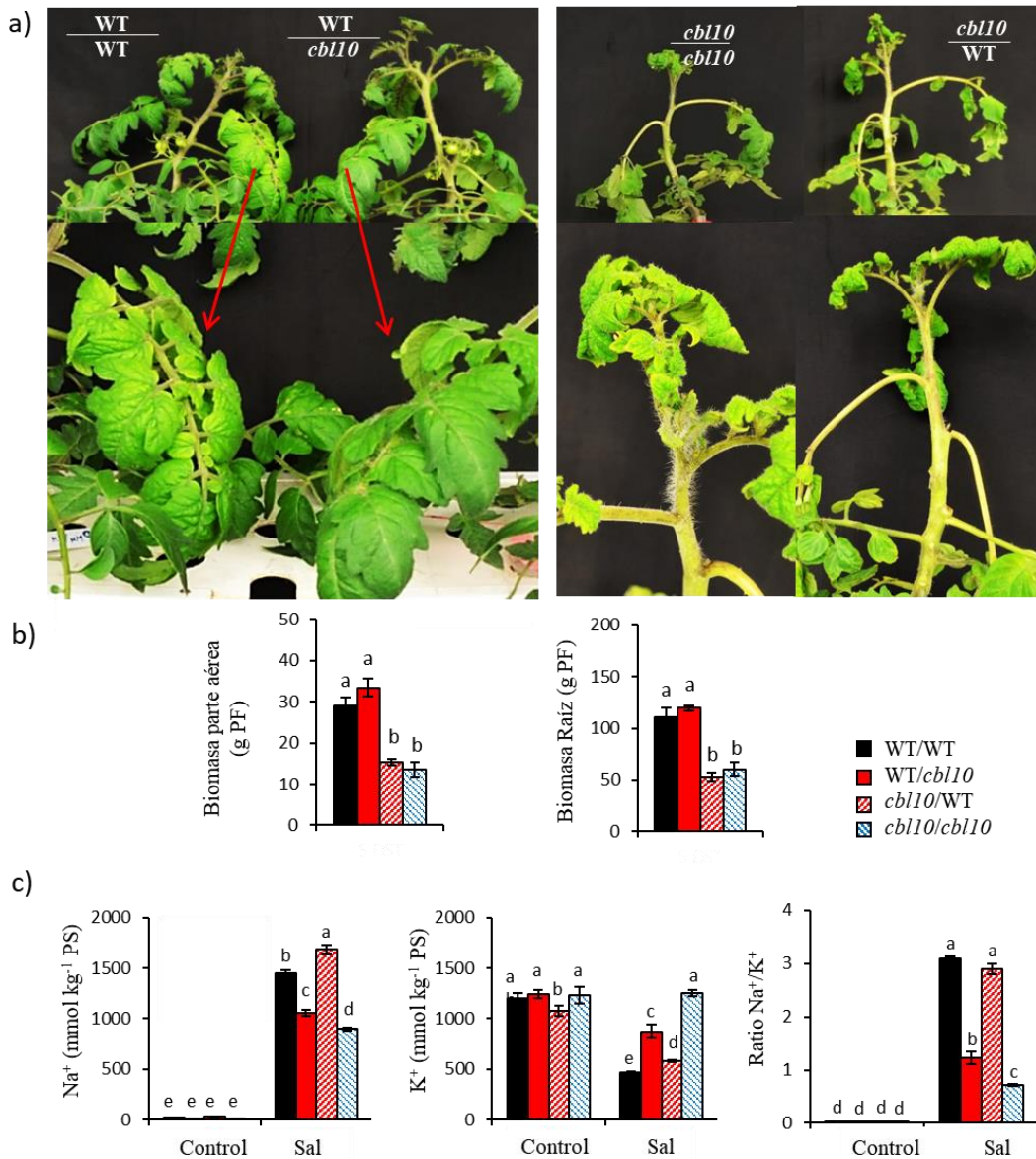


Figura 27. La sensibilidad a la sal de las plantas injertadas solo se observa cuando el mutante *Slcb110* se usa como parte aérea pero no como portainjertos. Las plantas injertadas de 5/6 hojas completamente desarrolladas se trataron con 150 mM de NaCl en sistema hidropónico durante 5 días (DST). a) Fotografías de plantas WT y *Slcb110* autoinjertadas (WT/WT y *Slcb110/Slcb110*) y plantas injertadas recíprocamente

(WT/*Slcb110* y *Slcb110*/WT) tras 5 DST. b) Peso fresco (PF) de raíces y parte aérea de plantas injertadas tras 5 DST. c) Concentraciones de Na⁺, K⁺ y relación Na⁺/K⁺ en la raíz de plantas de diferentes combinaciones de injertos a 0 (control) y tras 5 DST (sal). Los valores se expresan como media ± EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias según la prueba de Tukey (p < 0,05).

Los contenidos de Na⁺ y K⁺ se analizaron en raíces de plantas injertadas antes de aplicar el estrés salino (control) y al final del experimento (sal). Los injertos con raíz *Slcb110* mostraron una reducción significativa de los contenidos de Na⁺ y un aumento significativo de los de K⁺ con respecto a las plantas WT/WT (**Figura 27c**). Estos cambios indujeron reducciones significativas en el ratio Na⁺/K⁺.

Con el fin de indagar más a fondo en la función específica del gen *SICBL10* en la raíz en la tolerancia a la sal del tomate, se llevó a cabo un nuevo experimento hidropónico de estrés salino durante 15 días en 150 mM de NaCl, comparando la respuesta a la sal de plantas WT autoinjertadas con plantas con parte aérea WT injertadas en raíz mutante *Slcb110* (WT/*Slcb110*), en la línea RNAi (WT/RNAi) como portainjerto con el gen silenciado, así como la línea OE (WT/OE) con el gen sobreexpresado. Los niveles de expresión de los diferentes portainjertos se muestran en la (**Figura 28**), donde se observa que en WT aumenta su expresión al doble tras 2 DST, que en el mutante no hay expresión ni en control ni en sal y que la línea OE presenta un nivel de expresión 150 veces superior que WT tanto en control como en sal.

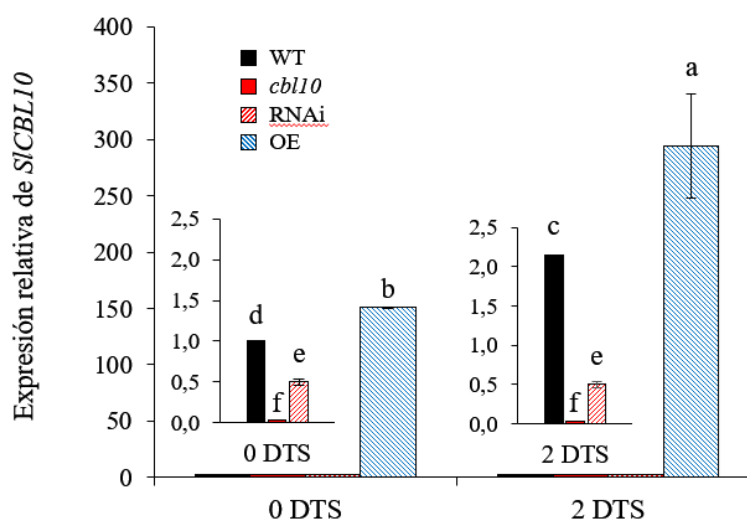


Figura 28. Expresión relativa del gen *SICBL10* en raíces de mutantes *Slcb110*, líneas RNAi y OE. Los valores son la media de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. El nivel de expresión hace referencia al nivel de expresión detectado en la raíz WT. Los valores se expresan como media ± EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05).

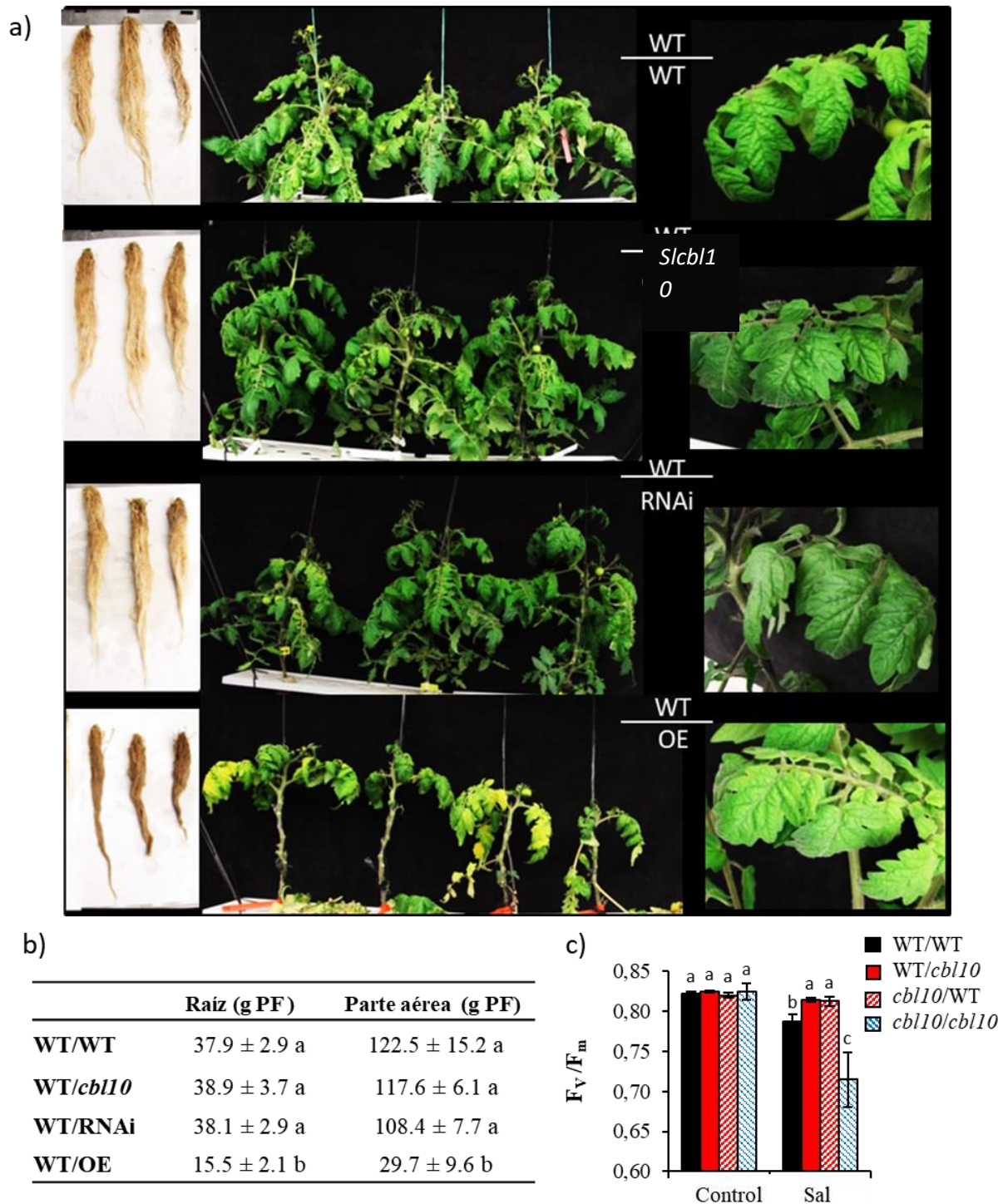
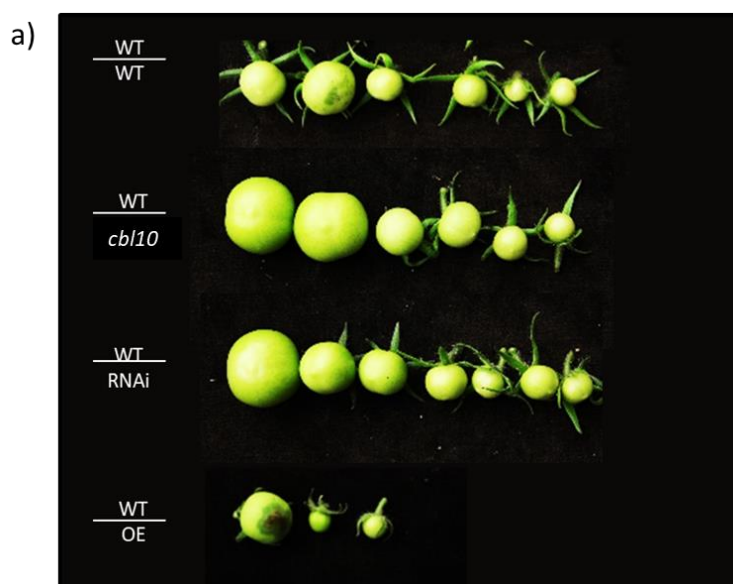


Figura 29. Las plantas injertadas no muestran sensibilidad a la sal cuando se utilizan líneas silenciadas *SICBL10* como portainjertos, mientras que se observa una alta sensibilidad a la sal cuando se sobreexpresa. Las plantas injertadas de 7/8 de hojas completamente desarrolladas se trataron con NaCl 150 mM en un sistema hidropónico durante 15 días (DST). a) Imágenes representativas de raíces, parte aérea completa y detalle de hojas (de izquierda a derecha) de diferentes combinaciones de injertos tras 15 DST. b) Biomasa de raíces y parte aérea de combinaciones de injertos tras 15 DST. c) Fluorescencia de clorofila foliar medida a 0 (Control) y tras 15 DST (Sal). Los valores se expresan como medias ± EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Al final del experimento, las hojas desarrolladas de las plantas WT/*Slcbl10* y WT/RNAi mostraron síntomas de clorosis menos severos en comparación con las plantas WT autoinjertadas (**Figura 29**). Por el contrario, las plantas WT/OE mostraron una sensibilidad a la sal extremadamente alta, con fuertes síntomas de clorosis en las hojas y la pérdida de casi todas las hojas basales, así como pardeamiento de las raíces. Los valores de biomasa vegetativa de las plantas WT/*Slcbl10* y WT/RNAi fueron similares a los de las plantas WT/WT (**Figura 29b**). Sin embargo, el injerto de WT como parte aérea en la línea OE originó una reducción significativa de la biomasa de raíces y, especialmente, de la parte aérea en sal, en comparación con las otras tres combinaciones injertadas (**Figura 29b**). De acuerdo con los síntomas de clorosis observados, la eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) fue mayor en las hojas de las plantas que presentaban parte aérea WT injertada en el mutante *Slcbl10* o en la línea RNAi, que en las hojas de las plantas WT autoinjertadas, mientras que el valor más bajo de este parámetro se encontró en hojas de plantas WT/OE (**Figura 29c**).



b)

	Rendimiento en fruto (g/planta)	Nº Frutos / planta	Peso frutos (g)
WT/WT	6.9 ± 0.5 b	2.52 ± 0.3 a	2.75 ± 0.1 b
WT/ <i>Slcbl10</i>	12.7 ± 2.5 a	1.99 ± 0.1 a	6.40 ± 0.2 a
WT/RNAi	12.4 ± 1.1 a	2.43 ± 0.2 a	5.11 ± 0.1 a
WT/OE	1.6 ± 0.3 c	0.79 ± 0.1 b	0.33 ± 0.01 c

Figura 30. La regulación a la baja del gen *SICBL10* en portainjertos aumentó la producción de frutos, mientras que se observó lo contrario cuando se sobreexpresó *SICBL10*. a) Imágenes representativas de frutos de diferentes combinaciones de injertos tras 15 DST a 150 mM de NaCl. b) Rendimiento de frutos, número de frutos por planta y promedio de peso de frutos de diferentes combinaciones de injertos tras 15 DST. Los valores se expresan como media ± EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Al final del experimento, las plantas habían desarrollado algunos frutos y se midió su biomasa (**Figura 30**). Se observó que el uso de portainjertos sin expresión del gen *SICBL10* (línea mutante *Slcbl10* y RNAi) parecía mejorar la biomasa reproductiva debido a un mayor peso del fruto, al contrario de lo observado cuando se utilizó como portainjerto la línea OE, donde se redujo tanto el número como el peso de los frutos. En conjunto, el fenotipo de hipersensibilidad a la sal aparece cuando la pérdida de la función del gen *SICBL10* ocurre en parte aérea, pero no en el portainjertos, mientras que la línea OE induce hipersensibilidad a la sal cuando se usa como portainjertos, lo que demuestra el diferente papel del gen *SICBL10* en parte aérea y raíz.

3.3.2. La modulación de la expresión de *SICBL10* en el portainjerto altera la homeostasis iónica de plantas injertadas y la expresión de los principales genes implicados en el transporte de Na^+ y K^+ .

Para conocer el efecto de la modulación de la expresión del gen *SICBL10* en portainjertos en la homeostasis iónica en plantas injertadas, se analizaron los contenidos de Na^+ y K^+ en los diferentes portainjertos utilizados (WT, mutante *Slcbl10*, línea RNAi y línea OE) y en parte aérea WT (tallo y hojas) de todas las combinaciones injertadas antes de aplicar el tratamiento con sal (condición control) y tras 15 DST (condición salina) (**Figura 31a**). Los contenidos de Na^+ en los portainjertos con el gen *SICBL10* silenciados (mutante *Slcbl10* y línea RNAi) fueron menores (alrededor del 50%) que en el portainjertos WT tras 15 DST; por el contrario, el portainjertos OE acumuló más Na^+ que el portainjertos WT. Respecto al K^+ , cabe destacar que su contenido fue mayor en los portainjertos con el gen *SICBL10* silenciado que en los WT en condiciones control, y se observó un incremento muy superior en estrés salino debido principalmente a la reducción de K^+ inducida por la salinidad en los portainjertos WT. Por el contrario, la salinidad redujo la concentración de K^+ del portainjerto OE hasta un valor cercano a cero, lo que podría explicar la alta sensibilidad a la sal de las plantas injertadas WT/OE. Otro rasgo fisiológico relacionado con la tolerancia a la sal es la relación Na^+/K^+ y el portainjerto OE aumentó su valor 10 veces respecto al WT.

Para saber cómo la modulación de la expresión del gen *SICBL10* en portainjertos alteraba la homeostasis de Na^+ en parte aérea WT, se analizó el contenido de iones tanto en el tallo como en la hoja de WT (**Figura 31b**). Aunque en menor grado que los cambios observados en los portainjertos, los cambios de Na^+ fueron similares en parte aérea WT, ya que el contenido de Na^+ se redujo significativamente tanto en el tallo como en la hoja de las plantas injertadas cuando se utilizó como portainjerto el mutante *Slcbl10* o la línea RNAi, en comparación con WT, y la respuesta opuesta cuando se utilizó la línea OE como portainjertos. Para K^+ , los cambios en parte aérea mostraron la misma tendencia que los observados en portainjertos solo en condiciones de sal, pero no en el control, donde los contenidos de K^+ en tallo y hoja de la parte aérea WT fueron similares en todos los casos. Curiosamente, los valores del ratio Na^+/K^+ se redujeron significativamente en parte aérea WT, tanto en el tallo como en la hoja, cuando se utilizaron portainjertos con el gen *SICBL10* silenciado, lo que parece estar asociado con la mayor tolerancia a la sal inducida

por la mutación o silenciamiento del gen. Esto concuerda con el mayor ratio Na^+/K^+ observado en parte aérea WT injertada en portainjertos OE y la alta sensibilidad a la sal de esta combinación.

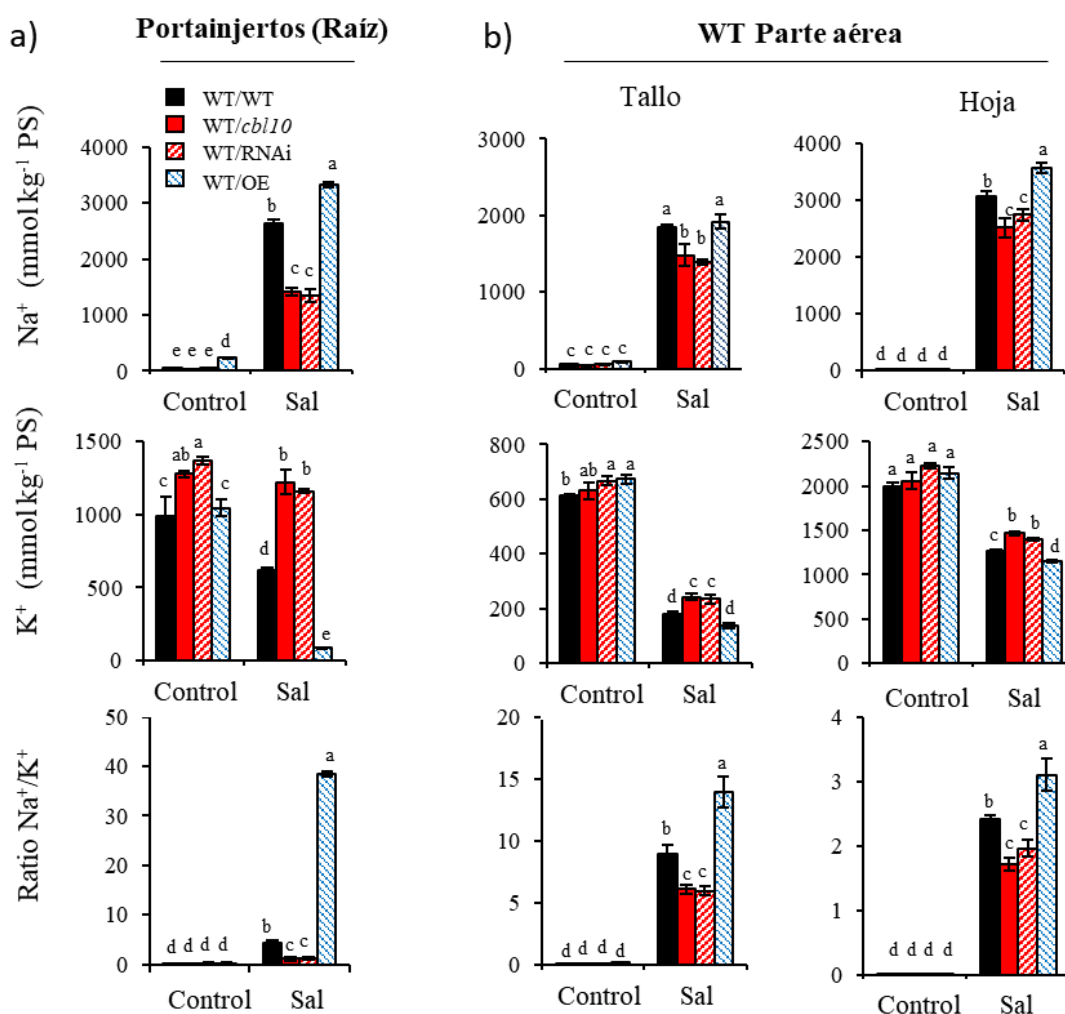


Figura 31. La regulación a la baja del gen *SICBL10* en el portainjertos redujo el contenido de Na^+ y aumentó el contenido de K^+ en las plantas injertadas, mientras que la sobreexpresión de *SICBL10* mostró la respuesta opuesta. Se midió Na^+ , K^+ y la relación Na^+/K^+ en diferentes portainjertos a), WT, mutante *Slcbl10*, línea RNAi y línea OE, y en parte aérea WT (b) de diferentes combinaciones injertadas a 0 (control) y tras 15 DTS (Sal). Los valores son medias \pm EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Los niveles de transcritos de genes responsables de la captación de Na^+ y su transporte a larga distancia en tomate, *SISOS1* y *SIHKT1,2*, junto con los genes implicados en la acumulación de Na^+ en la vacuola, *LeNHX3* y *LeNHX4* (Egea et al., 2018) se analizaron en los portainjertos antes de aplicar la sal (control) y tras 2 DST (sal), tiempo de tratamiento con sal donde los cambios en la expresión génica se han relacionado adecuadamente con la acumulación de Na^+ posteriormente (Albaladejo et al., 2017). Los cambios de expresión inducidos por la salinidad fueron opuestos en los portainjertos del mutante *Slcbl10* y la línea OE, al aumentar *SISOS1* y disminuir *SIHKT1,2* en el

portainjertos *Slcbl10* con respecto a WT, contrario a los cambios observados en el portainjerto OE (**Figura 32a**). Con respecto a los genes vacuolares, los cambios observados en *LeNHX3* fueron bastante similares a los observados para *SIHKT1,2*, con una expresión reducida y aumentada del gen *LeNHX3* en los portainjertos *Slcbl10* y línea OE, respectivamente, mientras que para *LeNHX4* no se encontraron cambios significativos (**Figura 32a**).

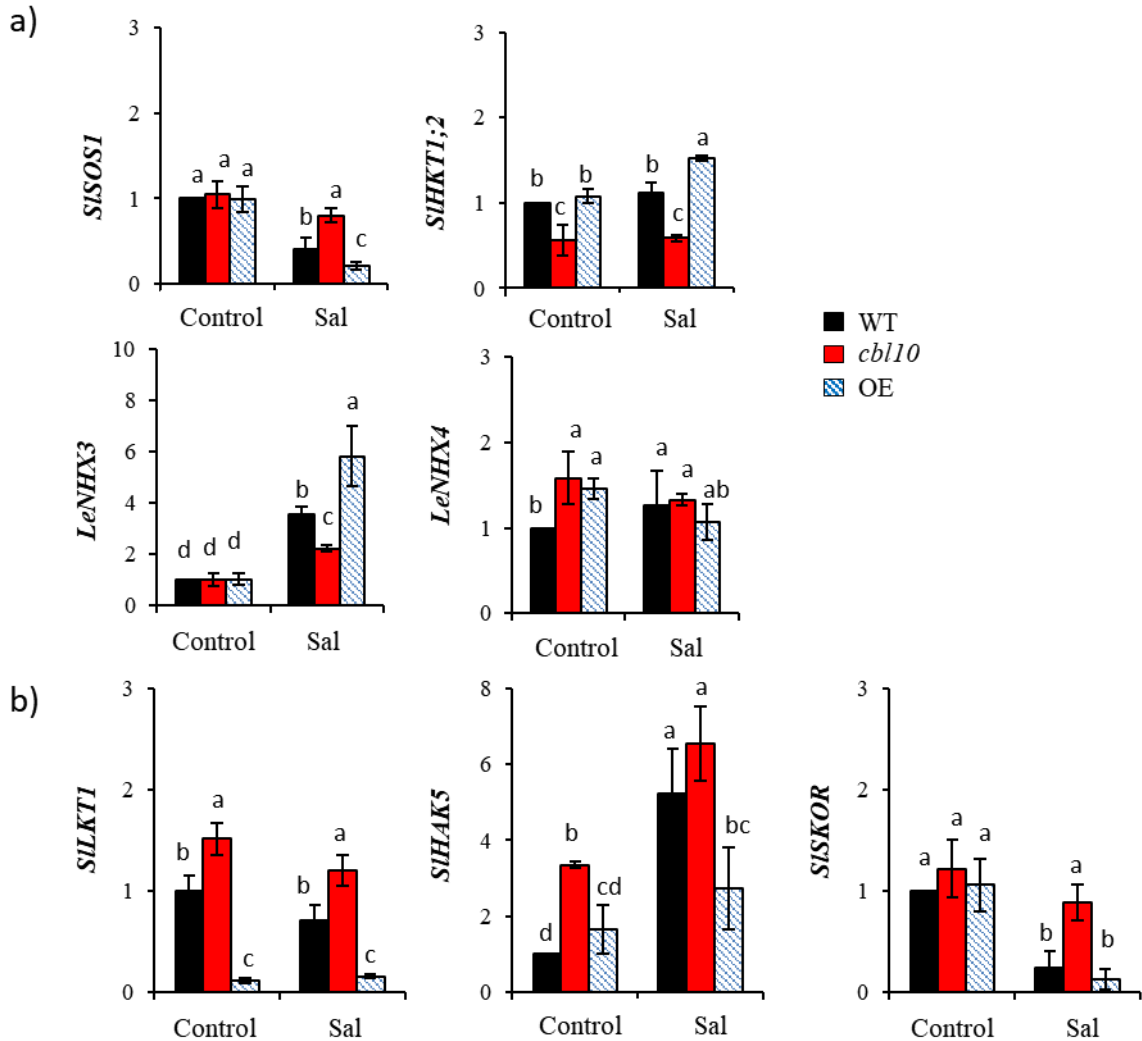


Figura 32. Cambios inducidos en el patrón de expresión de genes clave implicados en la homeostasis de Na⁺ y K⁺ cuando se utilizaron portainjertos que silenciaban y sobreexpresaban el gen *SICBL10*. La expresión se analizó en raíces de WT, mutante *Slcbl10* y línea OE a 0 (Control) y tras 2 días a 150 mM de NaCl (Sal). a) Genes implicados en la homeostasis del Na⁺. b) Genes implicados en la homeostasis del K⁺. Para cada gen, los valores son la media ± EE de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. El nivel de expresión hace referencia al nivel de expresión detectado en la raíz WT. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05).

Los niveles de expresión de *SIHAK5* y *LKT1*, los principales genes responsables de la absorción de K⁺ en las raíces (Amo et al., 2021), también se analizaron en los portainjertos de plantas injertadas (**Figura 32b**). Curiosamente, el portainjerto *Slcbl10* incrementó la expresión de *SIHAK5* y *LKT1* en el control, respecto a WT, y este aumento se mantuvo

para *LKT1* tras 2 DST, mientras que en el portainjerto OE se observó el comportamiento contrario. Con respecto al canal *SISKOR*, implicado en la carga xilemática de K^+ (Nieves-Cordones et al., 2016), es muy significativo el nivel de expresión que se mantiene en el portainjerto *Slcb110* bajo salinidad, mientras que tanto los portainjertos WT como los OE redujeron casi a cero el nivel de expresión de este canal (**Figura 32b**).

Teniendo en cuenta que los mayores cambios inducidos por los portainjertos en la acumulación de iones en parte aérea WT se observaron para Na^+ , se analizó en hojas de WT la expresión de genes involucrados en la homeostasis de Na^+ (**Figura 33**). No se detectaron cambios significativos de expresión en los dos genes implicados en la distribución de Na^+ en las hojas (*SISOS1* y *SIHKT1;2*). Los únicos cambios significativos se encontraron en el aumento de la expresión de dos genes vacuolares *LeNHX3* y *LeNHX4* en las hojas de WT injertadas en la línea OE, lo que puede ser consecuencia del alto Na^+ transportado por este portainjerto hasta las hojas de WT. En conjunto, la mayor tolerancia a la sal inducida por el silenciamiento de los portainjertos *SICBL10* al genotipo de parte aérea no solo se relaciona con la mejora de la homeostasis del Na^+ sino también con la homeostasis del K^+ , que se asocia principalmente con la expresión aumentada del gen *LKT1*.

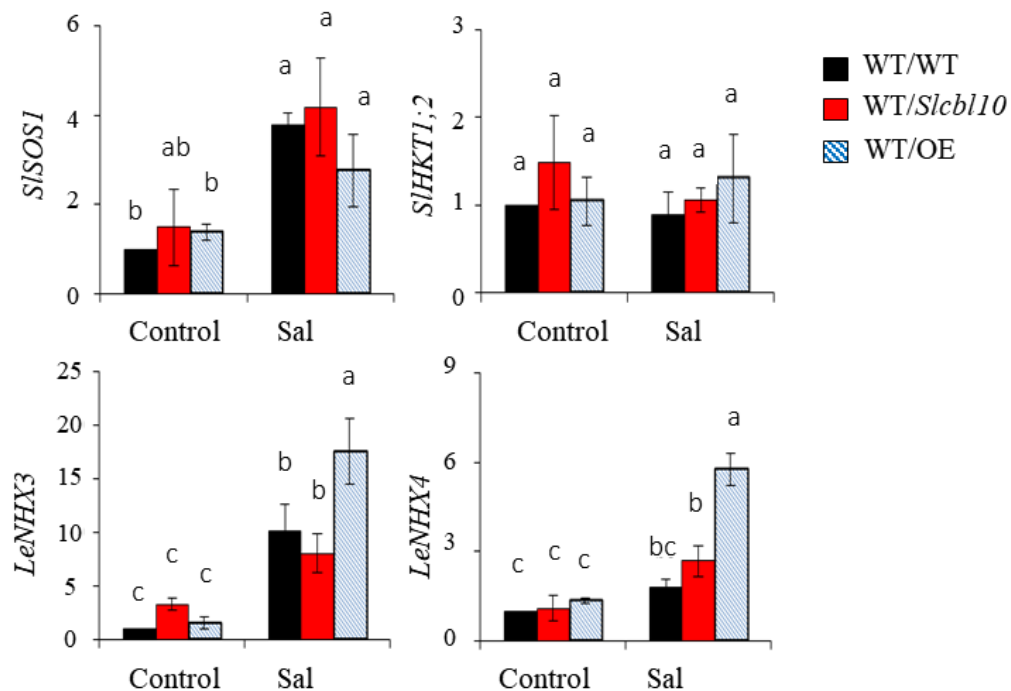


Figura 33. Cambios inducidos en los niveles de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na^+ en hojas de plantas WT autoinjertadas y WT injertadas en mutante *Slcb110* y línea OE a 0 (Control) y tras 2 DST (150 mM de NaCl). Para cada gen, los valores son la media de tres réplicas biológicas de tres plantas cada una. El nivel de expresión hace referencia al nivel de expresión \pm EE detectado en la raíz WT. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.3. SICBL10 interactúa directamente con el canal LKT1

Debido a la drástica disminución del contenido de K^+ y la reducción de la expresión del gen *LKT1* en la raíz de las plantas injertadas utilizando líneas OE como portainjertos, se propuso la hipótesis de que la función de *SICBL10* en la raíz estaba involucrada en la regulación negativa de la absorción de K^+ por la interacción directa con el canal *LKT1*. Para investigar si CBL10 interactúa directamente con LKT1 y regula la captación de K^+ mediada por LKT1, el grupo de la UAL analizó la localización subcelular de SICBL10 y LKT1 mediante la expresión transitoria de versiones de *SICBL10* (GFP::*SICBL10*) marcadas con proteínas de fluorescencia verde N-terminal (GFP) y *LKT1* (GFP::*LKT1*) en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 34a). La fluorescencia de la proteína de fusión GFP::*SICBL10* se localizó alrededor del tonoplasto y los orgánulos celulares como el núcleo y el cloroplasto (Figura 34b), lo que sugiere una localización en el citoplasma.

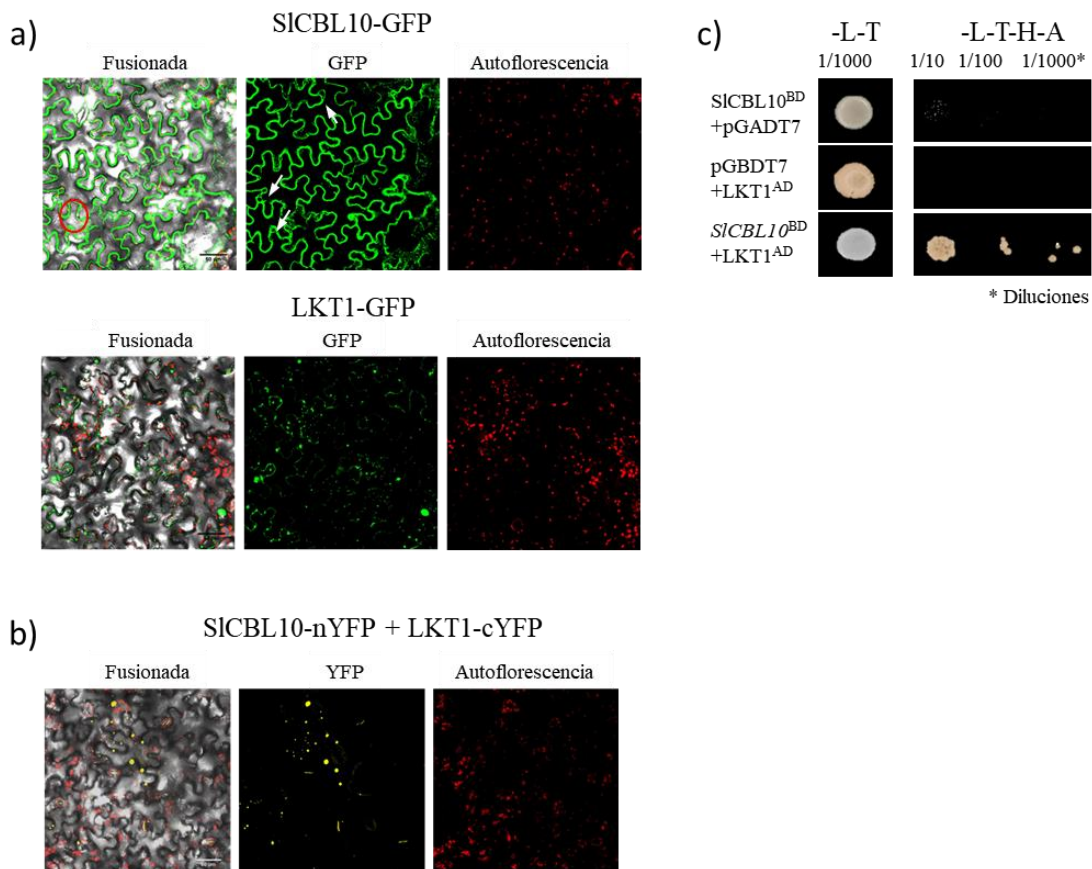


Figura 34. SICBL10 interactúa *in vitro* e *in vivo* con LKT1. a) Localización subcelular de las proteínas SICBL10 y LKT1. Las secuencias codificantes de SICBL10 y LKT1 completas se fusionaron en el extremo N con la proteína de fluorescencia verde (GFP) y se expresaron transitoriamente en hojas de *Nicotiana benthamiana*. b) Ensayos de dobles híbridos de levadura de las proteínas SICBL10 y LKT1. AD, dominio de activación como presa; BD, dominio de unión a ADN como cebo. Las células se cultivaron en -L-T, medio no selectivo menos Leu y Trp, y -L-T-H-A, medio selectivo menos Leu, Trp, His y Ade a diferentes diluciones. c) Imágenes confocales de complementación de fluorescencia bimolecular que muestran la interacción *in vivo* de SICBL10 y LKT1 en planta en dos localizaciones subcelulares diferentes. Se detectó fluorescencia de YFP nuclear en hojas de *N. benthamiana* que expresaban SICBL10 fusionado con la región N-terminal (nYFP) de la proteína de fluorescencia amarilla (YFP) y LKT1 fusionado con la región C-terminal de YFP (cYFP). En los paneles a) y c) el color rojo muestra la autofluorescencia de los cloroplastos y las barras de escala = 50 μm.

La posible interacción proteica entre *LKT1* y *SICBL10* se analizó en primer lugar mediante el ensayo de doble híbrido de levadura (Y2H) utilizando *SICBL10* como cebo (*SICBL10BD*) y *LKT* como presa (*LKTAD*). Los resultados de Y2H mostraron un crecimiento prototrófico de las cepas de levadura cotransformadas *SICBL10BD* y *LKTAD* en placas sin histidina, leucina, triptófano y adenina (**Figura 34b**), lo que indica que *CBL10* interactúa directamente con *LKT1* en la levadura. Para investigar la interacción entre *SICBL10* y *LKT1* en células vegetales vivas, se realizó un ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) coexpresando en hojas de *N. benthamiana* la región N-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP) fusionada con *SICBL10* (*SICBL10-nYFP*) y la región C-terminal de YFP fusionada con *LKT1* (*LKT1-cYFP*). La fluorescencia de YFP originada por la interacción de las proteínas recombinantes etiquetadas por fusión, *SICBL10-nYFP* y *LKT1-cYFP*, se localizó en estructuras punteadas de rápido movimiento en el compartimento citoplásmico de las células (**Figura 34c**), similar a la observada para GFP::*LKT1*. Los resultados demostraron que *SICBL10* puede interactuar directamente con *LKT1* tanto *in vivo* como *in vitro*.

3.3.4. El silenciamiento de *SICBL10* en el portainjerto mejora el rendimiento en fruto de plantas injertadas bajo estrés salino

Finalmente, para corroborar si la pérdida de la función *SICBL10* en las raíces mejora la tolerancia a la sal en términos de rendimiento de frutos, se realizó un ensayo a largo plazo en un invernadero de condiciones no controladas (NC) en la temporada de primavera-verano. WT, mutante *Slcbl10* y plantas de línea RNAi y plantas WT/*Slcbl10* y WT/RNAi injertadas se cultivaron sin sal (control) y con 100 mM de NaCl (sal) durante 80 días. A lo largo del experimento, el valor medio de la temperatura máxima diaria fue de 40,2°C antes de la cosecha de frutos, alcanzando los 45,7°C durante el período de cosecha. Además, el tiempo de exposición diario medio a una temperatura superior a 40 °C fue de 5,8 h (**Figura 35a**). En ausencia de estrés salino, los rendimientos de frutos del mutante *Slcbl10* y las plantas de la línea RNAi se redujeron con respecto a WT, tanto para frutos rojos como verdes, pero no en plantas injertadas en portainjertos *Slcbl10* y RNAi (**Figura 36a**). Bajo estrés salino, los efectos negativos en los rendimientos de frutos del mutante *Slcbl10* y las plantas de la línea RNAi fueron mucho mayores, mientras que se observó un efecto positivo en las plantas WT/ *Slcbl10* y WT/RNAi, ya que los rendimientos de frutos fueron significativamente mayores en las plantas injertadas que en WT principalmente debido al aumento del número de frutos rojos (**Figura 36b**). En resumen, los rendimientos de frutos de las plantas WT/ *Slcbl10* y WT/RNAi fueron similares a los de WT sin sal, pero aumentaron en condiciones salinas, siendo el número de frutos el principal componente del rendimiento que contribuyó al aumento del rendimiento de frutos en plantas injertadas bajo estrés salino.

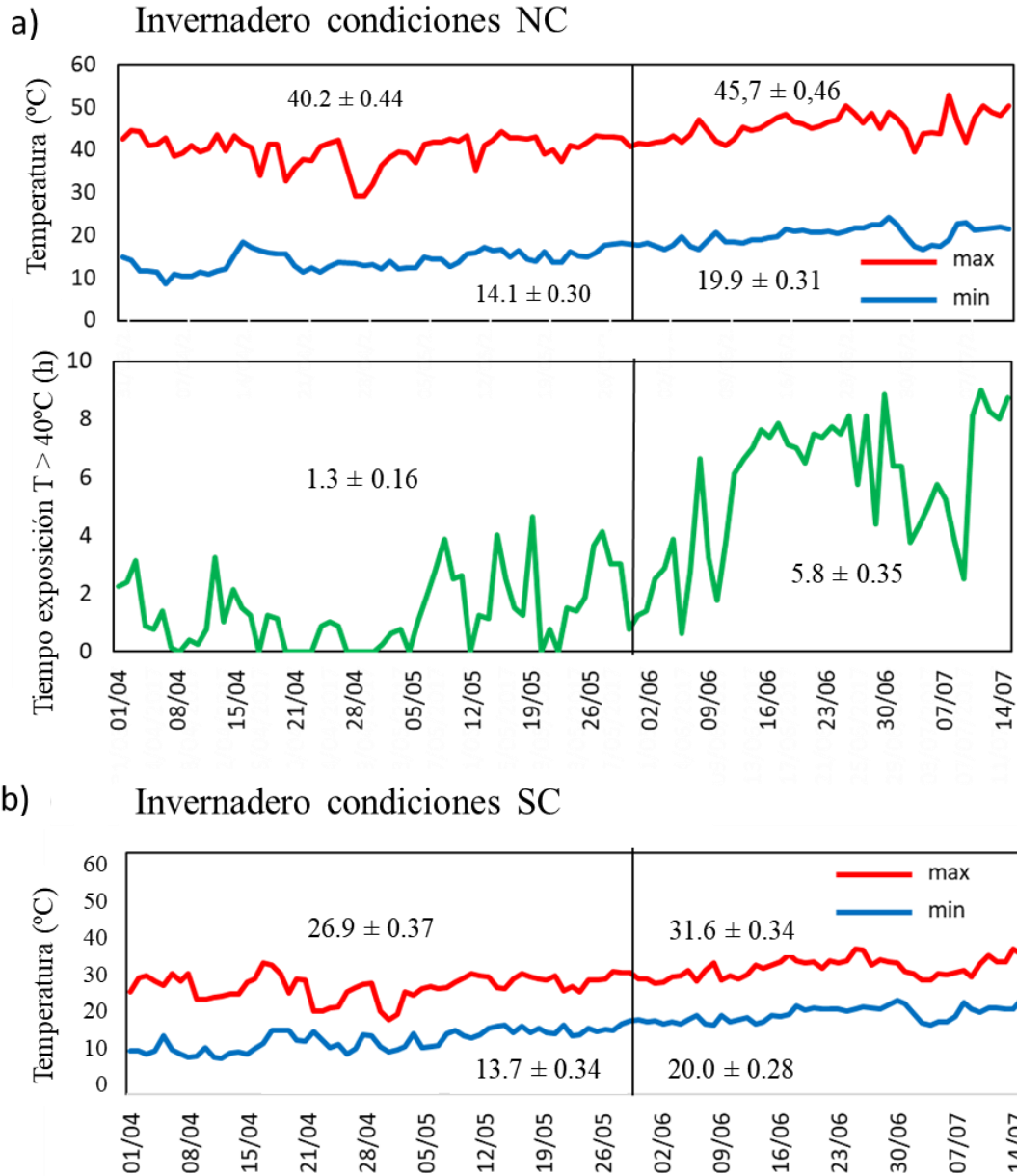


Figura 35. Temperaturas máximas y mínimas diarias en los experimentos de invernadero realizados en condiciones no controladas (NC) y semicontroladas (SC). Los valores medios se calcularon antes y durante el periodo de cosecha. También se muestra el tiempo de exposición (horas) a temperaturas > 40°C en el invernadero de condiciones climáticas no controladas.

El efecto positivo del portainjertos puede ser diferente según el genotipo de parte aérea y las condiciones de crecimiento (Martínez-Rodríguez et al., 2008). Por lo tanto, nos propusimos estudiar la respuesta agronómica de un híbrido de tomate comercial F1, cv. Jaguar (F1), injertado sobre el mutante *Slcbl10* (F1/*Slcbl10*), aplicando el mismo tratamiento de sal (100 mM de NaCl) y en la misma estación primavera-verano que en el experimento descrito anteriormente, pero utilizando dos invernaderos con diferentes condiciones climáticas. Uno de ellos era el mismo invernadero (NC) descrito anteriormente con temperaturas muy altas en la temporada de crecimiento, y el otro era

un invernadero con condiciones semicontroladas (SC), con temperaturas más amortiguadas (26,9 y 31,6°C antes y durante la cosecha) (Figura 33).

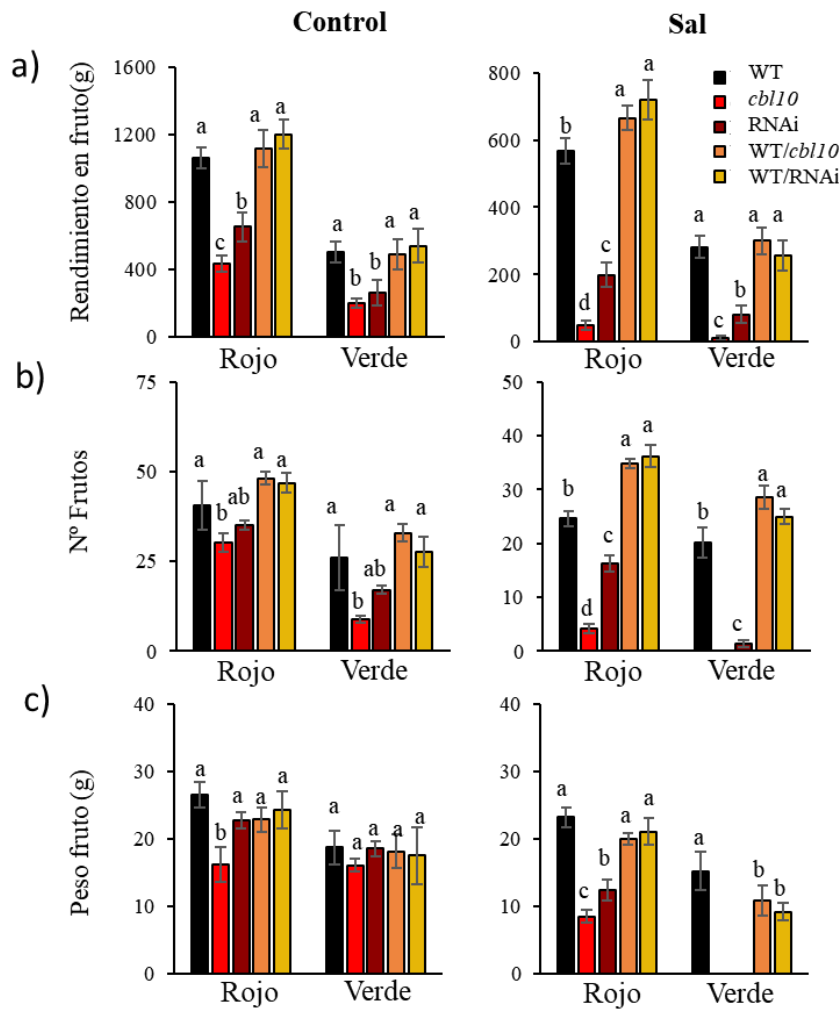


Figura 36. El injerto de plantas WT en portainjertos *Slcbl10* o RNAi mejoró el rendimiento de frutos con respecto a las plantas no injertadas. Se cultivaron plantas no injertadas WT, mutante *Slcbl10* y línea RNAi, y plantas injertadas de WT en portainjertos de la línea RNAi y mutante *Slcbl10* en ausencia de sal (Control) y en condiciones de estrés salino (100 mM de NaCl) durante 80 días (Sal) en condiciones No-Controladas (NC) de invernadero en temporada primavera-verano. a) Rendimiento de frutos rojos y verdes, b) número de frutos y c) peso medio de frutos. Los valores son medias \pm EE (n = 8). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Hubo diferencias entre el rendimiento de frutos de las plantas F1 en ambos invernaderos, ya que el rendimiento de frutos se redujo en un 25% en el invernadero NC con respecto al invernadero SC, mientras que las plantas injertadas F1/*Slcbl10* mantuvieron rendimientos de frutos similares en ambos invernaderos (Figura 37a,b). El principal componente responsable del efecto positivo inducido por el portainjertos *Slcbl10* en el rendimiento de fruto en condiciones SC fue el número de frutos, mientras que tanto el número como el peso de los frutos contribuyeron al aumento del rendimiento de frutos de F1/*Slcbl10* en condiciones NC. Además, los frutos de F1, pero no los de F1/*Slcbl10*, mostraron signos preliminares de BER bajo exposición a la sal (detalle en la Figura 37c,

asociado con un menor contenido de Ca^{2+} en estos frutos (**Figura 37d**). En resumen, los portainjertos con expresión del gen *SICBL10* silenciado pueden mejorar la tolerancia a la sal de las plantas de tomate en función del rendimiento del fruto. Además, el injerto alcanza sus máximos beneficios cuando las condiciones climáticas son más estresantes, como ocurre en la zona mediterránea para el cultivo de tomate de primavera-verano.

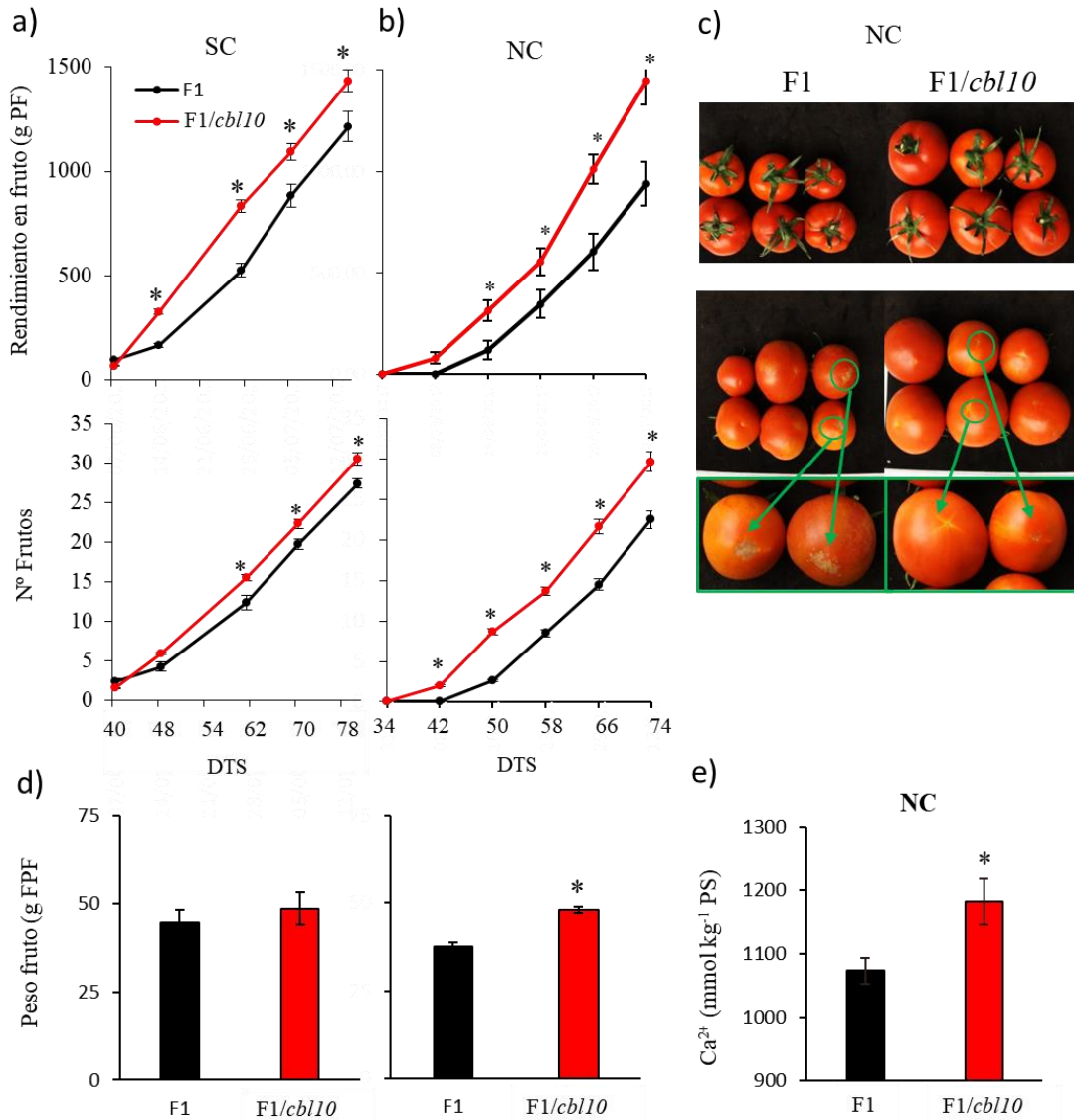


Figura 37. La tolerancia a la sal inducida por el portainjerto *SICBL10* en un híbrido comercial (F1) en términos de rendimiento de frutos es mayor en condiciones de cultivo más extremas. Las plantas injertadas F1 y F1/*Slcbl10* se cultivaron en condiciones de estrés salino (100 mM de NaCl) en dos invernaderos, uno con condiciones semi-controladas (a, SC) y otro con condiciones no controladas (b, NC) durante la temporada de primavera-verano, y se recolectó rendimiento y número de frutos en varias cosechas. El promedio de peso de frutos se calculó con la biomasa total de frutos. c) Imágenes representativas de frutos de plantas F1 y F1/*Slcbl10* en el invernadero NC, que muestran un mayor tamaño para frutos de plantas injertadas. En la fotografía inferior rodeado en color verde se muestra un detalle de los síntomas preliminares de BER en frutos de planta F1 pero no en frutos de plantas injertadas. d) Contenidos de Ca^{2+} en frutos de F1 y F1/*Slcbl10* en NC. Los valores se expresan como medias \pm EE (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el cultivar comercial no injertado (F1) y el F1 injertado sobre portainjerto mutante *Slcbl10* (prueba t de Student, $p < 0,05$)

3.4. Identificar el papel de *SICBL10* en la tolerancia del tomate a estrés por sequía y altas temperaturas

El estudio del papel de *CBL10* en la tolerancia del tomate a otros estreses abióticos, como sequía y estrés por temperatura, es de gran interés debido al desconocimiento existente al respecto. En este sentido, el gen *SICBL10* podría tener papeles opuestos para el estrés hídrico (EH) y el estrés por alta temperatura o estrés térmico (ET) debido a que las hojas mantienen los estomas abiertos durante el ET para el enfriamiento de las mismas, lo que estimula la transpiración, mientras que los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua por transpiración durante el EH, de manera similar al estrés salino. Otro aspecto interesante es como afecta la combinación de ambos estreses (ET + EH) a plantas que tienen alterada la expresión de *SICBL10*, ya que la respuesta de la planta puede ser mejor cuando se combinan ambos estreses que la obtenida a nivel individual o *viceversa*.

Para abordar este objetivo, se han cultivado plantas WT, del mutante *Slcbl10* y de la línea de OE en las siguientes condiciones:

1º) En el invernadero de condiciones semi-controladas (SC) donde las plantas se desarrollan en condiciones óptimas de cultivo y sin ET, ya que los valores máximos alcanzados eran próximos a 25°C durante los periodos vegetativo y reproductivo (**Figura 2**). Estas plantas representan las plantas control.

2º) En el invernadero de condiciones no-controladas (NC) donde las plantas sufren ET durante todo el periodo de cultivo, con valores de $37,2 \pm 5,9$ y $40,8 \pm 4^\circ\text{C}$ en los periodos vegetativo y reproductivo, respectivamente (**Figura 38**). Además, estas plantas se desarrollaban bajo dos condiciones de riego: con el 100% y 50% de la dosis de riego. Las primeras representan las plantas sometidas solo a ET y las segundas representan la combinación de ambos estreses: ET + EH.

La diferente respuesta debida al ET se observa al comparar los valores de rendimiento y número de frutos maduros (rojos), separados en sanos (frutos cosechables) y no sanos (con fisiopatías), de las plantas cultivadas en el invernadero SC (sin ET, control) y NC (ET). En el invernadero SC, el mutante *Slcbl10* reduce su rendimiento, como ya habíamos observado en ensayos anteriores, mientras que la línea de OE muestra una respuesta similar a WT tanto en frutos sanos como no-sanos (**Figura 38a**). En condiciones NC, los rendimientos de WT son menores que en condiciones SC, especialmente si se consideran los frutos sanos ya que aumenta el número de frutos no sanos (**Figura 38b**). El mutante también continúa reduciendo su rendimiento al pasar de condiciones SC a NC, pero la mayor reducción de rendimiento se observa en la línea de OE. Así, el rendimiento de frutos sanos de la línea OE se reduce un 60% respecto a WT en condiciones NC, mientras que no había diferencias entre WT y OE bajo condiciones SC. Además, el fenotipo de las plantas de la línea de OE se ve mas afectado en NC que en SC, donde las mayores diferencias se deben a la T (**Figura 38c**). Estos resultados indican que la línea de OE es sensible al estrés por alta temperatura.

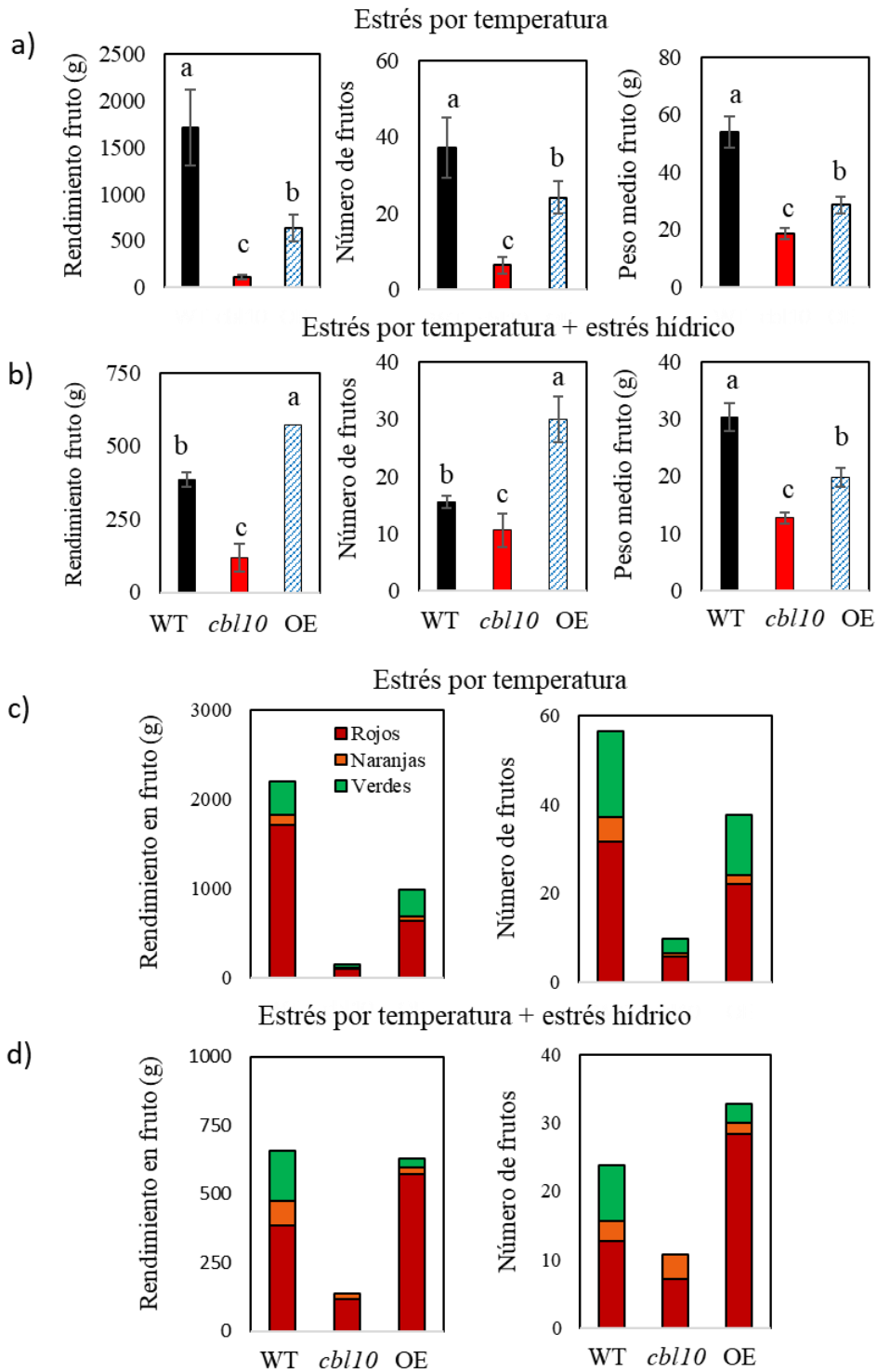


Figura 39. La sobreexpresión del gen *SICBL10* reduce el rendimiento bajo estrés por alta temperatura (ET) y aumenta con la combinación de ET y estrés hídrico. Plantas del cv. de tomate (WT), del mutante *Slcbl10* y de una línea que tiene sobreexpresado (OE) el gen *SICBL10*, desarrolladas en el invernadero de condiciones no-controladas durante primavera-verano, eran regadas con niveles óptimos y con un 50% de reducción de riego (estrés hídrico). Producción de frutos maduros (rojos y sin fisiopatías) durante 100 días de estrés en condiciones óptimas de riego (a) y con riego reducido (b). Distribución de frutos a los diferentes estados de maduración (c, d). Valores medios \pm ES (n = 9). Diferentes letras indican diferencias significativas entre medias (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Para comparar los cambios inducidos por EH se presentan los valores de rendimiento en fruto y sus componentes, número y peso medio de los frutos, de las plantas desarrolladas en el invernadero NC (**Figura 39**), donde las plantas se ven sometidas a la combinación de ET + EH debido a las altas temperaturas alcanzadas en el invernadero NC (**ver Figura 2**). Los mayores cambios inducidos por EH nuevamente se observan en la línea de OE, incrementando significativamente su rendimiento en fruto respecto a WT debido al mayor número de frutos en condiciones de EH (**Figura 39b**), lo que sugiere que la línea OE es más tolerante que WT al EH. Efectivamente, al comparar los valores de ET y ET + EH, la línea OE mantiene un rendimiento similar en ambos casos, contrariamente a la respuesta de WT donde se alcanza una reducción del 75% cuando el EH se combina con el ET (**Figura 39a,b**). Finalmente, es interesante resaltar que estos cambios en la respuesta de las plantas por estrés no son debidos a un retraso en la maduración, tal como se observa en la distribución de frutos en diferentes estados de maduración (**Figura 39c**). Así, la línea OE mantiene la reducción del número de frutos en ET y el incremento en ET + EH, respecto a WT, al considerar los frutos de diferentes estados de maduración. Estos resultados demuestran por primera vez que la sobreexpresión del gen *SlCBL10* induce sensibilidad al estrés por altas temperaturas pero no hay un efecto aditivo en la combinación ET + EH, mientras que WT es mucho menos sensible al ET y muy sensible a la combinación de estreses.

Un carácter fisiológico clave en la respuesta de las plantas a los estreses térmico e hídrico es la capacidad para mantener la absorción y transporte de agua desde la raíz hasta las hojas. En este estudio, se analizaron los contenidos de agua en los diferentes experimentos, condiciones SC como control y NC como ET y ET + EH. En control, se observa que el mutante y la línea de OE muestran tendencias opuestas, pues la línea OE aumenta su contenido de agua en raíz respecto a WT, mientras que el mutante tiende a aumentarlo en parte aérea y lo reduce en raíz (**Figura 40a**). En el invernadero de condiciones NC (solo ET, sin EH), los contenidos de agua son menores que en el SC pero las tendencias se mantienen, es decir el mutante aumenta en parte aérea y la línea OE en raíz, respecto a WT (**Figura 40b**). Bajo EH, las diferencias entre WT y mutante o línea de OE prácticamente desaparecen, pues solo se mantiene un mayor contenido de agua en tallo joven del mutante *Slcbl10* (**Figura 40c**). Se puede concluir que el alto grado de estrés por altas temperaturas del invernadero NC no provoca una mayor retención de agua como se podría esperar de la transpiración derivada de una mayor apertura estomática para el enfriamiento de las hojas, sino que ocurre lo contrario ya que los contenidos de agua son menores en todas las partes de la planta analizadas. Además, estos son bastante similares a los encontrados en las plantas sometidas a ambos estreses, ET + EH; lo que sugiere que la combinación de ambos estreses mejora la homeostasis hídrica evitando al menos parcialmente la deshidratación.

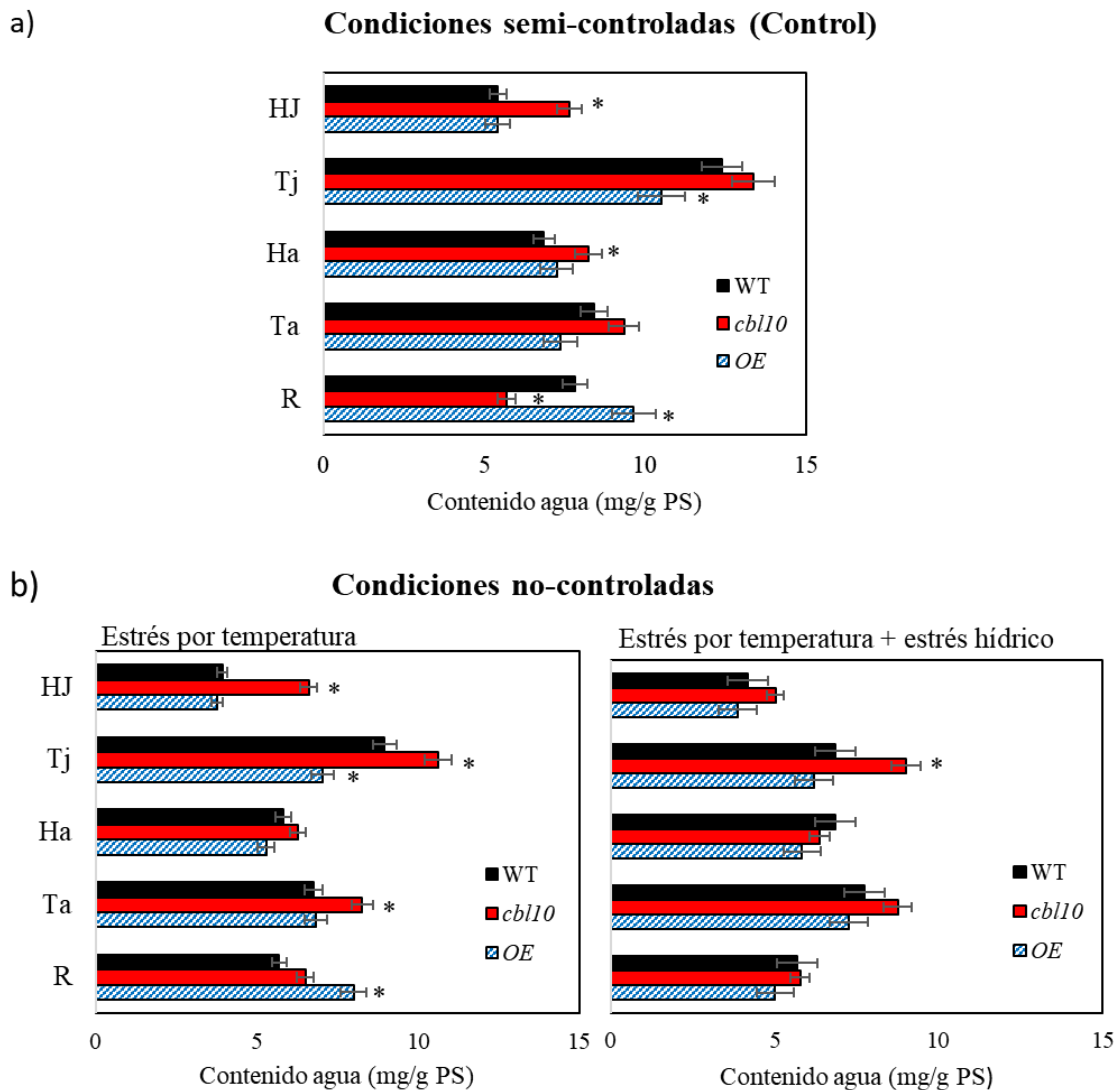


Figura 40. Cambios en los contenidos de agua inducidos por la expresión del gen *SICBL10*. Plantas del cv. de tomate (WT), del mutante *Slcbl10* y de la línea de sobreexpresión (OE) del gen *SICBL10* eran desarrolladas en invernadero de condiciones semi-controladas (a, control) y en el invernadero de condiciones no-controladas (NC) con estrés por alta temperatura bajo niveles óptimos de riego (b) y con una reducción del 50% durante 80 días (c). Contenidos de agua eran analizados en raíz, hoja y tallo adultos (a la mitad de la planta) y hoja y tallo superiores (2ª hoja desarrollada). Valores son las medias \pm EE de tres repeticiones. Asteriscos indican diferencias significativas respecto a WT (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

4. Discusión

4.1. El gen *SICBL10* es importante en el desarrollo reproductivo

Resultados previos mostraban una reducción del rendimiento en fruto del mutante *Slcbl10* cuando las plantas se desarrollaron en condiciones óptimas de cultivo (Egea et al., 2018). El papel del gen *CBL10* en el desarrollo reproductivo ha sido estudiado en *Arabidopsis* cuando las plantas eran sometidas a estrés salino (Monihan et al., 2016), pero no hemos encontrado referencias en la bibliografía sobre el papel de este gen en el desarrollo

reproductivo de tomate, ni cuando las plantas se desarrollan sin estrés ni cuando son sometidas a otro tipo de estrés.

El descubrimiento clave acerca del papel del gen *SICBL10* de tomate fue su implicación en la distribución de Ca^{2+} entre órganos (Egea et al., 2018). El Ca^{2+} es esencial para el desarrollo ya que es un componente importante de la pared celular, de modo que la deficiencia de Ca^{2+} puede llegar a provocar retraso en el crecimiento de la planta, clorosis foliar marginal y alteraciones en el desarrollo de las hojas, tejidos necróticos y poca biomasa reproductiva y también puede llegar a ocurrir un colapso apical (Hocking et al., 2016). Nosotros observamos los diferentes síntomas de deficiencia de Ca^{2+} en el mutante *Slcbl10*, especialmente cuando las plantas se sometían a estrés salino, lo que corrobora que el mutante tiene alterada la distribución de Ca^{2+} en la planta (Egea et al., 2018). Pero las condiciones en las que se obtuvieron estos resultados eran realmente condiciones de estrés, incluso en la plantas desarrolladas sin sal como consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas dentro del invernadero de condiciones NC. Así, es conocida la sensibilidad del tomate a estrés por alta T durante el desarrollo reproductivo, ya que el rendimiento en fruto tiende a reducirse por encima de Ts superiores a 29°C (Almeida et al., 2021). Sin embargo, el desarrollo vegetativo es menos sensible a incrementos de T, como evidencian Lu et al. (2017), ya que se detectaban daños estructurales en el fotosistema II pasados los 38°C. Esto explica que solo se vea afectada la biomasa reproductiva y no la vegetativa en el mutante y la línea RNAi (**Figura 19**).

Para dilucidar el papel del gen en el desarrollo reproductivo, era necesario comprobar la respuesta de las plantas sin estar sometidas a estrés térmico. Los resultados obtenidos al cultivar las plantas en un invernadero de condiciones climáticas semi-controladas (SC), donde no se alcanzaba estrés por altas temperaturas, mostraron una respuesta similar a la observada en condiciones NC, alcanzándose altas reducciones en el rendimiento de frutos cosechables (rojos y sanos) en el mutante y RNAi, respecto a WT (**Figura 21**). Estos resultados sugieren que el gen *SICBL10* funciona en el desarrollo reproductivo independientemente de que las plantas estén sometidas a estrés salino.

Los mayores niveles de humedad del invernadero SC reducen el DPV (**Figura 20**) y por tanto la transpiración (K. Li et al., 2021), mientras que las altas temperaturas incrementan el DPV (Sadok et al., 2021), de modo que las plantas pueden utilizar estrategias diferentes dependiendo de las condiciones del invernadero. Recientemente, Fich et al. (2020) demostraban que la transpiración del fruto de tomate ocurre principalmente vía los poros transcuticulares asociados a tricomas. Por tanto, una menor tasa de transpiración del fruto en desarrollo resultará en menor influjo de la savia del xilema, reduciendo así el transporte de nutrientes minerales hacia el fruto como Ca^{2+} y pudiendo provocar mayor incidencia de BER en el fruto.

A nivel de planta, la reducción en la transpiración provoca mayores deficiencias de Ca^{2+} en los diferentes órganos sumidero u órganos en desarrollo, como ápices y frutos, dado que el transporte de Ca^{2+} se produce mayoritariamente vía xilema (Robertson, 2013;

Uozumi et al., 2012; Tonetto de Freitas et al., 2014). En este sentido, hay que tener en cuenta que la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} provocada por la anulación del gen *SICBL10* estaba relacionada con un transporte excesivo a la vacuola en las hojas adultas o desarrolladas, lo que provocaba un suministro insuficiente de Ca^{2+} a los sumideros, tejidos que necesitan este catión para su desarrollo, como son los frutos (Egea et al., 2018). Así, nuestro grupo observó que el mutante mostraba síntomas muy evidentes de deficiencia de Ca^{2+} cuando las plántulas se desarrollaban *in vitro* (condiciones no transpirantes) e incluso se producía la muerte de las plantas (Egea et al., 2018). En este estudio, los síntomas de deficiencia de Ca^{2+} son muy evidentes en el fenotipo de las plantas, apareciendo progresivamente a lo largo del cultivo la típica clorosis foliar y alteraciones en el desarrollo de las hojas que terminan necrosándose (**Figura 22**). Efectivamente, los niveles de Ca^{2+} incrementaban significativamente en la hoja fuente del mutante y RNAi, respecto a WT, mientras que la respuesta opuesta era observada en los órganos sumidero, tanto a nivel de desarrollo vegetativo como reproductivo (**Figura 23**).

En fruto, el síntoma clásico de deficiencia de Ca^{2+} es *Blossom End Rot* (BER) causado por el colapso de las paredes celulares (Topcu et al., 2022). Generalmente, los síntomas de BER aparecen externamente sobre la parte distal del pericarpo, pero después de la inducción de BER las áreas se expanden y se vuelven necróticas cubriendo una proporción del fruto y en algunos casos afecta al fruto entero. Los frutos de las plantas con el gen *SICBL10* silenciado mostraron los síntomas de BER antes de la maduración y afectaba no solo a la parte distal del pericarpo sino que estaba extendido por todo el fruto (**Figura 22**). Respecto a la relación entre la incidencia de BER y los niveles de Ca^{2+} , son numerosos los estudios que muestran que la concentración diferencial de Ca^{2+} entre la zona proximal y distal del fruto está correlacionada con la aparición del BER (Topcu et al., 2022 y referencias citadas). Sin embargo, otros estudios sugieren que la alteración en el patrón de distribución de Ca^{2+} dentro de la planta, así como en los diferentes compartimentos celulares (citoplasma, apoplasto, vacuola, etc) es una consecuencia y no puede ser la causa del BER (Rached et al., 2018; Matsumoto et al., 2021). Independientemente del mecanismo implicado en la incidencia de BER, se puede concluir que la alta incidencia de BER provocada por el silenciamiento del gen *SICBL10* está asociada a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} .

Considerados en conjunto, estos resultados son de gran interés por dos razones. Es la primera vez que se indica que el gen *SICBL10* de tomate funciona en el desarrollo reproductivo y se atribuye una función independiente del estrés salino. Además, se demuestra que la reducción de la producción provocada por el silenciamiento del gen puede ser al menos parcialmente debida a la deficiencia de Ca^{2+} . Finalmente, es destacable el interés de las líneas de silenciamiento del gen *SICBL10* para avanzar en el conocimiento sobre la incidencia de BER en tomate. En una reciente revisión, Topcu et al. (2022) señalaba que a pesar de la amplia investigación sobre BER en tomate y otras especies hortícolas, aún no se conocen los genes implicados en esta fisiopatía que causa importantes pérdidas económicas. Así, los estudios sobre las bases genéticas de BER llevados a cabo por Topcu et al. (2021) identificaban cinco loci en los cromosomas 3, 4

5, 8 y 11 de tomate, de modo que el clonaje de estos genes puede suponer importantes avances en la incidencia de esta importante fisiopatía en tomate. Si bien, futuros estudios con las líneas de silenciamiento de *SICBL10* podrían suponer importantes avances genéticos dirigidos a solucionar este problema en el cultivo de tomate.

4.2. La sobreexpresión del gen *SICBL10* aumenta el número de frutos en condiciones salinas

El mutante nulo del gen de tomate *SICBL10* era hipersensible a sal tanto a corto como a largo plazo, demostrando que este gen es importante en la respuesta a sal de tomate (Egea et al. (2018). Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad a la sal observada en la parte aérea del mutante, este mantenía menores niveles de Na^+ y menor relación Na^+/K^+ en condiciones de salinidad lo que generalmente está relacionado con la tolerancia a sal. Por tanto, una cuestión a resolver es si la sobreexpresión de *SICBL10* es una estrategia válida para aumentar la tolerancia del tomate a la salinidad y como se ve alterada la homeostasis iónica al aumentar el nivel de expresión de *SICBL10*.

El rendimiento en fruto generalmente se ve afectado de manera diferente según el nivel de estrés, siendo el peso medio del fruto la principal componente afectada a niveles bajos y moderados mientras que a niveles altos no solo se ve afectado el peso sino también el número de frutos (Cuartero et al., 2006). En nuestro estudio, el nivel de estrés es considerado alto para tomate (100 mM de NaCl), y se refleja en las reducciones significativas observadas en ambas componentes de rendimiento en las plantas WT desarrolladas en sal (**Figura 24**). Interesantemente, en la línea de OE no solo no se reduce el número de frutos con la salinidad, sino que se observa un incremento próximo al 40% respecto al control, pero más interesante aún es el aumento respecto al WT en las plantas desarrolladas en sal, siendo un 80% mayor en la línea de OE que en WT. Este resultado es de gran interés con vistas a utilizar líneas que sobreexpresen el gen *SICBL10*, ya que uno de los mayores problemas para el cultivo en condiciones salinas es la reducción del número de frutos.

Teniendo en cuenta las dos componentes de rendimiento, nº de frutos y peso medio, el aumento del nº de frutos en la línea de OE está asociado a una reducción del peso medio del fruto. La reducción del peso del fruto puede ser una consecuencia del coste energético provocado por el uso de metabolitos y nutrientes para recuperar la homeostasis en vez de ser utilizados para el desarrollo (Muñoz-Mayor et al., 2008). Es necesario tener en cuenta que el metabolismo de la planta debe modificarse para producir compuestos necesarios para enfrentarse al estrés y, por consiguiente, las plantas deben distribuir los asimilados entre diferentes funciones fisiológicas, de modo que el uso múltiple de recursos limitados puede provocar reducciones en el desarrollo (Munns et al., 2019). Precisamente, una de las estrategias para aumentar el peso medio del fruto es la abscisión de parte de ellos, como se ha demostrado con plantas de tomate donde se reducía el número de frutos por racimo, desde un fruto hasta dejar el racimo intacto (Ji et al., 2020). Futuros estudios con diferentes niveles de estrés permitirán dilucidar los procesos implicados en el tamaño y número de frutos que conllevan la expresión del gen *SICBL10*, incluyendo aquellos

implicados en la distribución de asimilados entre órganos fuente (hojas desarrolladas) y sumideros (flores y frutos).

A nivel fisiológico, la disrupción del gen *SICBL10* reduce la acumulación de Na^+ en parte aérea, y este carácter de exclusión está generalmente relacionado con la tolerancia a la salinidad en tomate. Por tanto, una cuestión interesante era comprobar el mecanismo de tolerancia a la salinidad inducido por la sobreexpresión. Al analizar el patrón de distribución de Na^+ a lo largo de la planta (**Figura 26**), se observa una muy elevada acumulación en la raíz de la línea de OE, muy superior a la encontrada en las diferentes partes analizadas en la parte aérea, lo que indica que su mecanismo es retener el Na^+ en raíz evitando un transporte masivo a la parte aérea. Esta misma respuesta se observa al considerar los valores de la relación Na^+/K^+ . Si tenemos en cuenta que la acumulación de Na^+ en parte aérea es mayor en la línea OE que en el mutante, contrariamente a la respuesta de tolerancia a salinidad, se puede concluir que la línea OE tiene un comportamiento “incluidor” de Na^+ descrito previamente en las especies silvestres tolerantes a la salinidad de tomate (Albaladejo et al., 2018). La ventaja de esta estrategia es que la utilización de este catión para llevar a cabo el ajuste osmótico es mucho menos costoso energéticamente que la síntesis de solutos orgánicos (Muñoz-Mayor et al., 2008). Sin embargo, es necesario tener en cuenta la capacidad limitada de las vacuolas para acumular el Na^+ y evitar niveles citotóxicos, de modo que una variedad tolerante puede utilizar una estrategia incluidora inicialmente pero al aumentar el periodo de tratamiento o los niveles de estrés salino puede reducir la velocidad de transporte llegando incluso a resultar en una estrategia excluidora a largo plazo, como se ha observado en el cv. Pera tolerante a salinidad (Estañ et al., 2005). En definitiva, el mecanismo “incluidor” o “excluidor” *per se* no define inequívocamente la tolerancia o sensibilidad a salinidad.

En tomate, se ha comprobado la importancia del patrón de distribución de Na^+ en la tolerancia a la salinidad, y ello ha sido posible gracias a que esta especie es un muy buen modelo para estudiar el transporte de Na^+ gracias a sus características fisiológicas y anatómicas (Cuartero et al., 2006; Egea et al. 2022). Olias et al. (2009) demostraron que el papel relevante del gen *SISOS1* en parte aérea estaba asociado a la distribución de Na^+ en la parte aérea, lo que no se ha podido observar en *Arabidopsis*. Así, a causa de que el Na^+ en exceso es especialmente dañino en las hojas jóvenes, el patrón debe ser diferente en hojas jóvenes (en desarrollo) y adultas (desarrolladas). Interesantemente, mientras que el patrón de distribución de Na^+ está alterado en el mutante mostrando los valores más altos en los órganos jóvenes de la parte aérea, la sobreexpresión del gen no provoca alteraciones en el patrón de distribución de Na^+ , donde la mayor acumulación es en raíz y la menor en la hoja joven (**Figura 26**).

Pero las importantes diferencias de acumulación de Na^+ en la raíz y transporte a la parte aérea están principalmente asociadas a los diferentes niveles de expresión de los genes que codifican transportadores de Na^+ . Considerados en conjunto, la tolerancia a la salinidad de la línea de OE está asociada a la capacidad para retener Na^+ en la raíz sin transportarlo a la parte aérea.

4.3. Líneas silenciadas del gen *SICBL10* pueden ser utilizadas como portainjertos para incrementar la producción bajo estrés salino

4.3.1. El gen *SICBL10* presenta distinta función en parte aérea y en raíz.

Con el estudio de plantas mutantes WT y *Slcbl10* injertadas recíprocamente en condiciones de estrés salino, se ha demostrado que el gen *SLCBL10* presenta diferente función en parte aérea y en raíz. El fenotipo de sensibilidad a la sal solo apareció cuando la pérdida de función de *SICBL10* ocurrió en parte aérea, pero no en el portainjertos (**Figura 27**). De hecho, las plantas injertadas *Slcbl10*/WT y *Slcbl10*/*Slcbl10* mostraron un fenotipo sensible a la sal casi idéntico al observado previamente en el mutante *Slcbl10* y la línea RNAi (Egea et al., 2018), con inhibición del crecimiento de parte aérea, clorosis en el borde de hojas jóvenes, y finalmente colapso apical. Sin embargo, las plantas injertadas sobre portainjertos silenciadores del gen *SICBL10* toleraron mejor el estrés salino a medio plazo, ya que exhibieron menos clorosis en las hojas (**Figura 27**). Por el contrario, cuando se sobreexpresó *SICBL10* en el portainjertos, se indujo una sensibilidad muy alta a la sal en las plantas injertadas WT, con una reducción significativa del crecimiento de brotes y raíces, clorosis fuerte, pardeamiento de raíces y menor producción de frutos (**Figuras 29, 30**). Estos resultados indican que *SICBL10* podría actuar como un regulador positivo de tolerancia a estrés salino en parte aérea de tomate, pero como un regulador negativo en la raíz.

4.3.2. La función del gen *SICBL10* en raíces bajo condiciones de estrés salino está relacionada con la absorción de K^+ y Na^+ y afecta la relación Na^+/K^+ en toda la planta de tomate

La capacidad de una planta para mantener una proporción baja de Na^+/K^+ citosólico ha sido mencionada reiteradamente como un determinante clave de la tolerancia a salinidad de la planta en diferentes cultivos, incluido el tomate (Egea et al., 2022). Precisamente, los portainjertos de la línea mutante *Slcbl10* y RNAi presentaron contenidos de Na^+ aproximadamente un 50% inferiores a los del portainjertos WT tras 15 DST, mientras que la respuesta opuesta se observó en el portainjertos OE, donde la concentración de Na^+ fue un 30% superior (**Figura 31**). También se detectaron cambios importantes para K^+ , ya que aumentó muy significativamente en los portainjertos silenciadores *SICBL10* y se redujo casi un 90% en el portainjertos OE. Estos resultados indican por primera vez que la función de *SICBL10* en raíces de tomate está relacionada con la homeostasis del K^+ . De acuerdo los resultados presentados en esta tesis, un estudio previo de deficiencia de K^+ mostró que la sobreexpresión (OE) de *AtCBL10* en plantas de *Arabidopsis* mostró un fenotipo más sensible, con menor acumulación de K^+ en líneas OE que en plantas de *Arabidopsis* (Ren et al., 2013). Por lo tanto, la capacidad de retención de K^+ de los portainjertos en los que la función del gen *SICBL10* está anulada o silenciada hace que su uso sea una estrategia interesante para mejorar la tolerancia a la sal en los cultivares de tomate.

4.3.3. La función de *SICBL10* en el portainjertos está coordinada con la función de los transportadores necesarios para lograr los equilibrios homeostáticos de Na^+/K^+ en la planta

Curiosamente, la diferente expresión de los genes de Na^+ y K^+ en los portainjertos explica, al menos parcialmente, el mecanismo que opera en la mejora de la homeostasis iónica. Por lo tanto, el carácter excluyente del portainjertos mutante *Slcbl10* parece deberse principalmente al gen *SISOS1*, ya que mostró una expresión de dicho gen dos veces superior que el portainjertos WT bajo estrés salino (**Figura 32**); esto concuerda con la mayor extrusión de Na^+ desde la raíz y la menor acumulación de Na^+ inducida por el portainjerto *Slcbl10*, no solo en la raíz sino también en el tallo y hojas de las plantas WT/*Slcbl10* expuestas a la salinidad (**Figura 31**). Curiosamente, el importante papel de *SISOS1* en la tolerancia a la sal ha sido demostrado tanto en tomate cultivado como en especies silvestres de tomate (Olias et al., 2009; Albaladejo et al., 2017), e incluso en otras halófitas como *Thellungiella*, donde la reducción de la expresión de *SOS1* convirtió a esta halófito en una planta tan sensible al Na^+ como *Arabidopsis* (Oh et al., 2009). Contrariamente a lo observado cuando se silenció *SICBL10* en el portainjertos, la sobreexpresión de dicho gen (línea OE) indujo un nivel de transcripción más bajo de *SISOS1*, lo que refleja que la extrusión de Na^+ desde la raíz fue menor en este portainjertos.

Con el fin de reducir el efecto tóxico provocado por la alta acumulación de iones tóxicos Na^+ , el portainjerto OE incrementó ligeramente la expresión de *SIHKT1;2* y *LeNHX3* (**Figura 32**). De hecho, *HKT1;2* y *LeNHX3* parecen trabajar de manera cooperativa para descargar el exceso de Na^+ del xilema y luego facilitar su almacenamiento en las vacuolas de las células de la raíz, evitando así un alto contenido de Na^+ en parte aérea que dañaría los tejidos fotosintéticos y el crecimiento. Sin embargo, el ligero aumento detectado en los niveles de transcripción de *SIHKT1;2* y *LeNHX3* en el portainjerto OE no parece suficiente para evitar que una mayor cantidad de Na^+ llegue a la parte aérea de WT injertado en OE (**Figura 31**). Además, el efecto del portainjertos sobre la regulación de la expresión génica en parte aérea de WT mostró que solo aumentó la transcripción de ambos genes involucrados en la acumulación vacuolar, *LeNHX3* y *LeNHX4*, en las hojas de la planta WT/OE y, sin embargo, la pérdida de la función *SICBL10* en el portainjertos no indujo cambios en los patrones de expresión de los genes de Na^+ en hojas (**Figura 32**). Estos resultados indican que el menor contenido de Na^+ en la parte aérea de las plantas WT/*Slcbl10* es más bien una consecuencia indirecta de la mayor capacidad de extrusión del Na^+ inducida por la regulación a la baja de *SICBL10* en la raíz.

Bajo estrés salino, también es crucial el papel de los transportadores o canales involucrados en la homeostasis del K^+ . De hecho, cada vez hay más evidencia de que la regulación de algunos transportadores de K^+ puede inducir diferencias significativas en las concentraciones de K^+ y, por lo tanto, mantener una relación Na^+/K^+ citosólica más baja que explicaría las diferencias en la tolerancia a la sal entre glicófitas y halófitas (Himabindu et al., 2016, Nieves-Cordones et al., 2016). En las especies de tomate, la captación de K^+ está asociada principalmente con un transportador similar a *HAK5*

(*SIHAK5*) y un canal de K^+ similar a *AKT1* (*LKT1*). *SIHAK5* es el principal sistema de transporte de K^+ que opera en las células de la raíz a concentraciones extracelulares de $K^+ \leq 0,1$ mM (Nieves-Cordones et al., 2020), mientras que, por encima de 0,1 mM de K^+ , *LKT1* se convierte en el principal contribuyente a la absorción de K^+ . Como era de esperar, en este estudio, los cambios más importantes inducidos por la sal se observaron en *LKT1* (**Figura 32**). Así, mientras la pérdida de función de *SICBL10* en el portainjertos aumentaba el nivel de expresión de *LKT1*, se observaba la respuesta opuesta cuando se sobreexpresaba *SICBL10*, ya que el nivel de expresión de *LKT1* en raíces de plantas injertadas WT/OE era casi nulo. Curiosamente, la baja expresión de *LKT1* en raíces de plantas WT/OE en condiciones de salinidad se asoció con una baja absorción de K^+ y, por lo tanto, con la proporción perjudicialmente alta de Na^+/K^+ adquirida por esta combinación, que mostró un fenotipo hipersensible a la sal (**Figura 31**). Estos resultados concuerdan con un estudio reciente con el mutante de tomate *lkt1* (Amo et al., 2021). La importancia de *LKT1* en la absorción de K^+ en las plantas de tomate también fue evidenciada por estos autores, quienes observaron que mientras que el mutante *akt1* de *Arabidopsis* no afectó su absorción de K^+ a 10 mM de K^+ , en el mutante de tomate *lkt1* la absorción de K^+ aún se veía afectada a 20 mM. Esto sugiere que los sistemas de transporte de K^+ no identificados compensan completamente la ausencia de *AKT1* en altas concentraciones de K^+ en plantas *akt1* de *Arabidopsis* pero no en plantas de tomate.

4.3.4. SICBL10 interactúa directamente de manera independiente de CIPK con LKT1, lo que dificulta la absorción de K^+ desde la raíz

Los resultados obtenidos en la expresión de transportadores de K^+ muestran la importancia de *LKT1* en la tolerancia a la salinidad de los portainjertos que silencian y sobreexpresan el gen *SICBL10*. Este gen podría ejercer su papel represor por interacción directa con el canal de K^+ *LKT1*, como fue observado por Ren et al. (2013) en *Arabidopsis* en condiciones bajas en K^+ . Teniendo en cuenta que nuestros resultados anteriores sugerían que *SICBL10* es ortólogo al gen *AtCBL10* (Egea et al. 2018), se estudió si la función atribuida a *AtCBL10* en la captación de K^+ se conserva para *SICBL10*, es decir, si el canal de K^+ en la membrana *LKT1* plasmático era un objetivo directo para *SICBL10*. Los resultados de los ensayos Y2H y BiFC confirmaron esta hipótesis, ya que *SICBL10* pudo interactuar directamente con el canal *LKT1* tanto *in vitro* como *in vivo* (**Figura 34**). Con los resultados obtenidos en los ensayos de interacción de proteínas y la absorción casi nula de K^+ de la sobreexpresión del portainjertos *SICBL10*, podemos concluir que *CBL10* es capaz de interactuar directamente con *LKT1* afectando negativamente la absorción de K^+ en las plantas.

En resumen, el mecanismo que explica la tolerancia inducida por el silenciamiento de *SICBL10* en raíz está relacionado no solo con la reducción de la acumulación de Na^+ en las plantas injertadas sino también con la capacidad de retener K^+ , donde se evidencia la importancia del canal *LKT1* en la mejora de la homeostasis de K^+ .

4.3.5. El uso de portainjertos silenciados *SICBL10* mejora la tolerancia a la salinidad de cultivares de tomate tanto a nivel vegetativo como agronómico

Para evitar o reducir la pérdida de producción bajo estrés salino, es de suma importancia la identificación de genes clave del tomate involucrados en la tolerancia a largo plazo, es decir, genes cuya simple variación determina un cambio significativo no solo en el crecimiento vegetativo sino también en el reproductivo. Hasta la fecha, el número de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino a largo plazo, incluyendo desde la señalización hasta los genes de respuesta, es realmente escaso como se revisó recientemente (Egea et al, 2022). En este sentido, el resultado más interesante es que los portainjertos silenciados *SICBL10* mejoran la tolerancia a la salinidad a largo plazo, lo que se refleja en un aumento de la producción de frutos de los cultivares de tomate. Por lo tanto, las plantas injertadas con WT (cv Moneymaker) como parte aérea y tanto el mutante *Slcbl10* como la línea RNAi como portainjertos tuvieron rendimientos de frutos similares a WT en las plantas cultivadas sin sal y aumentaron significativamente bajo estrés salino (**Figura 36**). Pero una hipótesis a demostrar era si se obtenían resultados similares cuando se utilizaban otros cultivares comerciales de tomate como parte aérea o cuando las condiciones de cultivo eran diferentes. En estudios previos con injertos, se observó que el efecto positivo del portainjerto puede diferir dependiendo del genotipo de la parte aérea (Santa-Cruz et al., 2002; Martínez-Rodríguez et al., 2008). La capacidad del injerto para mejorar la tolerancia a la sal también se observó en el cv comercial. Jaguar, con características muy diferentes a las de Moneymaker (Estan et al., 2005). Además, considerando la importante influencia de las condiciones de cultivo en la respuesta agronómica a la salinidad (Romero-Aranda et al., 2020), estudiamos el efecto del injerto con el cv. Jaguar como parte aérea y mutante *Slcbl10* como portainjerto en dos invernaderos: uno de condiciones no controladas (NC), con condiciones muy cálidas y secas, y otro de condiciones semicontroladas (SC), con temperaturas más amortiguadas y condiciones menos estresantes. Curiosamente, el aumento en el rendimiento de frutos inducido por el uso del portainjertos *Slcbl10* fue aún mayor en NC que en SC: 53% y 18%, respectivamente (**Figura 37**), lo que sugiere que *SICBL10* también está involucrado en el estrés por calor. Al comparar la respuesta a la salinidad de ambos cultivares de tomate utilizados como parte aérea en los injertos, observamos que el aumento en el rendimiento de frutos inducido por el portainjertos *Slcbl10* fue mayor cuando el cv. Utilizado fue Jaguar en lugar de Moneymaker (**Figuras 36 y 37**), lo que concuerda con resultados anteriores que muestran que la efectividad del injerto depende del genotipo empleado en la parte aérea del injerto (Santa-Cruz et al., 2002). En conjunto, estos resultados demuestran que el uso de portainjertos que silencian el gen *SICBL10* mejora la tolerancia a la sal de diferentes cultivares de tomate, lo que se refleja en mayores rendimientos de frutos de los genotipos de parte aérea. Esta estrategia podría ser interesante teniendo en cuenta que el uso de portainjertos transgénicos se percibe como una tecnología más amigable para el consumidor para el desarrollo de germoplasma en comparación con la transformación genética (Kodama et al., 2021), al mejorar la tolerancia a la sal sin integrar nuevos materiales genéticos en los tejidos de la parte aérea.

4.4. Similitudes y diferencias respecto al papel de *SICBL10* en la tolerancia del tomate a diferentes estreses abióticos

Hasta ahora hemos comprobado que el gen de señalización *SICBL10* participa en el desarrollo reproductivo, en la incidencia de BER y en la tolerancia a la salinidad, actuando además de manera opuesta en parte aérea y raíz ya que es un regulador positivo de la tolerancia a la salinidad en parte aérea y negativo en raíz, es decir un simple gen puede ejercer papeles muy diferentes. Los genes multifuncionales identificados hasta ahora son escasísimos, siendo uno de ellos el receptor de quinasa FERONIA (Wang et al., 2022), y nuestros resultados demuestran que *SICBL10* es capaz de mediar señales múltiples y activar múltiples respuestas celulares que aún permanecen a ser clarificadas, como las respuestas a los estreses por temperatura y sequía (Plasencia et al., 2022).

En tomate, los mecanismos por los cuales las plantas perciben la T no son bien entendidos ya que la mayoría de los estudios proceden de la planta modelo *Arabidopsis* y hay una urgente necesidad de trasladar este conocimiento a los mecanismos moleculares asociados con la respuesta a alta T en cosechas relevantes como tomate (Zhu et al., 2021). Las rutas moleculares subyacentes en la termo-morfogénesis de la parte aérea han empezado a ser descifradas en *Arabidopsis* en los últimos 10-15 años (Ludwig et al., 2021) pero actualmente muy poco es conocido sobre las bases moleculares de la termo-morfogénesis en raíz (Fonseca de Lima et al., 2021). Quizás el cuello de botella se debe en parte a la dificultad para evaluar la tolerancia a ambos estreses a largo plazo, es decir a nivel agronómico, como señalan recientemente diferentes autores (Hein et al., 2021; Correia et al., 2022). Pero la situación es más compleja, ya que los estreses no impactan generalmente a nivel individual cuando las plantas se cultivan en condiciones naturales sino que se ven sometidas a una combinación de estreses. Puesto que la frecuencia e intensidad de las combinaciones de estrés están incrementando con el cambio climático, un objetivo prioritario es estudiar cómo afectan a las cosechas las combinaciones de estrés (Rivero et al., 2022). Por ejemplo, Lopez-Delacalle et al. (2020) observaron que el efecto negativo inducido por la combinación salinidad y calor en el desarrollo de tomate era menor que cuando se aplicó salinidad a nivel individual. Según estos autores, la mayor tasa de transpiración inducida por alta temperatura protege el aparato fotosintético y, por consiguiente, aumenta la asimilación de CO₂ y el desarrollo de la planta puede ser mayor por un periodo limitado de tiempo.

Por todo ello, se consideró muy interesante estudiar el papel de *CBL10* en la tolerancia del tomate a otros estreses abióticos, como sequía y estrés por temperatura, siendo estos los primeros resultados sobre el papel de este gen de señalización en otros estreses abióticos diferentes al estrés salino. Así, *CBL10* podría ser un regulador positivo de la tolerancia a sal y negativo de la tolerancia a sequía, tal como se observaba recientemente en el homólogo de *Arabidopsis* (Kang y Nam, 2016). Respecto al estrés por calor, las respuestas pueden ser opuestas a aquellas de sequía y salinidad, como las hojas mantienen los estomas abiertos durante el estrés por calor para enfriarlas y estimular la transpiración, mientras que los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua por transpiración,

mecanismos importantes en tomate durante los estreses hídrico y salino (Albaladejo et al., 2017; Egea et al., 2018).

Respecto al estrés por calor, el tomate es más tolerante durante el periodo vegetativo que reproductivo, ya que no se detectaban daños estructurales en el fotosistema II hasta temperaturas que alcanzaban los 38°C, mientras que temperaturas superiores a 30°C llegaban a reducir significativamente la producción (Lu et al., 2017; Bineau et al., 2021). Nuestros resultados sobre ET se han obtenido en el invernadero NC, donde se alcanzan temperaturas de 40°C durante el periodo reproductivo (**Figura 20**), y en estas condiciones la producción de la línea OE se reducía un 60% respecto a WT. Sin embargo, no había diferencias de rendimiento entre WT y OE cuando las plantas se desarrollaron sin ET, como ocurría en el invernadero de condiciones SC (**Figura 38a,b**). Estos resultados sugieren que la línea de OE es muy sensible al estrés por alta temperatura y *SICBL10* puede ser un candidato prometedor para posteriores análisis en orden a entender mejor los mecanismos de respuesta al calor en tomate, prácticamente desconocidos hasta ahora. Así, recientemente Bineau et al. (2021) trataban de identificar genes en respuesta al estrés de calor en tomate, explorando la respuesta al ET en dos grandes poblaciones de tomate caracterizadas para diferentes caracteres relacionados con las flores y frutos, incluida producción y composición de los frutos. Entre los numerosos genes seleccionados inicialmente, solo unos pocos eran finalmente seleccionados por los autores, entre ellos los genes de respuesta HSPs, y concluían que estos genes representaban candidatos prometedores para futuros análisis.

La siguiente cuestión a dilucidar fue comprobar el efecto provocado por la sequía y la combinación de los dos estreses: Calor y sequía. Los resultados muestran que la línea OE es más tolerante que WT al EH ya que incrementa significativamente su rendimiento en fruto respecto a WT en estas condiciones (**Figura 39b**), pero no se observa un efecto aditivo en la combinación ET + EH. En resumen, los primeros resultados sobre el papel de *SICBL10* en la tolerancia a calor y sequía sugieren que la sobreexpresión del gen *SICBL10* induce sensibilidad al estrés por altas temperaturas y tolerancia al estrés hídrico. Interesantemente, *SICBL10* parece tener nuevas funciones y además diferentes para ambos estreses, ya que sería un regulador negativo de la tolerancia al estrés por calor y positivo de la tolerancia a la sequía, similar a la respuesta encontrada en sal. Futuros estudios permitirán seguir avanzando en el conocimiento sobre los diferentes papeles de este gen multifuncional en la tolerancia a estreses abióticos.

RESULTADOS

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II.

V. PAPEL DEL GEN *SIRBOHG* EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD DEL TOMATE

1. Antecedentes

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un proceso crucial en la respuesta de las plantas a estreses abióticos. El estrés oxidativo generalmente se da como un estrés secundario tras otro estrés primario como puede ser el estrés salino. Recientemente, se ha establecido el doble papel de ROS, siendo considerados oxidantes peligrosos cuando se encuentran a altas concentraciones, mientras que la acumulación de ROS transitoria y específica en los compartimentos sirve como señal para varios procesos implicados en el desarrollo de la planta y en la respuesta al estrés (Foyer et al., 2017; Noctor et al., 2017; Czarnocka and Karpinski, 2018). En el apoplasto, los ROS se producen por la activación de enzimas productoras de ROS, como las peroxidasas apoplásticas, poliaminas oxidasas y NADPH oxidasas localizadas en la membrana plasmática (homologas de las oxidasas de explosión respiratoria, o Rbohs por sus siglas en inglés “*respiratory burst oxidase homologs*”) (Qi et al., 2017). Las NADPH oxidasas son consideradas la clase de productoras de ROS apoplásticos más importante, produciendo radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir de oxígeno molecular. Hay evidencias que muestran que los ROS juegan un importante papel en la tolerancia a salinidad (Hossain y Dietz, 2016; Niu et al., 2018). Por ejemplo, los mutantes de *Arabidopsis* de pérdida de función en alelos Rboh mostraron hipersensibilidad al estrés salino, lo que apoya el papel crucial de estos genes en la respuesta a estrés salino (Jiang et al., 2012). Ma et al. (2013) observaron que los dobles mutantes de *Arabidopsis AtrbohD1/F1* y *AtrbohD2/F2* exhibían una significativa inhibición en la generación de ROS y, como consecuencia, ratios Na^+/K^+ más elevados que WT. El mutante *knockout* (gen inactivado) *AtrbohF* mostró una mayor sensibilidad a salinidad y un desajuste en la homeostasis Na^+/K^+ (Jiang et al., 2013). Además, un reciente estudio indica que los patrones de expresión de los genes *RBOHD* y *RBOHF* en condiciones de salinidad difieren entre la glicófita *Arabidopsis* y la halófita *Eutrema salsugineum* (Pilarska et al., 2021).

En tomate, los análisis filogenéticos con Rbohs de *Arabidopsis* y arroz indicaron que las SIRbohs se pueden clasificar en cinco subgrupos (Li et al., 2015). *SIRBOHG*, previamente reportada como *SIRBOHI* (Sagi et al., 2004), pertenece al subgrupo IV donde se encuentran los homólogos de *Arabidopsis* (*AtRbohF*) y arroz (*OsRbohA/C*). Se ha demostrado que *SIRBOHG* está implicada en la regulación de la tolerancia al estrés oxidativo y al estrés por altas temperaturas, así como en los movimientos estomáticos mediados por ácido abscísico (ABA) y brasinoesteroides (BRs) (Xia et al., 2014; Zhou et al., 2014). En cuanto al estrés salino, Yi et al. (2015) estudiaron el impacto de las altas concentraciones atmosféricas de CO_2 en las respuestas de las plantas de tomate al dicho estrés, con un enfoque particular en el papel de *SIRBOHG*. Estos autores demostraron que niveles elevados de CO_2 pueden contrarrestar el impacto negativo del estrés salino sobre

la fotosíntesis y la producción de biomasa en una manera dependiente del H₂O₂ apoplástico. Además, la regulación de H₂O₂ también contribuía a la regulación del transporte de Na⁺ desde las raíces a la parte aérea, un proceso que está influenciado por el movimiento de los estomas y por la distribución de Na⁺ desde el xilema hasta las células de las hojas. Sin embargo, son necesarios más avances para dilucidar las funciones clave del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a la sal del tomate.

Desde 2006, nuestro grupo (Estrés abiótico, producción y calidad del CEBAS) viene trabajando ininterrumpidamente en colaboración con el grupo del IBMCP (UPV-CSIC), dirigido por el Prof. V. Moreno, y de la Universidad de Almería (UAL), dirigido por el Prof. R. Lozano, como queda demostrado con los sucesivos proyectos de investigación coordinados entre los tres grupos (Refs. AGL2006-15290-C03; AGL2009-13388-C03; AGL2012-40150-C03; AGL2015-64991-C3; PID2019-110833RB-C33). El objetivo era generar una colección de mutantes de inserción de tomate para identificar genes implicados en el desarrollo vegetativo y reproductivo, así como genes implicados en tolerancia a la salinidad, puesto que el análisis de mutantes es una de las estrategias más interesantes para dilucidar el papel de un gen (Kuromori et al., 2009, Giménez et al., 2010; Atkinson y Urwin, 2012). Los avances han sido muy importantes en los últimos años, pero aún queda un importante trabajo por desarrollar para llegar a identificar genes clave en la tolerancia a largo plazo (Egea et al., 2022). En el actual proyecto coordinado, el título del subproyecto de nuestro grupo es: “Regulación del calcio y especies reactivas de oxígeno para mejorar la tolerancia a estrés abiótico y la calidad de fruto en tomate”, donde se encuadra esta Tesis y estudiar el papel del gen de tomate *SIRBOHG* implicado en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es precisamente, uno de los objetivos.

Dentro de la colección, el grupo del IBMCP identificó inicialmente un mutante con alta sensibilidad a la salinidad, y a partir de las plantas TG2 con fenotipo mutante se obtuvieron líneas homocigotas (TG3) para el fenotipo de hipersensibilidad. Seguidamente, el grupo del IBMCP comprobó que no había correlación entre el inserto y el fenotipo de hipersensibilidad a sal, es decir no había co-segregación entre el fenotipo de sensibilidad a sal y el inserto T-DNA, tratándose por tanto de una mutación somaclonal. Dado el interés del mutante por su alta sensibilidad a la sal, nuestro grupo empezó a desarrollar los trabajos dirigidos a la caracterización fenotípica, fisiológica y molecular del mutante, denominado inicialmente *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*), y cuyos resultados formaron parte de la Tesis Doctoral del Dr. Plasencia (Plasencia 2015). A nivel fisiológico, el mutante mostraba un nivel muy alto de transporte de Na⁺ desde la raíz hasta la parte aérea en condiciones de salinidad, lo que provocaba un alto grado de clorosis en las hojas llegando incluso a causar la muerte de la planta. Fruto del esfuerzo continuado a lo largo de los años, posteriormente el grupo del IBMCP identificó otro mutante con similares características, y fue a partir de ese momento cuando se continuó con el estudio de esta mutación mediante el análisis simultáneo de los dos mutantes, llegando recientemente el grupo de la UAL a identificar el gen anulado: **El gen de tomate *RESPIRATORY BURST OXIDASE G* (*SIRBOHG*).**

2. Metodología específica

2.1. Diseño experimental de ensayo de estrés salino *in vitro*

Siguiendo la metodología de cultivo *in vitro* especificada en el apartado 2 de la sección III de Material y Métodos, se llevó a cabo un ensayo comparativo entre plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker WT y plantas mutantes *sodgat1* y *sodgat2*. Se germinaron 3 semillas esterilizadas por genotipo en frascos estériles (12 frascos por genotipo) con medio de germinación MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa y agar (Tabla 1), necesario para el correcto desarrollo de las plántulas. El tratamiento salino se aplicó desde el inicio a la mitad de los frascos por genotipo, adicionando la solución salina directamente al medio con una pipeta (75 mM de NaCl). La otra mitad de los frascos por genotipo se mantuvieron sin solución salina, en condiciones control. Las semillas germinaron y crecieron en dichas condiciones control o salinas durante 13 días, tras los cuales las plantas resultantes en estado de 2-3 hojas verdaderas se procesaron separando las hojas (sin los cotiledones) de la raíz, y se repartió el material vegetal en 3 pools de 6 plantas cada uno, constituyendo cada pool una réplica biológica. Se analizó la expresión del gen *SIRBOHG* en raíz y los contenidos de iones Na^+ y K^+ en raíz y parte aérea. Además, se obtuvo una muestra de raíz en fresco de 6 de las plantas por tratamiento y genotipo para la determinación (cuantitativa y cualitativa) de la concentración de H_2O_2 empleando las técnicas descritas en la sección III de Material y Métodos.

2.2. Diseño experimental del ensayo de estrés salino en cultivo hidropónico

Siguiendo la metodología de cultivo *in vivo* en hidropónico especificada en el apartado 3.3 de la sección III de Material y Métodos, se llevó a cabo un ensayo comparativo entre plantas WT y plantas mutantes *sodgat1* y *sodgat2* en la cámara de cultivo de condiciones controladas (ver apartado 3.1). Se empleó el sistema de cultivo hidropónico para plantas de mayor tamaño (ver apartado 3.3 de la sección III), y el tratamiento de estrés salino (100 mM de NaCl) se adicionó cuando las plantas presentaban un estado de desarrollo de 6 hojas verdaderas durante una semana (7 DTS). Se emplearon 18 plantas por genotipo y tratamiento. A lo largo del tratamiento, se llevaron a cabo una serie de medidas y análisis siguiendo los protocolos detallados en la sección III de Materiales y Métodos.

La expresión espacial del gen *SIRBOHG* se analizó en raíz, ápice, hoja adulta (3ª hoja), hoja joven (1ª hoja), tallo adulto (intersección entre 2ª-3ª hoja) y tallo joven (intersección ápice-1ª hoja) de plantas WT en control y sometidas a sal (100 mM NaCl) durante 2 DTS. La expresión temporal del gen en raíces de plantas WT se analizó a lo largo de 7 DTS. La evolución del contenido de agua en raíz, tallo y hoja adulta se analizó a los 0, 2 y 7 DTS. Los parámetros de intercambio gaseoso (conductancia estomática (g_s) y transpiración (E)) se midieron en hoja adulta a los 0, 2, 4 y 7 DTS. La evolución de los contenidos de Na^+ y K^+ se obtuvo en raíz, tallo adulto y hoja adulta, así como la relación Na^+/K^+ a los 0, 2 y 7 DTS. La expresión relativa de seis genes de la subfamilia *SIPIP* y dos *SITIP* y genes involucrados en el transporte de Na^+ y K^+ (*SISOS1*, *SIHKT1;1*, *SIHKT1;2*, *LeNHX3*,

LeNHX4, *SIHAK5* y *SISKOR*) se analizó en raíz y hoja adulta de plantas desarrolladas en control a los 0 y 2 DTS. Por último, se determinó (cuantitativa y cualitativamente) el H₂O₂ en raíz, tallo y hoja adulta de plantas control y sometidas al estrés salino a los 7 DTS. Para cada medida, se analizaron 3 réplicas biológicas constituyentes por 3 plantas cada una.

2.3. Diseño experimental del tratamiento salino combinado con DPI en cultivo en mini hidropónico

Atendiendo a la metodología de cultivo *in vivo* en mini-hidropónico especificada en el apartado 3.3 de la sección III de Material y Métodos, se llevó a cabo un experimento con plantas WT en la cámara de cultivo de condiciones controladas (ver apartado 3.1 de la misma sección) empleando el sistema de cultivo mini-hidropónico para plantas de menor tamaño. Se dispusieron 12 plantas WT por cubeta, en dos cubetas independientes. En estado de 2 hojas verdaderas se sometieron a solución Hoagland ½ con 75 mM de NaCl y 24 h después, a una de las cubetas se le adicionó 100 µM de DPI durante 6 horas. Pasadas las 6 horas se retiró la solución con DPI de esta cubeta y se sustituyó de nuevo por solución salina Hoagland ½ (75 mM de NaCl). De este modo teníamos plantas en dos condiciones: WT en sal no tratadas con DPI, y plantas WT en sal tratadas con DPI. 24 h y 48 h después, se muestrearon las plantas y se llevaron a cabo los análisis tal y como se describe en la sección III. La expresión relativa de *SISOS1* y *SIHKT1;2* y la acumulación de H₂O₂ en raíz se analizó empleando 6 de las 12 plantas de cada condición (WT o WT+DPI) tras 1 DTS. Las 6 plantas restantes de cada condición se emplearon tras 2 DTS para determinar la concentración de Na⁺ en raíz y parte aérea. Para cada medida, se analizaron 3 réplicas biológicas constituidas por 2 plantas cada una.

2.4. Diseño experimental de los ensayos de estrés salino en invernadero

Para los estudios de invernadero, se emplearon plantas WT y plantas del mutantes *sodgat1* en condiciones del cultivo en cuestión (control), y sometidas a estrés salino.

Se llevaron a cabo dos ensayos independientes en el invernadero NC: uno durante la campaña primavera-verano en 2020, y otro durante la campaña primavera verano de 2022 como se ha descrito previamente en el apartado 3.4.1 de la sección III Material y Métodos. En el primero de ellos, 9 plantas de cada genotipo se cultivaron en condiciones control y 9 se sometieron a un nivel elevado de salinidad (100 mM de NaCl). En el segundo ensayo, se repitieron ambos tratamientos de la misma manera, pero además se dispusieron 9 plantas más por genotipo y se sometieron a un nivel intermedio y moderado de salinidad (50 mM de NaCl). La salinidad se aplicó cuando las plantas presentaban un estado de 8-9 hojas desarrolladas según se ha descrito en el apartado 3.4.1. El ensayo de 2020 tuvo una duración de 50 DTS, ya que hubo que finalizarlo debido a que las plantas del estaban muy senescentes e incluso muertas en salinidad. El segundo ensayo (2022) tuvo una duración mayor, ya que se tuvo en cuenta la sensibilidad del mutante y por ello se añadió el nivel intermedio de salinidad. La recolección de la producción en las plantas control y a 50 mM de NaCl se llevó a cabo a los 60 DTS en este segundo ensayo, momento marcado

cuando los frutos del mutante alcanzaron el estado comercial. En este segundo ensayo se mantuvieron plantas extra hasta los 80 DTS en las que se midió la resistencia a la compresión cuando WT ya presentaba la mayoría de sus frutos en estado comercial. A lo largo de ambos ensayos de invernadero (2020 y 2022) se llevó a cabo el fenotipado visual, medidas fisiológicas *in situ* y se evaluaron caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo. El segundo ensayo se completó con respecto al primero con más análisis fisiológicos como la determinación de parámetros de intercambio gaseoso, contenido de agua e iones Na^+ y K^+ y además, se llevaron a cabo análisis de microscopía, metabolitos y hormonas y se evaluó la producción. Para los análisis se utilizaron 3 réplicas biológicas por genotipo y tratamiento conformadas por 3 plantas cada una, mientras que para las medidas no destructivas y análisis de microscopía, se emplearon 6 plantas individuales. Todos los análisis y técnicas realizadas se realizaron tal y como describe en la sección III de Material y Métodos

Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo de estrés salino en invernadero SC durante la campaña primavera-verano de 2022, como se ha descrito previamente en el apartado 3.4.2 de la sección III Material y Métodos. Se utilizaron 9 plantas por genotipo y tratamiento. El tratamiento salino fue de 50 mM de NaCl y se inició cuando las plantas tenían un estado de desarrollo de 8-9 hojas tal y como se describe en el apartado 3.4.2 de la sección III. Este ensayo tuvo una duración de 65 DTS, a lo largo de los que se analizaron algunos parámetros fisiológicos como la clorofila y se evaluó la tasa de abscisión.

En todos los experimentos de invernadero, 6 plantas por genotipo y tratamiento fueron analizadas para cada medida no destructivas, mientras que el resto de análisis se llevaron a cabo con 3 réplicas biológicas constituidas por 3 plantas cada una. Durante los tres experimentos de invernadero se controlaron minuciosamente las condiciones ambientales mediante los sensores de los invernaderos con el fin de poder comparar los resultados atendiendo a las mismas.

3. Resultados

3.1. Resultados previos obtenidos por los grupos que colaboran en el proyecto, IBMCP y UAL), sobre la caracterización genética de los mutantes *sodgat1* y *sodgat2* e identificación del gen

El primer mutante identificado fue nombrado *she-1* (*salt hypersensitive esculentum*) (Plasencia, 2015). Debido a que la principal alteración fisiológica responsable de la clorosis provocada por la salinidad en el mutante era el transporte masivo de Na^+ desde la raíz hasta las hojas, se renombró el mutante inicial como *sodgat1* (del inglés *sodium gatherer 1*), y denominamos al segundo mutante identificado *sodgat2*.

El grupo del IBMCP realizó varios ensayos de salinidad *in vitro* e *in vivo* donde ambos mutantes mostraron un fenotipo similar de sensibilidad, caracterizado por síntomas anormales de hiperhidratación y clorosis intensa en diferentes partes de la plántula (**Figura 41a**). Las segregaciones fenotípicas observadas en todos los experimentos *in*

in vitro e *in vivo* fueron consistentes con una herencia recesiva monogénica tanto para el mutante *sodgat1* ($\chi^2= 0,05$, $90\% \geq P \geq 75\%$) como para el mutante *sodgat2* ($\chi^2= 0,33$, $75\% \geq P \geq 50\%$). Además, también llevaron a cabo una prueba de complementación para determinar si las dos mutaciones recesivas afectaban a alelos de un mismo gen o de genes diferentes. La prueba indicó que las dos mutaciones recesivas eran alélicas ya que no se complementaban entre sí en el híbrido *sodgat1* x *sodgat2* (**Figura 41b**). Finalmente, sometieron a ambos a una prueba de sensibilidad a la kanamicina, que mostró ausencia de cosegregación entre el fenotipo y el gen *nptII* funcional del inserto de T-DNA.

Dado que la inserción de T-DNA no se asoció con el fenotipo mutante observado en *sodgat1* y *sodgat2*, el grupo de la UAL llevo a cabo una estrategia de mapeo por secuenciación para identificar las mutaciones causantes del fenotipo *sodgat*, utilizando una población F₂ derivada del cruce de *sodgat2* con el tomate silvestre (WT) *S. pimpinellifolium* (LA1589 adhesión). Se evaluaron un total de 103 plantas F₂ en un ensayo *in vitro* bajo condiciones de estrés salino (NaCl 100 mM), observando una segregación fenotípica en esta progenie F₂ interespecífica de 78 con fenotipo WT y 25 con fenotipo *sodgat*, consistente con un patrón de herencia monogénico recesivo de la mutación *sodgat2* ($\chi^2 = 0,03$, $90\% \geq P \geq 75\%$). Seguidamente, se llevó a cabo la secuenciación del genoma de un pool de ADN de 30 plantas F₂ con fenotipo WT y de otro pool de ADN de 25 plantas F₂ con fenotipo *sodgat*. El análisis del promedio de las frecuencias alélicas del genoma completo en los grupos WT y mutante reveló dos regiones genómicas en los cromosomas 8 y 10 con un fuerte sesgo hacia los alelos de referencia del tomate WT *S. pimpinellifolium* (**Figura 41b**), lo que indicaba que eran candidatos para albergar la variante genética subyacente a la mutación *sodgat2*. El examen de las lecturas pareadas en estas regiones candidatas mostró la presencia de una translocación equilibrada en el conjunto de mutantes, que involucraba las regiones de inicio y finalización de los cromosomas 8 y 10, respectivamente (**Figura 41c**). El punto de ruptura de translocación en el cromosoma 8 (SL4.0ch08:62,792,497) interrumpió a partir del tercer intrón el gen *SIRBOHG* (*Solyc08g081690*) (**Figura 41d**), mientras que el punto de ruptura en el cromosoma 10 (SL4.0ch10:987,176) se ubicó en la región promotora (1063 pb desde el sitio de inicio de la transcripción) del gen *Solyc10g006540* que codifica una proteína similar a la formina. Los análisis de PCR con cebadores que flanquean los puntos de ruptura de la translocación confirmaron la presencia de esta translocación de equilibrio en *sodgat2* (**Figura 41c**). El análisis de cosegregación realizado en la población de mapeo F₂ mostró que las 25 plantas con fenotipo *sodgat* eran homocigotas para el punto de corte de la translocación en el cromosoma 8. Por el contrario, 7 de las 25 plantas F₂ con fenotipo *sodgat* no portaban la translocación del cromosoma 10, lo que indica que la alteración del gen *SIRBOHG* era responsable del fenotipo *sodgat*. Esta hipótesis se validó aún más con la secuenciación del locus *SIRBOHG* en el mutante *sodgat1*, que condujo a la identificación de una delección de 2048 pb (SL4.0ch08:62,797,609.62,799,656) que abarca los exones 8-14 y flanquea la secuencia intrónica de este gen (**Figura 41d**).

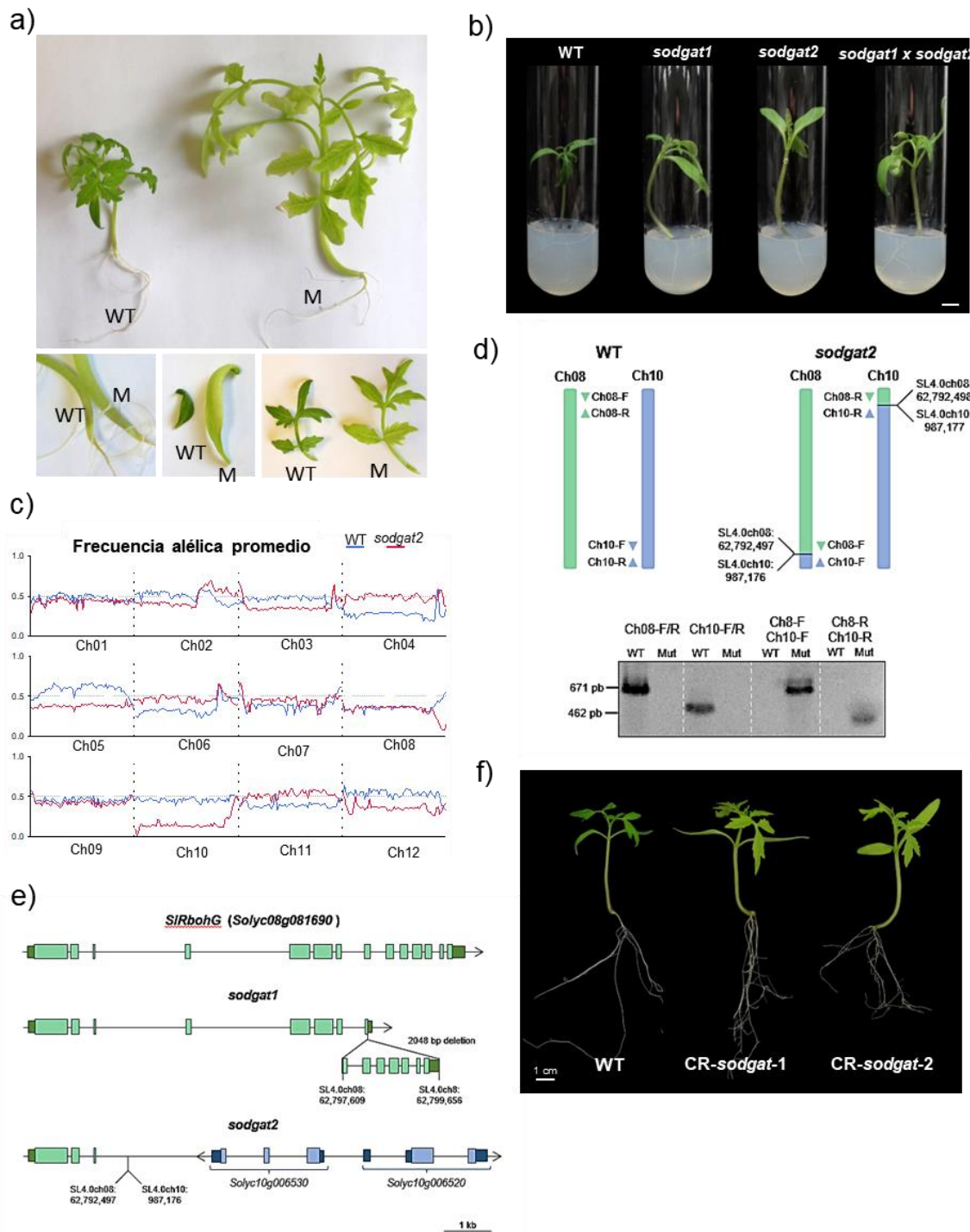


Figura 41. Las mutaciones *sodgat* afectan al gen *SIRBOHG*. a) Síntomas de clorosis e hiperhidratación en el mutante *sodgat1* (el tamaño más grande del mutante está relacionado con los síntomas de hiperhidratación), y primer plano de la hiperhidratación en el hipocótilo (extremo inferior izquierdo) y clorosis e hiperhidratación tanto en el cotiledón (extremo inferior central) como en la hoja (extremo inferior derecho). b) Prueba de alelismo de mutantes *sodgat1* y *sodgat2*. El cruce F1 muestra tanto el fenotipo de hiperhidratación como el de clorosis de las plantas parentales (mutantes *sodgat1* y *sodgat2*). c) Distribución de la frecuencia alélica promedio de los grupos WT (línea azul) y *sodgat2* (línea roja) agrupados por cromosomas. d) Representación esquemática (arriba) y PCR (abajo) que muestra la translocación equilibrada entre los cromosomas 8 y 10 encontrada en el mutante *sodgat2*. e) Representación esquemática del gen *SIRBOHG* y los reordenamientos genómicos resultantes de las mutaciones *sodgat1* y *sodgat2*. Las secuencias codificantes del gen *SIRBOHG* (Solyc08g081690) y UTR están representadas por recuadros verde y verde oscuro, respectivamente. Las secuencias de codificación y UTR de los genes del cromosoma

10 (Solyc10g006530 y Solyc10g006520) se representan mediante recuadros azul y azul oscuro, respectivamente. f) Fenotipo sensible representativo de las líneas CR-*sodgat1* y CR-*sodgat2* bajo condiciones de estrés salino.

Para demostrar si la pérdida de función de *SIRBOHG* era la responsable del fenotipo *sodgat*, se generaron líneas con el gen *SIRBOHG* desactivado mediante el uso de la tecnología CRISPR/Cas9, evaluando molecularmente un total de seis líneas diploides CRISPR/Cas9 independientes (CR-*SIRBOHG*). Estas plantas T₀ se autofecundaron para generar las poblaciones T₁, que se evaluaron en condiciones de estrés salino. En todos los casos, las líneas CR-*SIRBOHG* mostraron un fenotipo de sensibilidad a la sal claramente similar al observado en los mutantes *sodgat* (**Figura 41e**). Por lo tanto, los resultados generales revelaron que las mutaciones de translocación y deleción notificadas en el gen *SIRBOHG* eran responsables del fenotipo sensible observado en los mutantes *sodgat* en condiciones de estrés salino.

3.2. Dilucidar el mecanismo de acción del gen en relación con la homeostasis osmótica e iónica en condiciones de salinidad y determinar el papel del H₂O₂ en la tolerancia.

3.2.1. Caracterización *in vitro*

Como se ha indicado anteriormente, los mutantes se identificaron *in vitro* y su principal característica en medio salino era el fenotipo clorótico, pero hasta ahora no se había comprobado si la clorosis estaba asociada con el efecto tóxico provocado por la acumulación de Na⁺. Con el fin de determinar si la sensibilidad a la sal inducida por la interrupción de *SIRBOHG* se debía a una alteración de la homeostasis de Na⁺, se realizó un experimento *in vitro* con WT y ambos mutantes donde se adicionó al medio de cultivo un nivel moderado de estrés (75 mM de NaCl) durante 15 días (DTS), donde los mutantes mostraron claramente el fenotipo clorótico.

En primer lugar, se analizó la expresión del gen *SIRBOHG* en raíces, donde se observó un aumento del 50% en WT en condiciones de estrés salino (**Figura 42a**). Como era de esperar, las cantidades de transcritos fueron indetectables en los mutantes nulos *sodgat1* y *sodgat2*.

Respecto a los contenidos de Na⁺ en la parte aérea, este aumentó alrededor del 60% en ambos mutantes con respecto a WT tras 15 DTS (**Figura 42b**). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en K⁺, de modo que los valores de la relación Na⁺/K⁺ observados en los mutantes reflejan los cambios en Na⁺, siendo más elevados en mutantes que en WT. Estos resultados confirman que la sensibilidad a la sal mostrada por los mutantes *sodgat1* y *sodgat2* cuando se desarrollan *in vitro* está relacionada con mayor acumulación de Na⁺ y alta relación Na⁺/K⁺ en la parte aérea (**Figura 42b**). Teniendo en cuenta que la tasa de transpiración es muy baja en condiciones de cultivo *in vitro*, los importantes aumentos de Na⁺ observados en la parte aérea reflejan que la mutación altera la homeostasis de Na⁺ en raíz.

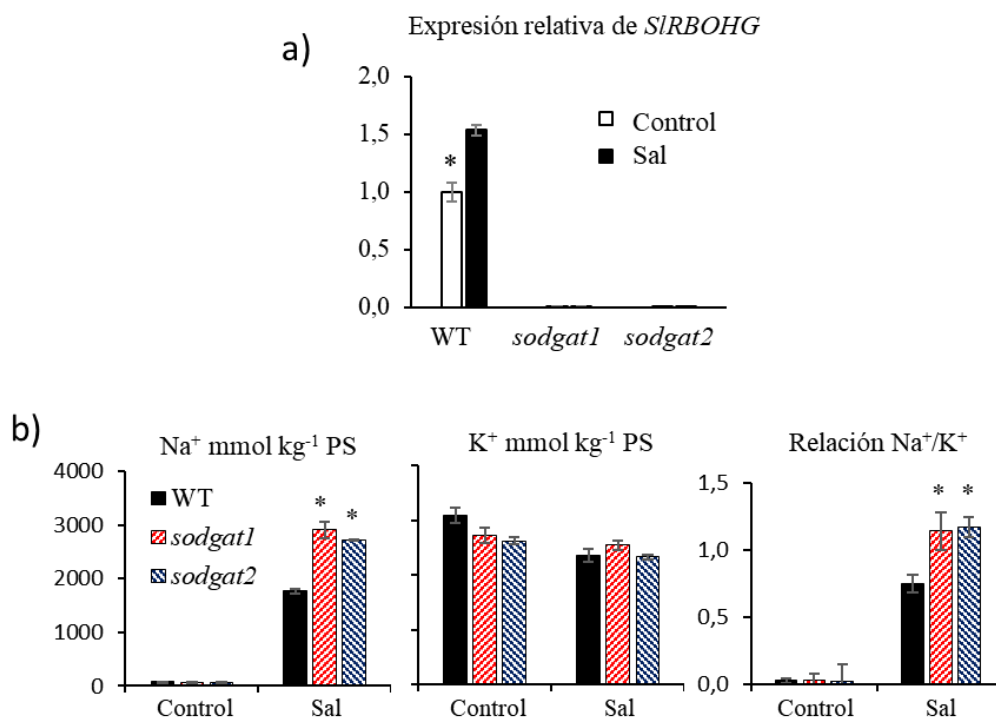


Figura 42. La sensibilidad a la sal mostrada por los mutantes *sodgat1* y *sodgat2* está relacionada con una mayor acumulación de Na⁺ y alta relación Na⁺/K⁺ en la parte aérea de las plantas cultivadas *in vitro*. Plantas WT, *sodgat1* y *sodgat2* desarrolladas en control y sal (75 mM NaCl) durante 15 días. a) Expresión relativa de *SIRBOHG* en raíces de WT y mutantes. b) Contenidos de Na⁺ y K⁺ y relación Na⁺/K⁺ en la parte aérea. Valores promedios ± EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student, p < 0.05)

3.2.2. Caracterización fenotípica y fisiológica *in vivo*

Seguidamente, se llevó a cabo la caracterización fenotípica y fisiológica *in vivo* en los mutantes *sodgat1-2* sensibles a la sal con el objetivo de estudiar sus respuestas individualizadas en parte aérea y raíz en condiciones transpirantes, así como determinar el transporte desde la raíz a la parte aérea. El ensayo se realizó en cultivo hidropónico, donde los efectos inducidos por la salinidad se observan antes debido a la rápida absorción de los iones salinos. El tratamiento salino (100 mM de NaCl) se aplicó a las plantas WT y mutantes *sodgat1-2* cuando habían desarrollado seis hojas verdaderas, y se aplicó durante 7 DTS. Como se observa en las imágenes representativas, los efectos de la sal en los mutantes eran muy evidentes (**Figura 43a**). Así, el tratamiento salino detuvo el crecimiento de la parte aérea de ambos mutantes, mientras que las plantas WT continuaban creciendo durante los 7 DTS (**Figura 43b**). Además, las hojas de estos redujeron sus contenidos en clorofila desde los 2 DTS, efecto que se intensificó tras 7 DTS (**Figura 43b**).

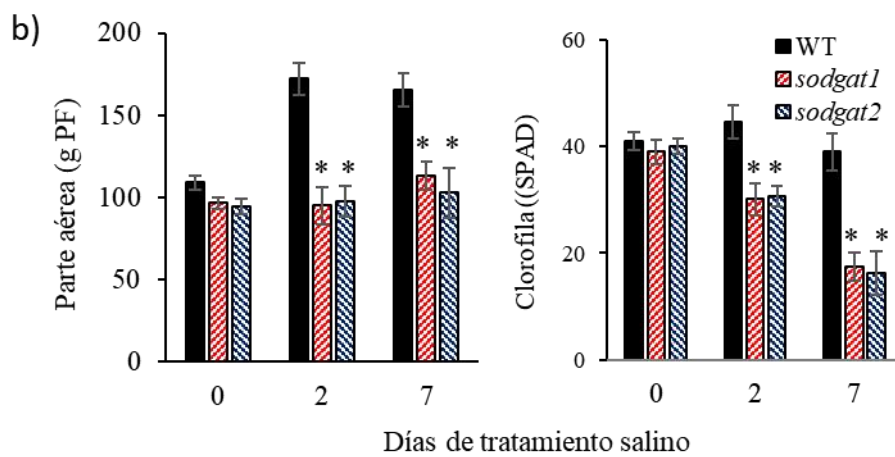
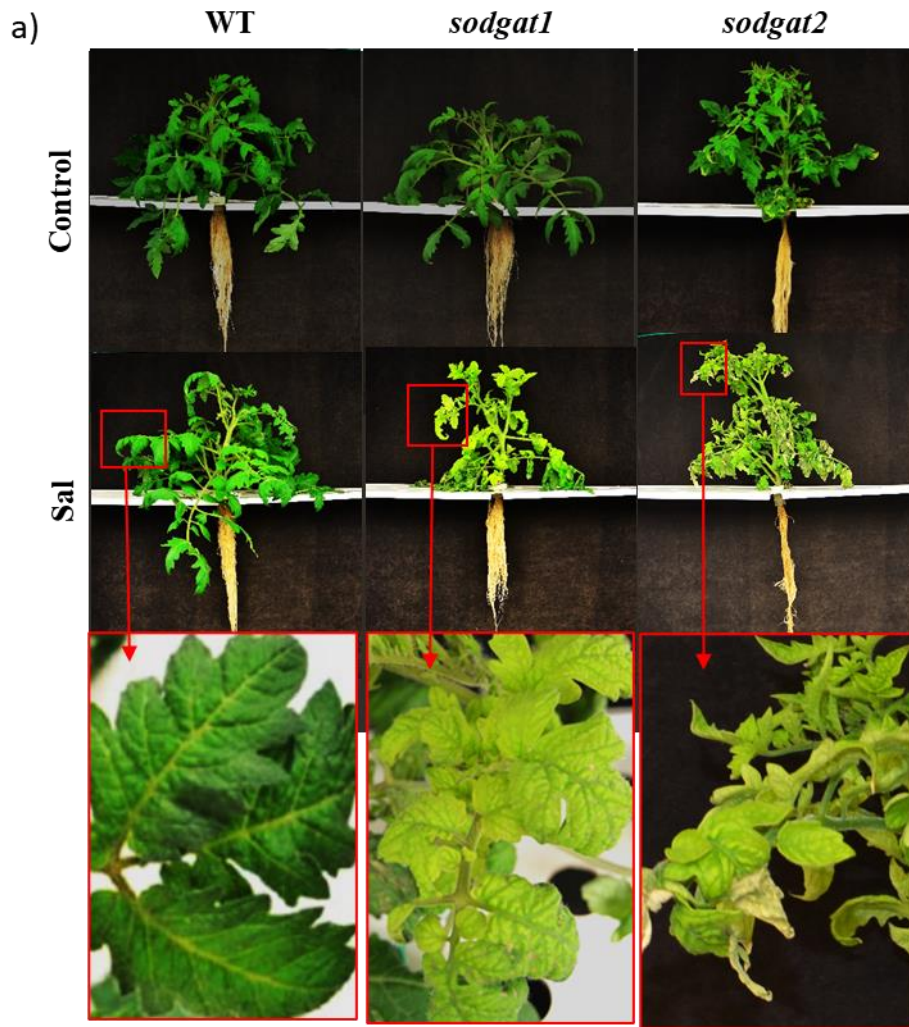


Figura 43. El fenotipo de hipersensibilidad a la sal de los mutantes *sodgat1* y *sodgat2* se observa rápidamente cuando las plantas se desarrollan en cultivo hidropónico. Plantas WT y mutantes desarrolladas en cultivo hidropónico en control y salinidad (100 mM NaCl) durante 7 días (DTS). a) Imágenes representativas de las plantas antes de aplicar el tratamiento (control, 0 DTS) y tras 7 DTS. Detalle de las hojas tratadas con sal de los mutantes mostrando un alto grado de clorosis, no observada en WT. b) Biomasa de la parte aérea y contenido de clorofila en las hojas de plantas WT y mutantes a 0, 2 y 7 DTS. Valores promedios \pm EE de tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student, $p < 0.05$).

En este ensayo se analizó el patrón de expresión espacial de *SIRBOHG* en plantas WT a los 0 y 2 DTS. El mayor incremento inducido por la salinidad se observó en raíz, donde triplicaba su expresión respecto al día 0, seguido de hoja y tallo adulto, mientras que no se observó inducción de la expresión en los órganos jóvenes de la parte aérea (**Figura 44a**). La expresión temporal de *SIRBOHG* inducida por la salinidad también se analizó en raíces de WT durante los 7 DTS. Los transcritos de *SIRBOHG* alcanzaban los niveles máximos tras 2 DTS, recuperándose hasta el nivel basal a los 7 DTS (**Figura 44b**).

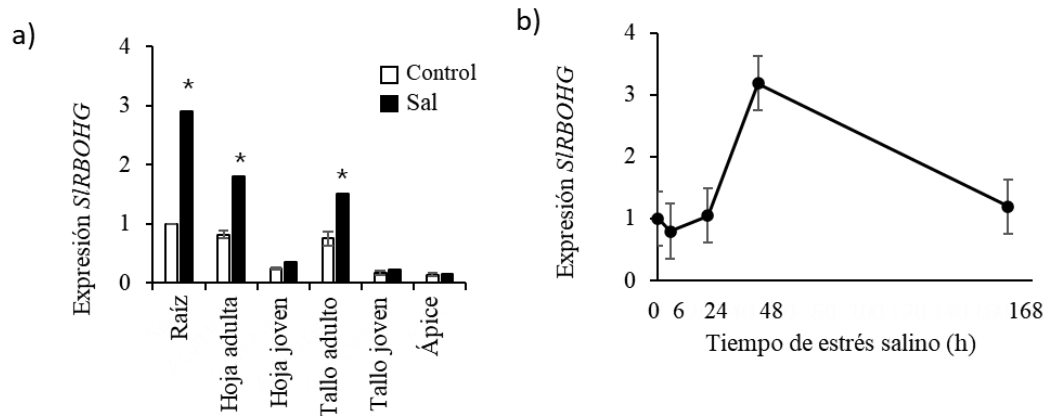


Figura 44. Expresión espacial y temporal del gen *SIRBOHG*. a) Expresión espacial del gen analizada en raíz y diferentes partes de la parte aérea de plantas WT en control y sal (100 mM NaCl) durante 2 DTS. b) expresión temporal del gen en raíces de plantas WT durante 7 DTS. Los valores eran reactivados a 1 para raíz en control, promedios \pm EE de tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre control y sal (Test t de Student, $p < 0.05$).

Una de las características fenotípicas de los mutantes *sodgat* era su aspecto suculento en condiciones de salinidad. Con el fin de comprobar los efectos inducidos por la salinidad en los contenidos de agua de la planta, se analizó la evolución del contenido de agua en raíz, tallo y hoja adulta de plantas WT y *sodgat1-2* durante 7 DTS (**Figura 45a**). No se observaron diferencias entre los contenidos de agua de WT y mutantes a lo largo del periodo de tratamiento en raíz, mientras que la salinidad inducía un aumento del contenido de agua en tallo y principalmente en las hojas de los mutantes *sodgat1-2*, pero no en el WT. Así, el contenido de agua incrementaba significativamente en las hojas desde los primeros 2 DTS (25 %), y continuaba aumentando entre los 2 y 7 DTS (50 %) en ambos mutantes.

Una cuestión a resolver era si los mayores contenidos de agua en las hojas de los mutantes estaban relacionados con cambios en los caracteres implicados en la pérdida de agua a través de las hojas. Para comprobar esto, se analizó la evolución de la conductancia estomática (g_s) y la tasa de transpiración (E) en la misma hoja adulta (2ª) en la que se analizó el contenido de agua. Como era de esperar, hubo reducciones importantes de g_s y E justo después de aplicar el tratamiento salino en las hojas de WT que se mantuvieron durante los 7 DTS (**Figura 45b**). La tendencia era similar en ambos mutantes, aunque las reducciones fueron menores en *sodgat1-2* que en las hojas WT a los 2 y 4 DTS, mientras que a los 7 DTS se reducían hasta valores similares a los de WT. Considerados en

conjunto, estos resultados muestran que la acumulación de agua inducida por la salinidad en los mutantes *sodgat1-2* está asociada inicialmente a mayor transporte de agua a través de la cadena de transpiración, como reflejan los mayores valores de g_s y E entre 2 y 4 DTS, pero esta respuesta no parece mantenerse a más largo plazo (7 DTS).

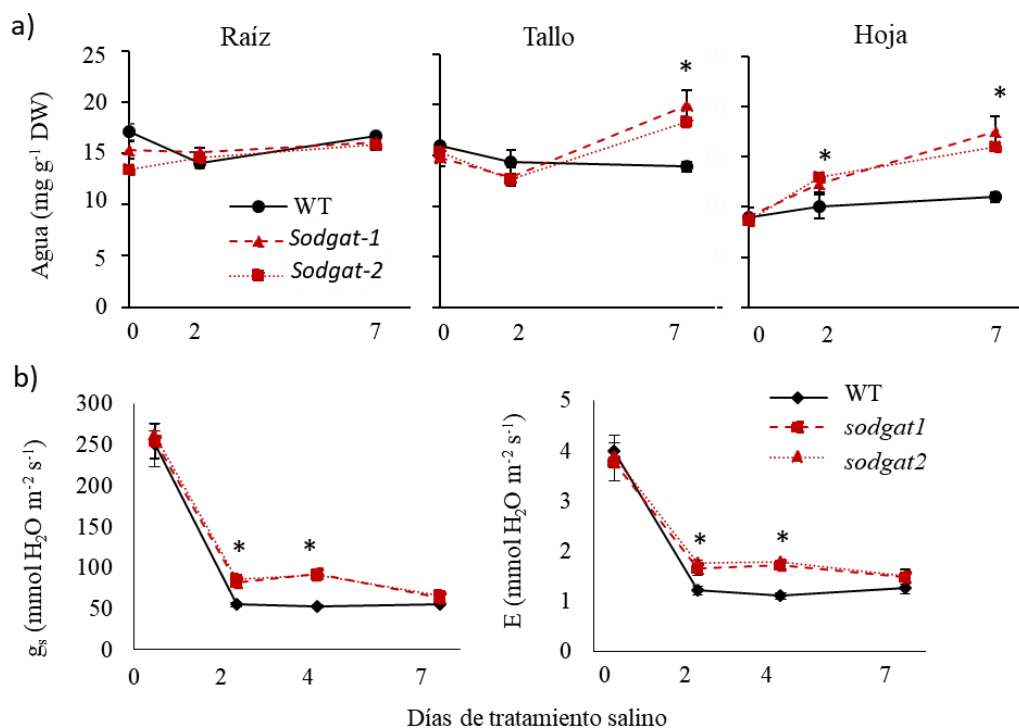


Figura 45. Efecto de la salinidad sobre los contenidos de agua en diferentes partes de la planta y los caracteres relacionados con la pérdida de agua a través de las hojas. Plantas WT y mutantes desarrolladas en cultivo hidropónico en control y salinidad (100 mM NaCl) durante 7 días (DTS). a) Evolución del contenido de agua en raíz, tallo y hoja adulta. b) Conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) a lo largo del periodo de tratamiento. Valores promedio \pm EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student, $p < 0.05$)

Otro de los efectos más importantes inducidos por la salinidad es la toxicidad provocada por la acumulación del ion tóxico Na^+ . Con el fin de identificar las alteraciones provocadas por la anulación del gen en la homeostasis del Na^+ , este se analizó en raíz, y tallo y hoja adulta (**Figura 46**). Como se observó para el contenido de agua, las diferencias entre WT y mutantes no estaban en raíz sino en la parte aérea, donde la acumulación de Na^+ aumentaba en tallo y, especialmente, en hoja tras 7 DTS, donde los contenidos de Na^+ eran 4 veces mayores en mutantes que en WT. Estos resultados demuestran que el patrón de distribución normal de Na^+ está totalmente alterado en los mutantes. Así, en las plantas WT los contenidos de Na^+ son mayores en la raíz, seguidos de tallo y la menor acumulación ocurre en la hoja para evitar el efecto tóxico, mientras que el comportamiento es opuesto en los mutantes *sodgat1-2* (**Figura 46**).

Mientras que los cambios más importantes en la homeostasis de Na^+ de ambos mutantes ocurrieron en hoja, los de K^+ se dieron en raíz, donde los contenidos se redujeron más del

50% en ambos mutantes con respecto a WT desde los 2 DTS (**Figura 46**). Un carácter relacionado con la sensibilidad a la sal es la relación Na^+/K^+ , y los valores de dicha relación se incrementaron en los tres órganos y, especialmente, en las hojas de ambos mutantes (**Figura 46**). Estos resultados muestran el importante papel del gen *SIRBOHG* en la homeostasis de Na^+ y K^+ .

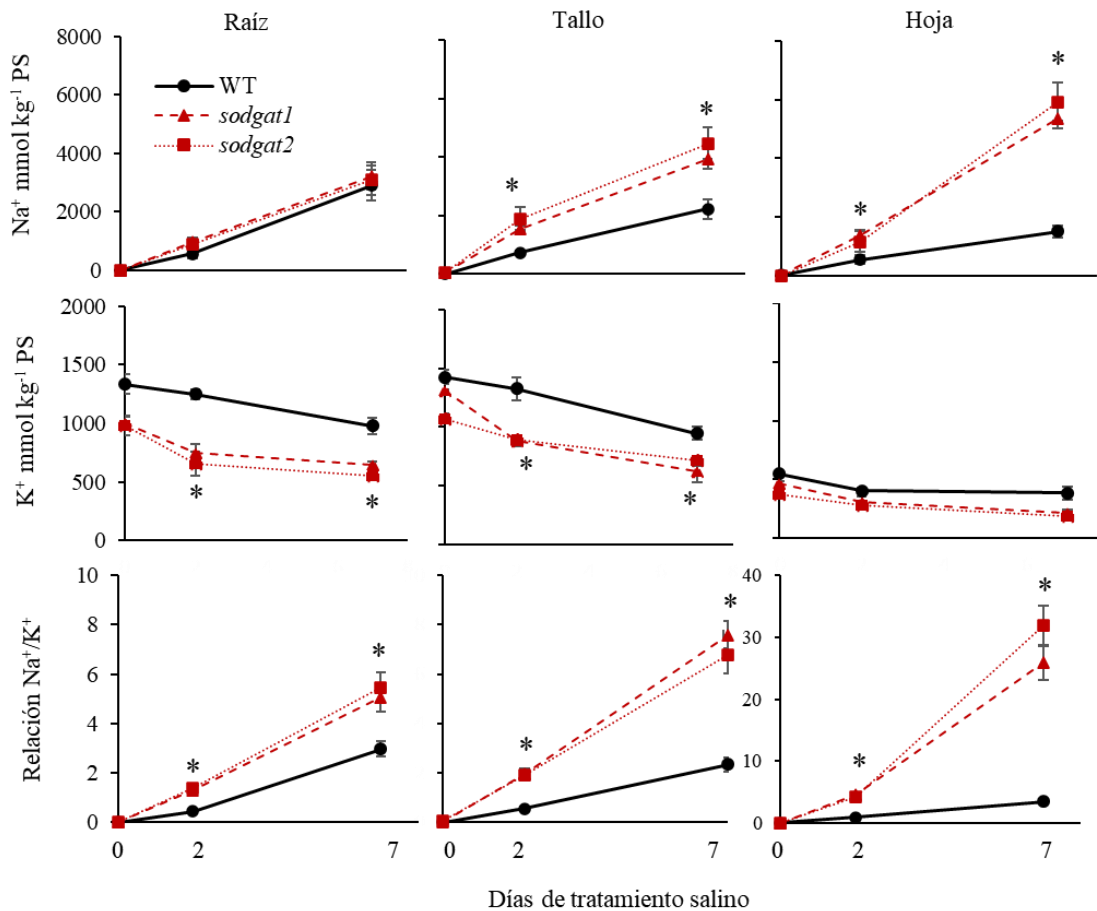


Figura 46. La disrupción de *SIRBOHG* promueve un transporte masivo de Na^+ desde la raíz a la parte aérea bajo condiciones salinas. Plantas WT y mutantes desarrolladas en cultivo hidropónico en control y salinidad (100 mM NaCl) durante 7 días (DTS). Evolución de los contenidos de Na^+ y K^+ en raíz, tallo adulto y hoja adulta, así como la relación Na^+/K^+ durante los 7 DTS. Valores promedio \pm EE de tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student, $p < 0.05$).

3.2.3. Caracterización molecular. Genes implicados en el transporte de agua y en la homeostasis Na^+/K^+

El primer efecto inducido por el estrés salino en ambos mutantes fue la mayor acumulación de agua en la parte aérea. Dado que las acuaporinas (AQP) están involucradas en el transporte de agua, se analizaron los niveles de expresión de 6 isoformas de acuaporinas de membrana plasmática (*SIP1P1;3*, *SIP1P1;5*, *SIP1P1;7*, *SIP1P2;1*, *SIP1P2;10*, *SIP1P2;12*) y 2 isoformas de tonoplasto (*SITIP1;1* y *SITIP2;2*) en raíces y hojas de WT y mutantes *sodgat1-2* a los 0 (control) y 2 DTS. Puesto que no se

conocían las isoformas mayoritarias en el cultivar de tomate utilizado en este trabajo (cv Moneymaker), en primer lugar comparamos los niveles de expresión de las isoformas, observando que *SIPIP1;3* presentaba la mayor expresión tanto en la raíz como en la hoja, seguida de *SIPIP1;5* y *SIPIP2;1*. No se observaron diferencias significativas en la expresión de acuaporinas entre WT y los mutantes *sodgat* (**Figura 47**).

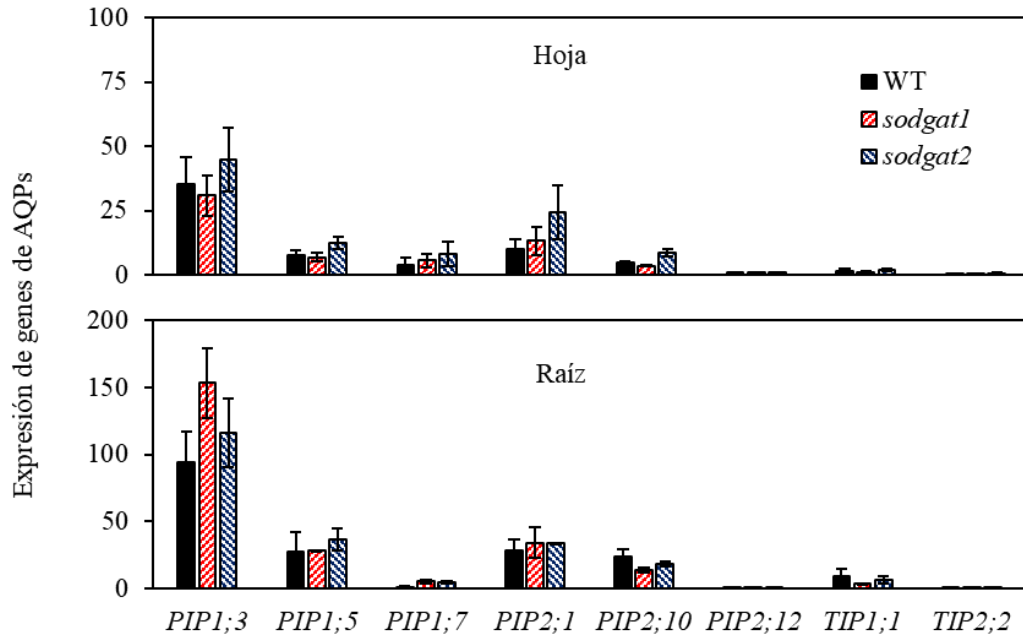


Figura 47. Expresión de genes de acuaporinas en WT y mutantes *sodgat1* y *sodgat2*. Expresión relativa de seis genes de la subfamilia *SIPIP* y dos *SITIP* analizada en raíz y hoja adulta de plantas desarrolladas en control. Los valores eran relativizados a 1 para *SIPIP2;12* de WT. Valores promedio \pm EE de tres repeticiones.

Respecto a los cambios inducidos por la salinidad en WT, se observó que los niveles de expresión de *SIPIP1;3* y *SIPIP1;5* aumentaron significativamente con la salinidad en hojas (**Figura 48a**). El resto de genes no variaron sus niveles de expresión con la salinidad ni en raíz ni en hoja de las plantas WT, excepto *SIPIP2;12* cuya expresión se redujo en ambos tejidos. Sin embargo, los niveles de expresión de los mutantes prácticamente no aumentaron respecto a WT en medio salino a excepción, tal y como sería esperable de acuerdo con el alto transporte de agua hasta sus hojas (**Figura 48b**). Incluso la expresión de algunos genes era reducida en los mutantes respecto a WT, como se observó para *SIPIP1;3* y *SIPIP1;5* en las raíces de ambos mutantes. Estos resultados demuestran que la sobreacumulación de agua provocada por la disrupción de *SIRBOHG* no está relacionada con la expresión de genes de acuaporinas implicados en el transporte de agua.

El otro efecto inducido por la mutación es el alto transporte de Na^+ desde la raíz hasta las hojas y la reducción de los niveles de K^+ , razón por la que se analizó la expresión génica implicada en la homeostasis de ambos iones. Respecto a Na^+ , se analizaron los niveles de expresión de los principales genes implicados en el transporte de dicho ion (*SISOS1*, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*) y en la compartimentalización vacuolar (*LeNHX3* y *LeNHX4*) a los 0 y 2 DST (**Figura 49**). La expresión de *SISOS1* y especialmente *SIHKT1;1* y

SIHKT1;2 era significativamente reducida en las raíces de los mutantes *sodgat*, respecto a WT, tanto en control como en salinidad. Respecto a los genes involucrados en la compartimentación vacuolar, la expresión se redujo en *LeNHX3* tanto en control como en sal en ambos mutantes, mientras que la expresión de *LeNHX4* solo se reducía con la sal en el mutante *sodgat2*.

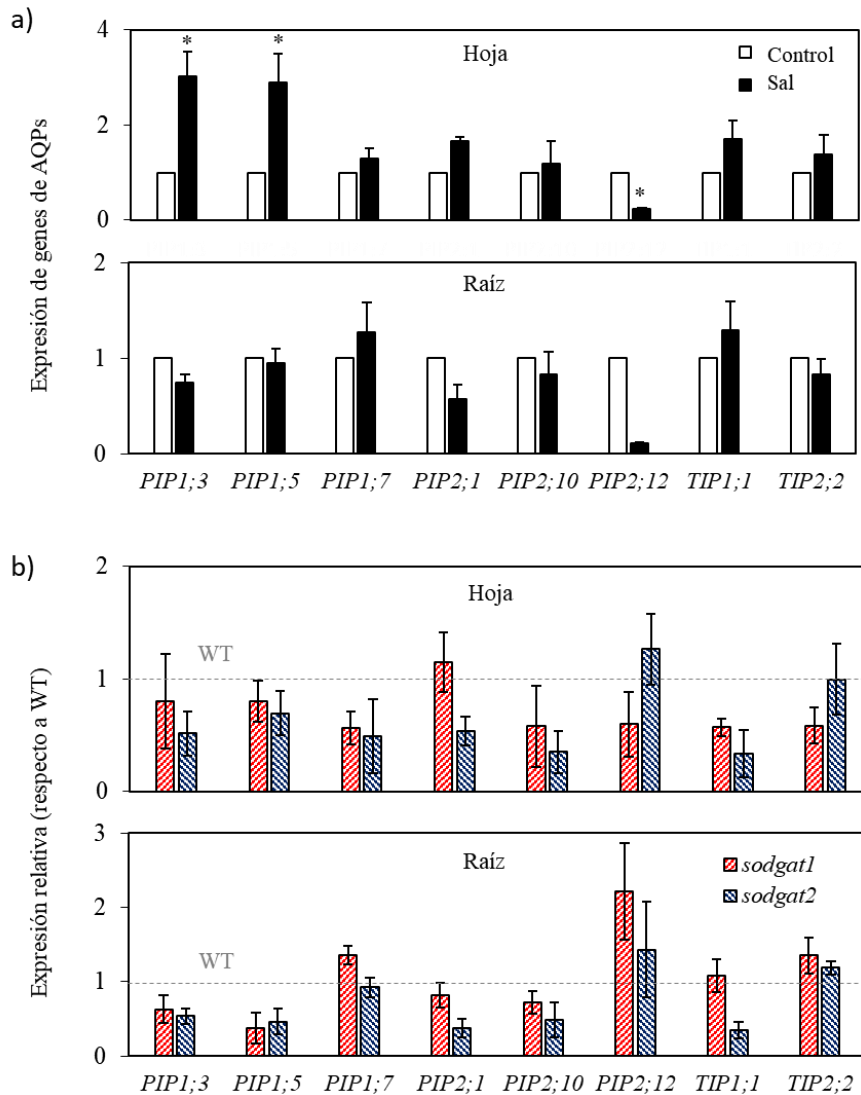


Figura 48. Cambios inducidos por la salinidad en la expresión de genes de acuaporinas en WT y mutantes *sodgat1* y *sodgat2*. Expresión relativa de seis genes de la subfamilia *SIPIP* y dos de *SITIP* analizada en raíz y hoja adulta a los 0 (control) y 2 DTS (100 mM NaCl). a) Niveles de expresión en control y sal de plantas WT. La expresión era relativizada a 1 para cada isoforma en control. b) Cambios de expresión inducidos por la salinidad en ambos mutantes respecto a WT. Para cada gen, la expresión era relativizada a 1 en WT. Valores son las medias \pm EE de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores promedios (Test t de Student, $p < 0.05$).

Además, y como consecuencia de la alteración de la homeostasis de K^+ , también se analizaron los principales genes implicados en absorción y transporte de este ion, *SIHAK5* y *SISKOR* (**Figura 49**). De los dos genes involucrados solo se redujo la expresión de *SISKOR* en ambos mutantes con respecto a las raíces WT. En conclusión, la alta relación

Na^+/K^+ en parte aérea de los mutantes *sodgat1-2* está relacionada con un patrón de expresión alterado de los genes transportadores de Na^+ y K^+ en la raíz.

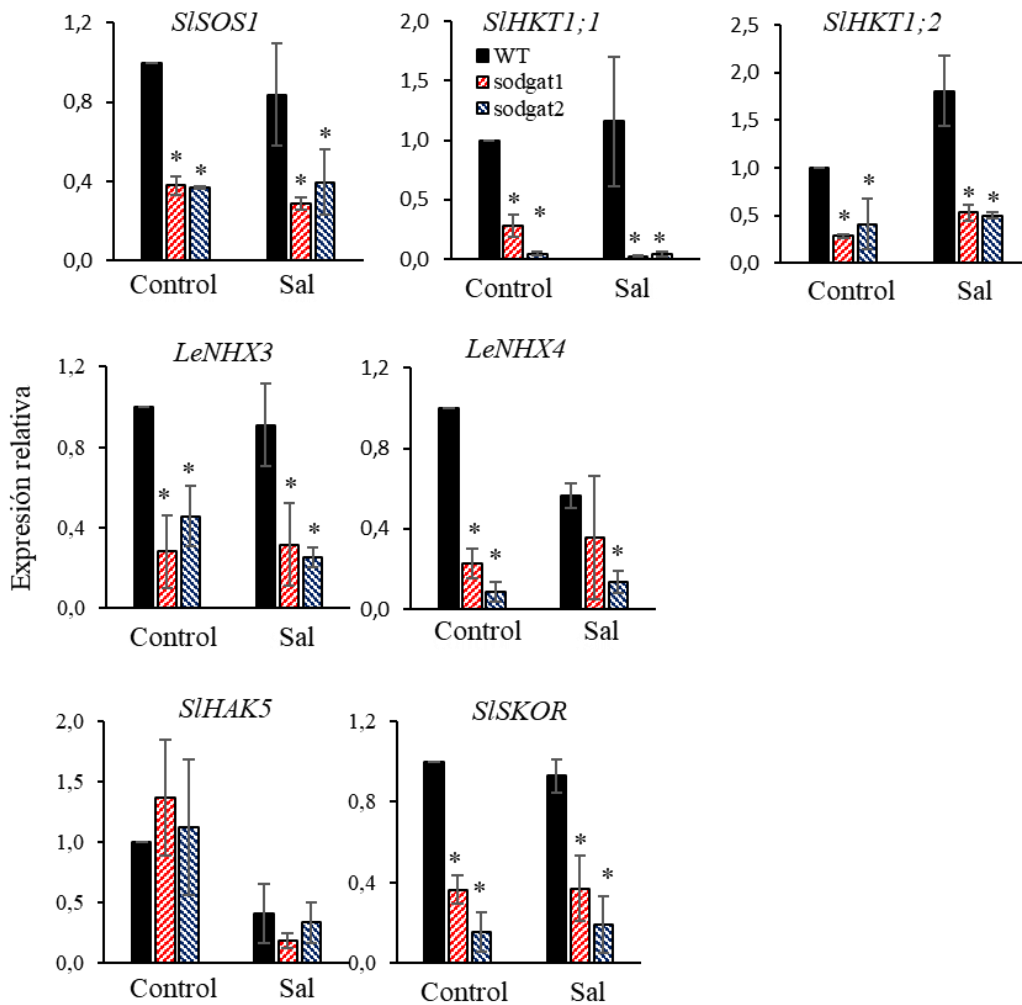


Figura 49. La disrupción de *SIRBOHG* altera la expresión de genes involucrados en la homeostasis Na^+/K^+ . Expresión relativa de genes involucrados en la absorción y transporte de Na^+ desde la raíz a la parte aérea (*SiSOS1*, *SiHKT1;1* and *SiHKT1;2*), en la compartimentación vacuolar (*LeNHX3* and *LeNHX4*) y en la absorción y transporte de K^+ (*SiHAK5* y *SiSKOR*) analizados en raíces a los 0 (control) y 2 DTS (sal). La expresión de genes era relativizada a 1 en WT control. Valores promedios \pm EE de tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student's, $p < 0.05$).

3.2.4. Cambios inducidos por la anulación de *SIRBOHG* en la producción de H_2O_2 en condiciones *in vitro* e *in vivo*

La expresión de *SIRBOHG* inducida por el estrés salino generalmente se asocia con un aumento de H_2O_2 . Con el fin de conocer los cambios inducidos por la mutación en los niveles de H_2O_2 , primero se analizó la producción de H_2O_2 en raíces de plantas *in vitro* usando diacetato de 2,7-diclorofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) y luego se midió usando la técnica e-FOX (ver apartado 4.13 sección III Material y Métodos). Se encontró una mayor intensidad de fluorescencia y una mayor producción de H_2O_2 en las raíces de las plántulas

WT tratadas con sal durante 15 días, mientras que la producción de H₂O₂ no aumentó con el estrés salino en los mutantes *sodgat1-2* (Figura 50a).

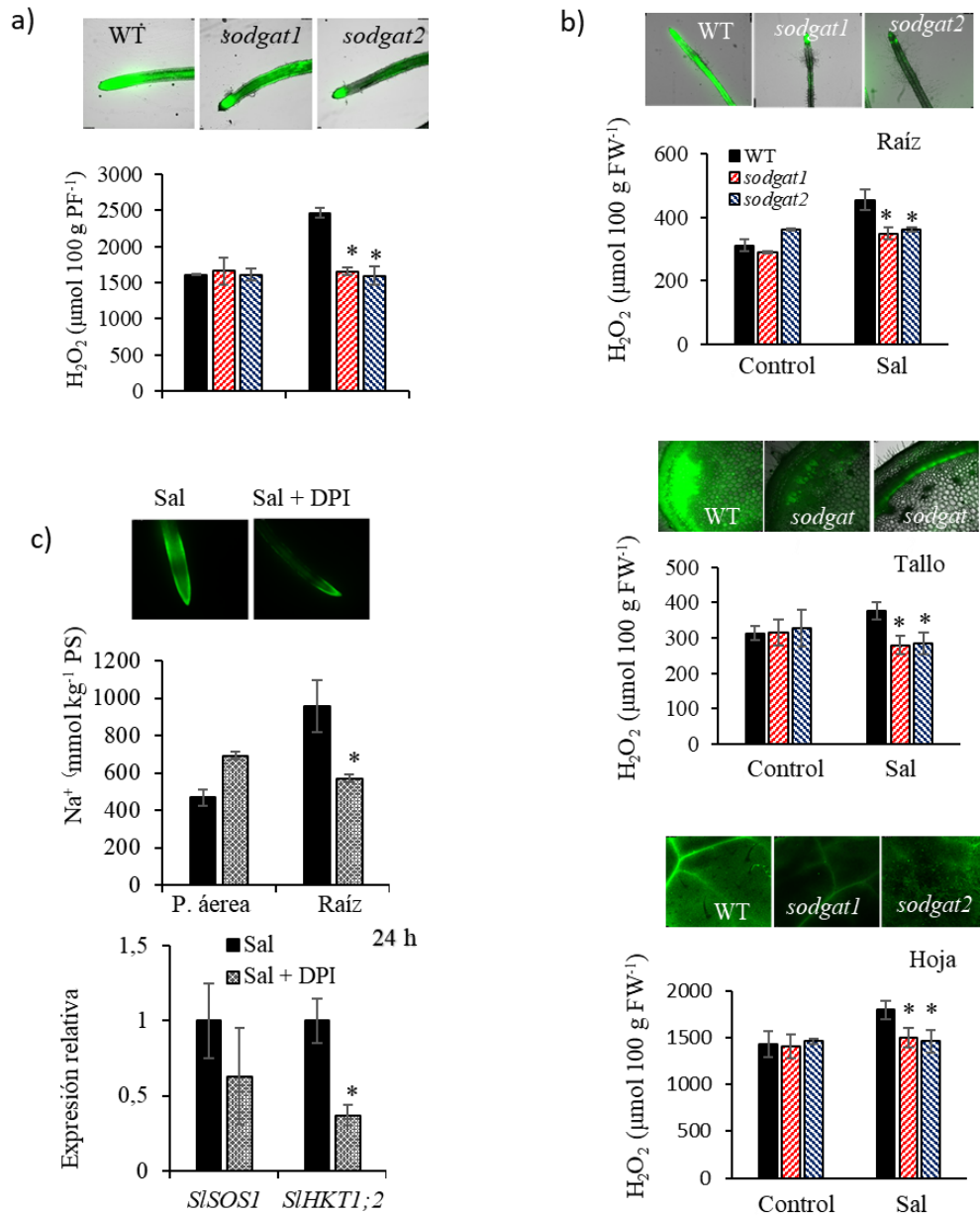


Figura 50. Producción de H₂O₂ en condiciones *in vitro* and *in vivo*. a) H₂O₂ analizado por microscopía y por espectrofotometría (e-FOX) en raíces de plantas WT y mutantes *sodgat1-2* en control y sal (75 mM NaCl) tras 15 DTS *in vitro*. b) Concentración de H₂O₂ en raíz, tallo y hoja adulta de plantas crecidas en cultivo hidropónico en control y sal (100 mM de NaCl) tras 7 DTS. c) Acumulación de H₂O₂ en raíz tras 1 DTS, concentraciones de Na⁺ en raíz y parte aérea tras 2 DTS y expresión relativa de *SISOS1* y *SIHKT1;2* en raíz tras 1 DTS en sal o sal + DPI de plantas crecidas en hidropónico. Valores promedio ± EE de 3 réplicas biológicas. Asteriscos indican diferencias significativas entre valores medios de WT y mutantes (Test t de Student, $p < 0.05$).

Seguidamente, se analizó la producción de H₂O₂ *in vivo* mediante microscopía, observando una mayor intensidad de fluorescencia en las plantas WT a los 2 DST, lo cual se corroboró cuando se midió el contenido de H₂O₂ por espectrofotometría a los 7 DST (Figura 50b). Así, la producción de H₂O₂ aumentó con la salinidad en raíz, tallo y hoja

de las plantas WT pero no en los mutantes *sodgat1-2*, que mantenían niveles similares en control y sal. Considerados en conjunto, el aumento de la expresión de *SIRBOHG* está asociado con la acumulación de H₂O₂ en las plantas WT, y esta respuesta es similar tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

Para corroborar los resultados anteriores, se estudiaron los efectos del inhibidor de la NADPH oxidasa, DPI sobre la producción de H₂O₂ en raíces de plantas WT (**Figura 50c**). La fluorescencia de H₂O₂ fue menor en las raíces tratadas con sal + DPI que las tratadas solo con sal. En este ensayo, también se midieron los niveles de Na⁺ en parte aérea y raíz, observando un aumento en parte aérea con el tratamiento DPI junto a una disminución en raíces. Finalmente, se analizaron los niveles de transcritos de *SISOS1* y *SIHKT1;2* en raíces. Mientras que la expresión de *SISOS1* no cambiaba con el tratamiento DPI en raíz, el nivel de expresión de *SIHKT1;2* se redujo un 60 % en el tratamiento sal + DPI. Estos resultados sugieren que la inhibición de las NADPH oxidasas en las plantas de WT tratadas con sal tiene un efecto similar al de la interrupción del gen *SIRBOHG* en los mutantes *sodgat1-2*, ya que la reducción de H₂O₂ en la raíz se asocia con un mayor transporte de Na⁺ a la parte aérea a través de una expresión reducida de *SIHKT1;2*, el transportador que más se ve afectado por la anulación del gen.

3.3. Determinar el papel del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a la salinidad a lo largo del desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta

Una vez caracterizados los mutantes nulos para el gen *SIRBOHG* en ensayos a corto-medio plazo, la etapa siguiente era comprobar si este gen estaba implicado en la tolerancia a salinidad a largo plazo, es decir si era un gen clave no solo del desarrollo vegetativo sino también reproductivo.

Para comprobar cómo afectaba la disrupción del gen en el desarrollo vegetativo y reproductivo (desarrollo floral, fructificación y producción), se llevaron a cabo dos ensayos a largo plazo en el invernadero situado en la finca experimental del CEBAS (Santomera, Murcia), durante las campañas de primavera-verano. Dada la similitud de respuestas de los dos mutantes, los ensayos a largo plazo se llevaron a cabo con uno solo de ellos (*sodgat1*). Además, al tratarse de un invernadero de condiciones no controladas, los experimentos se realizaron en dos años diferentes (2020 y 2022) con el fin de obtener resultados concluyentes sobre el papel del gen a largo plazo.

Experimento 1

En un primer experimento se cultivaron plantas WT y *Sodgat1* en control y estrés salino (100 mM de NaCl) durante la primavera-verano de 2020. El tratamiento salino se inició cuando las plantas empezaban a desarrollar el primer racimo floral.

A nivel vegetativo, la primera diferencia fenotípica observada en el mutante, respecto a WT, fue una mayor altura de las plantas tanto en condiciones control como en estrés salino (**Figura 51a**). Esta característica no se había observado en ninguno de los experimentos

que se habían realizado previamente en condiciones controladas, por lo que se podía tratar de un efecto ambiental.

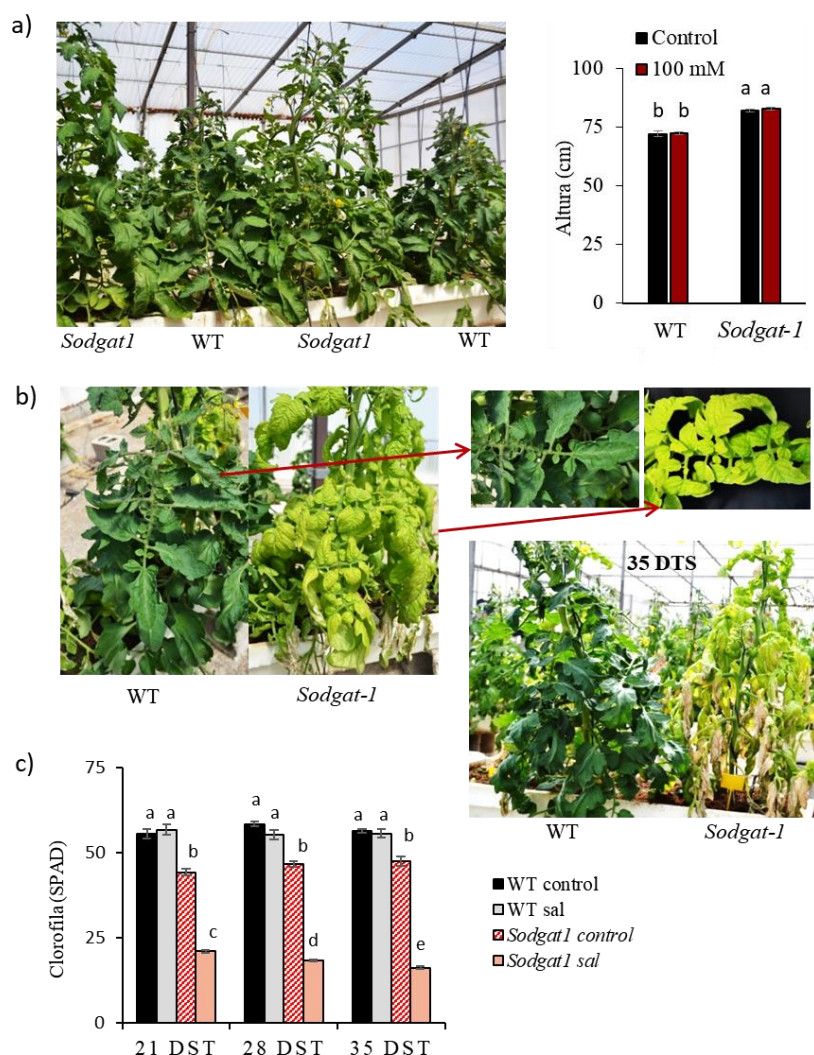


Figura 51. Fenotipo de las plantas de tomate (WT) y mutante *Sodgat1* desarrolladas en invernadero durante primavera-verano de 2020. a) La altura de las plantas era mayor en el mutante que en WT, tanto en control como a los 21 DTS (100 mM de NaCl). b) Imágenes de plantas WT y mutante *sodgat1* a los 21 y 35 DTS que muestran la clorosis provocada por la salinidad en la parte aérea, especialmente en hojas del mutante. c) Reducción del contenido de clorofila en el mutante *Sodgat1* a los 21, 28 y 35 DTS. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

En todos los experimentos a corto-medio plazo se había comprobado que el estrés salino causaba una elevada clorosis generalizada en la planta, y precisamente el carácter vegetativo más evidente en el mutante *sodgat1* era la clorosis provocada por la salinidad en la parte aérea. Este efecto era evidente desde los primeros días de aplicación del estrés, a pesar de que el tratamiento se iniciaba en plantas adultas (8 hojas verdaderas), y el alto grado de clorosis de las hojas del mutante se reflejaba en la disminución de los niveles de clorofila, mayores del 50% desde los 21 DTS (**Figura 51b, c**). Además, las hojas basales se deshidrataban antes en el mutante que en WT, encontrando en este primer experimento que a los 35 DTS las plantas *sodgat1* sometidas a 100 mM de NaCl ya presentaban casi

la mitad de las hojas basales senescentes e incluso necrosadas. Estos resultados demuestran que la sensibilidad a la sal del mutante se mantiene a largo plazo

Hasta ahora no se había estudiado el papel del gen en el desarrollo reproductivo en medio salino. Los primeros resultados obtenidos en este experimento sugieren que el gen *SIRBOHG* tiene un papel clave en el correcto desarrollo reproductivo en condiciones de salinidad, ya que su disrupción provocaba una alta tasa de abscisión floral en el mutante *sodgat1*, como se observa en las imágenes del mutante tan solo a los 28 DTS (**Figura 52a**).

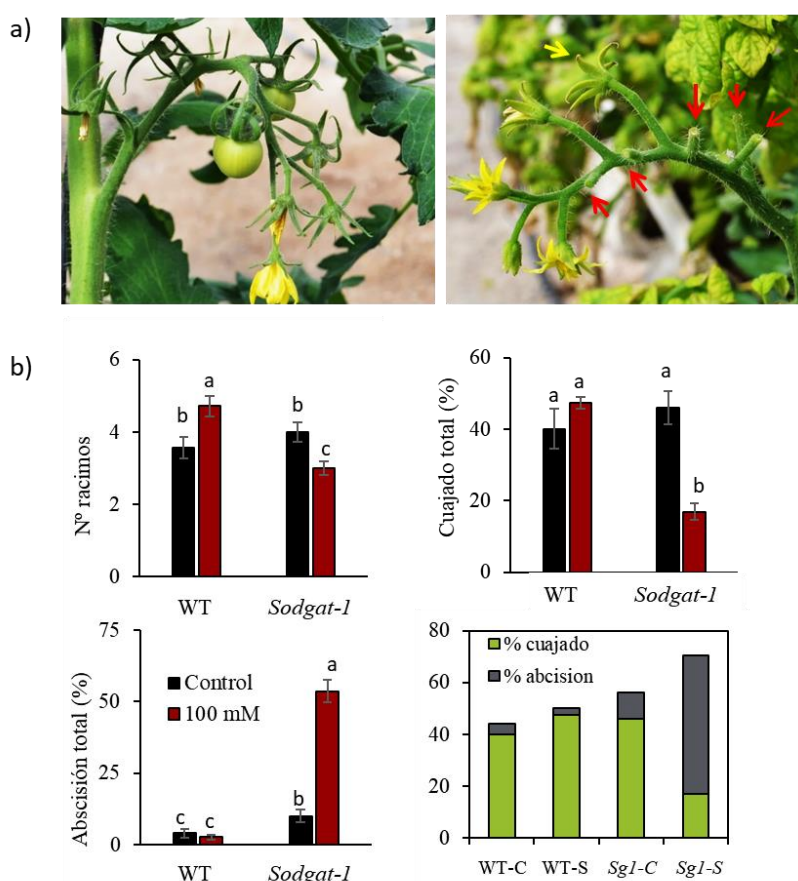


Figura 52. A nivel reproductivo, la sensibilidad a la sal del mutante *sodgat1* se refleja principalmente en el alto porcentaje de abscisión de los frutos, lo que provoca indirectamente la reducción del cuajado del fruto. a) Imágenes representativas de los racimos florales de WT y *sodgat1* a los 28 días de tratamiento salino (DTS, 100 mM de NaCl) de las plantas desarrolladas en invernadero durante primavera-verano de 2020. b) Al final del experimento (50 DTS), número de racimos con frutos en desarrollo, y porcentajes de cuajado del fruto y abscisión en WT y *sodgat1*. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

A pesar de que WT podía haber seguido desarrollándose y el fruto aún no había cuajado en gran parte de las flores, hubo que finalizar el experimento a los 50 DTS debido a que las plantas del estaban muy senescentes e incluso muertas. Para cuantificar el efecto provocado por la salinidad, al final del experimento (50 DTS) se realizó el conteo del número de racimos con algún fruto en desarrollo, y porcentajes de cuajado del fruto y abscisión en WT y *sodgat1* desarrolladas en control y sal (**Figura 52b**). Los bajos valores

de cuajado en WT no se deben a un mal desarrollo de estas plantas, sino son una consecuencia del elevado número de flores en las que aún no había cuajado el fruto por estar en preantesis o antesis.

El efecto más significativo provocado por la salinidad en las flores del mutante *sodgat1* fue el alto porcentaje de abscisión (> 50%), mientras que WT apenas presentó abscisión con un porcentaje inferior al 4% tanto en control como en salinidad. Además, el alto porcentaje de abscisión de las flores del mutante provocaba indirectamente la reducción del cuajado del fruto. Estos resultados en conjunto sugieren un importante papel del gen *SIRBOHG* en el desarrollo reproductivo, evitando la abscisión floral en condiciones de estrés salino.

Experimento 2

En el diseño de este nuevo experimento se tuvo en cuenta la alta sensibilidad a la sal mostrada por el mutante en el primer experimento al aplicar una concentración salina 100 mM de NaCl, lo que llevó a finalizar el experimento a los 50 DTS por la muerte de las plantas antes de poder controlar la producción. En el nuevo experimento realizado en el mismo invernadero y en la misma época de cultivo, se aplicó el mismo nivel salino (100 mM NaCl) con objeto de poder comparar los resultados de ambos experimentos y además un nivel intermedio de sal (50 mM de NaCl) que permitiera analizar los efectos sobre el rendimiento en fruto.

Además de analizar los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo, en este ensayo también se estudió la respuesta de las plantas a diferentes niveles, morfológico, fisiológico, hormonal y metabólico, con objeto de profundizar en los mecanismos de tolerancia inducidos por el gen *SIRBOHG* en tomate.

3.3.1. Efectos en el desarrollo vegetativo inducidos por la anulación del gen *SIRBOHG*

En primer lugar, se realizó un fenotipado de las plantas al inicio del experimento, desde que fueron trasplantadas al invernadero hasta el inicio del tratamiento salino (**Figura 53**). En este periodo de tiempo (desde el 2 de marzo hasta 23 de marzo de 2022) se observó que las plantas del mutante presentaban mayor altura que WT (**Figura 53b, c**). En la figura se representan por separado los tres lotes de plantas que estaba previsto utilizar para cada tratamiento (control y dos niveles salinos), donde se observa la homogeneidad de estos. En cuanto al resto de caracteres no había diferencias significativas entre las plantas WT y mutantes (**Figura 53d**). En el momento de aplicar los tratamientos, todas ellas habían desarrollado alrededor de 9 hojas, un primer racimo y algunas estaban comenzando a desarrollar el segundo, con una media de 6 flores, lo que demuestra que las plantas ya habían comenzado el desarrollo reproductivo cuando se aplicaron los tratamientos salinos.

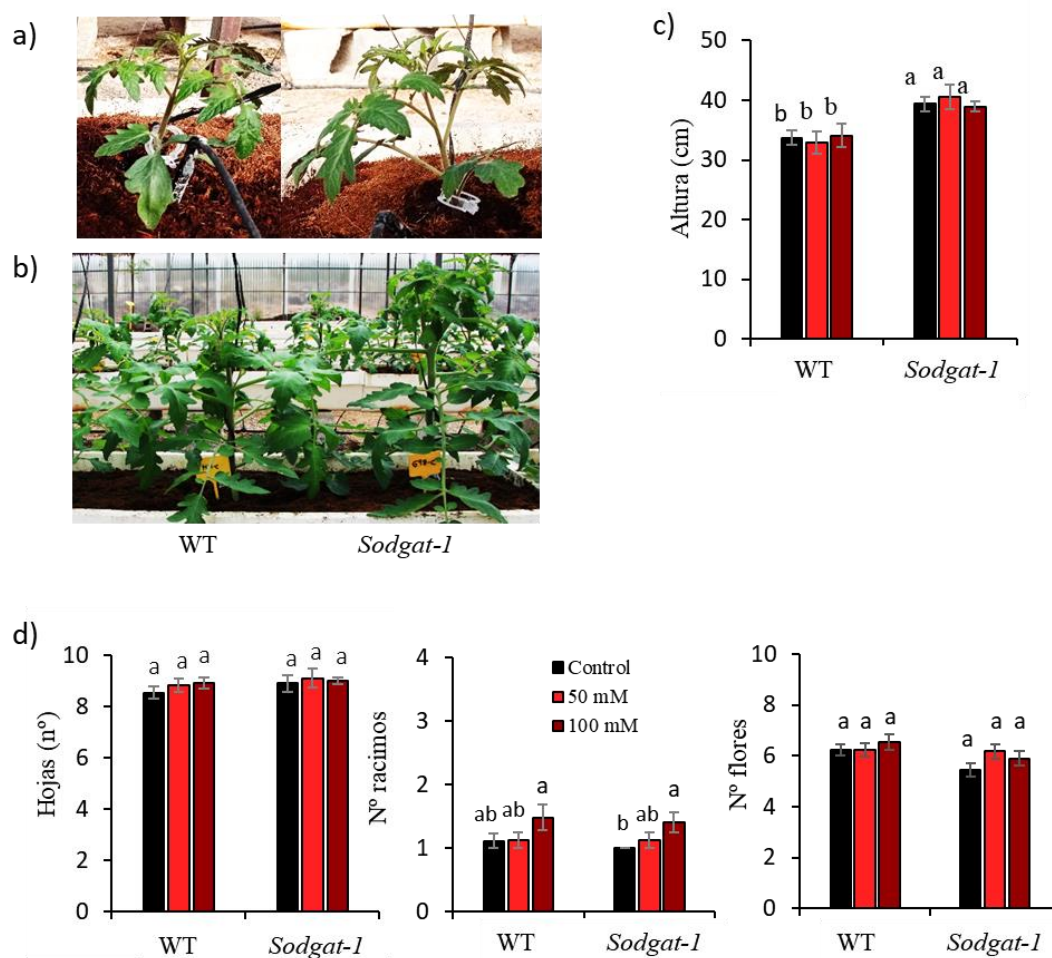
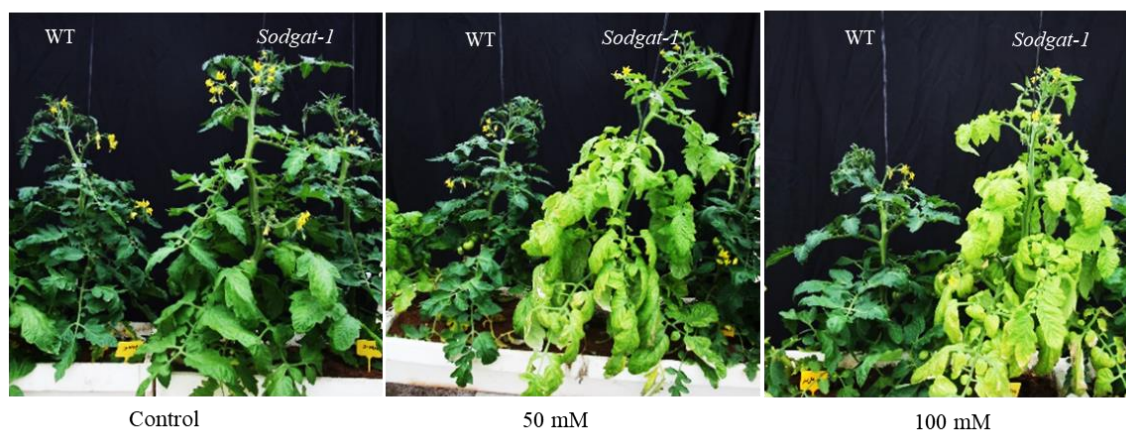


Figura 53. Fenotipo y estado de desarrollo de las plantas WT y mutante *sodgat1* cuando se trasplantan a invernadero y se inicia la aplicación de los tratamientos salinos durante primavera-verano de 2022. a) Fotos representativas en el trasplante y b) al inicio del tratamiento salino (0 DTS), c) altura y d) racimos, hojas y flores (n°) de plantas WT y *sodgat1* en condiciones control. En cada gráfico se representan por separado por separado los tres lotes de plantas a utilizar para cada tratamiento (control y dos niveles salinos: 50 y 100 mM de NaCl). Valores medios \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$)

Las plantas del mutante *sodgat1* presentaban el mismo fenotipo característico observado tanto en ensayos a corto-medio plazo como en el primer experimento a largo plazo: La salinidad inducía una clorosis generalizada de todos los tejidos fotosintéticos en el mutante con respecto a WT. Además, al utilizar los dos niveles de estrés (50 y 100 mM NaCl), se pudo observar que el fenotipo del mutante era más acentuado cuanto mayor era el estrés salino, tal como se observó a los 30 DTS (**Figura 54a**). Esta clorosis se reflejó en los niveles de clorofila (SPAD) y fluorescencia del fotosistema II (Fv/fm) (**Figura 54b**). WT no presentaba diferencias significativas en ninguno de ellos entre control y los dos niveles de salinidad, mientras que tanto clorofila como Fv/fm se redujeron significativamente en *sodgat1* con respecto a WT. La reducción inducida por la salinidad fue notablemente superior a 100 que a 50 mM NaCl, lo que sugiere que el nivel alto de sal es un nivel letal para la planta del mutante como habíamos observado en el primer experimento. Curiosamente, el mutante también reducía la clorofila y Fv/fm respecto a

WT en control, lo que puede estar relacionado con las condiciones ambientales del invernadero.

a)



b)

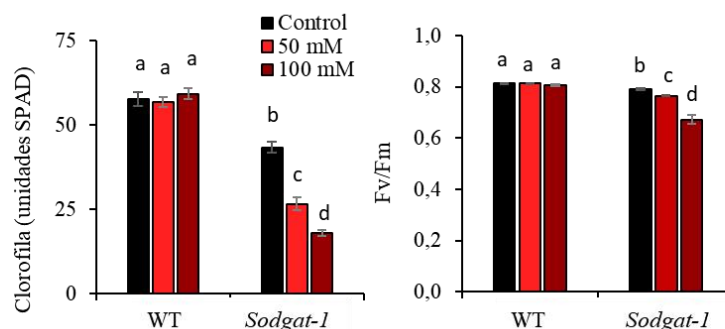


Figura 54. La clorosis inducida por la salinidad en el mutante *sodgat1* se incrementa con el nivel de estrés salino. a) Fenotipo de las plantas y b) niveles de clorofila y fluorescencia a los 30 días de tratamiento salino (DTS) de plantas WT y mutante *sodgat1* cultivadas en invernadero durante primavera-verano de 2022, en condiciones control y dos niveles de salinidad (50 y 100 mM NaCl). Valores medios \pm EE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Al aumentar el periodo de tratamiento (50 DTS), el fenotipo del mutante era más acentuado, con la mayor parte de las hojas basales senescentes, especialmente las desarrolladas a 100 mM NaCl (**Figura 55a**).

Aunque las plantas WT también mostraban fenotipos asociados a los síntomas provocados por el estrés salino, estos eran mucho menores y las plantas podían seguir desarrollándose, a diferencia del mutante sobre todo para el nivel alto de salinidad. A los 50 DTS, se llevó a cabo un análisis del desarrollo vegetativo más exhaustivo midiendo la altura de la planta y la distancia entre los nudos de las hojas y se contó el número de hojas (**Figura 55b**). No había diferencias en el número de hojas, pues todas las plantas presentaban alrededor de 20 hojas, mientras que sí que hubo diferencia significativa en la altura, donde el mutante presentaba una mayor altura que WT, independientemente del tratamiento. Estos resultados corroboran los obtenidos en el primer experimento (**Figura 51a**). Además, en este 2º experimento se comprobó que la mayor altura del mutante se debía a la mayor distancia de entrenudos y no al mayor número de hojas (**Figura 55b**).

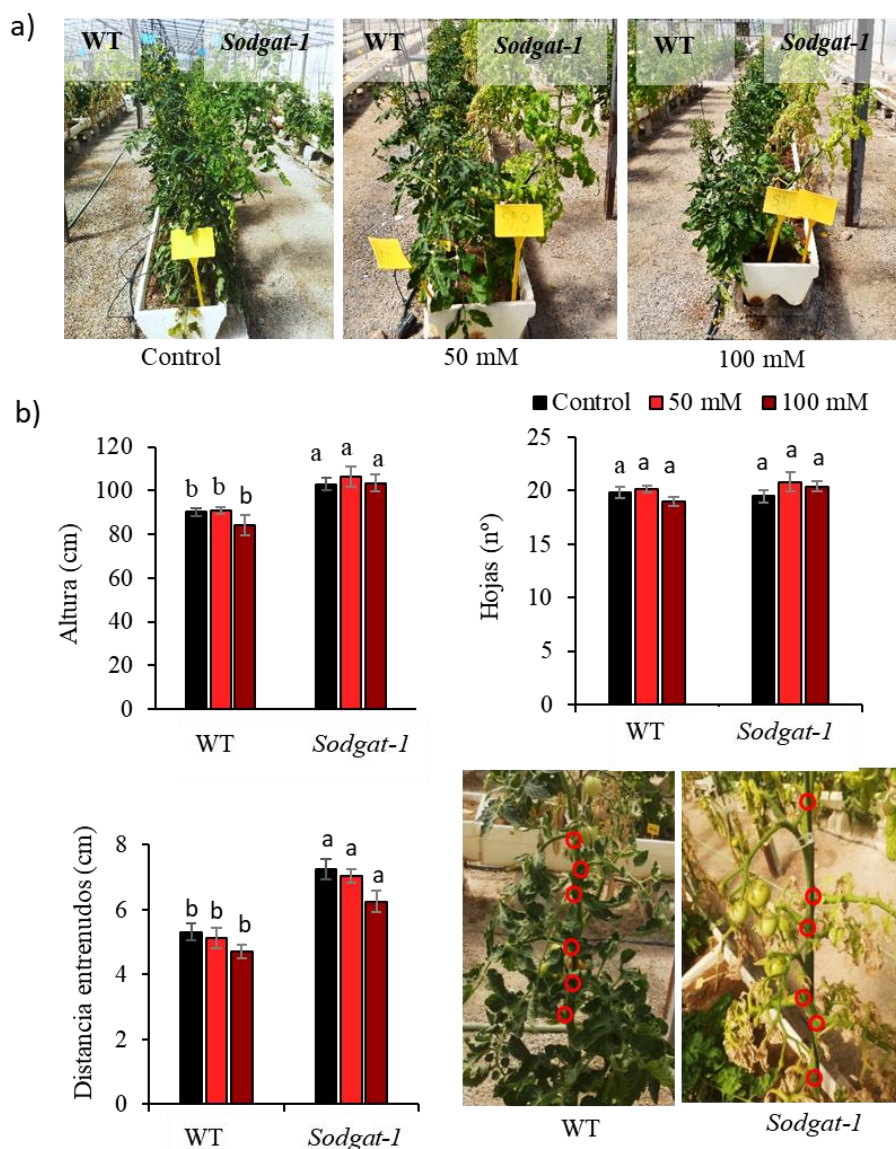


Figura 55. A nivel vegetativo, la mayor altura del mutante se debe a la mayor distancia entrenudos y no al mayor n° de hojas. a) Fotos representativas del fenotipo de las plantas y b) valores de altura, n° de hojas y distancia entrenudos de plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas en invernadero en condiciones control y dos niveles de salinidad (50 y 100 mM NaCl) durante 50 días (DTS). A la derecha, imágenes representativas de 6 entrenudos en plantas WT y mutante. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Considerados en conjunto, los resultados demuestran, en primer lugar, la mayor altura de las plantas provocada por la anulación del gen *SIRBOHG* en tomate, característica que hasta ahora no se había detectado en ninguno de los estudios anteriores dirigidos a dilucidar el papel de este gen en tomate. Desde el punto de vista del papel del gen en la tolerancia a la salinidad, el resultado más interesante es que el mutante mantiene la alta sensibilidad a la sal a largo plazo, es decir se puede concluir que *SIRBOHG* es un gen clave en la tolerancia del tomate a la salinidad a lo largo del ciclo de la planta y, por tanto, su anulación debe provocar importantes efectos en el desarrollo reproductivo.

3.3.2. Efectos en el desarrollo reproductivo inducidos por la anulación del gen *SIRBOHG*

Desarrollo floral: Zona de abscisión del pedicelo

No se observaron diferencias significativas en el número de racimos florales ni en el número de flores entre WT y *sodgat1*, ni en control ni en salinidad a los 50 DTS (**Tabla 19**), pero si en el fenotipo de la flor. En WT, el fenotipo de la flor en antesis, post-antesis o fruto recién cuajado no se veía afectado por la salinidad, ni a 50 ni a 100 mM NaCl, como se observa en las imágenes representativas a los 40 DTS (**Figura 56**). Sin embargo, el estrés salino afectaba a la morfología de las flores del mutante, presentando estas un mayor grado de clorosis en sépalos y pedicelos (órganos verdes de la flor) que era más marcado al aumentar el nivel de estrés, e incluso las puntas de los sépalos se atrofiaban. Otra alteración provocada por la salinidad en el fenotipo de las flores del mutante era que la parte superior de los estambres se necrosaban, especialmente a 100 mM NaCl (**Figura 56**).

Tabla 19. Número de racimos y de flores de WT y mutante *sodgat1* a los 50 días

	Nº racimos		Nº flores	
	WT	<i>sodgat1</i>	WT	<i>sodgat1</i>
Control	5.7 ± 0.33	5.6 ± 0.18	54.6 ± 8.4	51.0 ± 10.1
50 mM	6.0 ± 0.26	6.2 ± 0.20	49.0 ± 5.8	45.2 ± 6.8
100 mM	5.8 ± 0.20	6.0 ± 0.32	43.7 ± 7.9	39.0 ± 4.3

Además del mayor grado de clorosis provocado por la salinidad en los pedicelos del mutante, también se observaron cambios en su morfología. El primer cambio observado fue el mayor grosor de los pedicelos del mutante respecto a WT, efecto que se observaba visualmente tanto en flores intactas, como al cortarlas longitudinalmente y era independiente de la salinidad, ya que se observaba tanto en control como en estrés (**Figura 57a**). El cambio inducido por la salinidad parecía ser el mayor engrosamiento de los sépalos en el mutante que en WT, señalados con flechas rojas en las imágenes representativas (**Figura 57a**), aunque no se llevó a cabo una medida cuantitativa del grosor de los mismos. También se observó que el ovario de la flor estaba más clorótico y engrosado en el mutante, especialmente en el nivel más alto de salinidad. En resumen, la morfología floral del mutante *sodgat1* mostraba importantes alteraciones con la salinidad, como mayor clorosis en sépalos, ovario y pedicelos y necrosis en los estambres, así como un mayor grosor del pedicelo.



Figura 56. Las flores del mutante *sodgat1* muestran mayor grado de clorosis e incluso quemaduras en algunos órganos debido a la salinidad. Imágenes representativas de flores WT y *sodgat1* a los 40 DTS. En cada imagen se representan flores en antesis (arriba izquierda), postantesis (arriba derecha) y frutos recién cuajados (abajo). Flechas rojas indican zonas quemadas del mutante *sodgat1* en sépalos y estambres en condiciones de salinidad (50 y 100 mM de NaCl). Abajo, detalle de las quemaduras provocadas por la salinidad señaladas con flechas blancas.

Dentro del pedicelo, los cambios inducidos por la salinidad tenían lugar en la zona de abscisión (ZA). Esta comenzaba a hacerse mucho más marcada y evidente que en WT hasta que la parte proximal de la flor se atrofiaba y estaba a punto de desprenderse de la parte distal, como se observa en las imágenes representativas a 100 mM NaCl (**Figura 57b**). A partir de este momento, la abscisión se producía muy fácilmente a veces con tan solo rozar la flor, y cuando la abscisión no llegaba a producirse la parte distal de la flor acababa atrofiada y se secaba, como se observa en detalle en la **Figura 57b**.

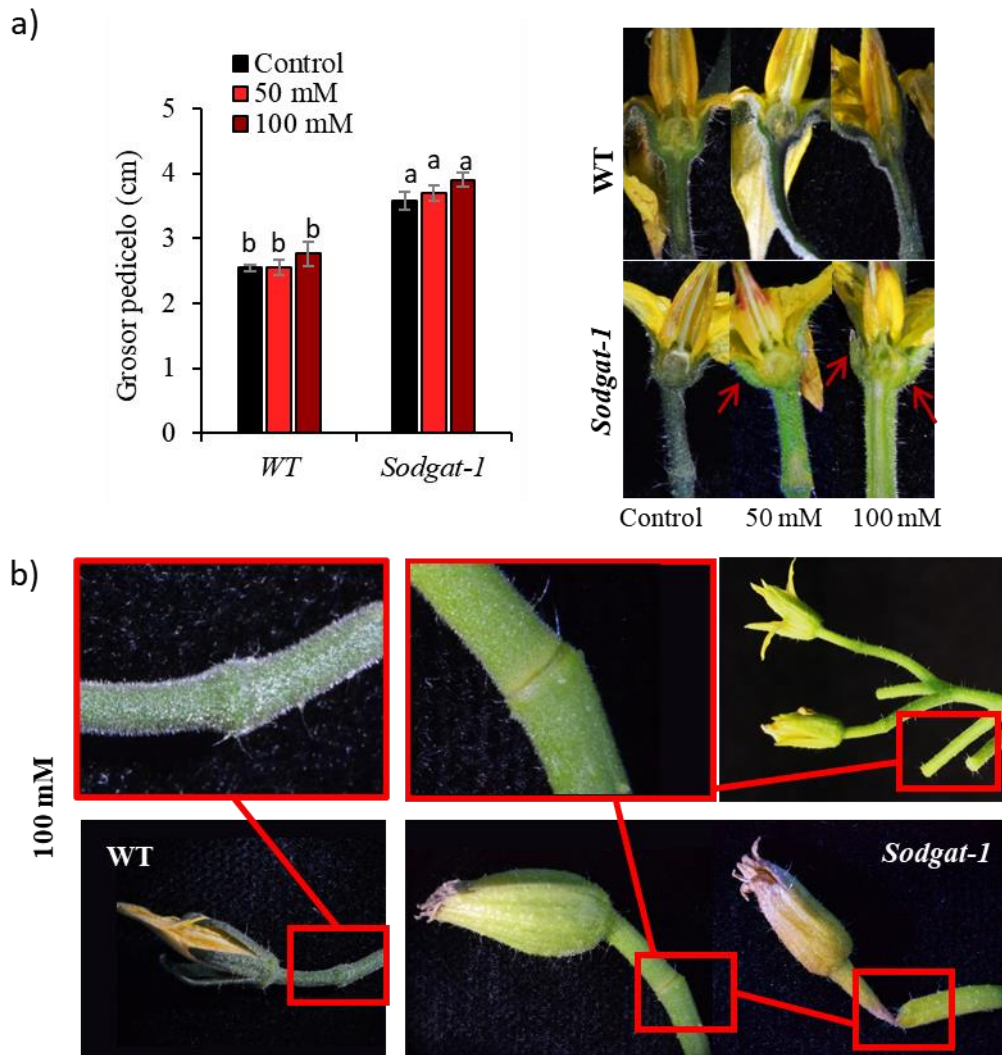


Figura 57. Las flores del mutante *sodgat1* muestran cambios en el pedicelo de la flor y en la zona de abscisión provocados por la salinidad. a) Grosor del pedicelo e imágenes representativas de flores WT y *sodgat1* cortadas longitudinalmente tras 40 DTS cultivadas en invernadero en condiciones control y dos niveles de salinidad (50 y 100 mM de NaCl). b) Imágenes representativas de la zona de abscisión (ZA) en las plantas WT y *sodgat1* tras 40 DTS a 100 mM de NaCl. A la derecha, detalle de los efectos provocados por la salinidad en el mutante, caída de la flor o atrofia de la parte distal de la ZA. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Para observar los cambios a nivel celular en la ZA, se prepararon semifinos de cortes longitudinales del pedicelo floral por la ZA de las flores en postantesis (**Figura 58**). En control, no se observaron diferencias entre la morfología celular de WT y mutante. Sin embargo, a 50 mM de NaCl se observó una degradación de la estructura celular en las células centrales inmediatas a la ZA por la parte distal, y a 100 mM de NaCl la ruptura de las células era generalizada en ambos lados de la ZA, mientras que se encontraban intactas en WT independientemente del tratamiento salino (señalado con flechas rojas en **Figura 58**). En resumen, los cambios en la ZA de las flores del mutante *sodgat1* se deben a una degradación celular inducida por la salinidad.

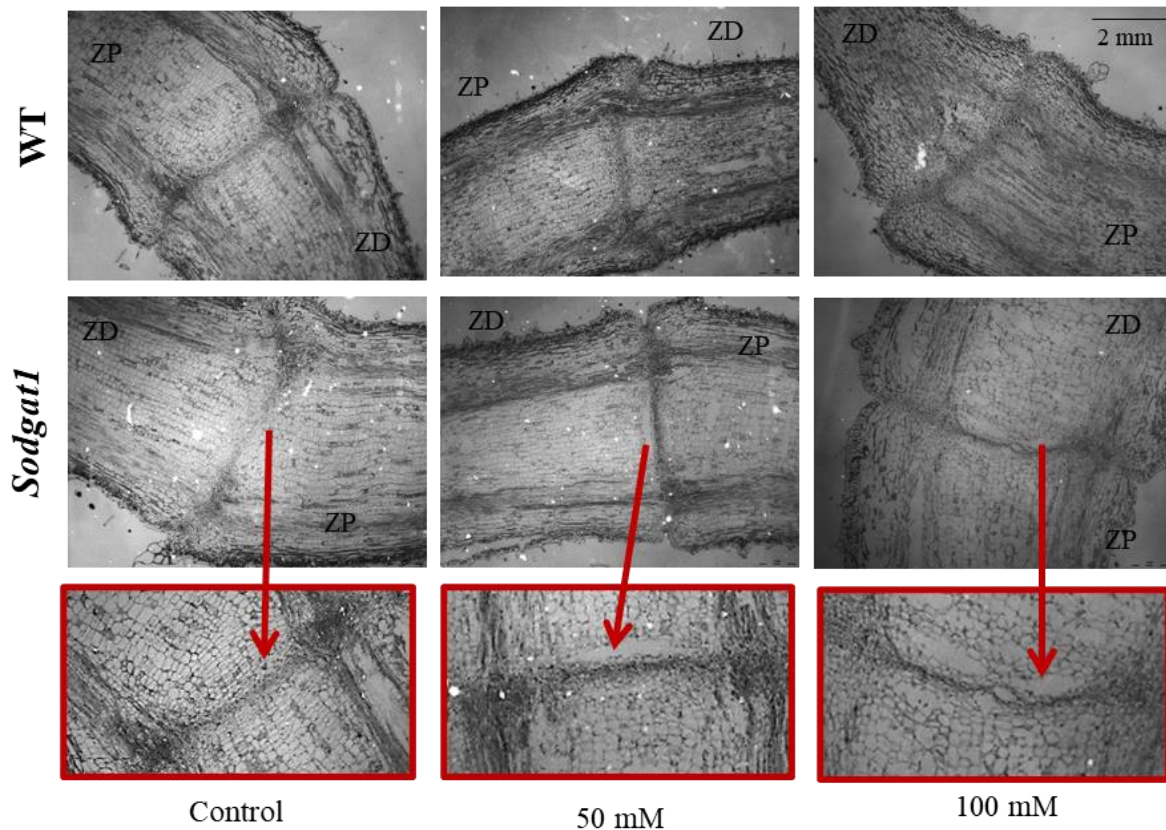


Figura 58. Los cambios en la zona de abscisión de las flores del mutante *sodgat1* se deben a una degradación celular en la parte distal inducida por la salinidad. Micrografías de preparaciones microscópicas de la ZA de flores en postantesis de plantas WT y mutante *sodgat1* cultivadas en invernadero a 0, 50 y 100 mM de NaCl durante 50 días (DTS) observadas a 10X.

Abscisión y cuajado del fruto

En este experimento se controló individualmente el porcentaje de abscisión de flores para cada uno de los 4 primeros racimos (hasta los 50 DTS). Se consideró interesante el control por racimos debido a que los tratamientos salinos se iniciaron cuando el primer racimo había aparecido en todas las plantas (ver Figura 12 donde se describe el estado de desarrollo de las plantas) y por tanto el efecto de la salinidad podía ser diferente debido a los diferentes tiempos de tratamiento salino de los racimos florales. Así, es conocido que, en las variedades de tomate de desarrollo indeterminado, como es el cv. Moneymaker, los efectos de la sal pueden variar para cada racimo, siendo mayores en los racimos superiores, desarrollados posteriormente y sujetos a mayores periodos de estrés salino que los más jóvenes (en los que la aparición de los frutos se da a menor tiempo de exposición al estrés).

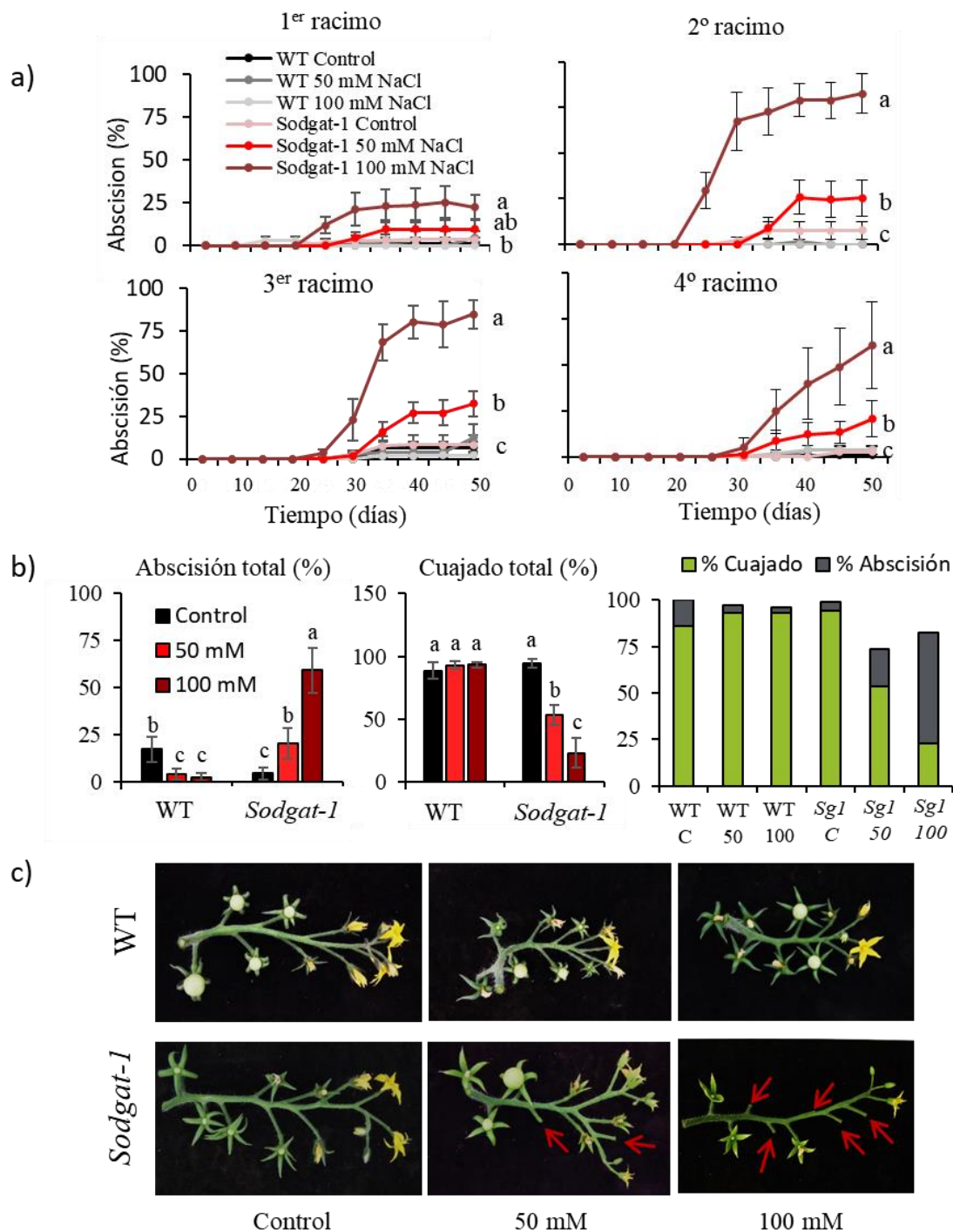


Figura 59. A nivel reproductivo, el principal efecto inducido por la salinidad en el mutante *sodgat1* es la elevada abscisión de las flores. a) Se representa la abscisión floral individualizada para los 4 primeros racimos a lo largo del periodo de tratamiento salino de plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas en invernadero a 0, 50 y 100 mM NaCl durante 50 días (DTS). b) Imágenes representativas del 2^o racimo floral de plantas WT y *sodgat1*. c) Abscisión total y cuajado total acumulado en los 4 racimos anteriores. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

En WT, los porcentajes de abscisión de flores (AF) fueron prácticamente nulos tanto en control como en los dos tratamientos salinos para cada uno de los 4 racimos (**Figura 59a**). Una respuesta bastante similar se obtuvo para el mutante *sodgat1* en control, con

porcentajes de AF que no mostraban diferencias significativas con WT. Sin embargo, la salinidad provocaba importante AF en el mutante, aunque había diferencias entre los racimos. Como se esperaba, el menor efecto tuvo lugar en el primer racimo, donde solo incrementó significativamente respecto al control en las plantas desarrolladas a 100 mM NaCl durante 50 DTS (25% AF), mientras que a 50 mM incrementaba hasta un 10% pero las diferencias con el control no llegaban a ser significativas (**Figura 59a**). Como se indicaba anteriormente, este menor efecto era sin duda debido al menor tiempo de exposición al tratamiento salino hasta el cuajado del fruto. En los dos racimos centrales (2° y 3°) la respuesta era idéntica, con porcentajes de AF del 25% a salinidad moderada y del 80 % en el nivel alto de salinidad, siendo la única diferencia el adelanto temporal de la curva acumulada de la AF en el 2° racimo para 100 mM NaCl, adelanto que no llegó a observarse a 50 mM NaCl. En la **Figura 59b** se muestran imágenes representativas del 2° racimo floral de plantas WT y *sodgat1* en control y sal. La tendencia en el 4° racimo es similar a la de los anteriores, aunque las curvas están retrasadas temporalmente como consecuencia del desarrollo posterior del racimo. Así, a los 40 DTS solo se alcanzaba un 40% AF en el 4° racimo a 100 mM NaCl, mientras que a este tiempo ya se había alcanzado el máximo (80%) en el racimo anterior.

Considerados en conjunto los 4 racimos, el porcentaje de AF alcanzó un valor próximo al 60% en las plantas del mutante desarrolladas a 100 mM NaCl, y en el nivel salino inferior (50 mM) el porcentaje no llegó al 20% (**Figura 59c**), lo que demuestra que el efecto no es proporcional al nivel de estrés. Esto puede ser debido a que los efectos predominantes pueden ser diferentes a moderado (50 mM NaCl) y alto (100 mM NaCl) nivel de estrés, pudiendo predominar el efecto osmótico a nivel moderado y el tóxico provocado por la acumulación de Na⁺ a nivel alto de salinidad

En cuanto al porcentaje total de cuajado en los cuatro primeros racimos, no se observaron diferencias significativas entre WT (en control o salinidad) y *sodgat1* en control y 50 mM de NaCl. Sin embargo, para el nivel superior de estrés (100 mM), *sodgat1* también reducía el porcentaje de cuajado hasta un 40% (**Figura 59c**). En resumen, las plantas del mutante desarrolladas a 100 mM NaCl no llegaban a producir debido principalmente a la elevada abscisión de las flores, pero también al menor cuajado de los frutos, lo que podría estar relacionado con la calidad o cantidad de polen de la flor.

Fructificación y rendimiento en fruto

El proceso de fructificación solo se pudo evaluar en las plantas desarrolladas en control y en el nivel moderado de sal (50 mM NaCl) ya que en el nivel más alto (100 mM) no se llegaron a obtener suficientes frutos por planta.

Un efecto observado en los dos primeros racimos que habían completado el proceso de maduración fue el adelanto de la misma en los frutos del mutante *sodgat1* desarrollados en sal (**Figura 60**). Así, al representar la distribución de frutos verdes (incluidos frutos de color verde intenso y *breaker*), naranjas y rojos entre 50 y 60 DTS, se observa que el porcentaje de frutos en maduración (naranjas y rojos) del mutante es más elevado al de

WT teniendo en cuenta el porcentaje total de frutos presentes. A los 60 DTS, el porcentaje de frutos en maduración en WT no llega al 30% en el 2º racimo a 50 mM de NaCl, mientras que en el mutante alcanza un 30% respecto al 40% de máxima producción alcanzada en el mutante, como además se observa en las imágenes representativas (Figura 60).

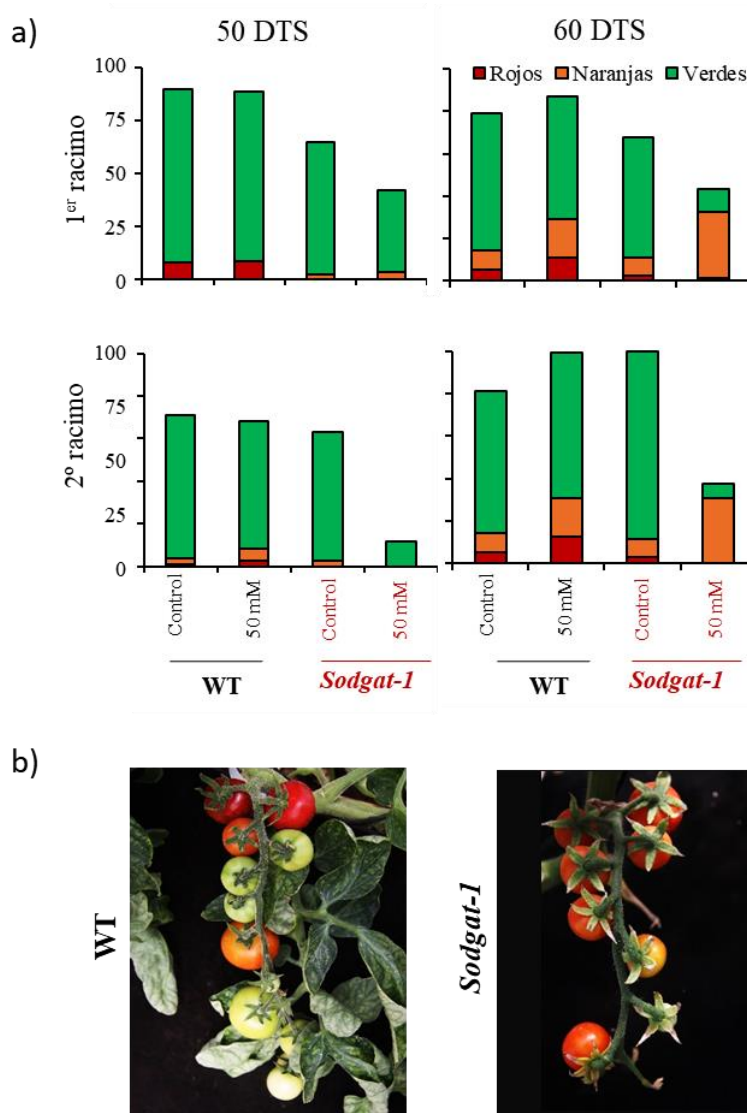


Figura 60. La salinidad induce un adelanto de la maduración en los frutos del mutante *sodgat1*. a) Se representa la distribución de frutos verdes (incluidos frutos de color verde intenso y breaker), naranjas y rojos en los dos primeros racimos que habían completado el proceso de maduración de plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas en invernadero a 0 y 50 mM de NaCl durante 60 DTS. b) Imágenes representativas del 2º racimo floral a los 60 DTS.

En cuanto al rendimiento en fruto, se llevó a cabo el recuento individualizado por racimos. En primer lugar, es de destacar el elevado número de frutos verdes en el 4º racimo de las plantas WT, tanto en control como a 50 mM NaCl, y los bajos valores en el mutante. Pero esta situación no se invierte en los frutos rojos, de modo que la producción va aumentando en los racimos de WT y disminuyendo en el mutante (Figura 61a). Mientras que WT no reducía el rendimiento en fruto con la salinidad, en el mutante se observó una reducción

significativa respecto a WT incluso en las plantas desarrolladas en control (50%), pero la disminución de rendimiento era mucho mayor en medio salino, donde se alcanzaba una reducción del 80% respecto a WT en control (**Figura 61b**).

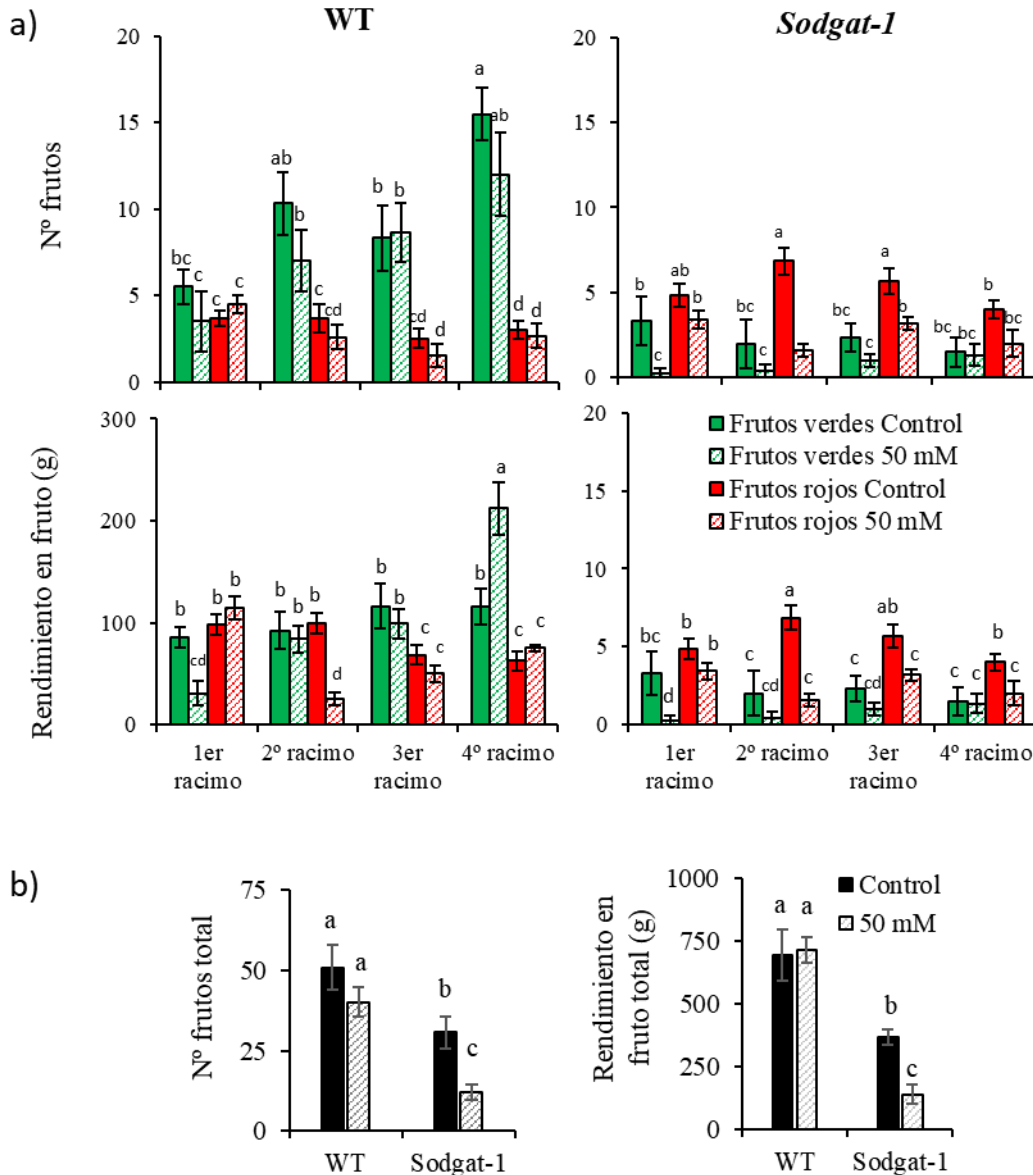


Figura 61. El mutante *sodgat1* reduce el rendimiento en fruto. a) Valores de número de frutos y rendimiento en fruto para los 4 primeros racimos y b) valores totales de los mismos de plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas en invernadero a 0 y 50 mM NaCl durante 60 DTS. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Finalmente, se midió la resistencia a la compresión de una muestra representativa ($n=15$) de los frutos WT y *sodgat1* en condiciones control y 50 mM de NaCl que se habían dejado madurar en la planta durante un periodo mayor de tiempo (80 DTS). Es interesante este nuevo resultado que demuestra que la resistencia a la compresión del fruto es menor en el mutante *sodgat1* en condiciones de salinidad, mientras que en control no presentaba diferencias con WT. Esto se veía reflejado en el aspecto de los frutos del mutante en salinidad (**Figura 62**).

En resumen, el mutante ya reducía su rendimiento en fruto respecto a WT en condiciones control, y este efecto negativo era mucho mayor por efecto de la salinidad donde la reducción en el mutante llegaba al 60% en sal respecto al control, siendo la componente afectada el número de frutos. Esto puede ser debido en parte a la abscisión de las flores y reducción del cuajado del fruto provocados por la salinidad en el mutante, pero otros procesos deben estar también alterados por la disrupción del gen *SIRBOHG* y que se ven reflejados en el rendimiento en fruto en condiciones control.

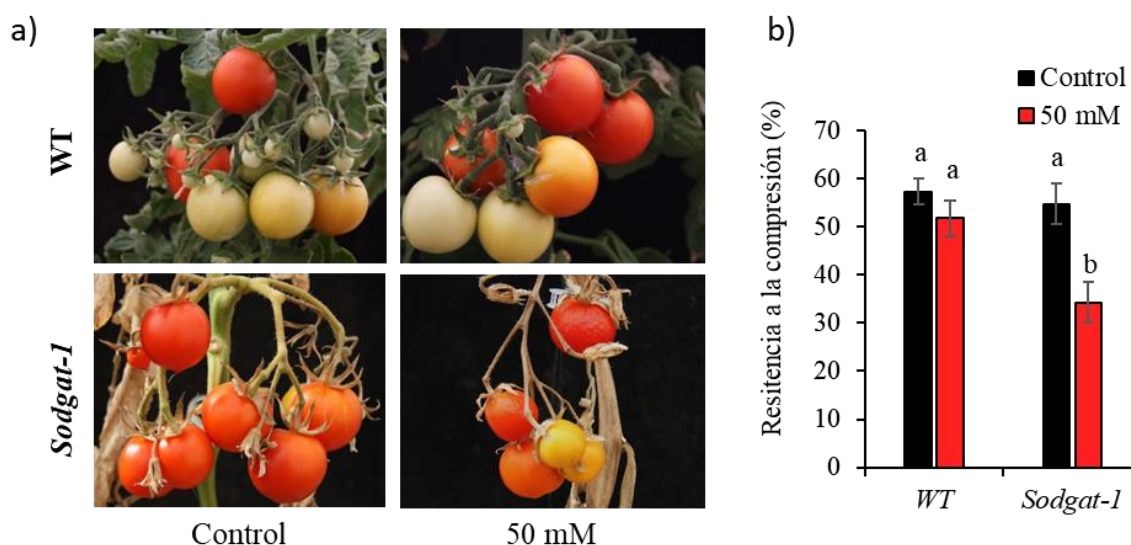


Figura 62. La resistencia a la compresión es menor en el mutante *sodgat1* en condiciones de salinidad. a) Imágenes representativas y b) resistencia a la compresión de frutos de plantas WT y *sodgat1* desarrolladas en condiciones control y 50 mM de NaCl que se han dejado madurar durante más tiempo en la planta (80 DTS). Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

3.3.3. Influencia de las condiciones ambientales

Para estudiar la respuesta a largo plazo de plantas que tienen anulado el gen *SIRBOHG* se ha utilizado el invernadero de condiciones no controladas (NC), situado en la finca experimental del CEBAS (Santomera, Murcia). Es conocido que la respuesta de las plantas puede variar con las condiciones ambientales. Con el fin de conocer la influencia de las condiciones ambientales en la respuesta de las plantas, los ensayos se realizaron en dos años diferentes (2020 y 2022) pero en la misma época de cultivo (primavera-verano) de modo que las diferencias entre temperatura, humedad y luminosidad fueran mínimas, y el cultivo se realizó en condiciones similares.

Un factor que puede influir en la respuesta del mutante a largo plazo puede ser la temperatura (T^a) alcanzada dentro del invernadero durante el desarrollo de las plantas y especialmente durante el periodo de fructificación. También influye la humedad (H) dentro del invernadero puesto que puede afectar a la transpiración y, por tanto, al transporte de Na^+ hasta las hojas. Por estas razones, se consideró interesante realizar un nuevo experimento en un invernadero de condiciones climáticas semi-controladas (SC),

disponible en los servicios de la UM, y los resultados se han comparado con los obtenidos en el mismo año y época de cultivo con el invernadero de condiciones NC del CEBAS.

En definitiva, pretendemos abordar dos aspectos diferentes y necesarios para dar solidez a los resultados dirigidos a dilucidar el papel del gen *SIRBOHG* en tomate: estudiar la influencia de diferentes años de cultivo por un lado y, por otro, de diferentes tipos de invernadero.

Respuesta comparativa de plantas desarrolladas en control y sal (100 mM NaCl) en invernadero de condiciones no-controladas durante diferentes años de cultivo

En la **Figura 63** se presentan las evoluciones de T^a y H en el invernadero de condiciones NC del CEBAS durante el cultivo de las plantas en 2020 y 2022. Se han separado tres fases: 1º) Desde trasplante al inicio del tratamiento salino, 2º) Periodo de tratamiento salino antes de empezar la recogida de cosecha, 3º) Periodo de recogida de cosecha. Como se puede comprobar, los valores medios de T^a eran prácticamente idénticos en las distintas etapas de los cultivos y las diferencias de H eran relativamente pequeñas y, por tanto, no deberían afectar *a priori* a los resultados de ambos cultivos (**Figura 63**).

Para comprobar si había diferencias entre los dos años de cultivo, se realizó un análisis estadístico (análisis multivariante univariado) considerando los tres efectos principales: genotipo, tratamiento y año de cultivo, así como las interacciones. A nivel vegetativo, se seleccionó el nivel de clorofila de hoja, por ser la medida fisiológica más evidente en el fenotipo del mutante tras aplicar el estrés salino. En la **Tabla 20**, se presenta el análisis multivariante univariado para clorofila en hojas de WT y mutante *sodgat1* procedentes de plantas desarrolladas en control y 100 mM NaCl (35 DTS) en el invernadero de condiciones NC durante 2020 y 2022. Los efectos principales genotipo y tratamiento son significativos al 0,1%, mientras que no lo es el año de cultivo, lo que pone de manifiesto la respuesta similar de ambos cultivos en los ensayos realizados en diferentes años. Así, la importante reducción de los niveles de clorofila en las hojas del mutante desarrolladas a 100 mM NaCl era similar en ambos cultivos de 2020 y 2022 (**Figura 64**).

A nivel reproductivo, el carácter más importante fue la abscisión de las flores del mutante inducida por la salinidad. El análisis estadístico mostró un resultado similar al observado para clorofila en hoja, ya que genotipo y tratamiento volvían a ser significativos al 0,1% pero no el año de cultivo (**Tabla 21**). Este resultado es de gran interés ya que permite confirmar que la anulación del gen *SIRBOHG* en tomate provoca un alto porcentaje de abscisión de flores cuando las plantas se desarrollan a alto nivel de salinidad (100 mM NaCl). Efectivamente, los valores eran prácticamente idénticos en los dos cultivos durante los 50 DTS (**Figura 65**). En resumen, el año de cultivo no ha influido en los efectos de la mutación del gen en salinidad, ni en el desarrollo vegetativo ni reproductivo y, por tanto, la abscisión de flores en el mutante *sodgat1* es independiente del año de cultivo.

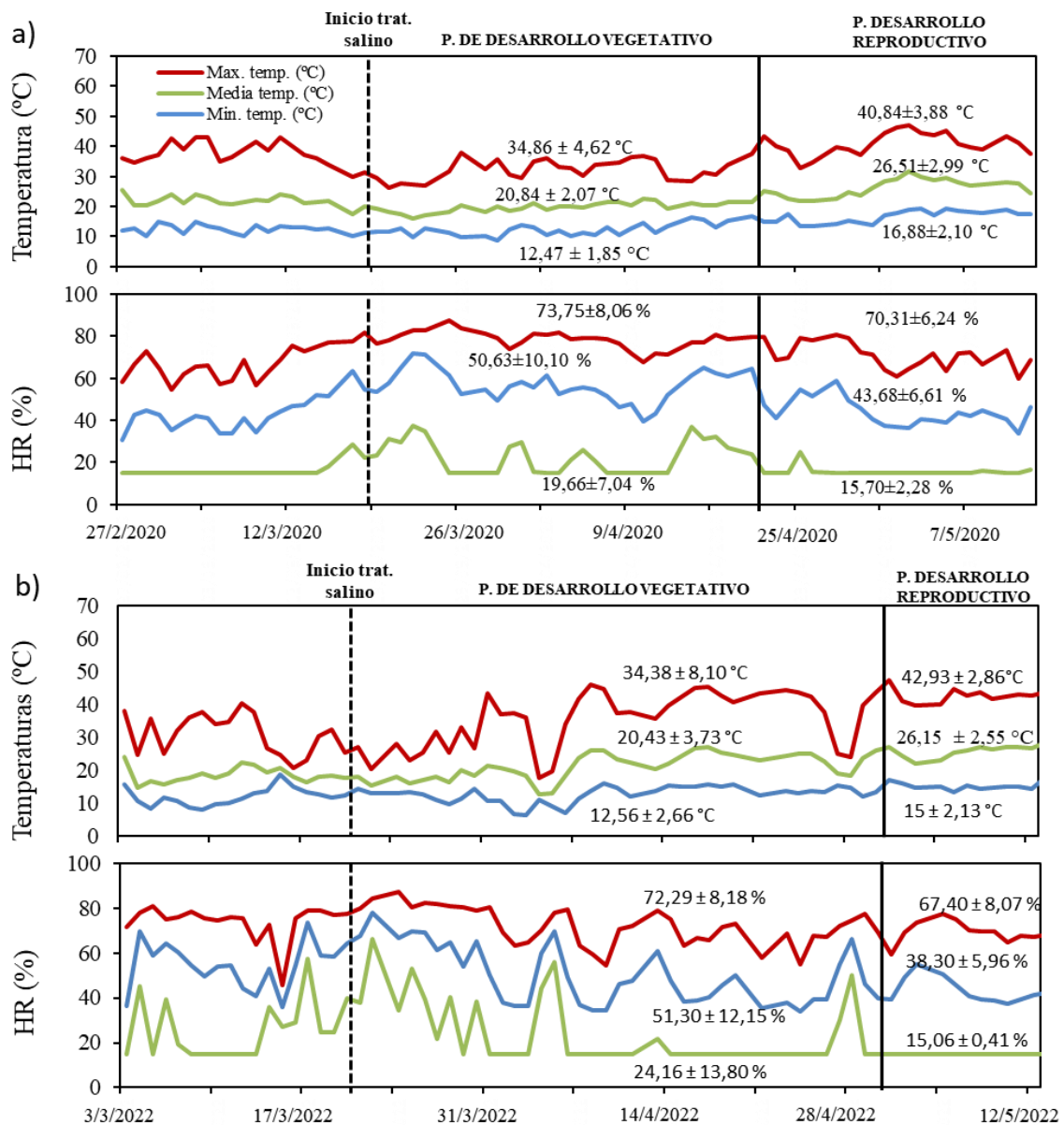


Figura 63. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas de tomate (WT) y mutante *sodgat1*. Temperatura (°C) y Humedad relativa (%) en el invernadero de condiciones no-controladas del CEBAS durante primavera-verano de a) 2020 y b) 2022. Se representan los valores medios para los tres periodos de cultivo: 1º) Desde trasplante al inicio del tratamiento salino, 2º) Periodo de tratamiento salino antes de empezar la recogida de cosecha, 3º) Periodo de recogida de cosecha. Se indican valores promedio \pm EE junto a cada línea de valores.

Tabla 20. Análisis multivariante univariado para clorofila en hojas de WT y mutante *sodgat1*.

	Fuente	Suma de cuadrados	GI	Media de cuadrados	Ratio F	P-valor
Efectos principales	Tratamiento	2735,538	1	2735,538	163,287	<0,001
	Genotipo	9774,880	1	9774,880	583,473	<0,001
	Año	1,062	1	1,062	0,063	0,802
Interacción	Tratamiento * Genotipo	3254,180	1	3254,180	194,246	<0,001
	Tratamiento * Año	87,645	1	87,645	5,232	0,026
	Genotipo * Año	28,331	1	28,331	1,691	0,199
	Tratamiento * Genotipo * Año	3,252	1	3,252	0,194	0,661
	Error	988,422	59	16,753		
	Total	133268,590	67			
	Total corregido	20420,081	66			
	a. R al cuadrado =0,952 (R al cuadrado ajustada = 0,946)					

Plantas desarrolladas en control y 100 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas durante 2020 y 2022. Datos tomados a los 35 días de tratamiento salino

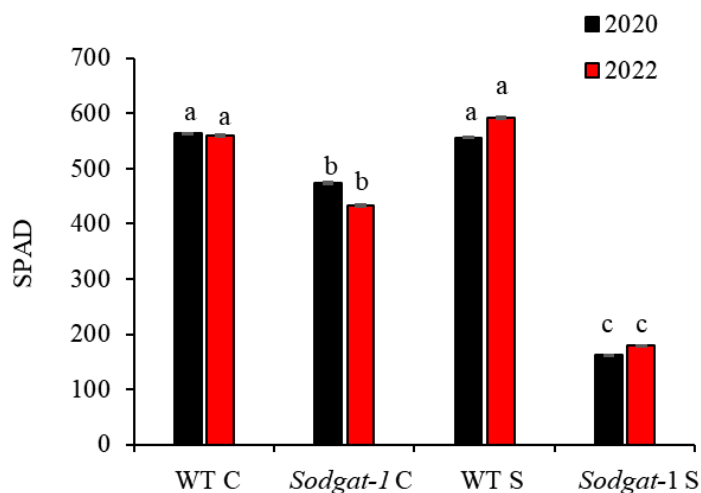


Figura 64. El contenido en clorofila en WT y mutante *sodgat1* es independiente del año de cultivo. Valores medios del porcentaje de abscisión de flores a los 35 DTS en plantas desarrolladas en control y 100 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas durante 2020 y 2022. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Tabla 21. Análisis de la multivariante univariado para abscisión de flores (%) en plantas WT y mutante *sodgat1*.

	Fuente	Suma de cuadrados	GI0	Media de cuadrados	Ratio F	P-valor
Efectos principales	Tratamiento	8007,070	1	8007,070	70,543	<0,001
	Genotipo	13717,031	1	13717,031	120,848	<0,001
	Año	43,540	1	43,540	0,384	0,538
Interacción	Tratamiento * Genotipo	4902,400	1	4902,400	43,190	<0,001
	Tratamiento * Año	98,596	1	98,596	0,869	0,355
	Genotipo * Año	17,342	1	17,342	0,153	0,697
	Tratamiento * Genotipo * Año	,000	0	.	.	.
	Error	6242,865	55	113,507		
	Total	63828,429	62			
	Total corregido	38630,715	61			
a. R al cuadrado = 0,838 (R al cuadrado ajustada = 0,821)						

Plantas desarrolladas en control y 100 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas durante 2020 y 2022. Datos tomados a los 50 días de tratamiento salino.

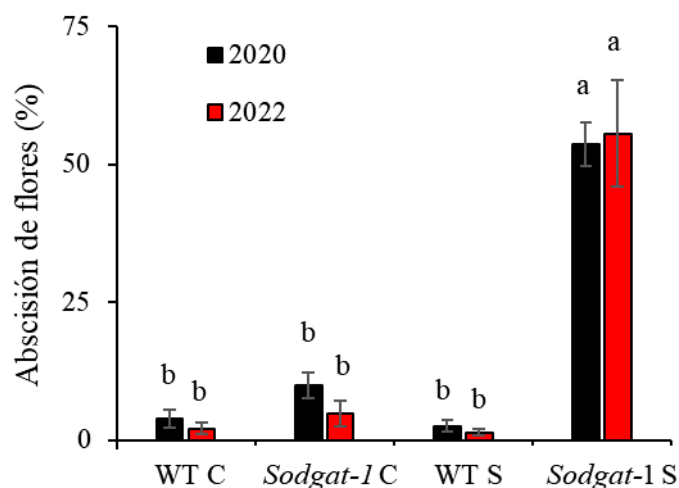


Figura 65. La abscisión de flores en WT y mutante *sodgat1* es independiente del año de cultivo. Valores medios del porcentaje de abscisión de flores en plantas desarrolladas en control y 100 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas durante 2020 y 2022. Valores medios + EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Respuesta comparativa en invernadero de condiciones no controladas y semi-controladas de plantas desarrolladas en control y sal (50 mM NaCl)

En el mismo año (2022) y en la misma época de cultivo (primavera-verano) se realizaron los experimentos en dos invernaderos con dos tipos de condiciones ambientales diferentes, el de condiciones NC donde se alcanzaban mayores T^a que en el de SC, como se observa en la **Figura 66**. Así, las T^a medias eran 20,4°C y 30,3°C en NC y 15,4° y 25,2° en SC, aunque las mayores diferencias se alcanzaban en las T^a máximas durante el periodo de recogida de cosecha, con un valor medio de 45,8°C en NC mientras que en SC era 31,9°C.

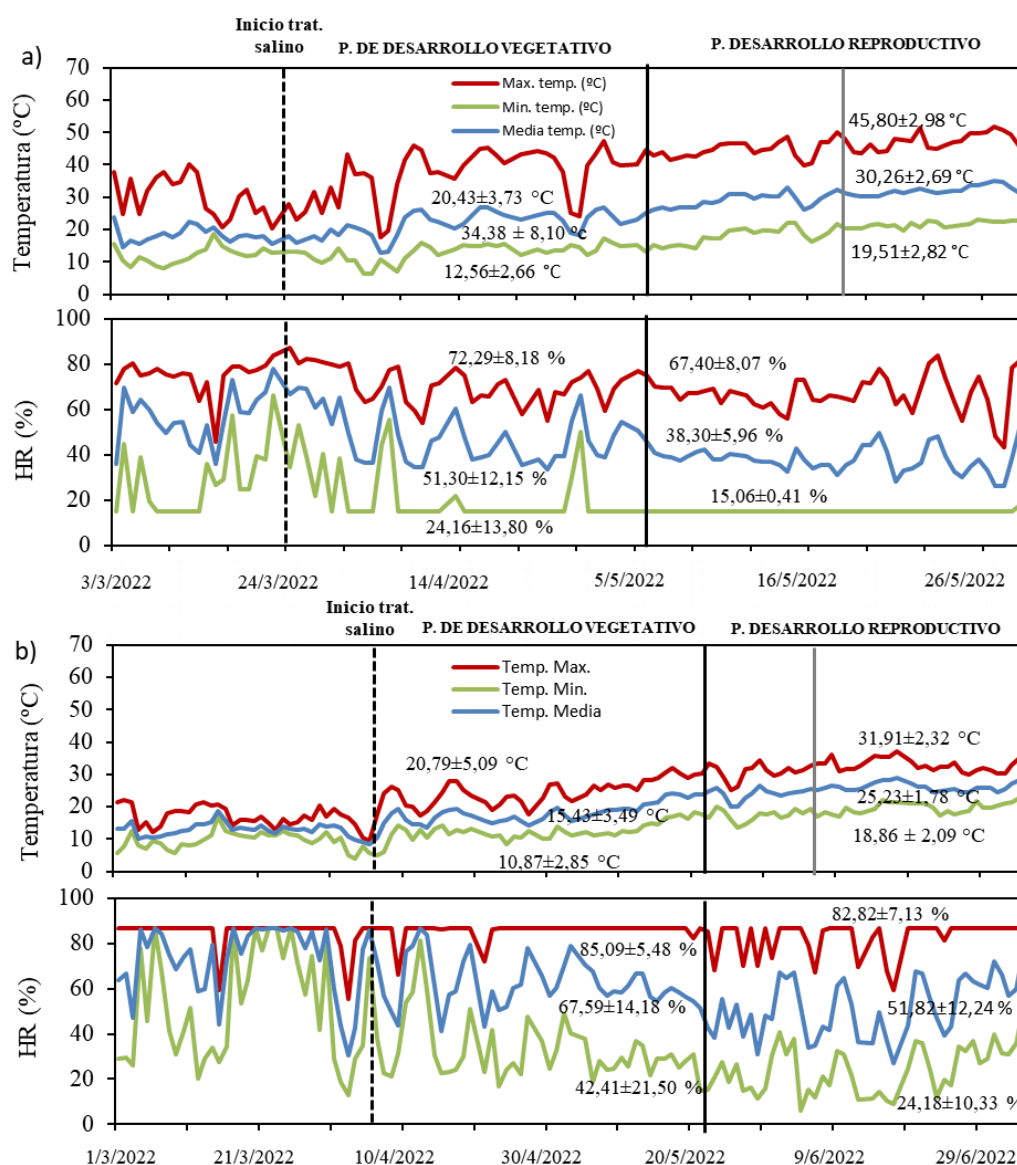


Figura 66. Evolución de la temperatura y humedad durante el cultivo de las plantas de tomate (WT) y mutante *sodgat1*. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) a) en el invernadero de condiciones no controladas del CEBAS y b) en el invernadero de condiciones semi-controladas de la Universidad de Murcia durante primavera-verano de 2022. Se representan los valores medios para los tres periodos de cultivo: 1º) Desde trasplante al inicio del tratamiento salino, 2º) Periodo de tratamiento salino antes de empezar la recogida de cosecha, 3º) Periodo de recogida de cosecha.

Si al comparar la respuesta de las plantas en ambos invernaderos se encuentran diferencias entre las desarrolladas en control, esas diferencias se podrían atribuir al estrés por altas temperaturas del invernadero NC. En los niveles de clorofila de hoja, los efectos principales genotipo y tratamiento eran significativos mientras que el tipo de invernadero no resultó significativo (Tabla 22). Estas medidas se tomaron a los 35 DTS y corresponden aún a la 2ª fase donde no se alcanzan altas T^a. Efectivamente, los valores medios son similares en ambos invernaderos para las hojas del mutante desarrolladas a 50 mM NaCl (Figura 67).

Tabla 22. Análisis multivariante univariado para clorofila en hojas de WT y mutante *sodgat1*.

	Fuente	Suma de cuadrados	GI	Media de cuadrados	Ratio F	P-valor
Efectos principales	Tratamiento	2770,902	1	2770,902	123,801	<0,001
	Genotipo	863,825	1	863,825	38,595	<0,001
	Invernadero	21,874	1	21,874	0,977	0,330
Interacción	Tratamiento * Genotipo	1194,624	1	1194,624	53,375	<0,001
	Tratamiento * Invernadero	223,221	1	223,221	9,973	0,003
	Genotipo * Invernadero	16,491	1	16,491	0,737	0,397
	Tratamiento * Genotipo * Invernadero	46,675	1	46,675	2,085	0,158
	Error	738,603	33	22,382		
	Total	85487,050	41			
	Total corregido	6611,858	40			
	a. R al cuadrado = 0,888 (R al cuadrado ajustada = 0,865)					

Plantas desarrolladas en control y 50 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas y semi-controladas durante primavera-verano de 2022. Datos tomados a los 35 días de tratamiento salino.

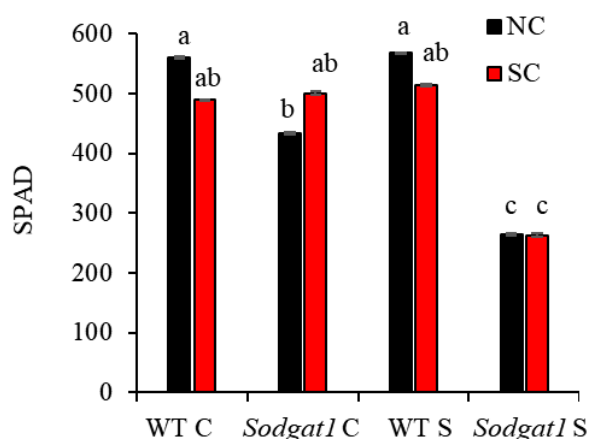


Figura 67. El contenido de clorofila en WT y mutante *sodgat1* es independiente de las condiciones de cultivo. Valores medios del porcentaje de abscisión de flores en plantas desarrolladas en control y 50 mM NaCl (35 DTS) en los invernaderos de condiciones no-controladas (NC) y semi-controladas (SC) durante primavera-verano de 2022. Valores medios ± EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

También se llevó a cabo el análisis multivariante univariado para la abscisión de las flores (4 primeros racimos en conjunto) inducida por la salinidad en las plantas desarrolladas en condiciones NC y SC en control y 50 mM NaCl, pero en este caso después de 60 DTS, es decir en el periodo de mayor recogida de cosecha, donde se alcanzaban valores medios de T^a máximas muy superiores en el invernadero NC respecto al SC. El análisis estadístico mostró que los tres efectos principales, genotipo, tratamiento y tipo de invernadero eran significativos (**Tabla 23**). Como se esperaba, los valores medios de abscisión eran muy bajos en el WT (menores del 10%), tanto en control como en sal (**Figura 68**). También en el mutante se obtenían bajos porcentajes de abscisión en las plantas control de ambos invernaderos, lo que sugiere que la caída de las flores en el mutante no está provocada por el estrés por altas temperaturas.

Tabla 23. Análisis multivariante univariado para la abscisión de flores de los cuatro primeros racimos de WT y mutante *sodgat1*.

	Fuente	Suma de cuadrados	GI	Media de cuadrados	Ratio F	P-valor
Efectos principales	Tratamiento	2403,602	1	2403,602	41,114	<.001
	Genotipo	2314,894	1	2314,894	39,596	<.001
	Invernadero	554,924	1	554,924	9,492	0,004
Interacción	Tratamiento * Genotipo	1715,137	1	1715,137	29,337	<.001
	Tratamiento * Invernadero	861,099	1	861,099	14,729	<.001
	Genotipo * Invernadero	861,305	1	861,305	14,733	<.001
	Tratamiento * Genotipo * Invernadero	0,000	0	.	.	.
	Error	1929,261	33	58,462		
	Total	19603,406	40			
	Total corregido	11678,055	39			
	a. R al cuadrado = 0,835 (R al cuadrado ajustada = 0,805)					

Plantas desarrolladas en control y 50 mM NaCl en invernadero de condiciones no-controladas y semi-controladas durante primavera-verano de 2022. Datos tomados a los 65 días de tratamiento salino.

En sal (50 mM de NaCl), los porcentajes de abscisión de flores se incrementaban significativamente en las plantas del mutante desarrolladas tanto en el invernadero NC como en el SC, pero el porcentaje era del 22% en NC y 52% en SC, contrariamente a lo esperado si se tiene solo en cuenta los valores ambientales de T^a y H. Es interesante señalar que el porcentaje obtenido en el invernadero NC a 50 mM NaCl (**Figura 68**) es coherente con el de las plantas mutantes desarrolladas al nivel alto de sal (100 mM NaCl) (**Figura 65**), ya que en estas se alcanzaba un 55%, algo superior al doble del obtenido en el invernadero SC al nivel moderado de sal. Sin embargo, el que resultó ser extremadamente alto fue el valor obtenido en el mutante a 50 mM de NaCl bajo condiciones SC. La primera cuestión a resolver era si se había aplicado mayor nivel de sal del previsto. Para ello, se rehicieron los cálculos y se comprobó que la disolución de riego tenía el nivel correcto de NaCl.

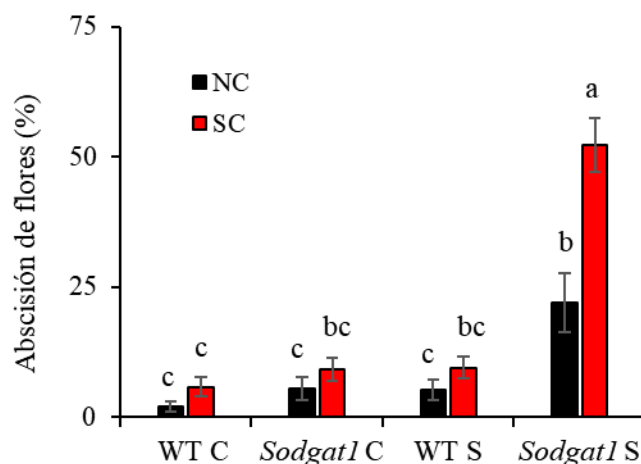


Figura 68. Las condiciones de cultivo influyen en el porcentaje de abscisión de flores del mutante *sodgat1* cuando las plantas se desarrollan en sal. Valores medios del porcentaje de abscisión de flores en plantas desarrolladas en control y 50 mM NaCl (60 DTS) en los invernaderos de condiciones no-controladas (NC) y semi-controladas (SC) durante primavera-verano de 2022. Valores medios \pm EE. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Una de las diferencias entre los cultivos de uno y otro invernadero era el tipo de recipiente, ya que en el invernadero SC se utilizan macetas de 17 L de volumen con una altura de 28 cm para cada planta individual, mientras que en el invernadero NC se utilizan contenedores rectangulares para cada 3 plantas, de aproximadamente la mitad de altura que las macetas del invernadero SC. Los contenedores del invernadero NC tienen una capacidad aproximada de 49 L (105 cm de longitud x 33 cm de ancho), con un fondo irregular que presenta una profundidad media de 14,5 cm (11 cm en la zona central y 17,5 cm a ambos lados de la anterior, longitudinalmente) (**Figura 69a**). Cuando se aplican tratamientos salinos, uno de los aspectos clave es evitar la salinización del sustrato, y para ello se controla el lixiviado a lo largo del cultivo con el fin de evitar que este supere dos unidades de la conductividad eléctrica de la solución de riego. Dados los diferentes volúmenes de sustrato, con importantes diferencias en la altura de los mismos, las dosis de riego fueron mayores en el invernadero SC para evitar la salinización del sustrato, como se representa en la **Figura 69b**. Así, la cantidad total de NaCl adicionada a las plantas cultivadas en el invernadero SC superaba en 400 mmol NaCl/planta a la suministrada en las plantas desarrolladas en el invernadero NC durante el periodo de control del porcentaje de abscisión de flores (**Figura 69c**).

Precisamente, las cantidades de sal adicionadas a los cultivos de 2020 y 2022 en el invernadero NC a 100 mM NaCl, fueron similares como consecuencia del menor periodo de tratamiento (sobre 2500 mmol por planta durante los 50 DTS) y se obtuvieron porcentajes de abscisión del 55% en el mutante. Por tanto, el valor obtenido en las plantas del mutante desarrolladas en sal en el invernadero SC es coherente (52%) si se tiene en cuenta la cantidad total de sal adicionada durante el periodo de tratamiento. Este resultado es de gran interés ya que permite confirmar que la abscisión de flores en el mutante *sodgat1* es provocada por la salinidad, siendo la primera vez que se propone este papel del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a la salinidad.

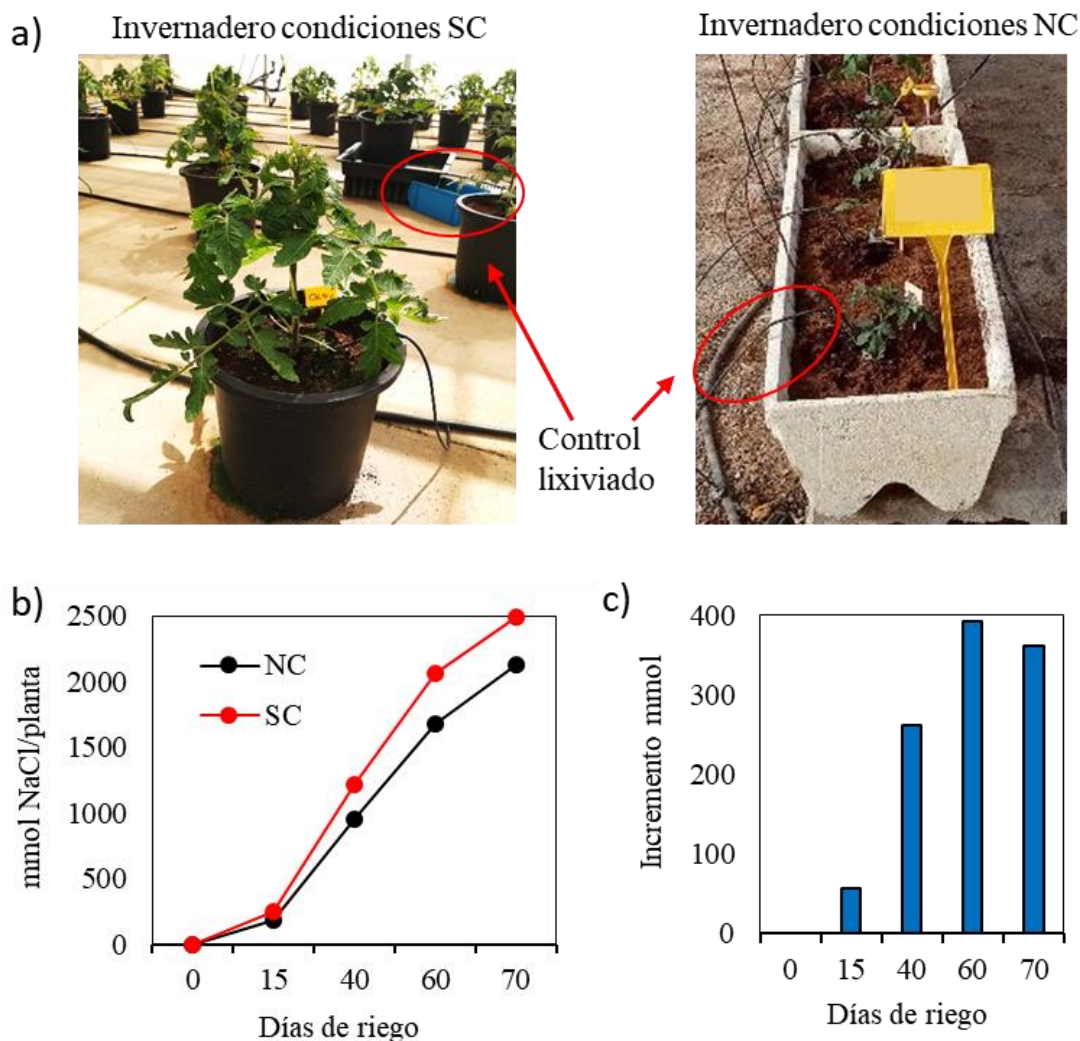


Figura 69. Cantidad de sal (mmol NaCl/planta) adicionada a través de la disolución de riego en los invernaderos de condiciones semi-controladas (SC) y no-controladas (NC). a) Fotografías de los recipientes de cultivo en ambos invernaderos. El riego aplicado era 50 mM NaCl en ambos. b) mmol de NaCl recibidos por planta en los invernaderos NC y SC y c) incremento de NaCl (mmol) recibido por las plantas del invernadero SC con respecto a las plantas del invernadero NC durante el tratamiento salino (50 mM de NaCl).

En resumen, es el efecto de la sal lo que provoca mayor abscisión de flores y no las mayores temperaturas del invernadero NC, ya que en el invernadero SC, con menores temperaturas, pero más sal adicionada a lo largo del cultivo, el porcentaje de abscisión es significativamente mayor.

3.3.4. Caracterización del mutante *sodgat1* a largo plazo

Tras comprobar los importantes efectos provocados por la disrupción del gen *SIRBOHG* en el desarrollo vegetativo y reproductivo a largo plazo, se consideró interesante profundizar en los cambios producidos a nivel morfológico, fisiológico, hormonal y metabólico y que podrían explicar, al menos parcialmente, las causas que provocan las alteraciones en el desarrollo.

A nivel fisiológico es conocido que los mecanismos responsables de la tolerancia a salinidad pueden variar con el nivel de estrés. Así, a niveles moderados de salinidad generalmente operan los mecanismos relacionados con la homeostasis osmótica, mientras que el mecanismo predominante a altos niveles de estrés es la homeostasis iónica. En este estudio, se han analizado los parámetros relacionados con ambos procesos, implicados tanto en la recuperación de la homeostasis osmótica como iónica, puesto que se ha utilizado un nivel moderado (50 mM NaCl) y alto (100 mM NaCl) de salinidad.

El mutante *sodgat1* altera la morfología de la hoja tanto en control como en estrés salino

En la mayoría de los ensayos llevados a cabo en invernadero se observaban visualmente claras diferencias entre el fenotipo de las hojas de WT y mutante *sodgat1*, como muestran las fotografías de las hojas seleccionadas para analizar cuantitativamente las diferencias a nivel celular entre ambos (**Figura 70a**). Para ello, se realizaron semifinos de planos longitudinales de la hoja y se obtuvo el tamaño celular mediante la medida del diámetro medio de las células del mesófilo y la densidad celular (**Figura 70b**). El diámetro medio celular no varió en WT con los tratamientos salinos, mientras que en el mutante aumentó significativamente con el tratamiento salino, con células de mayor diámetro (más hinchadas), cuanto mayor era el nivel de salinidad. En cuanto a la densidad celular, se observó que era significativamente menor en el mutante que en WT en condiciones control, siendo el número de células por unidad de área un 38% menor en el mutante (**Figura 70b**). En salinidad ambos WT y mutante mostraron una respuesta similar, reduciéndose significativamente la densidad celular proporcionalmente al nivel salino, tal como se refleja en las imágenes obtenidas por microscopía (**Figura 70c**). Estos resultados demuestran que la disrupción del gen *SIRBOHG* aumenta el tamaño celular, lo que disminuye la densidad celular en las hojas de plantas adultas desarrolladas en invernadero bajo condiciones naturales.

Alteraciones en la homeostasis osmótica inducidas por la mutación *SIRBOHG*

El primer efecto inducido por la salinidad es similar al provocado por estrés hídrico dada la dificultad de la planta para absorber y transportar agua hasta las hojas. Para recuperar la homeostasis osmótica, las hojas utilizan principalmente dos estrategias, reducir su potencial osmótico (ψ_s) para continuar el transporte de agua en condiciones de estrés y evitar la pérdida de agua a través de las hojas.

En este estudio se analizó ψ_s , temperatura foliar medida por termografía infrarroja, tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) a los 45 DTS (**Figura 71**). Respecto a ψ_s , este se reduce con la salinidad en WT y mutante, pero los cambios son muy diferentes. La reducción de ψ_s es similar a 50 y 100 mM de NaCl en WT mientras que en el mutante es muy superior al nivel alto de salinidad. En ambos niveles, los mayores valores negativos se alcanzaron en el mutante.

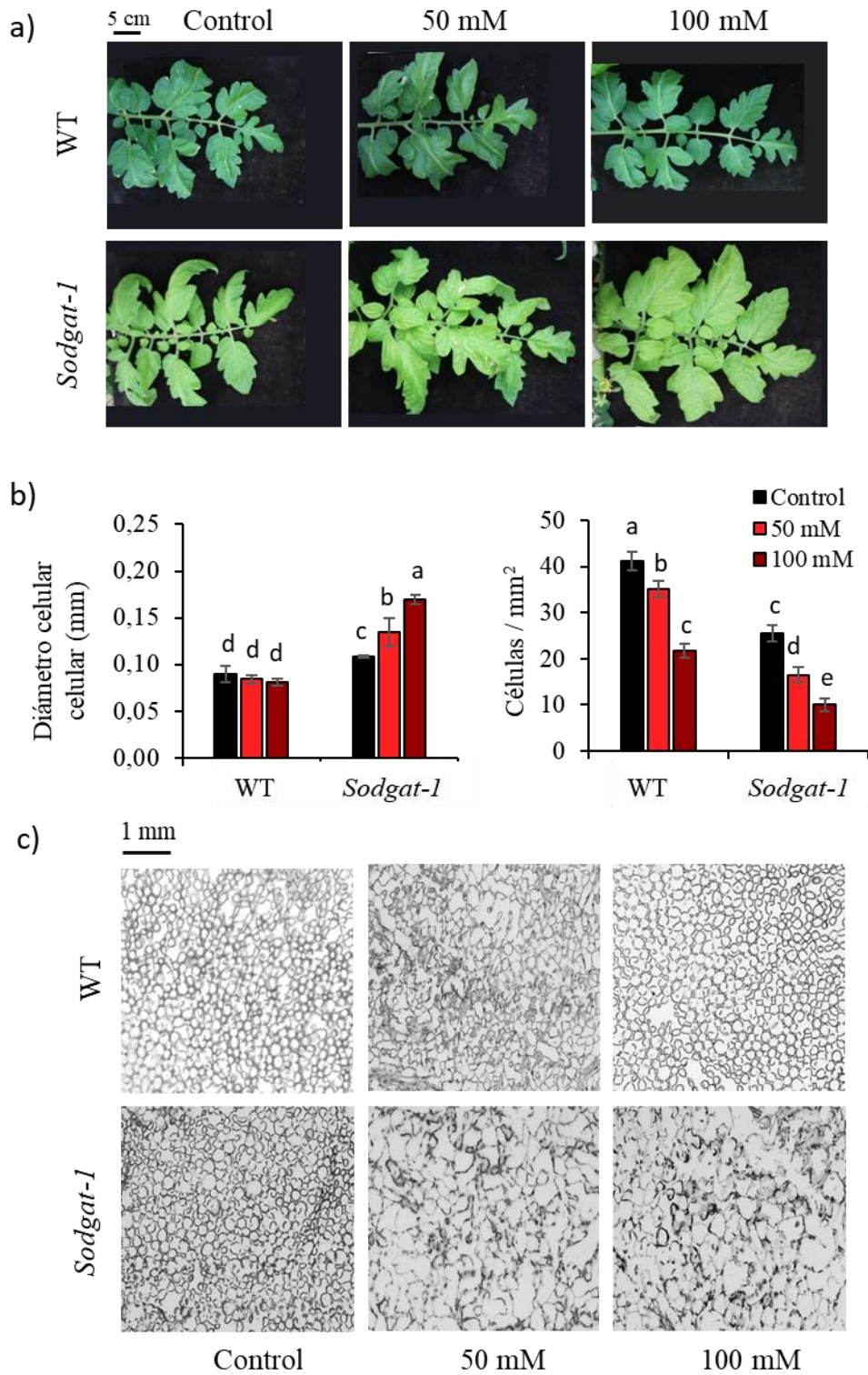


Figura 70. El mutante *sodgat1* altera la morfología de la hoja (aumenta el tamaño celular de la hoja y disminuye la densidad celular) tanto en control como en estrés salino. a) Imágenes representativas de hojas de plantas WT y *sodgat1* a los 35 DTS en condiciones control y salinas (50 y 100 mM de NaCl). b) Tamaño de las células del mesófilo a través de la medida del diámetro celular y densidad celular. c) micrografías de las células del mesófilo. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

La temperatura foliar (T^a) es una medida global de la estrategia de evitación de la pérdida de agua a través de la hoja. Los mayores valores se observaron en el mutante y además eran similares independientemente de que las plantas estuviesen en control o sal. Sin embargo, en WT la T^a aumentaba en las hojas desarrolladas al nivel alto de salinidad. Respecto a la tasa de transpiración (E), WT mostraba una tendencia a reducir E con la salinidad, pero las diferencias no llegaban a ser significativas respecto a control. Sin embargo, el mutante presentaba un valor similar al del WT en control pero reducía significativamente E con la salinidad, con valores similares para ambos niveles de estrés salino. La respuesta de la conductancia estomática (g_s) es similar a la de E en el mutante, con importantes y similares reducciones para ambos niveles de sal. Las hojas de WT también muestran una tendencia similar para g_s y E, aunque en este caso las diferencias de g_s entre el nivel alto de sal y control llegan a ser significativas.

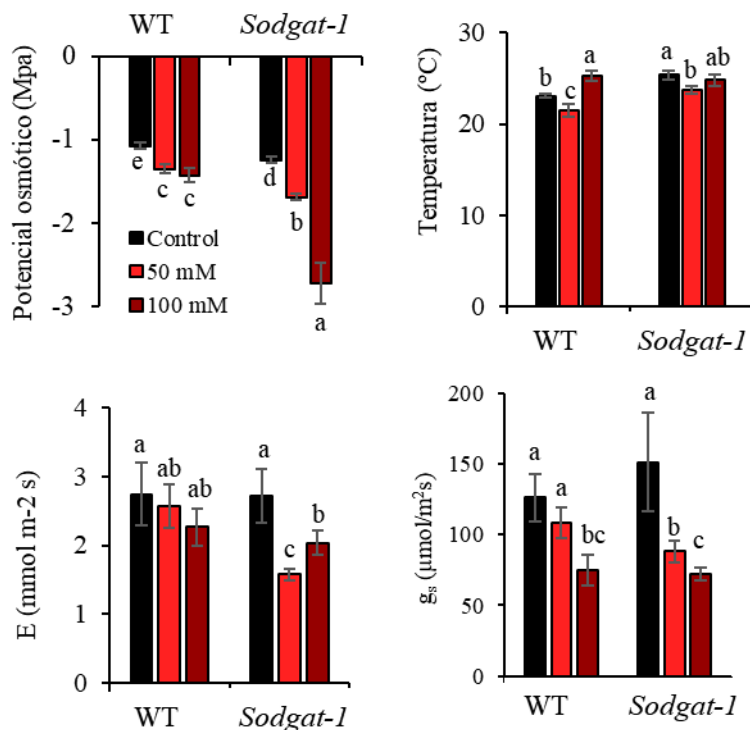


Figura 71. El mutante *sodgat1* reduce el potencial osmótico y la pérdida de agua por transpiración en condiciones salinas. Potencial osmótico, temperatura foliar medida por termografía infrarroja, tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) en las dos primeras hojas completamente desarrolladas de plantas WT y mutante *sodgat1* cultivadas en invernadero a 0, 50 y 100 mM NaCl. a los 45 días (DTS). Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

A continuación, se evaluó si la menor pérdida de agua por transpiración observada en el mutante se debía a cambios inducidos por el estrés salino en la apertura y densidad estomática (**Figura 72**). Para ello, se prepararon secciones de la cara abaxial de las hojas para su observación al microscopio electrónico de barrido de plantas WT y mutante en control y después de 35 DTS. Efectivamente, *sodgat1* presentó estomas más cerrados y menor número de ellos que WT en control. Así, la reducción inducida en la densidad

estomática del mutante para ambos niveles de salinidad era del 40%, respecto al control, mientras que en WT solo se reducía un 20% en el nivel moderado de estrés (**Figura 72**).

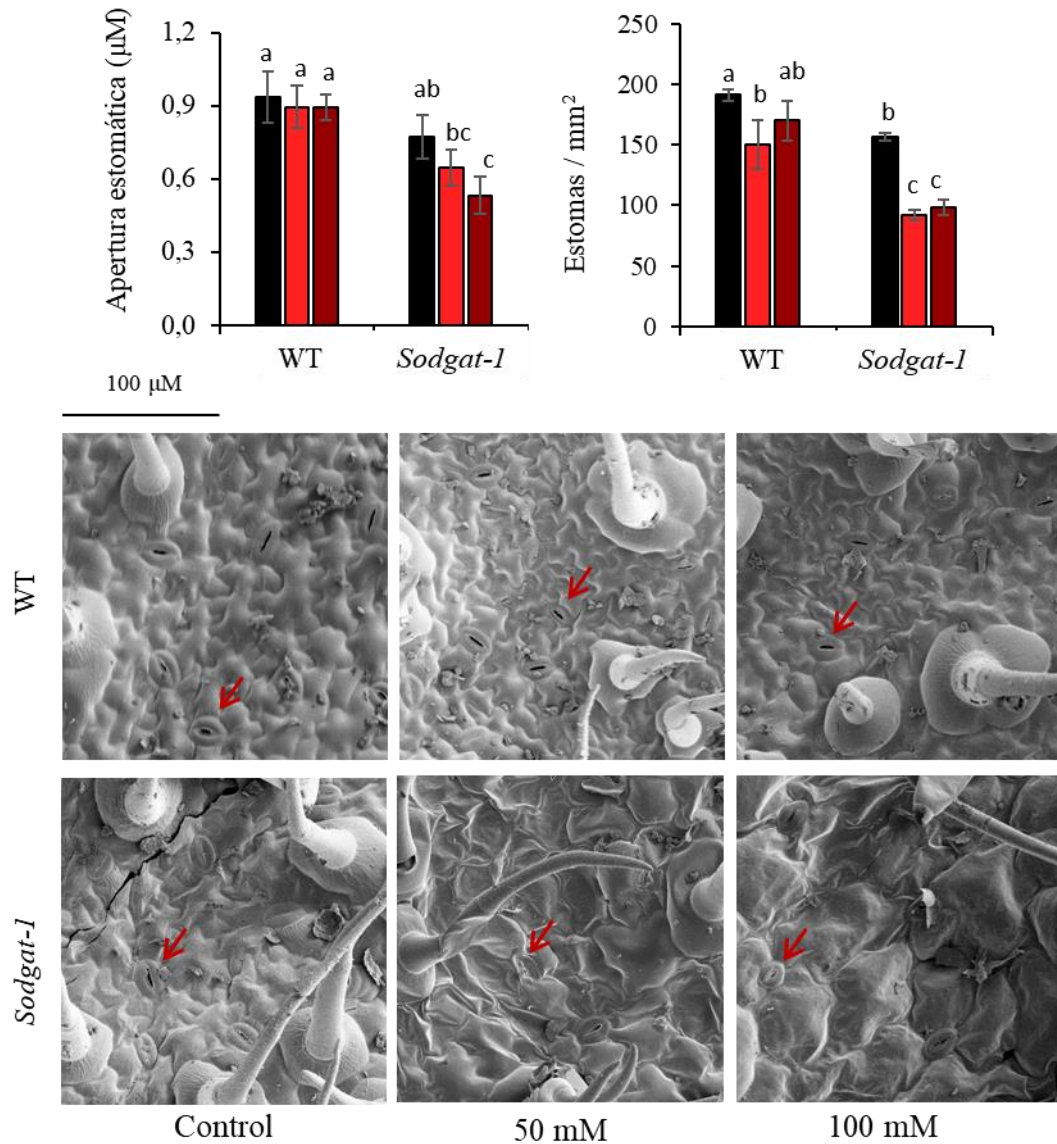


Figura 72. El mutante *sodgat1* reduce la pérdida de agua foliar vía reducción de la apertura y densidad estomática. Apertura estomática, densidad estomática y micrografías electrónicas de barrido de la superficie abaxial de la 2ª hoja a los 35 DTS en plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas a 0, 50 y 100 mM NaCl. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Considerados en conjunto, tanto WT como el mutante recuperan la homeostasis osmótica a largo plazo, pero el mutante muestra mayor capacidad para seguir transportando agua hasta las hojas vía reducción de ψ_s , así como para evitar la pérdida de agua a través de las hojas vía reducción de transpiración. Este mecanismo está asociado a una menor apertura estomática y, principalmente, menor densidad estomática.

Alteraciones en la homeostasis iónica inducidas por la mutación *SIRBOHG*

En base a los resultados obtenidos en plantas jóvenes al estudiar la respuesta a corto-medio plazo, donde se observó un transporte masivo de Na^+ desde la raíz a la parte aérea en los mutantes *sodgat*, se consideró interesante estudiar el patrón de distribución de Na^+ en las plantas adultas con objeto de comprobar si la sensibilidad a la sal a largo plazo también está relacionada con el efecto tóxico provocado por la acumulación de Na^+ .

A los 30 DTS, se analizaron las concentraciones de Na^+ y K^+ en distintos tejidos de las plantas, incluyendo el ápice, hoja adulta superior (2ª hoja adulta o desarrollada) y el peciolo correspondiente, hoja adulta media (entre 8-9 hoja adulta) y su peciolo, así como la raíz. Además, se analizaron los contenidos de agua en las mismas muestras, ya que otra de las características del mutante era la hiperhidratación de parte aérea (**Figura 73**).

La acumulación de Na^+ era mayor en el mutante que en WT en todas las partes de la planta analizadas, alcanzándose los mayores valores en la hoja media que superaba incluso a los del peciolo. Seguía la hoja adulta superior (2ª hoja) y era en el ápice donde se encontraba la menor acumulación de Na^+ . Esto responde al patrón normal de distribución de Na^+ en tomate, es decir acumulación en las partes basales y más adultas para evitar el transporte hasta los órganos en desarrollo como el ápice. Por tanto, la disrupción del gen *SIRBOHG* no provoca alteraciones en el patrón de distribución de Na^+ , sino un transporte masivo desde raíz a parte aérea, lo que corrobora los resultados obtenidos a corto-medio plazo. Los cambios en la relación Na^+/K^+ son prácticamente idénticos a los observados para Na^+ puesto que los contenidos de K^+ son muy similares en WT y mutante (**Figura 73**).

Respecto a los contenidos de agua, el mutante mantenía los tejidos de la parte aérea de las plantas hiperhidratados, ya que los contenidos de agua eran mayores en el mutante que en WT en todos los órganos analizados en parte aérea, con incrementos de 2 y 3 veces en el mutante respecto a WT. En resumen, los principales cambios fisiológicos del mutante observados a corto-medio plazo, que son el elevado transporte de agua y Na^+ a la parte aérea, se mantienen a lo largo del ciclo vegetativo (**Figura 73**).

Una cuestión interesante era comprobar si estos cambios se reflejaban también en los órganos reproductivos. Efectivamente, mientras que las flores de WT no acumulaban prácticamente Na^+ con la salinidad, en las del mutante se producía una alta acumulación de Na^+ desde el nivel moderado de sal, independientemente del estado de desarrollo de la flor (preantesis, antesis y post-antesis), siendo muy superior al nivel alto de sal a los 50 DTS (**Figura 74**). Además del ion tóxico Na^+ , también incrementaban los contenidos de K^+ y de agua en las flores del mutante.

También se analizaron estos contenidos en la zona de abscisión (ZA) y pedúnculo de la flor, observando mayores acumulaciones de Na^+ en ambas partes que las encontradas en flores (**Figura 74**). Los incrementos inducidos por la salinidad en los contenidos de agua de la ZA eran también muy importantes, y en el pedúnculo solo para el nivel alto de sal.

Sin embargo, los contenidos de K^+ no variaban en estas partes y, por tanto, los cambios en la relación Na^+/K^+ eran similares a los mostrados por Na^+ .

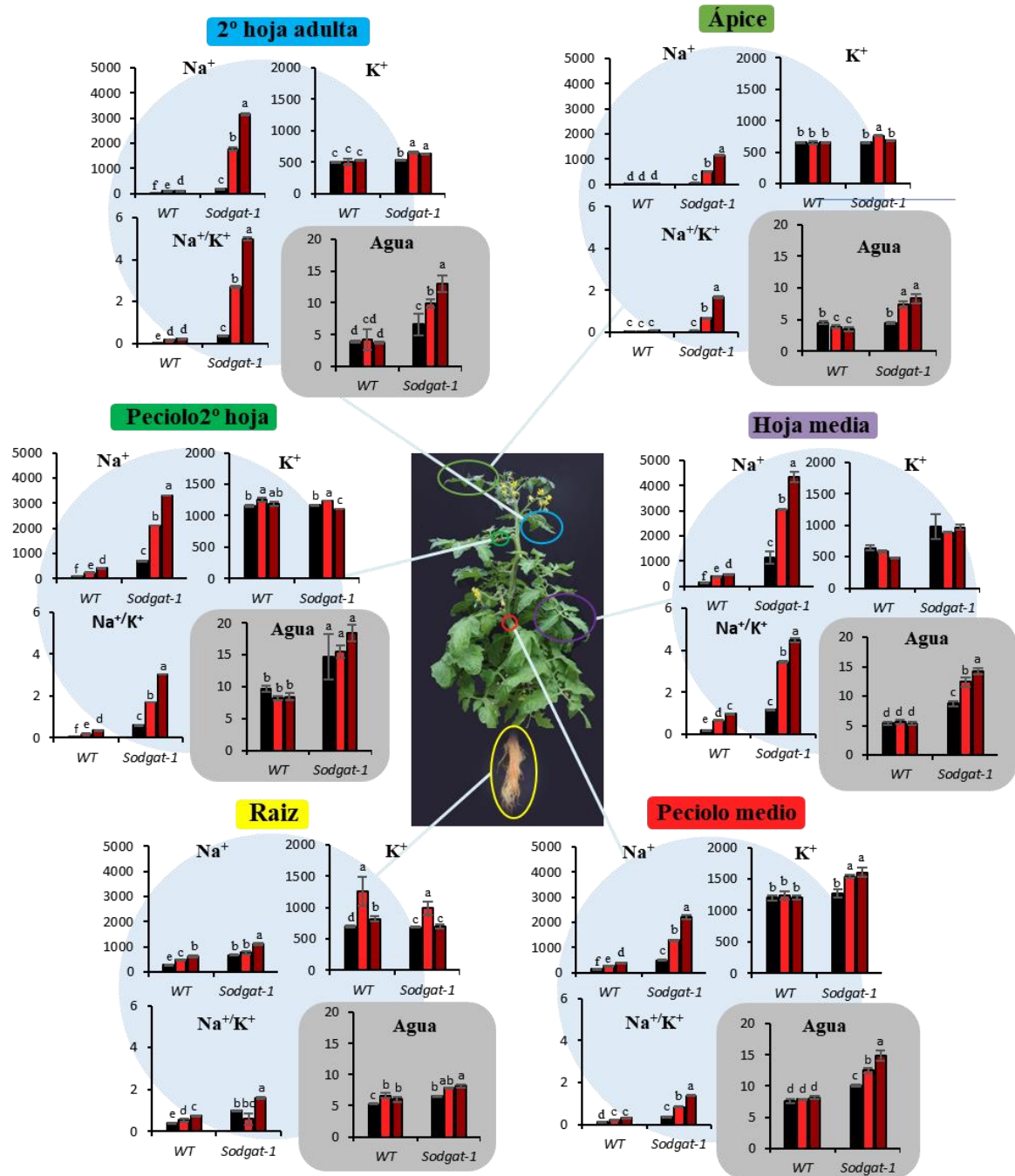


Figura 73. La disrupción de *SIRBOHG* promueve un transporte masivo de Na^+ y agua desde la raíz a la parte aérea en condiciones salinas. Los contenidos de Na^+ y K^+ (mmol/kg Peso seco), la relación Na^+/K^+ y el contenido de agua (mg/g Peso seco) eran medidos en los distintos órganos vegetativos (ápice, 2ª hoja adulta o desarrollada y el pecíolo correspondiente, hoja adulta media (entre 9-10 hoja adulta) y su pecíolo, y raíz) distribuidos a lo largo de las plantas WT y mutante *sodgat1* desarrolladas a 0, 50 y 100 mM NaCl a los 30 DTS. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

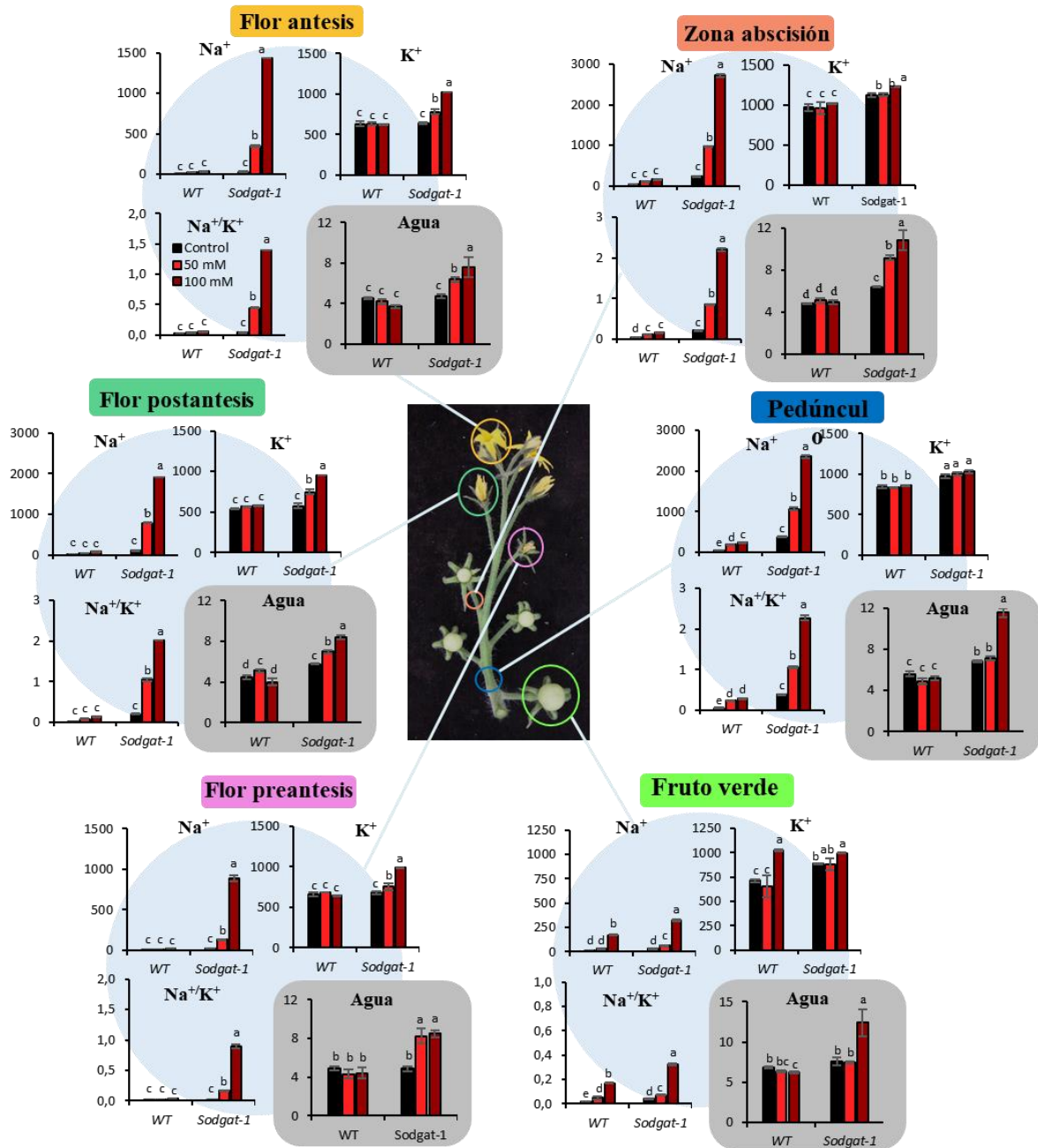


Figura 74. La disrupción del gen *SlrbhG* provoca un aumento del contenido de agua y Na⁺ en salinidad a nivel reproductivo. Contenidos de Na⁺, K⁺ (mmol/kg peso seco), relación Na⁺/K⁺ y contenidos de agua (mg/g peso seco) en distintos tejidos vegetales a nivel reproductivo (flor en preantesis, antesis y postantesis, zona de abscisión, pedúnculo y fruto verde) de plantas WT y *sodgat1* a los 30 DTS en condiciones control y dos niveles de salinidad (50 y 100 mM de NaCl). Valores medios ± EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Finalmente, se consideró interesante analizar el fruto verde para comprobar si el mayor transporte de Na⁺ del mutante llegaba incluso a reflejarse en el fruto, especialmente teniendo en cuenta que la acumulación de este ion en fruto de tomate es extremadamente baja comparada con la de hoja. Las diferencias entre WT y mutante son menores que en el resto de los órganos analizados; así, aunque los contenidos de Na⁺ eran bastante bajos

comparados con los del resto de órganos, se observaban incrementos significativos en los frutos WT y mutante, siendo ligeramente superiores en el mutante (**Figura 74**).

En resumen, la alteración producida por la disrupción de *SIRBOHG* en la homeostasis de Na^+ y agua no solo ocurre a nivel vegetativo sino también a nivel reproductivo y, especialmente, en la zona de abscisión de la flor. Esta alteración podría ser una de las causas que induce un alto porcentaje de abscisión de las flores del mutante.

Cambios hormonales y metabólicos inducidos por la mutación *SIRBOHG*

Dada la importancia de las hormonas en los procesos de fructificación y, especialmente, en la caída de la flor, se analizaron los contenidos de hormonas en hoja desarrollada y flor a los 30 TDS (100 mM NaCl). Respecto a auxina (AIA), los niveles se mantenían similares en WT y mutante en control, mientras que estos se reducían significativamente con la salinidad en el mutante respecto al control, tanto en hoja como en flor (**Figura 75**). La hormona que mostró una respuesta bastante similar a auxina fue ABA, aunque a nivel cuantitativo el efecto era muy superior. Así, la salinidad provocaba reducciones del 88 y 76% en hoja y flor del mutante respecto a WT. En resumen, los cambios hormonales en los niveles de auxina y ABA pueden ser responsables, al menos parcialmente, de la mayor abscisión de las flores del mutante con la salinidad.

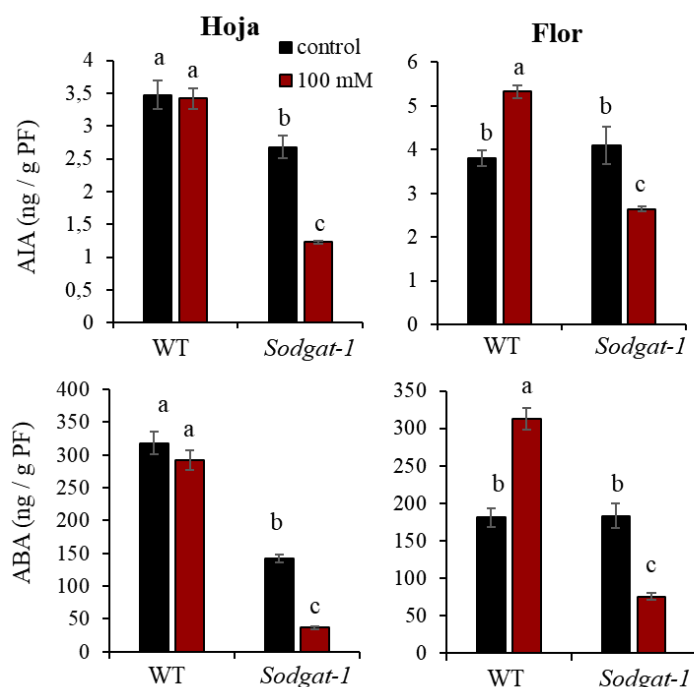


Figura 75. La disrupción del gen *SlrbhG* provoca alteraciones en los contenidos de AIA y ABA en hoja y flor. Contenidos de hormonas (expresados en ng/g PF) en hoja y flor de plantas WT y *sodgat1* desarrolladas en condiciones control y 100 mM de NaCl WT. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Otra de las causas que puede provocar la caída de la flor es el bajo suministro de azúcares desde la hoja fuente (adulta o desarrollada) hacia la flor y fruto (sumideros), como la abscisión del fruto inducida por estrés de azúcares parece estar mediada por ROS. En este estudio, se midieron los contenidos de sacarosa (el principal fotoasimilado de la hoja que se transporta a los órganos reproductivos) así como de glucosa y fructosa en hoja desarrollada (fuente) y flor y fruto verde (sumideros) a los 30 DTS (100 mM NaCl). Es interesante destacar la diferente respuesta de WT y *sodgat1* en medio salino, como los azúcares incrementaban muy significativamente en las hojas fuente del mutante con la salinidad, pero no en WT (**Figura 76**). Sin embargo, los mayores contenidos de azúcares en flor correspondían al WT.

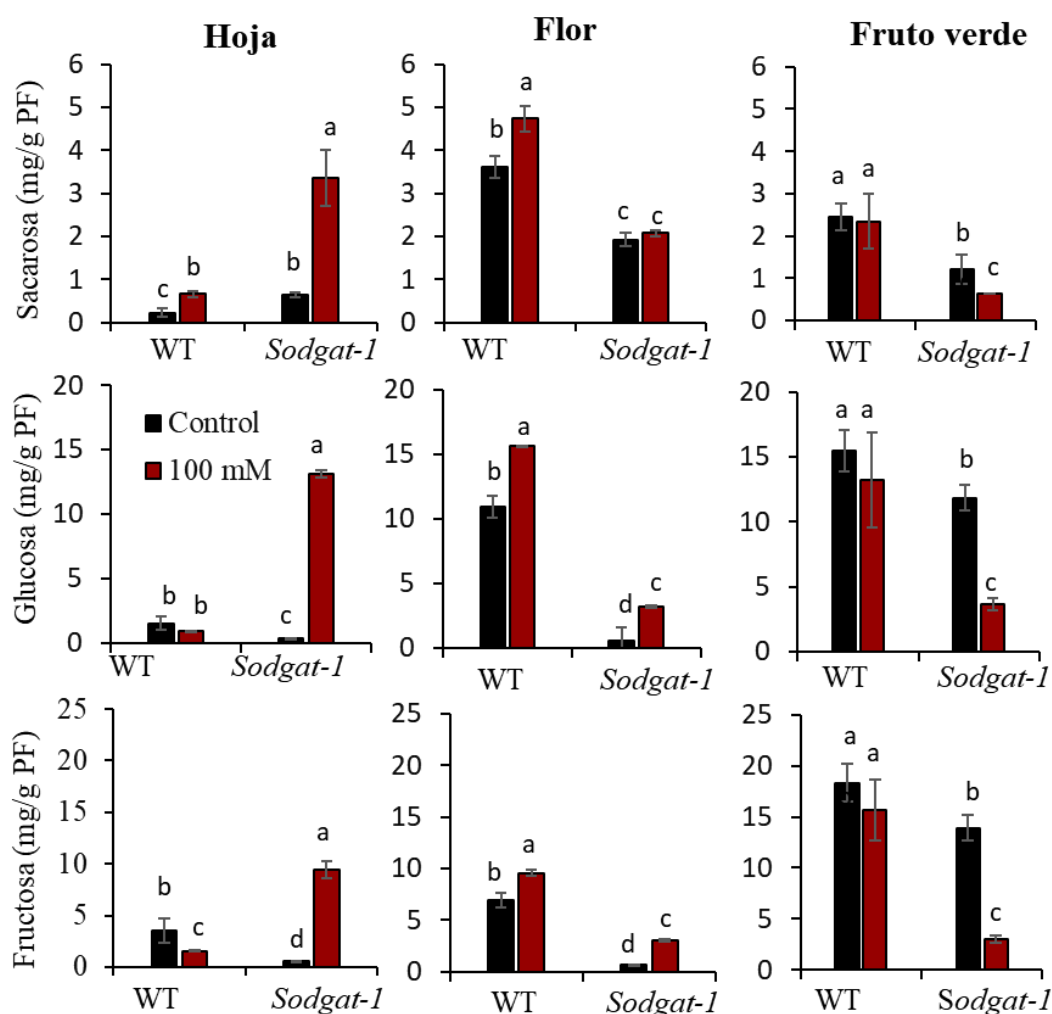


Figura 76. La disrupción del gen SIRBOHG provoca un aumento de azúcares en hoja y reducción en flor y fruto verde. Contenidos de azúcares (expresados en ng/g PF) de plantas WT y *sodgat1* en condiciones control y 100 mM de NaCl en hoja y flor a los 30 DTS. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Sorprendentemente, estos eran significativamente reducidos en el mutante respecto a WT tanto en control como en sal. La reducción del transporte de azúcares desde la hoja fuente

hasta los sumideros es incluso más evidente al analizar fruto verde, donde se alcanza una reducción superior al 70% en medio salino respecto a control.

También se analizaron ácidos orgánicos y aminoácidos con el fin de comprobar si la anulación del gen *SIRBOHG* provocaba también alteraciones en el resto de metabolitos primarios. Los ácidos orgánicos citrato y malato detectados en los tres órganos, no mostraban mayor acumulación en la hoja fuente del mutante en medio salino, como se observaba en azúcares, pero la respuesta en fruto si era similar ya que ambos ácidos se reducían hasta un 75% con la salinidad (**Figura 77**).

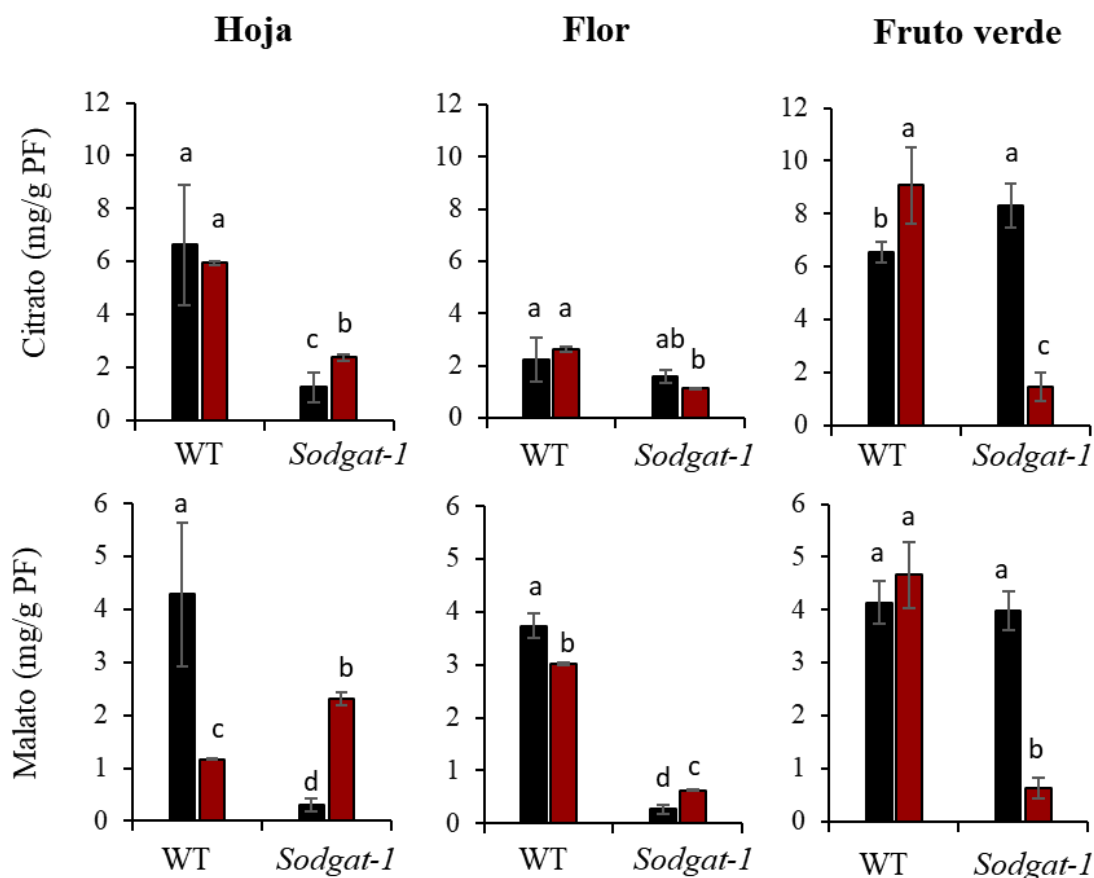


Figura 77. La disrupción del gen *SIRBOHG* provoca un aumento de ácidos orgánicos en hoja y reducción en flor y fruto verde. Contenidos de ácidos orgánicos (expresados en ng/g PF) de plantas WT y *sodgat1* en condiciones control y 100 mM de NaCl en hoja y flor a los 30 DTS. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Diferentes letras indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

Respecto a aminoácidos, son interesante los cambios encontrados en los aminoácidos mayoritarios de tomate, Glu, Gln, GABA y Pro. Así, nuevamente se observa el aumento inducido por la salinidad en hoja fuente del mutante, excepto en Glu, y la alta reducción en el fruto verde de todos los aminoácidos. Estos resultados muestran que la disrupción del gen *SIRBOHG* induce cambios en los diferentes metabolitos primarios, y en medio salino estos cambios parecen estar principalmente asociados a un menor transporte de azúcares desde la hoja fuente a los sumideros flor y fruto (**Figura 78**).

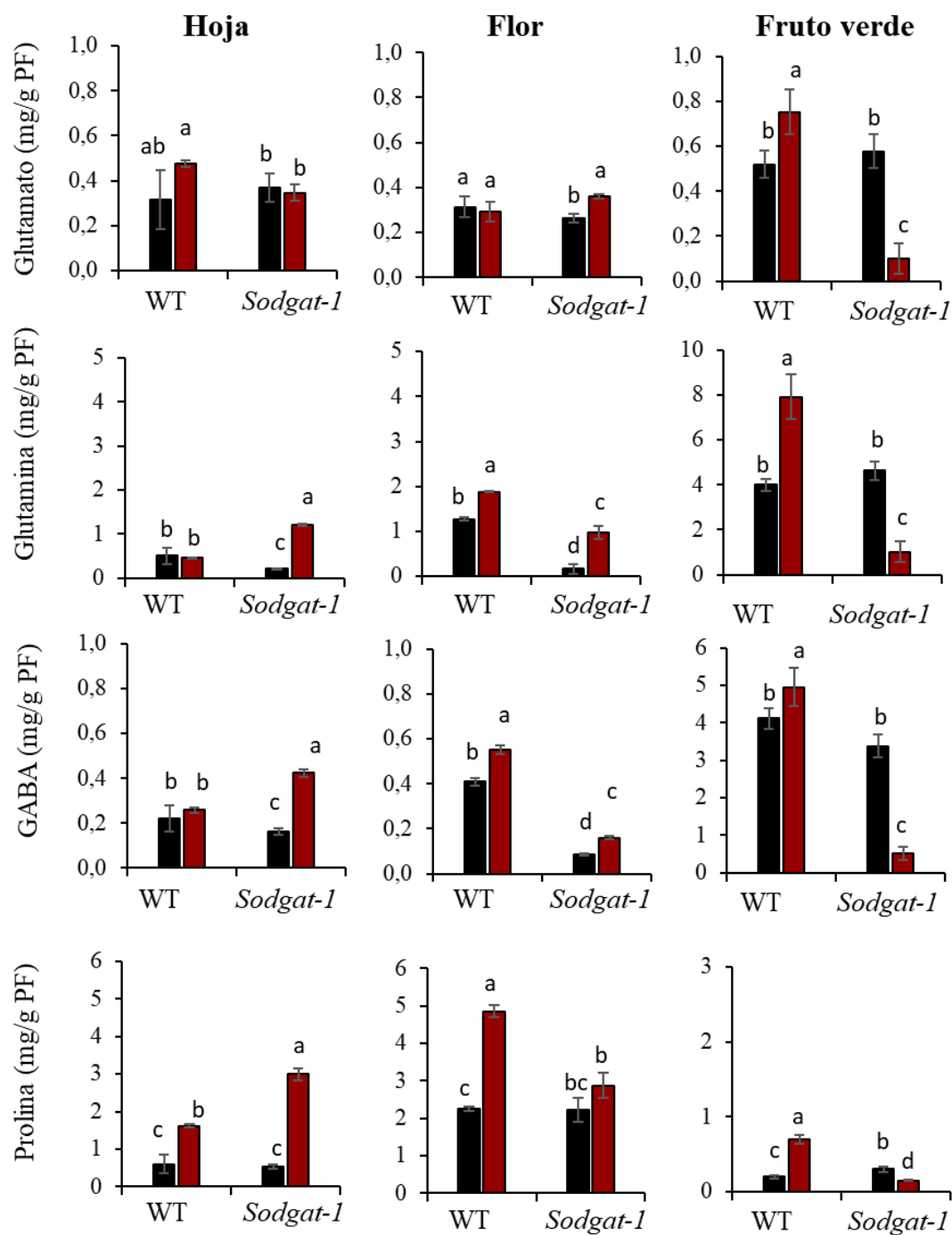


Figura 78. La disrupción del gen *SIRBOHG* provoca un aumento de aminoácidos en hoja y reducción en flor y fruto verde. Contenidos de aminoácidos (expresados en ng/g PF) de plantas WT y *sodgat1* en condiciones control y 100 mM de NaCl en hoja y flor a los 30 DTS. Valores medios \pm EE de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre genotipos y tratamientos (Test de Tukey's $p \leq 0.05$).

3.4. Estudio de la localización subcelular de AtRBOHG y SIRBOHG y las interacciones SICBL-SICIPK en la activación de SIRBOHG.

Arabidopsis es la especie modelo en la que más se ha investigado acerca de la transducción de estrés por complejos CBLs-CIPKs, y las investigaciones llevadas a cabo en esta especie vegetal han revelado la presencia de 10 proteínas sensoras de calcio de tipo CBL que forman una red de interacción con 26 proteínas quinasas de tipo CIPK (Kolukisaoglu et al., 2004; Weinl y Kudla, 2009). En esta tesis doctoral se llevó a cabo un análisis filogenético a partir de las secuencias de ADNc de 3 de los genes CBLs de tomate (*SICBL1*, *SICBL9*, *SICBL10*) y 6 de los genes de CIPKs (*SICIPK6*, *SICIPK11*, *SICIPK17*, *SICIPK20*, *SICIPK23* y *SICIPK24*). Los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran en la **Tabla 10**.

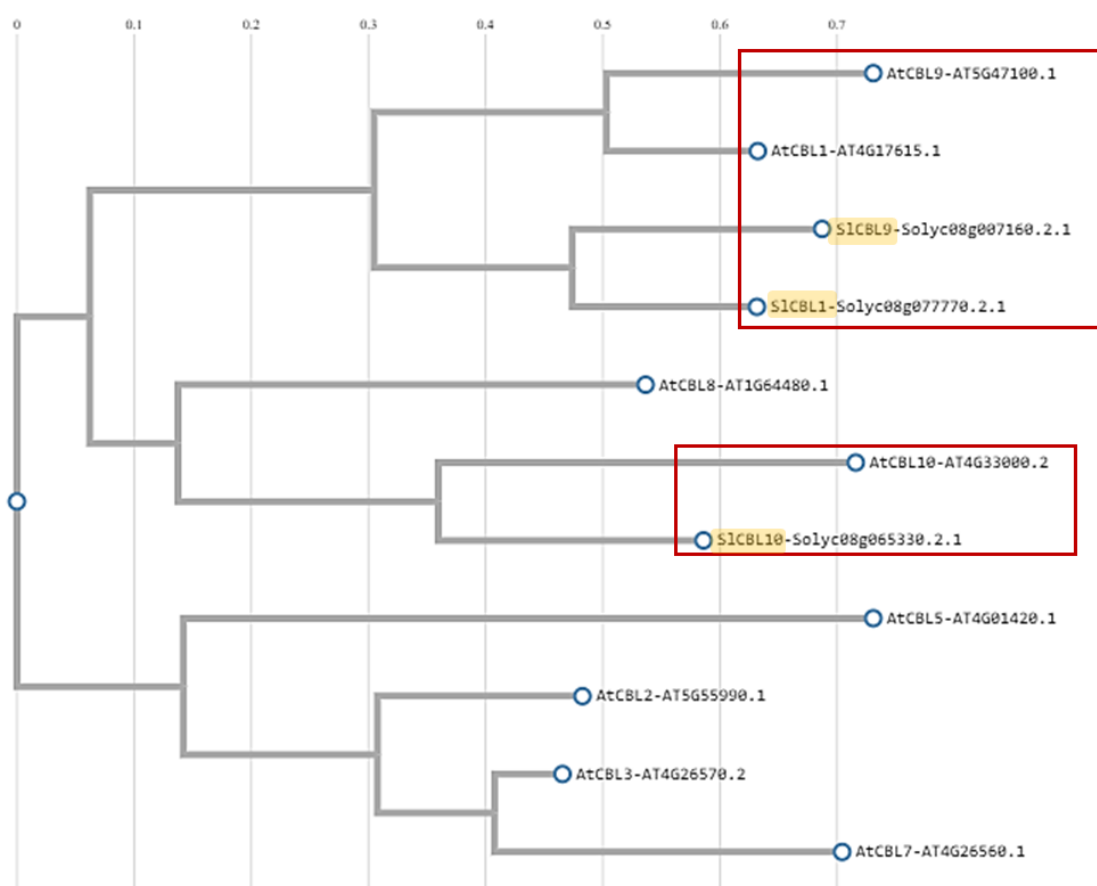


Figura 79. Genes ortólogos a *SICBL1*, *SICBL9* y *SICBL10* en *Arabidopsis*. Relaciones filogenéticas atendiendo a la secuencia de ADNc de los genes *CBLs* de *Arabidopsis thaliana* y candidatos estudiados en *Solanum lycopersicum* basadas en el criterio de evolución mínima aplicando el método de unión de vecinos con 1000 veces de *bootstrap*. Los análisis de datos identifican a *SICBL1* y *SICBL9* como ortólogos de *AtCBL1* y *AtCBL9* (cuadrado rojo) y *SICBL10* como ortólogo de *AtCBL10*. At: *Arabidopsis thaliana*, Sl: *Solanum lycopersicum*.

En cuanto a los genes *CBLs* analizados de tomate (**Figura 79**), se observa que *SICBL1* (Solyc08g077770) y *SICBL9* (Solyc08g007160) están filogenéticamente relacionados con sus ortólogos en *Arabidopsis* *AtCBL1* (AT4G17615.1) y *AtCBL9* (AT5G47100.1) ya que se agrupan en el mismo clado. A su vez, *SICBL10* (Solyc08g065330) es ortólogo a

AtCBL10 (AT4G33000.2). Respecto a los genes *CIPKs* (**Figura 80**), el gen *SICIPK20* (Solyc09g018280) aparece en el mismo clado que *AtCIPK14*, y a su vez está filogenéticamente cerca de *AtCIPK11* (AT2G30360.1). No obstante, los genes *SICIPK11* (JF831201.1) y *SICIPK17* (Solyc06g082440) se encuentran filogenéticamente más cerca de *AtCIPK11* que *SICIPK20*, tratándose posiblemente de dos genes de tomate con función redundante, ortólogos a *AtCIPK11* de *Arabidopsis*. *SICIPK23* (Solyc11g062410) está filogenéticamente muy cerca de los genes *AtCIPK3* (AT2G26980.1) y *AtCIPK26* (AT5G21326.1) de *Arabidopsis*, *SICIPK6* (Solyc12g010130) es ortólogo a *AtCIPK6* (AT4G30960.1); y *SICIPK24* (Solyc12g009570) es ortólogo a *AtCIPK24* (AT5G35410.1).

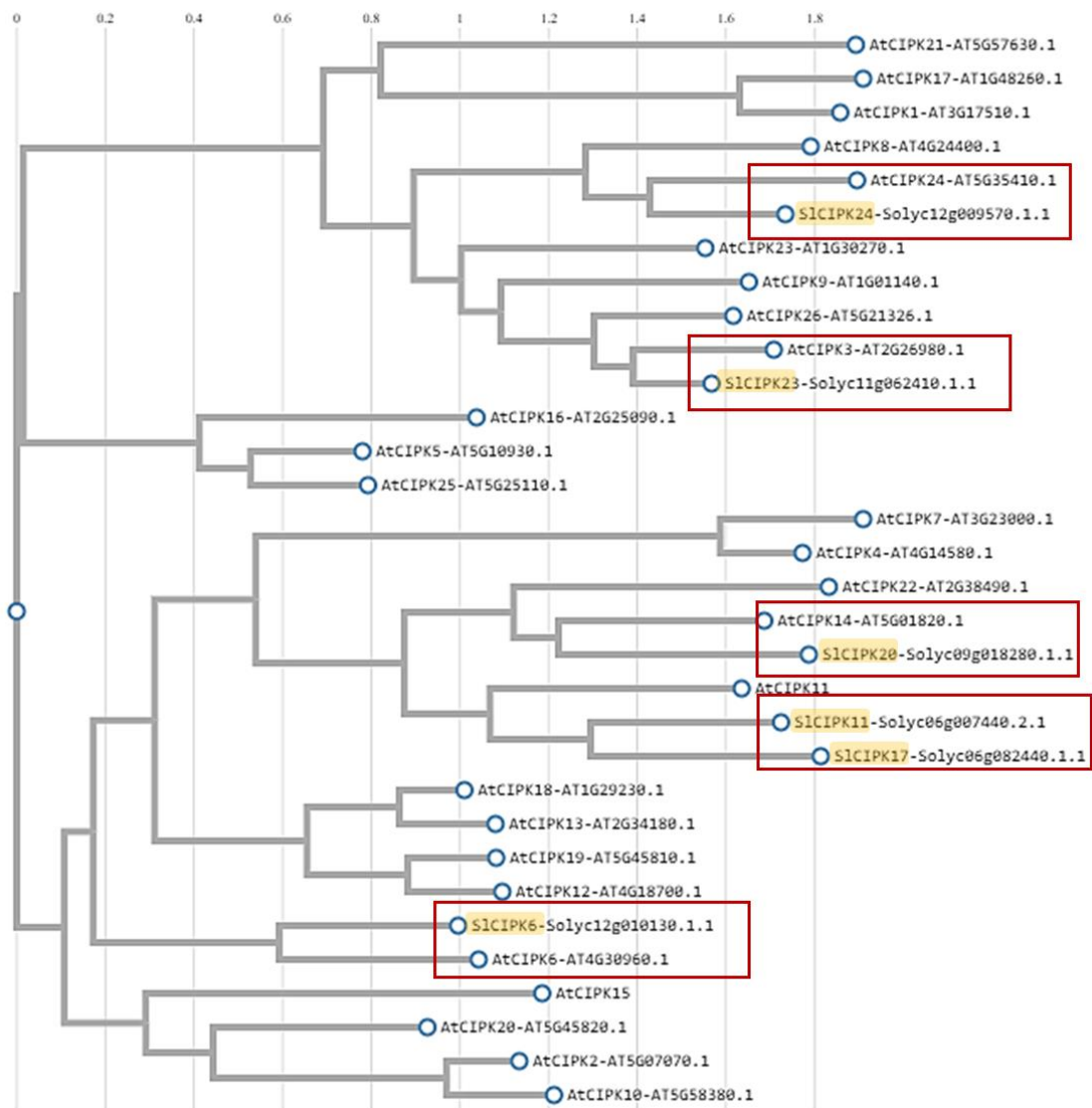


Figura 80. Genes ortólogos a SICIPK6, SICIPK11, SICIPK17, SICIPK20, SICIPK23 y SICIPK24 en *Arabidopsis*. Relaciones filogenéticas ateniendo a la secuencia de ADNc de los genes CIPKs de *Arabidopsis thaliana* y candidatos estudiados en *Solanum lycopersicum* basadas en el criterio de evolución mínima aplicando el método de unión de vecinos con 1000 veces de *bootstrap*. Los análisis de datos identifican a SICIPK20 como ortólogo de *AtCIPK14*; SICIPK11 y SICIPK17 como ortólogos de *AtCIPK11*; SICIPK6 como ortólogo de *AtCIPK6*, SICIPK23 muy relacionado con *AtCIPK3* y *AtCIPK26* y SICIPK24 como ortólogo de *AtCIPK24*. At: *Arabidopsis thaliana*, Sl: *Solanum lycopersicum*.

3.4.1. Complejos CBLs-CIPKs que median la activación de SLRBOHG dependiente de Ca²⁺ en células HEK293T

Para estudiar la regulación de SLRBOHG por complejos CBLs-CIPKs, utilizamos un ensayo de producción de ROS reconstituyendo las rutas basadas en las relaciones quinasas/sustrato en un sistema celular de riñón de embrión humano (HEK293T). Este sistema celular presenta una actividad NADPH oxidasa endógena muy baja, tratándose de un sistema excelente para el estudio de la regulación y la actividad de las proteínas RBOHs (NADPH oxidasas) de plantas expresadas heterológicamente y se ha probado con éxito para la identificación de módulos funcionales AtCBL-AtCIPK, que activan a AtRBOHs en *Arabidopsis* (Kimura et al., 2013; Drerup et al., 2013; Zhang et al., 2018; Han et al., 2019). Previamente se comprobó que la expresión de RBOH solo (sin la transfección de CBLs ni CIPKs) resulta en una generación basal de ROS comparable con la generación de ROS producida por células transfectadas con un vector vacío como control (Han et al., 2019). Sin embargo, cuando se aplica el ionóforo de calcio (ionomicina), con Ca²⁺ y con la NADPH oxidasa, se detecta una pequeña inducción en la producción de ROS, debida muy probablemente a la unión de Ca²⁺ a las manos EF de la proteína NADPH oxidasa (Drerup et al., 2013). Por lo tanto, la coexpresión de combinaciones CBLs-CIPKs con RBOHs en el cultivo celular HEK293T es una buena forma de estudiar qué combinaciones pueden ser potenciales activadoras de la producción de ROS dependiente de Ca²⁺ en las células vegetales. Sin embargo, el cultivo celular presenta actividad quinasa y fosfatasa humana endógena, por lo que las proteínas expresadas en él también están sujetas a esta actividad interna. La aplicación del inhibidor de fosfatasa (caliculina A, CA) puede inducir cierta producción de ROS incluso en ausencia de ionomicina (Ogasawara et al., 2008; Takeda et al., 2008). De hecho, se ha comprobado que el pretratamiento con CA mejora la producción de ROS inducida por RBOHC, RBOHD y RBOHF, sugiriendo un posible mecanismo sinérgico de fosforilación y unión de Ca²⁺ en la activación de las proteínas RBOH vegetales (Kimura et al., 2012).

En tomate no se ha identificado, hasta la fecha, ningún módulo funcional SICBL-SICIPK que active a las proteínas SLRBOHs, y con este objetivo realicé una estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Kudla de la Universidad de Münster, donde tienen a punto el sistema de células HEK293T y podía trabajar con proteínas de tomate. Para este ensayo seleccionamos tres proteínas SICBL de tomate (*SICBL1*, *SICBL9*, *SICBL10*) y 6 CIPK (*SICIPK6*, *SICIPK11*, *SICIPK17*, *SICIPK20*, *SICIPK23* y *SICIPK24*) para formar diferentes combinaciones de módulos funcionales SICBL-SICIPK. Para ello en primer lugar, se llevó a cabo un análisis filogenético a partir de las secuencias de ADNc de los 3 genes SICBLs y de los de los 6 genes SICIPKs junto con los 10 CBLs y 26 CIPKs de *Arabidopsis thaliana* y los números de accesión de las secuencias utilizadas se muestran en la **Tabla 10**. Los árboles filogenéticos obtenidos mostraron relaciones filogenéticas similares a las encontradas por Aljabari (2021). En cuanto a los genes *CBLs* analizados de tomate (**Figura 79**), se observa que *SICBL1* (Solyc08g077770) y *SICBL9* (Solyc08g007160) están filogenéticamente relacionados con sus ortólogos en

Arabidopsis AtCBL1 (AT4G17615.1) y *AtCBL9* (AT5G47100.1) ya que se agrupan en el mismo clado. A su vez, *SICBL10* (Solyc08g065330) es ortólogo a *AtCBL10* (AT4G33000.2). Respecto a los genes *CIPKs* (**Figura 80**), el gen *SICIPK20* (Solyc09g018280) aparece en el mismo clado que *AtCIPK14*, y a su vez está filogenéticamente cerca de *AtCIPK11* (AT2G30360.1). No obstante, los genes *SICIPK11* (JF831201.1) y *SICIPK17* (Solyc06g082440) se encuentran filogenéticamente más cerca de *AtCIPK11* que *SICIPK20*, tratándose posiblemente de dos genes de tomate con función redundante, ortólogos a *AtCIPK11* de *Arabidopsis*. *SICIPK23* (Solyc11g062410) está filogenéticamente muy cerca de los genes *AtCIPK3* (AT2G26980.1) y *AtCIPK26* (AT5G21326.1) de *Arabidopsis*, *SICIPK6* (Solyc12g010130) es ortólogo a *AtCIPK6* (AT4G30960.1); y *SICIPK24* (Solyc12g009570) es ortólogo a *AtCIPK24* (AT5G35410.1).

Las proteínas CBLs y CIPKs se seleccionaron en función de estudios previos publicados o estudios preliminares del grupo de investigación en CEBAS y Alemania. Así, se utilizaron los candidatos SICBL1 y SICBL9 en combinación con varias SICIPKs por ser ortólogos a AtCBL1 y AtCBL9, que son activadores junto con AtCIPK26 de AtRBOHF (proteína ortóloga a SIRBOHG) (Drerup et al., 2013). Se utilizó además SICBL10 dada la importancia previamente desarrollada en el capítulo anterior, con el fin de avanzar en su implicación en la señalización del estrés. Entre las proteínas SICIPKs seleccionamos para su ensayo, SICIPK6, por haberse descrito que fosforila y activa a RBOHB formando módulo funcional con CBL10 en tomate (de la Torre et al., 2013); SICIPK23, por haberse identificado su interacción con SICBL9 y SICBL1 en tomate (Aljabari et al., 2021), SICIPK24 por haberse descrito la interacción de su homólogo con CBL10 en *Arabidopsis* (Kim et al., 2007), así como en tomate en ensayos previos a esta tesis aún no publicados y finalmente SICIPK17, SICIPK20 por ser dos proteínas que estaban siendo utilizadas en el laboratorio del Dr. Kudla a mi llegada. Todas las proteínas (SICBLs, SICIPKs y SIRBOHG) se clonaron en plásmidos pEF1 (en el que la expresión está controlada por el promotor humano EF1 α y la señal de poliadenilación de BGH), ya que previamente había resultado el más adecuado para la expresión simultánea de varias proteínas (Drerup et al., 2013). La producción de ROS en las células HEK293T transfectadas se detectó mediante quimioluminiscencia amplificada con luminol. La coexpresión de proteínas en ausencia de CA nos permitió obtener solo algunos resultados, mientras que la aplicación de CA arrojó datos más claros relativos a todas las combinaciones probadas.

Cuando se coexpresó SICBL1 con SICIPK23 en células HEK293T sin CA (**Figura 81a**), se observó un aumento repentino en la producción de ROS inducidos por ionomicina. En el caso de SICBL1 con SICIPK20 sin CA, también se observó una activación de SIRBOHG aunque en menor medida. La aplicación del inhibidor de fosfatasa CA (**Figura 81b**) confirmó la fuerte activación de SIRBOHG por el módulo funcional SICBL1-SICIPK23 y también una clara activación, aunque menor por la combinación SICBL1-SICIPK20. Los ensayos con CA mostraron también que la combinación SICBL1-SICIPK6 activa fuertemente a SIRBOHG, y que las proteínas SICIPK11 y SICIPK17 combinadas con SICBL1 también eran capaces de producir un ligero aumento

de ROS en el sistema. No obstante, nuestros resultados indican que SICBL1-SICIPK24 (SISOS2) no activan la SIRBOHG, mostrando una producción de ROS basal similar a la producida cuando se coexpresaba SIRBOHG individualmente, o en combinación de la SICBL1 pero sin ninguna SICIPK.

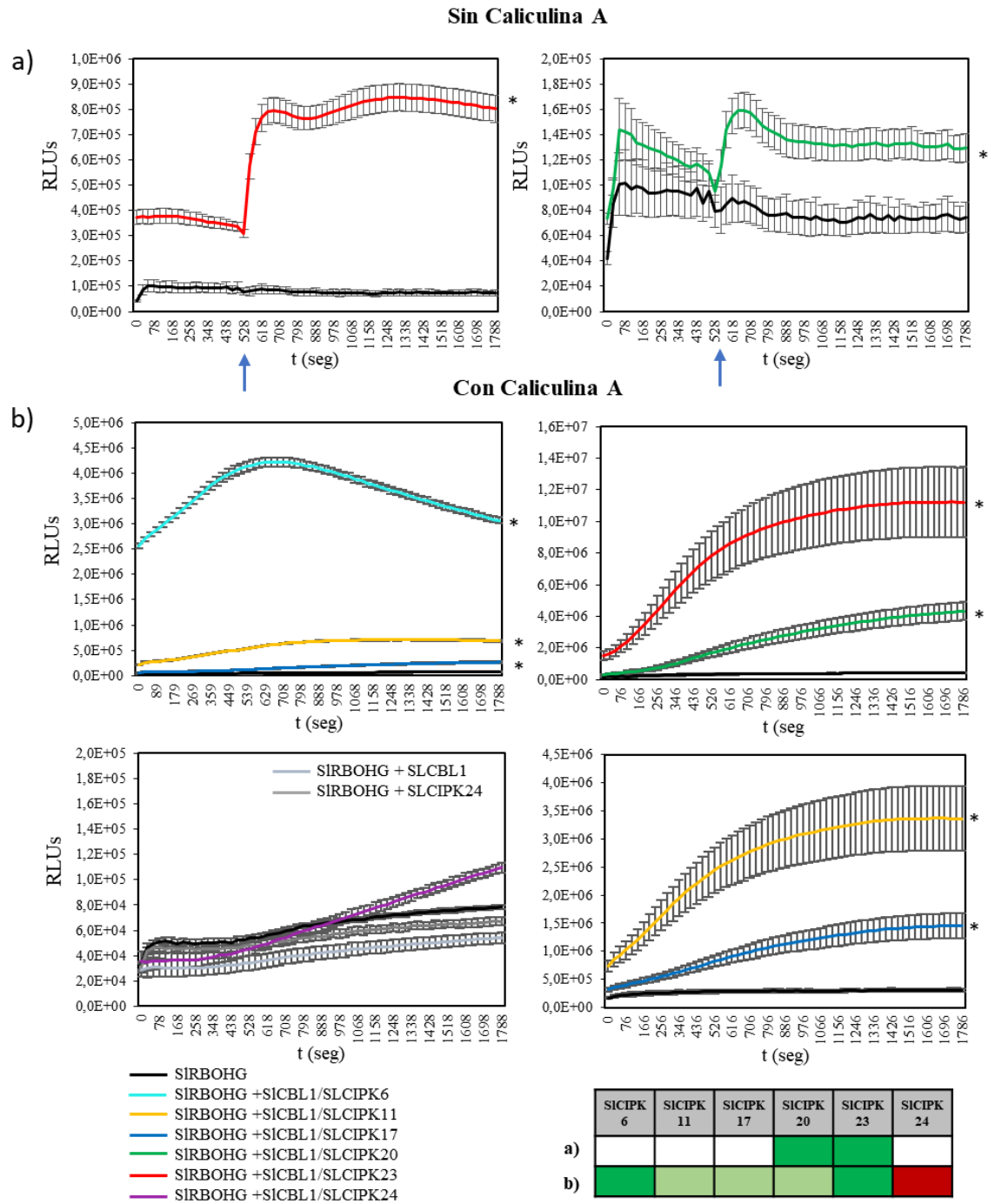


Figura 81. Coexpresión de CIPKs de tomate con SICBL1. Se representa la producción de ROS por SIRBOHG en las células HEK293T transfectadas en una placa de 96 pocillos detectada mediante quimioluminiscencia amplificada con luminol y expresada en unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) (a) en respuesta a la adición de ionomicina 1 μ M en el momento indicado con la flecha y (b) tras la adición de Caliculina A. Cada valor es el promedio de RLU/s de cinco pocillos \pm error estándar. En la leyenda (abajo a la izquierda) se indica el color asignado a cada combinación CBL-CIPK-SIRBOHG, mientras que

otras combinaciones duales probadas se indican en el interior del gráfico. La tabla inferior a la derecha resume el grado de activación observado (verde oscuro: alto, verde claro: bajo, rojo: nulo). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a la actividad de SIRBOHG independiente (Test t-Student)

Los resultados fueron similares cuando se coexpresaron las SICIPKs con SICBL9 (**Figura 82**), muy relacionada filogenéticamente con SICBL1. En este caso, la aplicación de ionomicina sin CA mostró de nuevo la fuerte activación de SIRBOHG por SICBL9-SICIPK23, con un aumento 10 veces superior de la luminiscencia relativa (RLU/s) en comparación con la producción de ROS resultante de la actividad de SIRBOHG sola, o la combinación dual de la SIRBOHG con la CBL o CIPK independientes (**Figura 82a-izqda**). No obstante, SICBL9-SICIPK20 no mostró mayor producción de ROS que cuando se expresó SIRBOHG individualmente (**Figura 82a-dcha**). En cuanto a los resultados tras la aplicación de CA (**Figura 82b**), se confirmó nuevamente la fuerte activación de la SIRBOHG por el complejo SICBL9-SICIPK23, y se detectó que al igual que ocurría con SICBL1, la coexpresión de SICBL9-SICIPK6 junto con SIRBOHG también presentaba un fuerte aumento en la producción de ROS en comparación con SIRBOHG sola. Por otro lado, tanto SICIPK11 como SICIPK17 en combinación con SICBL9 activaban SIRBOHG en menor medida, y en este caso, nuestros resultados además muestran una ligera activación de SIRBOHG por SICBL9-SICIPK24, aunque con nivel de RLU/s notablemente más reducido que el resto de combinaciones.

Finalmente, cuando se coexpresaron las distintas CIPKs probadas de tomate con SICBL10 (**Figura 83**), sin la aplicación de CA se encontró que SICBL10-SICIPK23 provocaba una fuerte activación de SIRBOHG, con un aumento de la luminiscencia relativa 7 veces superior que cuando se expresaba SIRBOHG sola (**Figura 83a-izqda**). La aplicación de ionomicina también reveló que ni SICBL10-SICIPK24 ni SICBL10-SICIPK6 eran combinaciones activadoras de la producción de ROS por SIRBOHG, mostrando un nivel de RLU/s similar al de SIRBOHG sola o coexpresada con SICBL10 sin ninguna CIPK (**Figura 83a-dcha**). Cuando se aplicó CA, además de corroborarse los resultados observados sin la aplicación del inhibidor, se observó una ligera activación de SIRBOHG por SICBL10-SICIP11 y SICBL10-SICIPK20, mientras que no se observó diferencia en la producción de ROS cuando se coexpresó SICBL10-SICIPK17 con la expresión de SIRBOHG sola.

En conjunto, nuestros resultados preliminares indican que SICBL1, SICBL9 y SICBL10 activan a SIRBOHG en tomate, formando módulo funcional con SICIPK23 y con SICIPK6 en el caso de SICBL1 y SICBL9, pero no con SICBL10, por lo que son candidatas potenciales para futuros estudios de señalización celular por ROS dependiente de calcio.

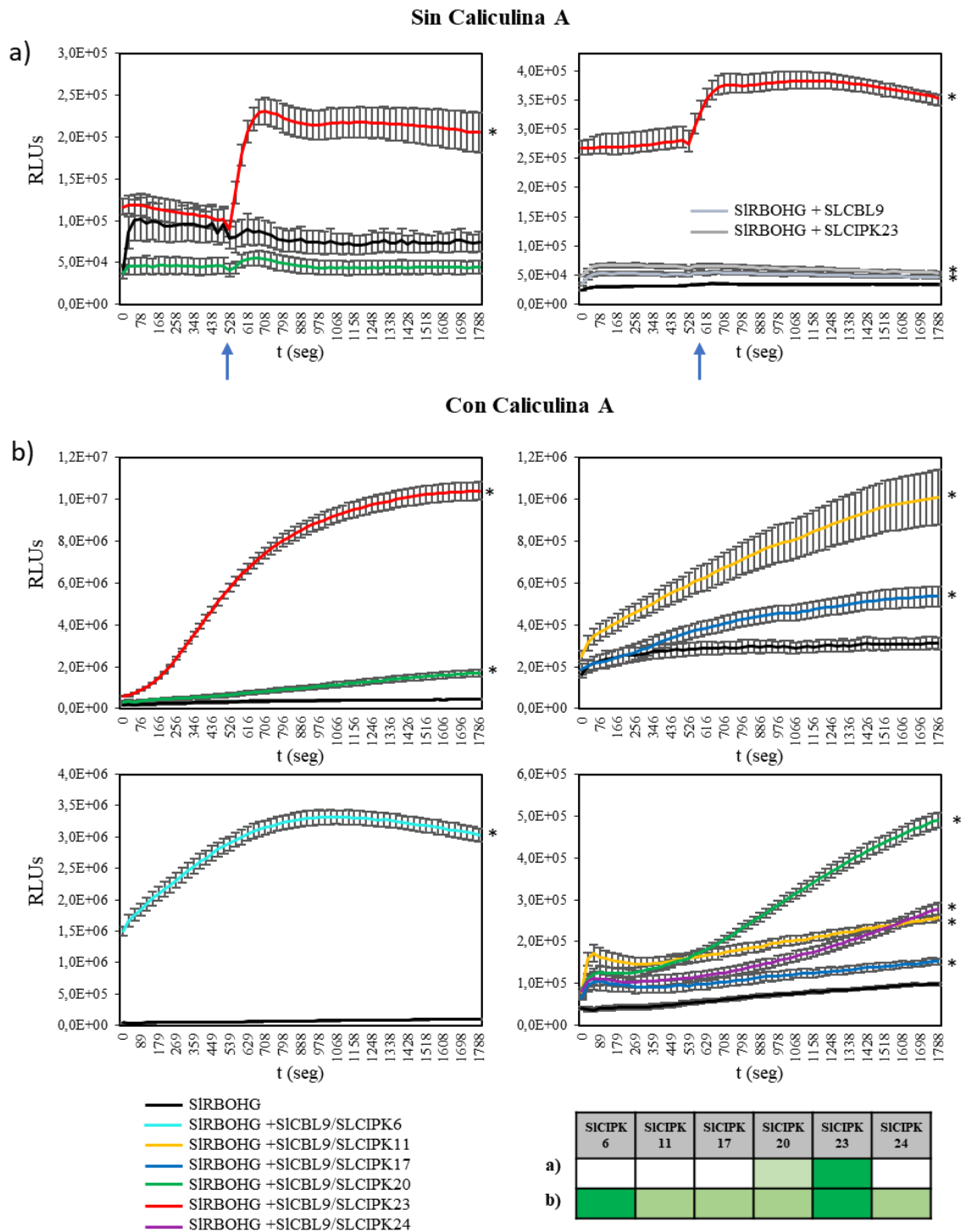
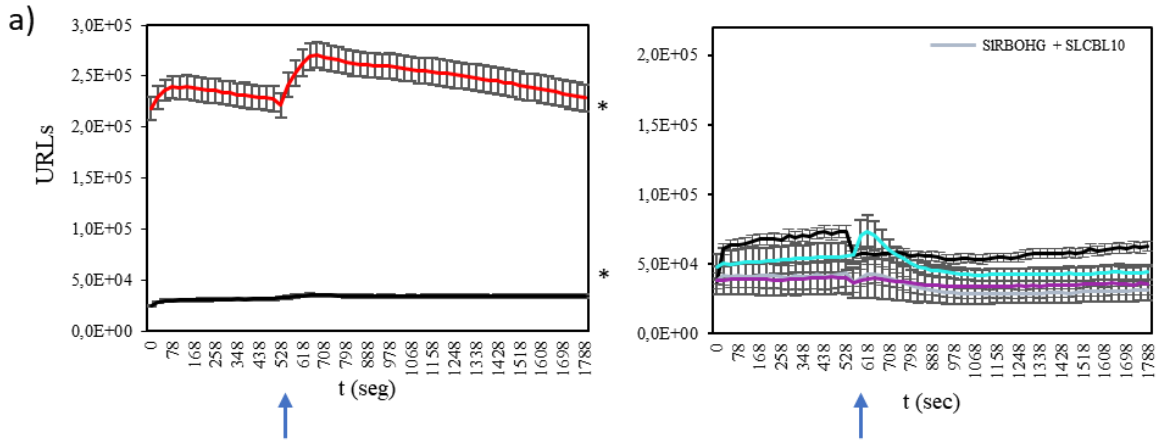


Figura 82. Coexpresión de CIPKs de tomate con SICBL9. Se representa la producción de ROS por SIRBOHG en las células HEK293T transfectadas en una placa de 96 pocillos detectada mediante quimioluminiscencia amplificada con luminol y expresada en unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) (a) en respuesta a la adición de ionomicina 1 μ M en el momento indicado con la flecha y (b) tras la adición de Caliculina A. Cada valor es el promedio de RLU/s de cinco pocillos \pm error estándar. En la leyenda (abajo a la izquierda) se indica el color asignado a cada combinación CBL-CIPK-SIRBOHG, mientras que otras combinaciones duales probadas se indican en el interior del gráfico. La tabla inferior a la derecha resume el grado de activación observado (verde oscuro: alto, verde claro: bajo, rojo: nulo). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a la actividad de SIRBOHG independiente (Test t-Student)

Sin Caliculina A



Con Caliculina A

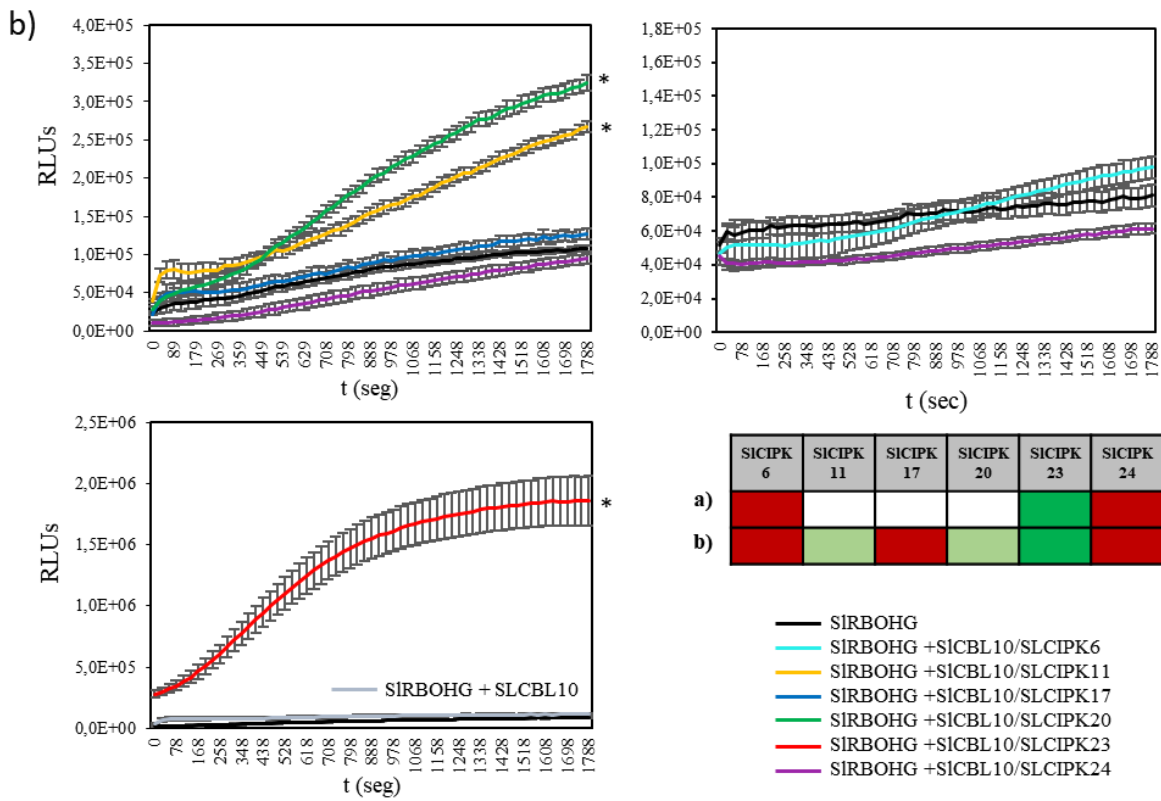


Figura 83. Coexpresión de CIPKs de tomate con SICBL10. Se representa la producción de ROS por SIRBOHG en las células HEK293T transfectadas en una placa de 96 pocillos detectada mediante quimioluminiscencia amplificada con luminol y expresada en unidades relativas de luminiscencia (RLU/s) (a) en respuesta a la adición de ionomicina 1 μ M en el momento indicado con la flecha y (b) tras la adición de Caliculina A. Cada valor es el promedio de RLU/s de cinco pocillos \pm error estándar. En la leyenda (abajo a la izquierda) se indica el color asignado a cada combinación CBL-CIPK-SIRBOHG, mientras que otras combinaciones duales probadas se indican en el interior del gráfico. La tabla inferior a la derecha resume el grado de activación observado (verde oscuro: alto, verde claro: bajo, rojo: nulo). Asteriscos indican diferencias significativas respecto a la actividad de SIRBOHG independiente (Test t-Student)

3.4.2. Localización subcelular de SIROBHG en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Para estudiar la localización de SIRBOHG en planta, analizamos mediante microscopía confocal la localización de GFP:SIRBOHG en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas transitoriamente. Para ello, cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron transformadas con plásmidos pGTVII que portaban en cada caso la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) sola, junto a AtRBOHF, o bien junto a SIRBOHG. En cada caso, las construcciones en vector se llevaron a cabo utilizando promotores diferentes: sXVE (promotor artificial), o UBQ10 o 35S (promotores naturales), todos promotores fuertes pero el primero artificial e inducible únicamente por β -estradiol durante un día antes de la toma de imágenes (Schlücking et al., 2013), mientras que los otros son constitutivos de *Arabidopsis* e inducidos directamente tras la transfección en la planta (Norris et al., 1993; Grefen et al., 2010). Hojas de *Nicotiana Benthamiana* se co-infiltraron con las cepas de *Agrobacterium* anteriormente mencionadas, junto con P19 y la proteína PM-OFP (previamente publicada como CBL1n:OFP por Batistič et al. (2008)), marcadora de membrana plasmática establecida que consta de 12 aminoácidos del extremo N de CBL1 fusionados con una variante de mRFP designada como *Orange Fluorescent Protein*, en inglés “proteína fluorescente naranja” (Bloch et al., 2011; Held et al., 2011).

Los resultados se muestran como proyecciones en 3D de la célula completa realizadas a partir de varios planos de células epidérmicas de *N. benthamiana*, que están coexpresando las proteínas indicadas con los promotores sXVE (**Figura 84**) o UBQ10 (**Figura 85**) en cada caso según se indica en las figuras. Ambas figuras presentan la misma estructura: las proteínas de fusión GFP en los paneles de la izquierda, el marcador de membrana en los centrales (control de expresión en membrana plasmática), y la superposición de ambas en los paneles de la derecha, y muestran la misma localización subcelular de las proteínas estudiadas con independencia del promotor utilizado en cada caso, aportando solidez a los resultados. En nuestros experimentos, observamos una distribución en forma de anillo de AtRBOHF:GFP y SIRBOHG:GFP en la membrana plasmática, ausente en citoplasma y núcleo, independientemente del promotor utilizado. En los paneles la derecha se observa en color blanco la superposición en la membrana plasmática de ambas proteínas de fusión.

PROMOTOR sXVE

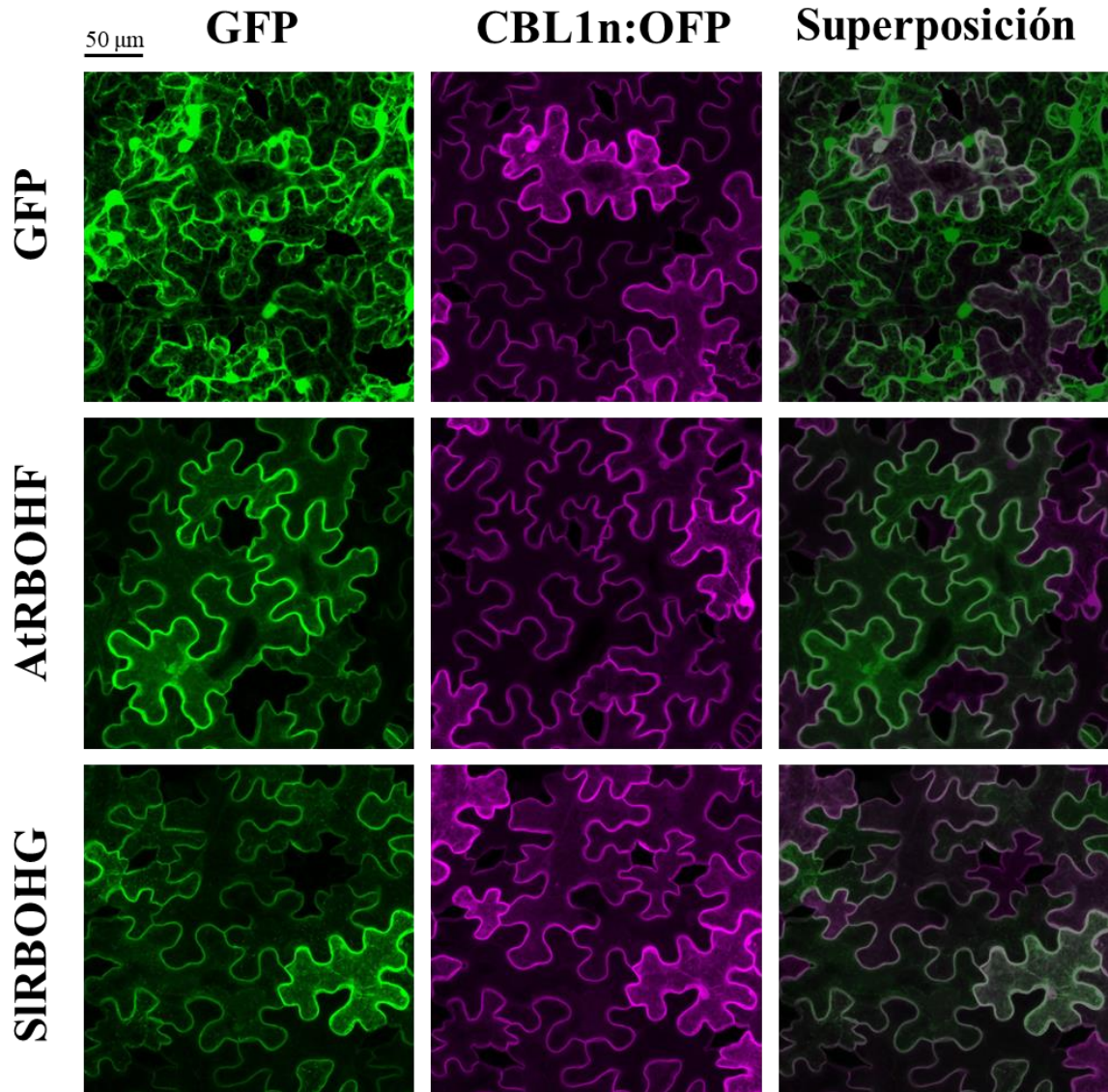


Figura 84. Localización subcelular de la proteína RBOHG de *Arabidopsis* y tomate en hojas de *Nicotiana benthamiana* bajo control del promotor inducido por β -estradiol, sXVE. Proyecciones 3D de distintos planos de células epidérmicas de *N. benthamiana* observadas a microscopio confocal expresando las combinaciones de construcciones indicadas junto con la cepa P19 de *Agrobacterium*. Localización de las proteínas de fusión GFP:SIRBOHG y GFP:AtRBOHF.

PROMOTOR UBQ10

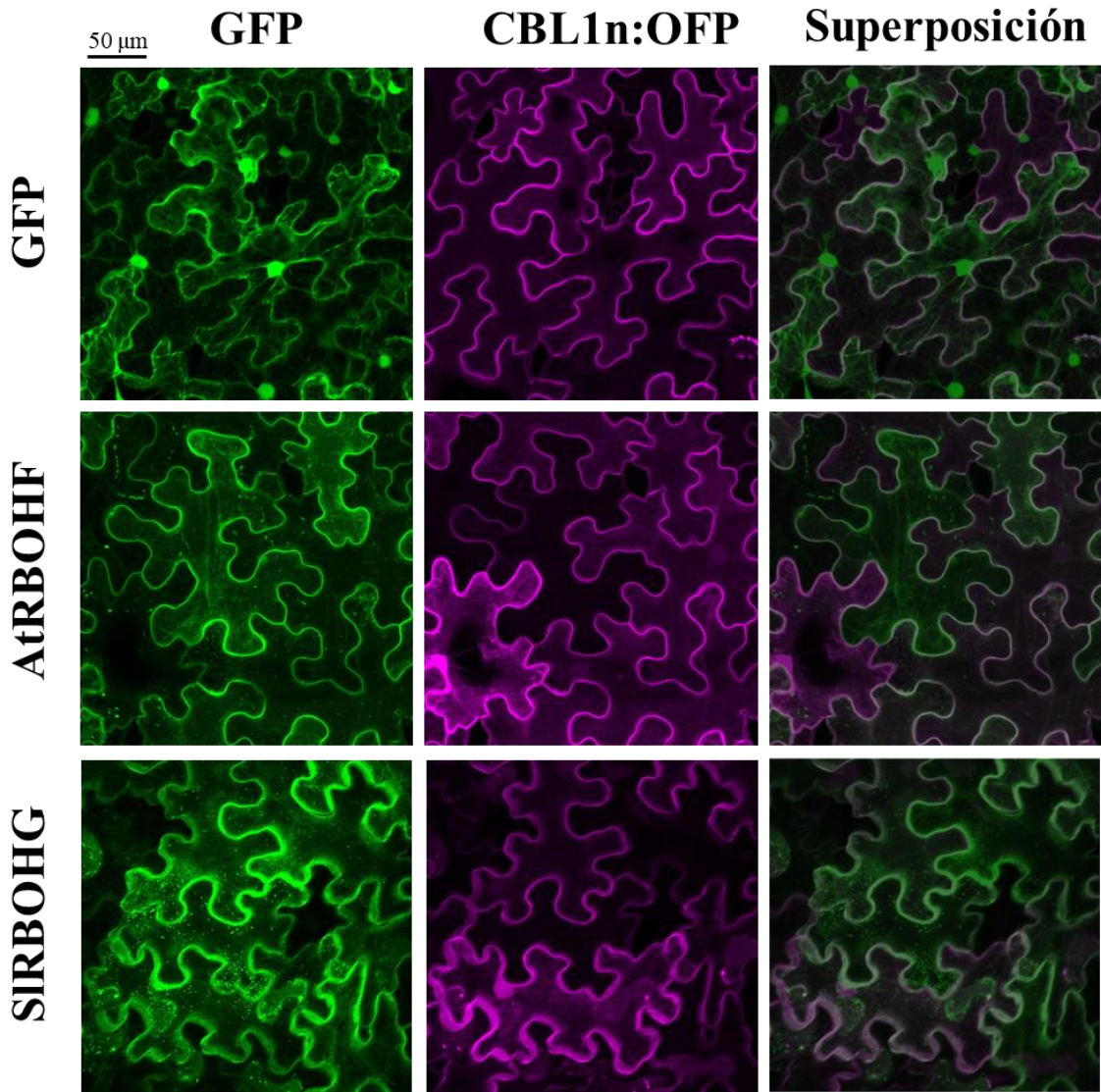


Figura 85. Localización subcelular de la proteína SIRBOHG de *Arabidopsis* y *tomate* en hojas de *Nicotiana benthamiana* bajo control del promotor constitutivo UBQ10. Proyecciones 3D de distintos planos de células epidérmicas de *N. benthamiana* observadas a microscopio confocal expresando transitoria las combinaciones de construcciones indicadas junto con la cepa P19 de *Agrobacterium*. Localización de las proteínas de fusión GFP:SIRBOHG y GFP:AtRBOHF comparadas con GFP.

4. Discusión

4.1. Papel del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a corto-medio plazo

4.1.1. El papel principal del gen *SIRBOHG* es la regulación del transporte de Na⁺ desde la raíz a la parte aérea

La identificación y caracterización de los mutantes *sodgat1-2* llevaba a la identificación del gen de tomate *SIRBOHG*, un gen clave en la tolerancia a la salinidad a corto-medio plazo implicado en la producción de ROS. La disrupción del gen provoca un alto grado de clorosis en la parte aérea desde el inicio del tratamiento salino, efecto que va generalmente asociado al efecto tóxico provocado por la acumulación de Na⁺ (Cuartero et al., 2010).

La acumulación de Na⁺ en parte aérea de las plantas que crecen bajo estrés salino depende tanto de la tasa de transpiración como de la concentración de Na⁺ en la corriente de transpiración. Si el mayor transporte de Na⁺ provocado por la interrupción del gen *SIRBOHG* se hubiera debido a una mayor transpiración, los fenotipos mutantes *sodgat1-2* no se habrían identificado *in vitro* (condiciones sin transpiración), como se ha observado en otros genes involucrados en la transpiración. En este contexto, *AtHKT1;1* de *Arabidopsis* exhibió diferentes respuestas cuando las plantas mutantes o sobreexpresadas se cultivaron en condiciones transpirantes y no transpirantes (Davenport et al., 2007). Nuestro grupo observó una respuesta similar en un mutante de tomate en el que se anuló un gen MYB de tipo R1 (Campos et al., 2016), y demostramos que el fenotipo sensible a la sal provocado por la interrupción de este gen era atribuible a un mayor transporte de Na⁺ de la raíz a parte aérea como resultado de una mayor conductancia estomática en condiciones de transpiración. En este estudio, se ha comprobado que ambos mutantes *sodgat* presentan mayor acumulación de Na⁺ en la parte aérea cuando son cultivados *in vitro* (**Figura 41b**). Por consiguiente, el hecho de identificar ambos mutantes *in vitro* indica que la función más importante del gen *SIRBOHG* está relacionada con el estrés iónico provocado por la toxicidad de Na⁺.

En condiciones *in vivo*, el transporte de Na⁺ desde la raíz a parte aérea de ambos mutantes fue incluso mayor, afectando completamente la acumulación de Na⁺ (**Figura 46**). Estos resultados corroboran que la sensibilidad a la sal inducida por la alteración de *SIRBOHG* se debe principalmente a una alteración de la homeostasis del Na⁺, como se observó previamente en tomate (Zhou et al., 2014; Yi et al., 2015). Sin embargo, la tasa de transpiración podría contribuir, aunque sea parcialmente a la mayor acumulación de Na⁺ en las hojas de ambos mutantes en condiciones *in vivo* (**Figura 45b**). Así, los valores de g_s y E eran mayores en los mutantes que en WT entre 2 y 4 DST, pero no a mayor tiempo de tratamiento (7 DST). Una tendencia similar fue observada por Yi et al. (2015), y estos autores sugerían que la transpiración es una respuesta precoz y puede jugar un papel importante durante las primeras etapas del estrés salino, mientras que el transporte de Na⁺ es predominante a más largo plazo y, por consiguiente, el principal determinante de la respuesta a la salinidad.

4.1.2. ¿La disrupción del gen *SIRBOHG* provoca un cotransporte agua – Na⁺?

Una característica fisiológica observada en ambos mutantes *sodgat1-2* ha sido su mayor acumulación de agua inducida por la salinidad en parte aérea (**Figuras 45a**), tratándose de una nueva característica provocado por la mutación que no se había observado hasta ahora en los estudios dirigidos a estudiar el papel de este gen en tomate. Dado que las acuaporinas (AQPs) juegan un papel importante en la absorción de agua por la raíz, una cuestión a dilucidar era si el mayor transporte de agua en los mutantes estaba asociado con una mayor expresión génica de AQPs. Las funciones de las isoformas de acuaporinas individuales siguen siendo en gran parte desconocidas y especialmente bajo estrés ambiental (Kapilan et al., 2018). En primer lugar, analizamos los niveles de expresión de seis *SIPIPs* y dos *SITIPs* en raíces y hojas de plantas control WT y *sodgat1-2*, ya que estas parecen ser diferentes en ambas partes de la planta y pueden variar dependiendo del genotipo (Reuscher et al., 2013; R. Li et al., 2016; Jia et al., 2020). En nuestro estudio, donde WT es el cv. Moneymaker, *SIPIP1;3* fue la isoforma de membrana plasmática que mostró la mayor expresión seguida de *SIPIP1;5*, mientras que *SIPIP1;7* y *SIPIP2;12* tenían la expresión más baja junto con los dos genes TIP analizados, *SITIP1;1* y *SITIP2;2* (**Figura 47**). Comparando nuestros resultados del cv. Moneymaker (WT) con los de otro genotipo de tomate, cv. M82, las respuestas son bastante similares, puesto que la segunda isoforma de WT *SIPIP1;5* fue la que exhibió la mayor expresión en raíces de cv. M82, y fue también elevada en hojas (Jia et al., 2020).

En WT, es interesante señalar el importante incremento inducido por la salinidad en los niveles de expresión de las dos isoformas mayoritarias *SIPIP1;3* y *SIPIP1;5* en sus hojas (**Figura 48a**). Dada su alta expresión, estos resultados sugieren que ambos genes son importantes en la regulación del transporte de agua bajo estrés salino en tomate, al menos en el cv. Moneymaker utilizado en este estudio. Sin embargo, el mayor transporte de agua en los mutantes *sodgat* no está asociado a una mayor expresión génica de AQPs, ya que ambos mutantes no solo no aumentaron los genes AQPs con la salinidad, sino que algunos de ellos se redujeron con respecto a WT, como se observa para *SIPIP1;3* y *SIPIP1;5* en raíces de ambos mutantes (**Figura 48b**).

La siguiente pregunta a dilucidar es si el alto transporte de Na⁺ desde la raíz a la parte aérea está asociado a un patrón de expresión alterado de los transportadores de iones en la raíz. La reducción de la expresión de *SISOS1* en las raíces de los mutantes *sodgat* (**Figura 49**) puede explicar parcialmente su alteración de la homeostasis de Na⁺, ya que *SISOS1* está involucrado en la extrusión de Na⁺ en la raíz (Olias et al., 2009). Sin embargo, los genes que juegan un papel importante en el transporte de Na⁺ desde la raíz hasta la parte aérea son los dos genes que codifican transportadores HKT1 en tomate, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* (Asins et al., 2013). Comparando ambos genes, Jaime-Pérez et al. (2017) mostraban que *SIHKT1;2* es el más importante en el control de la homeostasis de Na⁺, mientras que los alelos *SIHKT1;1* tuvieron poco efecto, lo que también se observó en otros estudios sobre los mecanismos de tolerancia a la sal en especies de tomate cultivado y silvestre (Almeida et al., 2014; García-Abellán et al., 2014; Albaladejo et al., 2017). En nuestro estudio, la expresión tanto de *SIHKT1;1* como de *SIHKT1;2* era

significativamente reducida en las raíces de los mutantes *sodgat*, tanto en condiciones control como de estrés salino (**Figura 49**). Además, es interesante señalar que el pretratamiento de WT con el inhibidor de RBOH (DPI) aumentó el transporte de Na^+ a la parte aérea debido a la reducción de la expresión de *SIHKT1;2* en raíz (**Figura 50c**).

La capacidad de las especies de tomate cultivado y silvestre para secuestrar Na^+ en las vacuolas de las células de las hojas se ha asociado con una mayor expresión de *NHX3* y *NHX4* (Gálvez et al., 2012; Albaladejo et al., 2017). En ambos mutantes se redujo la expresión en *SINHX3* tanto en el control como en la sal (**Figura 49**), lo que sugiere que además del mayor transporte de Na^+ hasta las hojas, la capacidad de compartimentación en vacuolas también es menor en ambos mutantes. Respecto a la homeostasis de K^+ , el principal gen implicado en el transporte de K^+ a la parte aérea es el canal SKOR (Nieves-Cordones et al., 2014). Nosotros observamos que la expresión del canal SKOR también se redujo en las raíces de ambos mutantes con respecto a WT (**Figura 49**). En resumen, los elevados valores de la relación Na^+/K^+ en la parte aérea de los mutantes *sodgat* está relacionada con el alto grado de reducción de la expresión de *HKT1;2*, provocando alta acumulación de Na^+ en la parte aérea de los mutantes, y también del canal SKOR en la raíz, involucrado en la carga de K^+ en el xilema, alterando la homeostasis de K^+ .

Teniendo en cuenta el alto transporte de Na^+ de raíz a parte aérea inducido por la disrupción de *SIRBOHG*, una pregunta relevante y sin resolver es si un alto transporte de agua de raíz a parte aérea está asociado a un cotransporte de agua - Na^+ , puesto que no era debido a la regulación positiva de los genes AQPs. En este sentido, los conceptos de transporte de la membrana vegetal se han basado generalmente en la suposición de que el agua y los solutos se mueven a través de las membranas pero por rutas separadas. Sin embargo, además de su importante papel como transportadores específicos de iones, los transportadores de membrana también pueden comportarse como canales de agua, aunque existe un gran desconocimiento al respecto. Wegner et al. (2017) sugerían un cotransporte de agua y solutos y, concretamente, con canales iónicos que proveen rutas para el transporte de iones y agua. Un claro ejemplo se observa en los canales maxi- K^+ de *Chara corallina*. También se observó otra "función dual" para la acuaporina de *Arabidopsis AtPIP2.1*, que transloca agua y al mismo tiempo conduce cationes, preferentemente Na^+ (Byrt et al., 2017). Recientemente, Handa et al. (2022) remarcan que las AQPs tienen varios sustratos fisiológicos junto con el agua, y los metaloides han surgido como uno de sus sustratos importantes, y se ha demostrado que las AQPs tienen un papel sustancial en la regulación de la homeostasis de los metaloides de las plantas. Además de los canales iónicos y las AQPs, se han propuesto otros candidatos para el acoplamiento del flujo soluto-agua, como cotransportadores catión-cloruro del tipo CCC, y transportadores de azúcares y aminoácidos (Wegner et al., 2017), aunque serán necesarios futuros estudios para dilucidar el cotransporte ion – agua.

4.1.3. La producción de H_2O_2 es crítica para la tolerancia al estrés salino

El H_2O_2 actúa como molécula señalizadora, participando en una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos (Baxter et al., 2014), estando las RBOH involucradas en la

generación de H₂O₂ como se ha observado previamente en tomate (Zhou et al., 2014; Yi et al., 2015). Nuestros resultados muestran que la expresión de *SIRBOHG* inducida por estrés salino está asociada con mayor producción de H₂O₂ solo en WT pero no en los mutantes *sodgat*, en ninguna de las condiciones de cultivo, *in vitro* e *in vivo* (**Figura 50a, b**). Interesantemente, cuando se estudiaron los efectos del inhibidor DPI en plantas WT tratadas con sal, se observó que la reducción de H₂O₂ se asociaba con un aumento de la acumulación de Na⁺ en parte aérea y una disminución en las raíces, lo que era debido a la reducción de la expresión de *SIHKTI;2* (**Figura 50c**). Estos resultados muestran que la inhibición de NADPH oxidasas en plantas WT tratadas con sal tiene un efecto similar a la interrupción del gen *SIRBOHG* en mutantes *sodgat1-2*. Ello está de acuerdo con diferentes autores que sugieren que el H₂O₂ es una molécula de señalización clave involucrada en la regulación del transporte de Na⁺ bajo estrés salino (Niu et al., 2018). Además, se ha propuesto un aumento en la producción de H₂O₂ dependiente de Rboh como un mecanismo para aumentar la descarga de Na⁺ mediada por HKT desde la savia del xilema (Jiang et al., 2012).

El H₂O₂ también sirve como señal para controlar la absorción de agua bajo estrés abiótico (Aroca et al., 2012), ya que tiene propiedades moleculares similares a las del H₂O y se mueve a través de la membrana plasmática vía acuaporinas (Castro et al., 2021). Sin embargo, las funciones del H₂O₂ en la absorción de agua son bastante confusas, ya que la aplicación exógena de H₂O₂ tendía, por un lado, a disminuir el transporte de agua (Lee et al., 2004; Aroca et al., 2005), y por otro aumentaban las PIP en *Phaseolus vulgaris* (Benabdellah et al., 2009). En nuestro estudio, parece existir una relación inversa entre la producción de H₂O₂ y la acumulación de agua bajo estrés salino, ya que el H₂O₂ aumentó con el estrés salino en WT pero no en los mutantes *sodgat* mientras que el contenido de agua incrementaba en los mutantes con respecto a WT, es decir la hiperhidratación no se asociaba con la producción de H₂O₂. La cuestión a resolver en futuros estudios será dilucidar cómo el H₂O₂ está participando en los procesos fisiológicos alterados por la disrupción de *SIRBOHG*. El conocimiento actual de cómo los tejidos vegetales detectan el estrés salino es bastante limitado hasta la fecha (Kudla et al., 2018), y sería muy interesante dilucidar si este gen actúa como un sensor de Na⁺.

4.2. Papel del gen *SIRBOHG* en la tolerancia a largo plazo

4.2.1. El gen *SIRBOHG* es clave en la tolerancia a la salinidad a lo largo del ciclo vegetativo de tomate.

La tolerancia a la salinidad puede variar con el estado de desarrollo de la planta, de modo que el grado de sensibilidad/tolerancia a corto/medio plazo puede ser diferente al mostrado a largo plazo. En definitiva, la biomasa de la planta, tanto vegetativa como reproductiva, depende de la disponibilidad de los recursos esenciales como luz, agua y nutrientes. En condiciones de estrés abiótico como salinidad, el metabolismo de la planta se modifica para producir compuestos necesarios para enfrentarse al estrés y, por consiguiente, las plantas deben distribuir los recursos que genera entre diferentes funciones. Las diferencias encontradas en el grado de tolerancia de un genotipo a nivel

vegetativo o reproductivo están principalmente asociadas al coste energético provocado por el uso parcial de metabolitos y nutrientes para la recuperación de la homeostasis en vez de ser utilizados para el desarrollo (Munns et al., 2019). Este uso múltiple de recursos crea una alteración en el balance desarrollo – tolerancia, lo que provoca que la tolerancia del genotipo puede ser diferente si se considera la biomasa vegetativa más bien que la reproductiva o *viceversa*. En orden a evitar o reducir pérdidas de producción en condiciones de estrés abiótico, la identificación de genes clave involucrados en la tolerancia a largo plazo es una prioridad, es decir genes que determinen cambios significativos no solo a nivel vegetativo sino también reproductivo. En una reciente revisión de nuestro grupo (Egea et al., 2022), destacábamos el escaso número de genes identificados hasta ahora en tomate y que están involucrados en la tolerancia a largo plazo, mientras que son muy numerosos los descritos en la bibliografía como genes de tolerancia. En este sentido, Kotula et al. (2020) señalaba que, a pesar del importante número de genes utilizados para transformar plantas tolerantes a estrés abiótico, este reto no ha sido tan exitoso como se esperaba, siendo precisamente uno de los mayores problemas la falta de estudios dirigidos a comprobar el papel de los genes a lo largo del ciclo vegetativo de la planta.

Cuando se estudiaron los efectos en el desarrollo vegetativo inducidos por la anulación del gen *SIRBOHG*, observamos que la sensibilidad a la sal se mantiene a largo plazo (**Figuras 51, 54, 55**), puesto que las plantas del mutante *sodgat1* seguían presentando el mismo fenotipo característico observado a corto-medio plazo (**Figura 43**). Así, la salinidad inducía una clorosis generalizada en todos los tejidos fotosintéticos del mutante, y esta clorosis se reflejaba en menores niveles de clorofila y fluorescencia del fotosistema II en las hojas del mutante (**Figura 54**). Es interesante resaltar que este efecto era evidente desde los primeros días de aplicación del estrés, a pesar de que el tratamiento se iniciaba en plantas adultas (8 hojas verdaderas).

Sin embargo, sí se ha observado en el mutante una diferencia fenotípica cuando las plantas se cultivan en invernadero bajo condiciones naturales: el mutante tiene mayor altura que WT independientemente del tratamiento y este efecto es debido a la mayor distancia entre nudos y no al mayor nº de hojas (**Figuras 51, 55**). Hasta ahora no se había observado esta característica en ninguno de los experimentos que se habían realizado previamente en condiciones controladas. Aunque no podemos precisar a qué se debe este efecto positivo sobre la altura del mutante cuando las plantas se desarrollan en condiciones naturales en el invernadero, podría estar relacionado con el mayor contenido de agua de la parte aérea del mutante (**Figuras 73 y 74**) que produce una mayor expansión celular. Así, el mutante *sodgat1* altera la morfología de la hoja tanto en control como en estrés salino (**Figura 70**), aumentando el tamaño celular y disminuyendo la densidad celular de las hojas procedentes de plantas adultas desarrolladas en invernadero bajo condiciones naturales. En este sentido, se ha puesto de manifiesto la importancia de las adaptaciones anatómicas cuando las plantas se cultivan en condiciones de estrés abiótico (Galmes et al., 2013; Albaladejo et al., 2017).

En resumen, la anulación del gen *SIRBOHG* en tomate induce un incremento en la altura de las plantas cuando se cultivan en invernadero bajo condiciones naturales, característica que hasta ahora no se había detectado en ninguno de los estudios anteriores dirigidos a dilucidar el papel de este gen en tomate. Desde el punto de vista del papel del gen en la tolerancia a la salinidad, el resultado más interesante es que el mutante mantiene la alta sensibilidad a la sal a largo plazo, es decir se puede concluir que *SIRBOHG* es un gen clave en la tolerancia del tomate a la salinidad a lo largo del ciclo de la planta y, por tanto, su anulación debe provocar importantes efectos en el desarrollo reproductivo.

4.2.2. El principal efecto provocado por la disrupción del gen *SIRBOHG* a nivel reproductivo es el alto porcentaje de abscisión de flores inducido por la salinidad

Hasta ahora no se había estudiado el papel del gen en el desarrollo reproductivo en medio salino y, por tanto, estos son los primeros resultados que demuestran que el gen *SIRBOHG* tiene un papel clave en el desarrollo reproductivo en condiciones de salinidad. El primer efecto observado era la alteración de la morfología de las flores del mutante por la salinidad, con mayor grado de clorosis en sépalos y pedicelos (órganos verdes de la flor), y necrosis en la parte superior de los estambres (**Figura 56**).

Pero sin duda, los mayores cambios tienen lugar en la zona de abscisión (ZA) del pedicelo, donde la parte proximal de la flor del mutante se atrofia y la abscisión se produce muy fácilmente, siendo estos cambios en la ZA del mutante debidos a una degradación celular inducida por la salinidad (**Figuras 57, 58**). Este efecto es muy evidente, los porcentajes de abscisión de flores son prácticamente nulos en WT tanto en control como en los dos tratamientos salinos (50 y 100 mM NaCl), y en el mutante *sodgat1* en control, mientras que alcanza el 60% en las plantas del mutante desarrolladas a 100 mM NaCl (**Figura 59**). El efecto es bastante inferior al nivel moderado de sal (50 mM NaCl) donde el porcentaje no llegó al 20%, lo que sugiere que el efecto no es proporcional al nivel de estrés.

La abscisión es un proceso normal durante el desarrollo del fruto debido a los mecanismos auto-reguladores de la planta para reducir la carga del fruto, pero en condiciones de estrés abiótico este mecanismo puede causar problemas importantes, siendo la tasa de abscisión floral un carácter agronómico de gran relevancia frente al cambio climático. Así, la abscisión prematura de órganos reproductivos reducirá significativamente el cuajado del fruto y la producción. Por tanto, un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la abscisión es de gran importancia para mantener la producción frente a las condiciones de estrés abiótico. Diferentes autores sugieren que los ROS juegan un papel crítico en la regulación de la abscisión (Li et al., 2020; Lee et al., 2022). Los procesos de abscisión se inician por señales de desarrollo y estímulos ambientales.

Entre los mecanismos involucrados en la abscisión floral en tomate, los mayores avances se han conseguido mediante la interacción entre hormonas y metabolismo de carbohidratos (Dong et al., 2021; Li et al., 2022). Para prevenir la abscisión en tomate se requiere un continuo y constante transporte polar basipétalo de auxina desde el órgano

distal (flor o fruto) a la ZA (Meir et al., 2010). El ácido indolacético (AIA) es la auxina más común y entre sus funciones, estimula el desarrollo del fruto. Así, la eliminación de la flor, el mayor sitio de biosíntesis de auxina (Aux), o la aplicación de un inhibidor del transporte polar de Aux, induce abscisión del pedicelo de la flor debido a la reducción del transporte de Aux a la ZA (Ma et al., 2021). Entre los pocos genes identificados hasta ahora, Sundaresan et al. (2021) indicaban que el gen *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN PROTEIN1 (KDI)* regula la abscisión de la flor vía alteración del gradiente de Aux en la ZA del pedicelo de tomate. En nuestro estudio, los niveles de AIA se reducían significativamente a 100 mM NaCl en el mutante respecto al control, tanto en hoja como en flor (**Figura 73**), por lo que la abscisión del mutante podría ser debida, al menos parcialmente, al transporte reducido de auxina hacia la hoja y flor. Otra hormona que mostró cambios similares a auxina en el mutante fue ABA, pues la salinidad provocaba reducciones del 88 y 76% en hoja y flor del mutante respecto a WT, por lo que podría estar también involucrada en el proceso de abscisión. En este sentido, Li et al. (2022) sugerían que existe una interacción entre AIA, ABA y etileno para regular la abscisión de la flor en tomate. Sin embargo, resultados contrarios eran encontrados por Reichardt et al. (2020), que demostraban que la abscisión de la flor en el pedicelo de tomate es regulada por fitosulfokina (PSK) en una manera independiente de auxina y etileno.

Otro proceso clave en la abscisión es la disponibilidad de carbohidratos. Así, la abscisión de la flor en tomate ocurre con mayor frecuencia cuando las plantas se cultivan en la época de otoño-invierno debido a que los niveles bajos de luz conducen a reducción de la tasa fotosintética y, por tanto, menor suministro de carbohidratos (Li et al., 2022). En este sentido, diferentes autores asocian el menor transporte de azúcares desde las hojas fuente a las inflorescencias con la abscisión de la flor de tomate (Chai et al., 2021; Li et al., 2022) y, precisamente, uno de los primeros procesos alterados por la salinidad en el mutante *sodgat1* es la distribución de azúcares entre hojas fuente y los órganos reproductivos que actúan como sumideros (flor y fruto verde). Así, los contenidos de hexosas y sacarosa (el principal fotoasimilado de la hoja que se transporta a los órganos reproductivos) incrementaban muy significativamente en las hojas fuente de las plantas mutantes desarrolladas a 100 mM NaCl mientras que se reducían los contenidos en flor y fruto verde, contrariamente a la respuesta de WT (**Figura 76**). Estos resultados sugieren que la alta abscisión en el mutante a alta salinidad está relacionada, al menos parcialmente, con su incapacidad de mantener el transporte de sacarosa vía floema a los tejidos sumideros flor y fruto. Sin embargo, este no parece ser el principal proceso responsable de la abscisión, puesto que los niveles de azúcares también se reducían muy significativamente en las flores control del mutante a pesar de que la abscisión era muy baja (**Figura 57**). Metabolitos intermedios del ciclo TCA como citrato y malato así como aminoácidos mayoritarios como Glu, Gln, GABA y Pro eran también diferencialmente regulados en el mutante *sodgat1* respecto a WT (**Figuras 77, 78**), lo que sugiere que la disrupción de *SIRBOHG* afecta la regulación de metabolitos primarios. Estos resultados pueden ser una consecuencia del menor transporte de azúcares desde la hoja fuente a los sumideros flor y fruto en el mutante *sodgat1* cuando las plantas se desarrollan en condiciones de alta salinidad, ya que los procesos del metabolismo celular están interconectados y, por tanto,

la reducción de azúcares contribuirá a los cambios observados en las rutas del TCA y aminoácidos.

Teniendo en cuenta el dramático efecto que provoca la anulación del gen sobre la abscisión del fruto a alta salinidad y, por consiguiente, sobre el rendimiento en fruto, otros de los múltiples y complejos procesos que regulan la fructificación podrían estar también afectados en el mutante (Dong et al 2021; X. Wang et al. 2021). En futuros estudios se abordarán otros aspectos como cantidad y calidad de polen, con el fin de ampliar los conocimientos sobre el papel de este gen clave en el rendimiento en fruto de tomate. Pero independientemente del proceso responsable de la alta abscisión provocada por la salinidad en el mutante, es interesante señalar que se ha demostrado por primera vez el papel del gen *SIRBOHG* en el desarrollo reproductivo y, especialmente, en la abscisión de flores cuando las plantas se desarrollan en condiciones de estrés salino. Puesto que los experimentos se llevaron a cabo en condiciones naturales, esta afirmación está basada en los resultados obtenidos al estudiar la influencia de las condiciones ambientales, donde se ha demostrado que el año de cultivo no ha influido sobre los efectos de la mutación del gen en salinidad, ni en el desarrollo vegetativo ni reproductivo y, por tanto, la abscisión de flores en el mutante *sodgat1* es independiente del año de cultivo (**Figura 65**). En definitiva, la anulación de *SIRBOHG* provoca una alta tasa de abscisión floral, carácter agronómico de gran relevancia.

4.2.3. El alto porcentaje de abscisión de flores inducido por la salinidad en el mutante está asociado a alta acumulación de Na⁺ y agua en la zona de abscisión

Hasta ahora se conoce que los ROS juegan un papel importante en la abscisión (Bar-Dror et al., 2011), pero los mecanismos por los que se produce son aún bastante desconocidos (Yang et al., 2015; Tranbarger et al., 2017; Ma et al., 2021).

Al analizar los contenidos de Na⁺ en los órganos reproductivos, se observó que la salinidad inducía una alta acumulación de Na⁺ en las flores del mutante, independientemente del estado de desarrollo de la flor (preantesis, antesis y post-antesis), pero no en las del WT (**Figura 74**). En este sentido, diferentes estudios demuestran que las reducciones de rendimiento inducidas por la salinidad están relacionadas con acumulación de Na⁺ y altos valores de la relación Na⁺/K⁺ en órganos reproductivos (Samineni et al., 2011; Kobayashi et al., 2017). En *Arabidopsis*, An et al. (2017) indicaban que los niveles de Na⁺ en flores, pero no en hojas, están positivamente relacionados con la tolerancia a salinidad, sugiriendo que el contenido de Na⁺ floral es más interesante para establecer la tolerancia a salinidad que el contenido en hojas o parte aérea. Por otra parte, Monihan et al. (2016) indicaban que la anulación del gen *SICBL10* inducía mayores niveles de Na⁺ y de la relación Na⁺/K⁺ en flores cuando las plantas se desarrollaban en medio salino, provocando múltiples defectos en la función de la flor y una fertilidad reducida en respuesta a la salinidad.

En tomate, Romero-Aranda et al. (2020) investigaban el papel de dos alelos *HKT1;2*, en la tolerancia a la sal, usando dos líneas NILs homocigotas para uno u otro alelo, *S*.

lycopersicum o *S. cheesmaniae* y sus respectivas líneas de silenciamiento (RNAi-*Sl/ScHKT1;2*). Ellos observaron importantes reducciones de rendimiento en fruto con la salinidad en ambas líneas RNAi, las cuales estaban asociadas a alta acumulación de Na^+ en flores y alterada relación Na^+/K^+ . Además, la alterada relación Na^+/K^+ estaba asociada con flores mostrando áreas necróticas en sépalos y pétalos e incluso pérdida de órganos reproductivos, permaneciendo solo los receptáculos unidos a los pedicelos remanentes. Es interesante resaltar que según Romero-Aranda et al. (2020) el transportador *SlHKT1;2* protege la flor frente a la toxicidad de Na^+ y mitiga la reducción de rendimiento en fruto de tomate bajo condiciones salinas. Precisamente, cuando se estudió la respuesta a la salinidad a corto-medio plazo, observamos que la expresión de *SlHKT1;2* era significativamente reducida en las raíces de los mutantes *sodgat*, pero estas reducciones tenían lugar tanto en condiciones control como en estrés salino (**Figura 46**). Por tanto, aunque pueda estar relacionada la abscisión de la flor provocada por la disrupción de *SIRBOHG* con las alteraciones del patrón de expresión de *SlHKT1;2*, no se puede concluir que este sea el principal proceso responsable de la abscisión. Además, Romero-Aranda et al. (2020) no observaron realmente abscisión de la flor en las líneas RNAi- *Sl/ScHKT1;2* sino alteraciones fenotípicas donde la flor no llegaba a escindirise.

Interesantemente, nosotros observábamos que la acumulación de Na^+ y la relación Na^+/K^+ eran incluso mayores en la zona de abscisión (ZA) del mutante que los valores encontrados en flores (**Figura 74**), lo que sugiere que la abscisión podría estar relacionada con el alto transporte de Na^+ a la ZA del mutante y/o los altos valores de la relación Na^+/K^+ . Pero además se observa que los incrementos inducidos por la salinidad en los contenidos de agua de la ZA eran también muy importantes (**Figura 74**) y, por tanto, podrían actuar conjuntamente en el proceso de abscisión inducido por la disrupción de *SIRBOHG* cuando las plantas se cultivan en medio salino.

Al estudiar la respuesta a corto-medio plazo, también se observó mayor acumulación de agua inducida por la salinidad en la parte aérea de ambos mutantes (**Figuras 45**). Pero al analizar los niveles de expresión de diferentes AQPs en raíz comprobamos que el mayor transporte de agua en los mutantes *sodgat* no estaba asociado a una mayor expresión génica de AQPs, ya que ambos mutantes no solo no aumentaron los genes AQPs con la salinidad, sino que algunos de ellos se redujeron con respecto a WT (**Figura 48**). Sin embargo, estos resultados no excluyen que el mayor contenido de agua en la ZA del mutante favorezca la abscisión de la flor al llegar a ella altos niveles de Na^+ . ¿Por qué pueden estar ambos interrelacionados? Es conocido que la expansión celular requiere influjo de agua (Braidwood et al., 2013). Así, el estrés por inundación incrementaba la abscisión de la flor y del fruto joven en algodón (Najeed et al., 2015) y diferentes autores sugieren que el influjo de agua en las células en expansión de la ZA es un fenómeno común durante la abscisión (Kumpk et al., 2013; Tranbarger et al., 2017). Cuando estudiábamos los cambios a nivel celular en la ZA, precisamente observábamos que la salinidad inducía un hinchamiento y degradación de la estructura celular (**Figura 58**).

Según R. Wang et al., (2021) el transporte de H₂O₂ y de agua mediado por acuaporinas es importante para la abscisión del pedicelo de la flor de tomate. Concretamente, estos autores observaron que la anulación de la expresión del gen *SITIP1;1* resultaba en abscisión demorada mientras que la sobreexpresión aceleraba la abscisión. El modelo propuesto es que la eliminación de la flor o bien el estrés osmótico ensalza el nivel de H₂O₂ apoplástico en la ZA del pedicelo, el cual es luego transportado al citoplasma vía *SITIP1;1*. A su vez, el elevado H₂O₂ citoplásmico suprime la señal de auxina al inicio del proceso de abscisión y luego ensalza la producción de etileno, activando la expresión de *SITIP1;1* inducida por *SIERF52*. Sin embargo, en nuestro estudio la disrupción del gen *SIRBOHG* no provoca realmente abscisión en condiciones no salinas a pesar de que el contenido de agua del mutante aumenta respecto a WT (4,8 y 6,4 ml/g PS en la ZA de WT y mutante, respectivamente (**Figura 74**). Por tanto, no podemos atribuir la alta abscisión inducida por la salinidad en el mutante, especialmente en el nivel alto de estrés, solo al mayor contenido de agua sino a la interacción entre la acumulación de Na⁺ y agua en la ZA del pedicelo.

4.3. Los genes *SICBL10* y *SIRBOHG* podrían jugar un papel clave en el diálogo cruzado Ca²⁺-ROS con función de señalización de estrés.

Numerosos estudios en *Arabidopsis* y otras especies en los últimos años han puesto de manifiesto una compleja regulación de la actividad de las NOX/RBOHs por unión del Ca²⁺ a los motivos EF-hand, por interacción proteína – proteína (pequeñas RAc GTPasas) y por modificaciones postranscripcionales (nitrosilación), entre las cuales la fosforilación está emergiendo como un jugador clave para la regulación de las RBOHs en plantas (Han et al., 2019). En concreto en RBOHF de *Arabidopsis*, homóloga a *SIRBOHG* en tomate, se han identificado varios sitios de fosforilación en el extremo N-terminal de la proteína que pueden contribuir individualmente a su regulación (Han et al., 2019). Algunas de las proteínas kinasa que se ha demostrado que pueden fosforilar y regular la actividad de la proteína RBOHF en *Arabidopsis* son la kinasa Open stomata 1 (OST1) que interacciona y fosforila a RBOHF produciendo una elevación de H₂O₂ que induce la expresión del gen *Slow Anion Channel-Associated 1 (SLAC1)* y con ello al cierre estomático (Shi et al., 2015). Otras proteínas kinasas que se han identificado como reguladoras de la actividad de RBOHF son las proteínas MAPKs, las CDPKs, capaces de interaccionar directamente con esta proteína en respuesta a patógenos y estrés oxidativo entre otras (Kovtun et al., 2000; Rentel et al., 2004). Más recientemente los complejos CBL-CIPKs también se han relacionado con la regulación de la actividad de las RBOHF en *Arabidopsis*. Así, estudios llevados a cabo por el grupo del Dr. Kudla (donde realicé mi estancia predocotoral) han podido demostrar la interacción y activación de RBOHF por los complejos formados por CIPK26 con CBL1 y CBL9 (Drerup et al., 2013). Este grupo además, también ha sido capaz de demostrar que la fosforilación mediada por CBL1-CIPK26 mejora la actividad de otra proteína de la familia de las NADPH oxidasa, la proteína RBOHC, lo cual además, es imprescindible para el crecimiento de los pelos radiculares (Zhang et al., 2018). Más recientemente también han demostrado la interacción y activación alternativa por otra CIPK, la CIPK11 junto con CBL1, así como que la fosforilación conjunta, pero en sitios diferentes, de RBOHF por CIPK26 y OST1 genera una activación adicional de la proteína, mientras que la fosfatasa ABI1 contrarresta esta activación por desfosforilación

(Han et al., 2019). Concluyendo tras todos estos estudios que la fosforilación por diferentes módulos CBL-CIPK, así como por otras proteínas kinasas, permitiría el ajuste fino en *Arabidopsis* de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por RBOHs en respuesta a diferentes estímulos y en diversos procesos fisiológicos.

En cuanto a la regulación de la actividad de las proteínas RBOHs en tomate por módulos funcionales CBL-CIPK, hasta donde llega nuestro conocimiento la única publicación hasta la fecha es un estudio publicado en 2013 (de la Torre et al., 2013) en el que se demostró que RBOHB era activada por fosforilación por un módulo funcional formado por CBL10-CIPK6 en respuesta a estrés biótico. Hasta la fecha, no hemos encontrado ninguna publicación referente a la identificación de módulos funcionales CBL-CIPK implicados en la fosforilación y activación de la SROHG de tomate. Los únicos resultados sobre los que tenemos conocimiento son los recogidos en la tesis de la Dra. Aljabari defendida recientemente (2021) y dirigida por el Dr. Kudla. En este caso SIRBOHG es nombrada como SIRBOHF, y en sus resultados se proporcionan la primera evidencia de la implicación de un módulo funcional CBL-CIPK, el formado por CBL1-CIPK23, en la regulación positiva de la actividad de SIRBOHF a través de la interacción y la fosforilación de la misma por SICIPK23, localizándose esta interacción en la membrana plasmática por la técnica BiFC.

En nuestro estudio nosotros hemos podido corroborar estos resultados previos, confirmando que el tándem formado por SICBL1-SICIPK23 es capaz de activar por fosforilación a SIRBOHG en presencia de Ca^{2+} (**Figura 81**). Además, hemos avanzado en el conocimiento de la regulación de esta NADPH-oxidasa de tomate por complejos CBLs-CIPKs, aportando claras evidencias de que la actividad de SIRBOHG puede ser también regulada positivamente por los módulos funcionales formados por SICBL9 y SICBL10 con SICIPK23 y SICBL1 y SICBL9 con SICIPK6, aumentando notablemente la coexpresión de estas proteínas en las células HEK la producción de ROS en presencia de Ca^{2+} (**Figuras 82 y 83**). Por el contrario, la combinación de cualquiera de estas tres CBLs con SICIPK24 no fue capaz de activar a SIRBOHG, no detectándose ningún aumento de la producción de ROS, mientras que la combinación de las mismas con SICIPK11 y SICIPK17, solo originó un ligero aumento de ROS y casi siempre en presencia de CA (**Figuras 81, 82 y 83**). Por otro lado, cabe esperar que la interacción de los módulos funcionales CBL-CIPK, identificados en esta tesis como activadores de SIRBOHG, se produzca en la membrana plasmática, ya que es donde se ha localizado *in vivo* la proteína SIRBO mediante la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (**Figuras 84 y 85**). En cuanto a los módulos funcionales formados por SICBL1 y SICBL9 con SICIPK23, estudios previos han demostrado que en tomate están implicados en la activación por fosforilación del canal de potasio LKT1 en raíz, regulando la entrada de K^+ a la planta, tanto en condiciones de deficiencia de K^+ como en condiciones de estrés salino (Amo et al., 2021). Por otro lado, en esta tesis también se ha comprobado que la ausencia de función del gen *SIRBOHG* en los mutantes *sodgat* provoca una disminución del contenido de K^+ en toda la planta, lo que sugiere que la activación de los SIRBOHG por los módulos funcionales formados por SICBL1 y SICBL9 con SICIPK23, podrían también estar implicados en la señalización de respuesta al déficit de K^+ en la planta por estrés salino.

En cuanto a SICBL10, nuestros estudios preliminares demostraron que *SICBL10* juega un papel clave en la regulación de los flujos vacuolares de Ca^{2+} en respuesta al estrés salino. También en esta tesis se ha evidenciado el importante papel de SIRBOHG en la señalización y activación de mecanismos de respuesta en estrés salino por lo que esta nueva función otorgada a SICBL10 en la regulación de la actividad de SIRBOHG, posiciona a estos dos genes objeto de estudio en esta tesis, como potenciales jugadores clave en el diálogo cruzado entre Ca^{2+} y ROS para la transmisión a larga distancia de la señalización del estrés salino en tomate. Así, recientemente se ha postulado la aparición de ondas de Ca^{2+} y ROS en movimiento célula a célula para la transmisión de la señal de un estímulo o estrés a larga distancia en la planta (revisado en Choi et al., 2017), tratándose de un tema de gran interés actualmente por su relevancia en la adaptación de la planta al estrés. No obstante, para poder afirmar la implicación de estos genes en el diálogo cruzado Ca^{2+} -ROS para la transmisión a larga distancia de señal, así como conocer qué respuestas a estímulos o estreses específicos son señalizados por cada módulo CBL-CIPK a través de la activación de SIRBOHG se requieren estudios posteriores en mayor profundidad.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE TOMATO *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10 (SLCBL10)* GENE

1.1. The *SLCBL10* gene has a very important role in tomato reproductive development, since knockout of the gene significantly reduces fruit yield when the plant is grown under optimal conditions. This gene is also involved in incidence of Blossom End Rot (BER), a physiopathy related to alteration of Ca^{2+} homeostasis, with symptoms of Ca^{2+} deficiency being visible at the vegetative and reproductive level in plants that have cancelled or reduced expression of *SICBL10*

1.2. It has been verified that the effects of silencing *SICBL10* gene on the incidence of BER are related to alterations in Ca^{2+} homeostasis, since Ca^{2+} levels significantly increase in source leaves and significantly reduce in sink organs, such as young leaves and flowers, as a reduction in the Ca^{2+} transport towards these organs has been detected.

1.3. Overexpression (OE) of *SICBL10* gene induces tolerance to salinity based on fruit yield, in particular in number of fruits, a result of great agronomic importance because the number of fruits is the yield component mainly affected at high levels of such stress.

1.4. When analysing the physiological changes induced by overexpression of *SICBL10*, it is observed that salinity tolerance is associated with the ability of accumulating high Na^+ in the root and maintaining the pattern of Na^+ distribution in the shoot, with the lowest levels in developing organs of the shoot.

1.5. *SICBL10* gene has opposite roles in shoot and root regarding salt tolerance. While it is a positive regulator of tolerance in shoot, it is a negative regulator of such tolerance in root, since loss-of-function of the gene confers salt tolerance when used as rootstock.

1.6. Rootstocks carrying the silenced-*SICBL10* gene are capable of increasing fruit yield of untransformed plant (WT) used as scion when culture is performed under saline conditions. The tolerance to salinity induced by rootstocks with silenced-*SICBL10* is related to changes at the physiological and molecular levels, especially in the Na^+ and K^+ contents and in the expression of main genes involved in the transport of both key ions.

1.7. The first results on the role of *SICBL10* in tomato tolerance to other abiotic stresses are presented, such as drought and temperature stress. These show that *SICBL10* overexpression induces sensitivity to heat stress, contrary to the response observed for salt stress. These results are of great interest to advance in the knowledge about the predominant mechanisms triggered in the plant response to a combination of abiotic stresses, which is a key point given the multiple abiotic stresses that affect plant growth and development in Mediterranean environmental conditions.

2. ROLE OF THE *RESPIRATORY BURST OXIDASE G (SIRBOHG)* GENE IN SALINITY TOLERANCE OF TOMATO

2.1. The characterization of two *SIRBOHG* gene knockout mutants, denominated *sodgat1* and *sodgat2* (from *sodium gatherer*), featured by a massive transport of Na^+ from the root

to the aerial part, has allowed the determination of the key importance in salinity tolerance of this gene involved in ROS production.

2.2. Disruption of the *SIRBOHG* gene causes a high transport of water and Na⁺ from the root to the aerial part, a response observed both in non-transpiration (*in vitro*) and transpiration (*in vivo*) growth conditions. This physiological alteration is mainly associated with changes in the expression of the ions transporters in the roots of the knockout mutants especially with the reduction of the expression of *SIHKT1;2*, the most important gene involved in the control of Na⁺ homeostasis in tomato.

2.3. H₂O₂ production under saline conditions is impaired in *SIRBOHG* knockout mutants. Thus, the mutants do not accumulate H₂O₂ with salinity, contrary to the higher H₂O₂ production in untransformed (WT) plants.

2.4. Long-term phenotypic and agronomic characterization under different growth conditions has shown the critical role of *SIRBOHG* gene in tolerance to salinity throughout the crop cycle, being a key gene in vegetative development and, especially, reproductive development, where its loss-of-function causes significant production losses.

2.5. The main effect caused by disruption of *SIRBOHG* gene at the reproductive level is a high degree of flower abscission induced by salinity, where important changes are produced in the abscission zone of the flower pedicel. This effect is mainly observed at 100 mM NaCl salt treatment, where the predominant effect induced by salinity is the ionic stress caused by the high accumulation of the toxic Na⁺ ion.

2.6. The hormonal alterations induced by disruption of *SIRBOHG* gene can influence the abscission of flowers, as the levels of auxin and ABA were reduced with salinity in leaves and flowers of the knockout mutant. Another of the processes that seems to be involved in flower abscission is primary metabolism and, especially, sugars, due to the significant reduction in the transport of these from the source leaf to the sink flower and fruit in the mutant.

2.7. When analysing Na⁺ contents in reproductive organs, it was observed that salinity induced a high accumulation of this cation in the mutant flowers, regardless of the stage of flower development (pre-anthesis, anthesis and post-anthesis), but not in the WT flowers. In addition, accumulation of Na⁺ was even higher in the abscission zone (AZ) than in flowers in the knockout mutants, which suggests that abscission is mainly linked to high transport of Na⁺ to the AZ, a transport that is also associated with a high accumulation of water.

2.8. This research work will make it possible to advance in the identification of processes involved in the premature abscission of reproductive organs, where ROS seem to play a critical role in regulating abscission, since abscission is an agronomic trait of critical importance to maintain crop production in climate change conditions.

2.9. A key aspect in tolerance to abiotic stress is to go further in the knowledge of the signalling mechanisms of the plant when reacting to such stress. In this regard, the results presented in this research work suggest that *SICBL10* and *SIRBOHG* could be key players in the crosstalk between Ca²⁺ and ROS with signalling functions in tomato.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M. V., & Mengiste, T. (2009). Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal*, 58(2), 347-360.
- Adams, P., & Ho, L. C. (1993). Effects of environment on the uptake and distribution of calcium in tomato and on the incidence of blossom-end rot. *Plant and soil*, 154, 127-132.
- Ahmed, S., Kouser, S., Asgher, M., & Gandhi, S. G. (2021). Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1089-1105.
- Aiqing, S., Somayanda, I., Sebastian, S. V., Singh, K., Gill, K., Prasad, P. V. V., & Jagadish, S. V. K. (2018). Heat stress during flowering affects time of day of flowering, seed set, and grain quality in spring wheat. *Crop Science*, 58(1), 380-392.
- Albaladejo, I., Egea, I., Morales, B., Flores, F. B., Capel, C., Lozano, R., & Bolarin, M. C. (2018). Identification of key genes involved in the phenotypic alterations of res (restored cell structure by salinity) tomato mutant and its recovery induced by salt stress through transcriptomic analysis. *BMC plant biology*, 18, 1-19.
- Albaladejo, I., Meco, V., Plasencia, F., Flores, F. B., Bolarin, M. C., & Egea, I. (2017). Unravelling the strategies used by the wild tomato species *Solanum pennellii* to confront salt stress: from leaf anatomical adaptations to molecular responses. *Environmental and Experimental Botany*, 135, 1-12.
- Albert, E., Segura, V., Gricourt, J., Bonnefoi, J., Derivot, L., & Causse, M. (2016). Association mapping reveals the genetic architecture of tomato response to water deficit: focus on major fruit quality traits. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6413-6430.
- Ali, Z., Park, H. C., Ali, A., Oh, D.-H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W. S., & Kim, W.-Y. (2012). TsHKT1; 2, a HKT1 homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea*, shows K⁺ specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiology*, 158(3), 1463-1474.
- Aljabari, Z. (2021). *Investigations on heat and salt stress tolerance in tomato «Solanum lycopersicum»*. Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.
- Almeida, J., Perez-Fons, L., & Fraser, P. D. (2021). A transcriptomic, metabolomic and cellular approach to the physiological adaptation of tomato fruit to high temperature. *Plant, Cell & Environment*, 44(7), 2211-2229.
- Amo, J., Lara, A., Martínez-Martínez, A., Martínez, V., Rubio, F., & Nieves-Cordones, M. (2021). The protein kinase SICIPK23 boosts K⁺ and Na⁺ uptake in tomato plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(12), 3819-3835.
- An, D., Chen, J.-G., Gao, Y.-Q., Li, X., Chao, Z.-F., Chen, Z.-R., Li, Q.-Q., Han, M.-L., Wang, Y.-L., & Wang, Y.-F. (2017). AtHKT1 drives adaptation of *Arabidopsis thaliana* to salinity by reducing floral sodium content. *PLoS Genetics*, 13(10), e1007086.
- Andrés, Z., Pérez-Hormaeche, J., Leidi, E. O., Schlücking, K., Steinhorst, L., McLachlan, D. H., Schumacher, K., Hetherington, A. M., Kudla, J., & Cubero, B. (2014). Control of vacuolar

- dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), E1806-E1814.
- Apse, M. P., & Blumwald, E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS letters*, 581(12), 2247-2254.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285(5431), 1256-1258.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., & Teraoka, T. (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24(1), 135-147.
- Aroca, R., Amodeo, G., Fernández-Illescas, S., Herman, E. M., Chaumont, F., & Chrispeels, M. J. (2005). The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiology*, 137(1), 341-353.
- Aroca, R., Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of experimental botany*, 63(1), 43-57.
- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olias, R., Álvarez De Morales, P. A. Z., Huertas, R., Li, J. U. N., JAIME-PÉREZ, N., Haro, R., & Raga, V. (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis. *Plant, cell & environment*, 36(6), 1171-1191.
- Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R. P., Lobell, D. B., Cammarano, D., Kimball, B. A., Ottman, M. J., Wall, G. W., & White, J. W. (2015). Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature climate change*, 5(2), 143-147.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., García-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., & Flores, F. B. (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant cell reports*, 30, 1865-1879.
- Atkinson, C. J., Mansfield, T. A., Kean, A. M., & Davies, W. J. (1989). Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of *Commelina communis* L. *New Phytologist*, 111(1), 9-17.
- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- Bai, Y., & Lindhout, P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of botany*, 100(5), 1085-1094.
- Bai, Y., Sunarti, S., Kissoudis, C., Visser, R. G. F., & van der Linden, C. (2018). The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. *Frontiers in plant science*, 9, 801.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173.
- Balestrini, R., Brunetti, C., Cammareri, M., Caretto, S., Cavallaro, V., Cominelli, E., De Palma, M., Docimo, T., Giovinazzo, G., & Grandillo, S. (2021). Strategies to modulate specialized metabolism in Mediterranean crops: From molecular aspects to field. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2887.

- Baniwal, S. K., Bharti, K., Chan, K. Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S. K., Nover, L., Port, M., & Scharf, K.-D. (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of biosciences*, 29, 471-487.
- Bar-Dror, T., Dermastia, M., Kladnik, A., Žnidarič, M. T., Novak, M. P., Meir, S., Burd, S., Philosoph-Hadas, S., Ori, N., & Sonogo, L. (2011). Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato. *The Plant Cell*, 23(11), 4146-4163.
- Barragan, V., Leidi, E. O., Andres, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernandez, J. A., Cubero, B., & Pardo, J. M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(3), 1127-1142.
- Bar-Tal, A., Aloni, B., Karni, L., Oserovitz, J., Hazan, A., Itach, M., Gantz, S., Avidan, A., Posalski, I., & Tratkovski, N. (2001). Nitrogen nutrition of greenhouse pepper. I. Effects of nitrogen concentration and NO₃:NH₄ ratio on yield, fruit shape, and the incidence of blossom-end rot in relation to plant mineral composition. *HortScience*, 36(7), 1244-1251.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., & Blumwald, E. (2011). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant Cell*, 23(9), 3482-3497.
- Bassil, E., Zhang, S., Gong, H., Tajima, H., & Blumwald, E. (2019). Cation specificity of vacuolar NHX-type cation/H⁺ antiporters. *Plant physiology*, 179(2), 616-629.
- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K. S., Grillo, S., & Zhu, J.-K. (2007). SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and cellular biology*, 27(22), 7781-7790.
- Batistič, O., & Kudla, J. (2009). Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(6), 985-992.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S., & Kudla, J. (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(5), 1346-1362.
- Battisti, D. S., & Naylor, R. L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911), 240-244.
- Bauchet, G., & Causse, M. (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Genetic diversity in plants*, 8, 134-162.
- Bawa, G., Feng, L., Chen, G., Chen, H., Hu, Y., Pu, T., Cheng, Y., Shi, J., Xiao, T., & Zhou, W. (2020). Gibberellins and auxin regulate soybean hypocotyl elongation under low light and high-temperature interaction. *Physiologia plantarum*, 170(3), 345-356.
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1229-1240.

- Bayer, E., Thomas, C. L., & Maule, A. J. (2004). Plasmodesmata in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma*, 223, 93-102.
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B., Moyle, L. C., Rose, J. K. C., Stack, S. M., van der Knaap, E., Baek, Y. S., Lopez-Casado, G., & Covey, P. A. (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, 24, 171-187.
- Belver, A., Olías, R., Huertas, R., & Rodríguez-Rosales, M. P. (2012). Involvement of SISOS2 in tomato salt tolerance. *Bioengineered*, 3(5), 298-302.
- Ben Rejeb, K., Lefebvre-De Vos, D., Le Disquet, I., Leprince, A., Bordenave, M., Maldiney, R., Jdey, A., Abdelly, C., & Savouré, A. (2015). Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 208(4), 1138-1148.
- Benabdellah, K., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2009). Hydrogen peroxide effects on root hydraulic properties and plasma membrane aquaporin regulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant molecular biology*, 70, 647-661.
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., & Cellier, F. (2003). Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal*, 22(9), 2004-2014.
- Bineau, E., Diouf, I., Carretero, Y., Duboscq, R., Bitton, F., Djari, A., Zouine, M., & Causse, M. (2021). Genetic diversity of tomato response to heat stress at the QTL and transcriptome levels. *The Plant Journal*, 107(4), 1213-1227.
- Blanca, J., Canizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS one*, 7(10), e48198.
- Blanco-Ulate, B., Vincenti, E., Powell, A. L. T., & Cantu, D. (2013). Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. *Frontiers in plant science*, 4, 142.
- Bloch, M. H., & Qawasmi, A. (2011). Omega-3 fatty acid supplementation for the treatment of children with attention-deficit/hyperactivity disorder symptomatology: systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 50(10), 991-1000.
- Bolarin, M. C., Estañ, M. T., Caro, M., Romero-Aranda, R., & Cuartero, J. (2001). Relationship between tomato fruit growth and fruit osmotic potential under salinity. *Plant Science*, 160(6), 1153-1159.
- Bolarin, M. C., Fernandez, F. G., Cruz, V., & Cuartero, J. (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(2), 286-290.

- Boursiac, Y., Lee, S. M., Romanowsky, S., Blank, R., Sladek, C., Chung, W. S., & Harper, J. F. (2010). Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in *Arabidopsis* results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. *Plant physiology*, *154*(3), 1158-1171.
- Bowerman, A. F., Byrt, C. S., Roy, S. J., Whitney, S. M., Mortimer, J. C., Ankeny, R. A., Gilliam, M., Zhang, D., Millar, A. A., & Rebetzke, G. J. (2023). Potential abiotic stress targets for modern genetic manipulation. *The Plant Cell*, *35*(1), 139-161.
- Braidwood, L., Breuer, C., & Sugimoto, K. (2014). My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist*, *201*(2), 388-402.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology*, *166*(3), 1292-1297.
- Brust, G. (2004). *Physiological tomato fruit disorders*.
- Bullock, Wo. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-ga-lactosidase selection. *BioTechniques*, *5*, 376.
- Busoms, S., Paajanen, P., Marburger, S., Bray, S., Huang, X.-Y., Poschenrieder, C., Yant, L., & Salt, D. E. (2018). Fluctuating selection on migrant adaptive sodium transporter alleles in coastal *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(52), E12443-E12452.
- Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Analysis of mRNA expression by real-time PCR. *Real-time PCR. An essential guide*, 125-184.
- Byrt, C. S., Zhao, M., Kourghi, M., Bose, J., Henderson, S. W., Qiu, J., Gilliam, M., Schultz, C., Schwarz, M., & Ramesh, S. A. (2017). Non-selective cation channel activity of aquaporin AtPIP2; 1 regulated by Ca²⁺ and pH. *Plant, cell & environment*, *40*(6), 802-815.
- Cabrera, M., Boronat, S., Marte, L., Vega, M., Perez, P., Ayte, J., & Hidalgo, E. (2020). Chaperone-facilitated aggregation of thermo-sensitive proteins shields them from degradation during heat stress. *Cell Reports*, *30*(7), 2430-2443.
- Cadahia, C. (1995). Fertilización. En *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. Pp 169- 187.
- Cai, Z.-Q., & Gao, Q. (2020). Comparative physiological and biochemical mechanisms of salt tolerance in five contrasting highland quinoa cultivars. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 1-15.
- Campos, J. F., Cara, B., Pérez-Martín, F., Pineda, B., Egea, I., Flores, F. B., Fernandez-Garcia, N., Capel, J., Moreno, V., & Angosto, T. (2016). The tomato mutant *ars1* (altered response to salt stress 1) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(6), 1345-1356.
- Cao, M., Prince, S. D., Li, K., Tao, B. O., Small, J., & Shao, X. (2003). Response of terrestrial carbon uptake to climate interannual variability in China. *Global Change Biology*, *9*(4), 536-546.
- Capel, C., Albaladejo, I., Egea, I., Massaretto, I. L., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., García-Sogo, B., Angosto, T., Flores, F. B., & Moreno, V. (2020). The *res* (restored cell structure by salinity) tomato mutant reveals the role of the DEAD-box RNA helicase SIDEAD39 in plant development and salt response. *Plant, Cell & Environment*, *43*(7), 1722-1739.

- Capel, C., Fernández del Carmen, A., Alba, J. M., Lima-Silva, V., Hernández-Gras, F., Salinas, M., Boronat, A., Angosto, T., Botella, M. A., & Fernández-Muñoz, R. (2015). Wide-genome QTL mapping of fruit quality traits in a tomato RIL population derived from the wild-relative species *Solanum pimpinellifolium* L. *Theoretical and Applied Genetics*, *128*, 2019-2035.
- Capel, C., Yuste-Lisbona, F. J., López-Casado, G., Angosto, T., Cuartero, J., Lozano, R., & Capel, J. (2017). Multi-environment QTL mapping reveals genetic architecture of fruit cracking in a tomato RIL *Solanum lycopersicum* × *S. pimpinellifolium* population. *Theoretical and applied genetics*, *130*, 213-222.
- Capovilla, G., Schmid, M., & Posé, D. (2015). Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*, *66*(1), 59-69.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 26378-26394.
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*, *70*, 321-346.
- Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., & Coaker, G. (2021). Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature plants*, *7*(4), 403-412.
- Causse, M., Damidaux, R., & Rousselle, P. (2007). Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of solanaceous crops: Tomato. Enfield: Science Publ*, 153-192.
- Chai, S., Ge, F., Zhang, Y., & Li, S. (2020). S-acylation of CBL10/SCaBP8 by PAT10 is crucial for its tonoplast association and function in salt tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, *62*(6), 718-722.
- Chamarro, J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. *El cultivo del tomate*, 43-91.
- Chamberlain, L. H., & Shipston, M. J. (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiological reviews*, *95*(2), 341-376.
- Charng, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., Chang, S., & Wang, T. (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *143*(1), 251-262.
- Chaves, Ó. M., Fernandes, F. A., Oliveira, G. T., & Bicca-Marques, J. C. (2019). Assessing the influence of biotic, abiotic, and social factors on the physiological stress of a large Neotropical primate in Atlantic forest fragments. *Science of the Total Environment*, *690*, 705-716.
- Cheeseman, J. M. (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of experimental botany*, *57*(10), 2435-2444.
- Chen, T., Ji, D., Zhang, Z., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2021). Advances and strategies for controlling the quality and safety of postharvest fruit. *Engineering*, *7*(8), 1177-1184.
- Chen, T., Qin, G., & Tian, S. (2020). Regulatory network of fruit ripening: current understanding and future challenges. *New Phytologist*, *228*(4), 1219-1226.

- Chen, X., Shi, L., Chen, Y., Zhu, L., Zhang, D., Xiao, S., Aharoni, A., Shi, J., & Xu, J. (2019). Arabidopsis HSP70-16 is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures. *Plant, cell & environment*, 42(4), 1190-1204.
- Chen, Z. J., & Mas, P. (2019). Interactive roles of chromatin regulation and circadian clock function in plants. *Genome biology*, 20(1), 1-12.
- Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Grant, J. J., Batistic, O., Li, L., Kim, B., Lee, S., Kudla, J., & Luan, S. (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52(2), 223-239.
- Cho, J. H., Lee, J. H., Park, Y. K., Choi, M. N., & Kim, K.-N. (2016). Calcineurin B-like protein CBL10 directly interacts with TOC34 (Translocon of the Outer membrane of the Chloroplasts) and decreases its GTPase activity in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1911.
- Choi, W. G., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., & Gilroy, S. (2017). Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca²⁺, ROS and electrical signals. *The Plant Journal*, 90(4), 698-707.
- Choi, Y. H., Kim, H. K., Linthorst, H. J. M., Hollander, J. G., Lefeber, A. W. M., Erkelens, C., Nuzillard, J.-M., & Verpoorte, R. (2006). NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of natural products*, 69(5), 742-748.
- Conn, S., & Gilliam, M. (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of botany*, 105(7), 1081-1102.
- Considine, M. J., & Foyer, C. H. (2021). Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5795-5806.
- Contreras-Angulo, L. A., Heredia, J. B., Sánchez-Álvarez, C. E., Angulo-Escalante, M. Á., & Villarreal-Romero, M. (2011). Efecto del genotipo y sales de calcio en la calidad de tomates frescos cortados. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(SPE1), 39-45.
- Correia, P. M. P., Cairo Westergaard, J., Bernardes da Silva, A., Roitsch, T., Carmo-Silva, E., & Marques da Silva, J. (2022). High-throughput phenotyping of physiological traits for wheat resilience to high temperature and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 73(15), 5235-5251.
- Corwin, D. L. (2021). Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. *European Journal of Soil Science*, 72(2), 842-862.
- Costa, A., Luoni, L., Marrano, C. A., Hashimoto, K., Köster, P., Giacometti, S., De Michelis, M. I., Kudla, J., & Bonza, M. C. (2017). Ca²⁺-dependent phosphoregulation of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase ACA8 modulates stimulus-induced calcium signatures. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3215-3230.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.
- Craig Plett, D., & Møller, I. S. (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, cell & environment*, 33(4), 612-626.

- Cuartero, J., Bolarin, M. C., Asins, M. J., & Moreno, V. (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of experimental botany*, 57(5), 1045-1058.
- Cuartero, J., Bolarin, M. C., Moreno, V., & Pineda, B. (2009). Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. *Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition*, 373-405.
- Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R., González-Fernández, J. (1995). Estreses abióticos. En: El cultivo del tomate, Nuez, F. (Ed), Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 351- 384
- Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.
- Davenport, R. J., MUÑOZ-MAYOR, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. N. A., & Tester, M. (2007). The Na⁺ transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 30(4), 497-507.
- de Freitas, S. T., & Mitcham, E. J. (2012). Factors involved in fruit calcium deficiency disorders. *Horticultural reviews*, 40, 107-146.
- de Freitas, S. T., Shackel, K. A., & Mitcham, E. J. (2011). Abscisic acid triggers whole-plant and fruit-specific mechanisms to increase fruit calcium uptake and prevent blossom end rot development in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2645-2656.
- de la Torre, F., Gutiérrez-Beltrán, E., Pareja-Jaime, Y., Chakravarthy, S., Martin, G. B., & del Pozo, O. (2013). The tomato calcium sensor CBL10 and its interacting protein kinase Cipk6 define a signaling pathway in plant immunity. *The Plant Cell*, 25(7), 2748-2764.
- De Smet, I., Quint, M., & van Zanten, M. (2021). High and low temperature signalling and response. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7339-7344.
- Decros, G., Baldet, P., Beauvoit, B., Stevens, R., Flandin, A., Colombié, S., Gibon, Y., & Pétriacq, P. (2019). Get the balance right: ROS homeostasis and redox signalling in fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1091.
- Del Olmo, I., Poza-Viejo, L., Piñeiro, M., Jarillo, J. A., & Crevillén, P. (2019). High ambient temperature leads to reduced FT expression and delayed flowering in *Brassica rapa* via a mechanism associated with H₂A. Z dynamics. *The Plant Journal*, 100(2), 343-356.
- Demarty, M., Morvan, C., & Thellier, M. (1984). Calcium and the cell wall. *Plant, Cell & Environment*, 7(6), 441-448.
- Díaz-Pérez, J. C., & Hook, J. E. (2017). Plastic-mulched bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plant growth and fruit yield and quality as influenced by irrigation rate and calcium fertilization. *HortScience*, 52(5), 774-781.
- Ding, L., Milhiet, T., Couvreur, V., Nelissen, H., Meziane, A., Parent, B., Aesaert, S., Van Lijsebettens, M., Inzé, D., & Tardieu, F. (2020). Modification of the expression of the aquaporin ZmPIP2; 5 affects water relations and plant growth. *Plant physiology*, 182(4), 2154-2165.
- Ding, Y., & Yang, S. (2022). Surviving and thriving: How plants perceive and respond to temperature stress. *Developmental Cell*.

- Dong, C., Ponciano, G., Huo, N., Gu, Y., Ilut, D., & McMahan, C. (2021). RNASeq analysis of drought-stressed guayule reveals the role of gene transcription for modulating rubber, resin, and carbohydrate synthesis. *Scientific Reports*, *11*(1), 21610.
- Dong, L., Wang, Q., Manik, S. M. N., Song, Y., Shi, S., Su, Y., Liu, G., & Liu, H. (2015). *Nicotiana sylvestris* calcineurin B-like protein NsylCBL10 enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, *34*, 2053-2063.
- Dong, Q., Wallrad, L., Almutairi, B. O., & Kudla, J. (2022). Ca²⁺ signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of integrative plant biology*, *64*(2), 287-300.
- Dong, X., Ma, C., Xu, T., Reid, M. S., Jiang, C.-Z., & Li, T. (2021). Auxin response and transport during induction of pedicel abscission in tomato. *Horticulture research*, *8*.
- Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K., & Kudla, J. (2013). The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF. *Molecular plant*, *6*(2), 559-569.
- Driesen, E., Van den Ende, W., De Proft, M., & Saeys, W. (2020). Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy*, *10*(12), 1975.
- Eckardt, N. A., Cutler, S., Juenger, T. E., Marshall-Colon, A., Udvardi, M., & Verslues, P. E. (2023). Focus on climate change and plant abiotic stress biology. *The Plant Cell*, *35*(1), 1-3.
- Egea, I., Estrada, Y., Flores, F. B., & Bolarín, M. C. (2022). Improving production and fruit quality of tomato under abiotic stress: Genes for the future of tomato breeding for a sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 105086.
- Egea, I., Pineda, B., Ortíz-Atienza, A., Plasencia, F. A., Drevensek, S., García-Sogo, B., Yuste-Lisbona, F. J., Barrero-Gil, J., Atarés, A., & Flores, F. B. (2018). The SICBL10 calcineurin B-like protein ensures plant growth under salt stress by regulating Na⁺ and Ca²⁺ homeostasis. *Plant Physiology*, *176*(2), 1676-1693.
- Egea-Fernandez, Jose. M., Egea, Jose. M., Egea, I., and Rivera, D. (2015). Recursos Fitogenéticos [Plant Genetic Resources]. In: Cultivos promisorios para enfriar el clima y alimentar al mundo. Una propuesta agroecológica para tierra de iberos. Ed. Integral, Sociedad para el Desarrollo Rural, 13–24 (ISBN 978-84-608-3897-5).
- Eshed, Y., & Zamir, D. (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, *79*, 175-179.
- Eshed, Y., Abu-Abied, M., Saranga, Y., & Zamir, D. (1992). *Lycopersicon esculentum* lines containing small overlapping introgressions from *L. pennellii*. *Theoretical and applied genetics*, *83*, 1027-1034.
- Esquinas-Alcazar, J. T. (1981). *Genetic resources of tomatoes and wild relatives. A global report*.
- Esquinas-Alcazar, J., Nuez Viñals, F., Rodriguez del Rincon, A., Tello, J., Cuartero, J., & Segura, B. (1995). *Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate*.
- Estan, M. T., Martinez-Rodriguez, M. M., Perez-Alfocea, F., Flowers, T. J., & Bolarin, M. C. (2005). Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *Journal of experimental botany*, *56*(412), 703-712.

- FAO (2009). *High Level Expert Forum—How to Feed the World in 2050*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Rome, Italy.
- FAO (2021). *FAO World Food and Agriculture*. Statistical Yearbook 2021.
- Fich, E. A., Fisher, J., Zamir, D., & Rose, J. K. C. (2020). Transpiration from tomato fruit occurs primarily via trichome-associated transcuticular polar pores. *Plant Physiology*, *184*(4), 1840-1852.
- Fischer, B. B., Hideg, E., & Krieger-Liszky, A. (2013). Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxidants & redox signaling*, *18*(16), 2145-2162.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, *37*(7), 604-612.
- Flowers, T. J., Munns, R., & Colmer, T. D. (2015). Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of botany*, *115*(3), 419-431.
- Fonseca de Lima, C. F., Kleine-Vehn, J., De Smet, I., & Feraru, E. (2021). Getting to the root of belowground high temperature responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, *72*(21), 7404-7413.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, *2007*.
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and experimental botany*, *154*, 134-142.
- Franco, J., Bañón, S., & Madrid, R. (1994). Effects of a protein hydrolysate applied by fertigation on the effectiveness of calcium as a corrector of blossom-end rot in tomato cultivated under saline conditions. *Scientia horticultrae*, *57*(4), 283-292.
- Franks, P. J., W. Doheny-Adams, T., Britton-Harper, Z. J., & Gray, J. E. (2015). Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, *207*(1), 188-195.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, *43*(3), 228-265.
- Fu, D., Zhu, B., Zhu, H., Jiang, W., & Luo, Y. (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant Journal*, *43*(2), 299-308.
- Fu, H., Yu, X., Jiang, Y., Wang, Y., Yang, Y., Chen, S., Chen, Q., & Guo, Y. (2023). Salt overly sensitive 1 is inhibited by clade D Protein phosphatase 2C D6 and D7 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *35*(1), 279-297.
- Galmés, J., Ochogavía, J. M., Gago, J., Roldán, E. J., Cifre, J., & Conesa, M. À. (2013). Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell & Environment*, *36*(5), 920-935.
- Gálvez, F. J., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodríguez-Rosales, M. P., & Venema, K. (2012). Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*, *51*, 109-115.

- García-Abellan, J. O., Egea, I., Pineda, B., Sanchez-Bel, P., Belver, A., Garcia-Sogo, B., Flores, F. B., Atares, A., Moreno, V., & Bolarin, M. C. (2014). Heterologous expression of the yeast HAL5 gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na⁺ accumulation in the long term. *Physiologia plantarum*, *152*(4), 700-713.
- Garcia-Abellan, J. O., Fernandez-Garcia, N., Lopez-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F. B., Angosto, T., Capel, J., Lozano, R., Pineda, B., & Moreno, V. (2015). The tomato res mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiologia Plantarum*, *155*(3), 296-314.
- Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., & Granell, A. (2017). Use of natural diversity and biotechnology to increase the quality and nutritional content of tomato and grape. *Frontiers in plant science*, *8*, 652.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K. A. S., & Grill, E. (2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(17), 8023-8028.
- Genc, Y., Taylor, J., Lyons, G., Li, Y., Cheong, J., Appelbee, M., Oldach, K., & Sutton, T. (2019). Bread wheat with high salinity and sodicity tolerance. *Frontiers in plant science*, *10*, 1280.
- Geraldson, C. M. (1956). Evaluation of control methods for blackheart of celery and blossom-end rot of tomatoes. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, *69*, 236-241.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant signaling & behavior*, *5*(1), 26-33.
- Gilroy, S., Bethke, P. C., & Jones, R. L. (1993). Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science*, *106*(2), 453-461.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M. T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V., & Lozano, R. (2010). Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, *5*(12), e14427.
- Giovannoni, J., Nguyen, C., Ampofo, B., Zhong, S., & Fei, Z. (2017). The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology*, *68*, 61-84.
- Gisbert, C., Rus, A. M., Bolarín, M. C., López-Coronado, J. M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R., & Moreno, V. (2000). The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant physiology*, *123*(1), 393-402.
- Grant, O. M., Chaves, M. M., & Jones, H. G. (2006). Optimizing thermal imaging as a technique for detecting stomatal closure induced by drought stress under greenhouse conditions. *Physiologia Plantarum*, *127*(3), 507-518.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, *64*(2), 355-365.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of mi R 398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *74*(5), 840-851.

- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J.-K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell*, *13*(6), 1383-1400.
- Han, J. P., Köster, P., Drerup, M. M., Scholz, M., Li, S., Edel, K. H., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Hippler, M. & Kudla, J. (2019). Fine-tuning of RBOHF activity is achieved by differential phosphorylation and Ca²⁺ binding. *New Phytologist*, *221*(4), 1935-1949.
- Han, Y., Kim, B., Cho, U., Park, I. S., Kim, S. I., Dhanasekaran, D. N., Tsang, B. K., & Song, Y. S. (2019). Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells. *Oncogene*, *38*(45), 7089-7105.
- Handa, N., Gupta, P., Khanna, K., Kohli, S. K., Bhardwaj, R., Alam, P., & Ahmad, P. (2022). Aquaporin-mediated transport: Insights into metalloloid trafficking. *Physiologia Plantarum*, *174*(3), e13687.
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in plant science*, *7*, 1787.
- Harrison Day, B. L., Carins-Murphy, M. R., & Brodribb, T. J. (2022). Reproductive water supply is prioritized during drought in tomato. *Plant, Cell & Environment*, *45*(1), 69-79.
- Hasegawa, P. M. (2013). Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and experimental botany*, *92*, 19-31.
- Havko, N. E., Das, M. R., McClain, A. M., Kapali, G., Sharkey, T. D., & Howe, G. A. (2020). Insect herbivory antagonizes leaf cooling responses to elevated temperature in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(4), 2211-2217.
- He, Y., Fu, J., Yu, C., Wang, X., Jiang, Q., Hong, J., Lu, K., Xue, G., Yan, C., & James, A. (2015). Increasing cyclic electron flow is related to Na⁺ sequestration into vacuoles for salt tolerance in soybean. *Journal of Experimental Botany*, *66*(21), 6877-6889.
- Hedrich, R., & Marten, I. (2011). TPC1–SV channels gain shape. *Molecular plant*, *4*(3), 428-441.
- Heidari, M., & Mesri, F. (2008). Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, *11*(10), 1385-1389.
- Hein, N. T., Ciampitti, I. A., & Jagdish, S. V. K. (2021). Bottlenecks and opportunities in field-based high-throughput phenotyping for heat and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, *72*(14), 5102-5116.
- Heinlein, M. (2002). Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*(6), 543-552.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C., Offenborn, J. N., Lacombe, B., Dreyer, I., & Thibaud, J.-B. (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell research*, *21*(7), 1116-1130.
- Hernandez, V., Hellín, P., Fenoll, J., & Flores, P. (2015). Increased temperature produces changes in the bioactive composition of tomato, depending on its developmental stage. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(9), 2378-2382.

- Heschel, M. S., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G. C., Sharrock, R. A., & Donohue, K. (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist*, *174*(4), 735-741.
- Hichri, I., Muhovski, Y., Clippe, A., Žižková, E., Dobrev, P. I., Motyka, V., & Lutts, S. (2016). SIDREB2, a tomato dehydration-responsive element-binding 2 transcription factor, mediates salt stress tolerance in tomato and Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, *39*(1), 62-79.
- Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M. C., Kanygin, A., Redding, K. E., & Chandrasekhar, T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, *124*, 39-63.
- Ho, L. C., & White, P. J. (2005). A cellular hypothesis for the induction of blossom-end rot in tomato fruit. *Annals of Botany*, *95*(4), 571-581.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, *347*(2nd edit).
- Hochman, Z., Gobbett, D. L., & Horan, H. (2017). Climate trends account for stalled wheat yields in Australia since 1990. *Global change biology*, *23*(5), 2071-2081.
- Hochmuth, G. J., & Hochmuth, R. (2009). Blossom-end rot in bell pepper: causes and prevention. *SL*, *284*, 5.
- Hocking, B., Tyerman, S. D., Burton, R. A., & Gilliam, M. (2016). Fruit calcium: transport and physiology. *Frontiers in plant science*, *7*, 569.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, *303*(5913), 179-180.
- Hoel, B. O., & Solhaug, K. A. (1998). Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany*, *82*(3), 389-392.
- Horie, T., Hauser, F., & Schroeder, J. I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in plant science*, *14*(12), 660-668.
- Hossain, M. S., & Dietz, K.-J. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in plant science*, *7*, 548.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in plant science*, *10*, 800.
- Huang, L., Ren, Q., Sun, Y., Ye, L., Cao, H., & Ge, F. (2012). Lower incidence and severity of tomato virus in elevated CO₂ is accompanied by modulated plant induced defence in tomato. *Plant Biology*, *14*(6), 905-913.
- Huertas, R., Rubio, L., Cagnac, O., García-Sánchez, M. J., Alché, J. D. D., Venema, K., Fernández, J. A., & Rodríguez-Rosales, M. P. (2013). The K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K⁺ homeostasis in transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment*, *36*(12), 2135-2149.
- Jagadish, S. V. K. (2020). Heat stress during flowering in cereals—effects and adaptation strategies. *New Phytologist*, *226*(6), 1567-1572.

- Jaime-Pérez, N., Pineda, B., García-Sogo, B., Atarés, A., Athman, A., Byrt, C. S., Olías, R., Asins, M. J., Gilliam, M., & Moreno, V. (2017). The sodium transporter encoded by the HKT1; 2 gene modulates sodium/potassium homeostasis in tomato shoots under salinity. *Plant, Cell & Environment*, *40*(5), 658-671.
- Jaunin, F., & Hofer, R. M. (1988). Calcium and rhizodermal differentiation in primary maize roots. *Journal of experimental botany*, *39*(5), 587-593.
- Ji, D., Cui, X., Qin, G., Chen, T., & Tian, S. (2020). SIFERL interacts with S-adenosylmethionine synthetase to regulate fruit ripening. *Plant Physiology*, *184*(4), 2168-2181.
- Jia, J., Liang, Y., Gou, T., Hu, Y., Zhu, Y., Huo, H., Guo, J., & Gong, H. (2020). The expression response of plasma membrane aquaporins to salt stress in tomato plants. *Environmental and Experimental Botany*, *178*, 104190.
- Jian, W., Cao, H., Yuan, S., Liu, Y., Lu, J., Lu, W., Li, N., Wang, J., Zou, J., & Tang, N. (2019). SIMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits. *Horticulture research*, *6*.
- Jiang, C., Belfield, E. J., Cao, Y., Smith, J. A. C., & Harberd, N. P. (2013). An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. *The Plant Cell*, *25*(9), 3535-3552.
- Jiang, C., Belfield, E. J., Mithani, A., Visscher, A., Ragoussis, J., Mott, R., Smith, J. A. C., & Harberd, N. P. (2012). ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, *31*(22), 4359-4370.
- Jones, H. G. (1999). Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell & Environment*, *22*(9), 1043-1055.
- Jung, J.-H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., & Cortijo, S. (2016). Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science*, *354*(6314), 886-889.
- Juroszek, P., & von Tiedemann, A. (2013). Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. *European Journal of Plant Pathology*, *136*, 21-33.
- Juroszek, P., Laborde, M., Kleinhenz, B., Mellenthin, M., Racca, P., & Sierotzki, H. (2022). A review on the potential effects of temperature on fungicide effectiveness. *Plant Pathology*, *71*(4), 775-784.
- Kang, H. K., & Nam, K. H. (2016). Reverse function of ROS-induced CBL10 during salt and drought stress responses. *Plant Science*, *243*, 49-55.
- Kapilan, R., Vaziri, M., & Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological research*, *51*(1), 1-11.
- Karkute, S. G., Gujjar, R. S., Rai, A., Akhtar, M., Singh, M., & Singh, B. (2018). Genome wide expression analysis of WRKY genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. *Plant Gene*, *13*, 8-17.
- Katschnig, D., Bliet, T., Rozema, J., & Schat, H. (2015). Constitutive high-level SOS1 expression and absence of HKT1; 1 expression in the salt-accumulating halophyte *Salicornia dolichostachya*. *Plant Science*, *234*, 144-154.

- Kennelly, M., O'Mara, J., Rivard, C., Miller, G. L., & Smith, D. (2012). Introduction to abiotic disorders in plants. *The Plant Health Instructor*, 10(1094), 10-20.
- Kerchev, P. I., & Van Breusegem, F. (2022). Improving oxidative stress resilience in plants. *The Plant Journal*, 109(2), 359-372.
- Kiani-Pouya, A., Li, L., Rasouli, F., Zhang, Z., Chen, J., Yu, M., Tahir, A., Hedrich, R., Shabala, S., & Zhang, H. (2022). Transcriptome analyses of quinoa leaves revealed critical function of epidermal bladder cells in salt stress acclimation. *Plant Stress*, 3, 100061.
- Kiani-Pouya, A., Rasouli, F., Shabala, L., Tahir, A. T., Zhou, M., & Shabala, S. (2020). Understanding the role of root-related traits in salinity tolerance of quinoa accessions with contrasting epidermal bladder cell patterning. *Planta*, 251, 1-11.
- Kidrič, M., Kos, J., & Sabotič, J. (2014). Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica serbica*, 38(1), 139-158.
- Kim, B., Waadt, R., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., Dominguez-Solis, J. R., Schültke, S., Lee, S. C., Kudla, J., & Luan, S. (2007). The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 52(3), 473-484.
- Kim, D. M., & Nimigean, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: a structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(5), a029231.
- Kim, K.-N. (2013). Stress responses mediated by the CBL calcium sensors in plants. *Plant biotechnology reports*, 7, 1-8.
- Kimura, S., Kawarazaki, T., Nibori, H., Michikawa, M., Imai, A., Kaya, H., & Kuchitsu, K. (2013). The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *The journal of biochemistry*, 153(2), 191-195.
- Kimura, S., Kaya, H., Kawarazaki, T., Hiraoka, G., Senzaki, E., Michikawa, M., & Kuchitsu, K. (2012). Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(2), 398-405.
- Kirkby, E. A., Nikolic, M., White, P. J., & Xu, G. (2023). Mineral nutrition, yield, and source–sink relationships. En *Marschner's Mineral Nutrition of Plants* (pp. 131-200). Elsevier.
- Kissoudis, C., Sunarti, S., Van De Wiel, C., Visser, R. G. F., van der Linden, C. G., & Bai, Y. (2016). Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. *Journal of experimental botany*, 67(17), 5119-5132.
- Klee, H. J., & Giovannoni, J. J. (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, 45, 41-59.
- Kobayashi, N. I., Yamaji, N., Yamamoto, H., Okubo, K., Ueno, H., Costa, A., Tanoi, K., Matsumura, H., Fujii-Kashino, M., & Horiuchi, T. (2017). OsHKT1; 5 mediates Na⁺ exclusion in the vasculature to protect leaf blades and reproductive tissues from salt toxicity in rice. *The Plant Journal*, 91(4), 657-670.
- Kodama, H., Miyahara, T., Oguchi, T., Tsujimoto, T., Ozeki, Y., Ogawa, T., Yamaguchi, Y., & Ohta, D. (2021). Effect of transgenic rootstock grafting on the omics profiles in Tomato. *Food Safety*, 9(2), 32-47.

- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., & Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant physiology*, *134*(1), 43-58.
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, *204*, 383-396.
- Kostaki, K.-I., Coupel-Ledru, A., Bonnell, V. C., Gustavsson, M., Sun, P., McLaughlin, F. J., Fraser, D. P., McLachlan, D. H., Hetherington, A. M., & Dodd, A. N. (2020). Guard cells integrate light and temperature signals to control stomatal aperture. *Plant Physiology*, *182*(3), 1404-1419.
- Kotula, L., Garcia Caparros, P., Zörb, C., Colmer, T. D., & Flowers, T. J. (2020). Improving crop salt tolerance using transgenic approaches: An update and physiological analysis. *Plant, Cell & Environment*, *43*(12), 2932-2956.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., & Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(6), 2940-2945.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R., & Schumacher, K. (2010). Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(7), 3251-3256.
- Kudla, J., Becker, D., Grill, E., Hedrich, R., Hippler, M., Kummer, U., Parniske, M., Romeis, T., & Schumacher, K. (2018). Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytologist*, *218*(2), 414-431.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W., & Luan, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(8), 4718-4723.
- Kumpf, R. P., Shi, C.-L., Larrieu, A., Stø, I. M., Butenko, M. A., Péret, B., Riiser, E. S., Bennett, M. J., & Aalen, R. B. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(13), 5235-5240.
- Kuromori, T., Fujita, M., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2022). Inter-tissue and inter-organ signaling in drought stress response and phenotyping of drought tolerance. *The Plant Journal*, *109*(2), 342-358.
- Kuromori, T., Sugimoto, E., & Shinozaki, K. (2011). Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *The Plant Journal*, *67*(5), 885-894.
- Lara, A., Ródenas, R., Andrés, Z., Martínez, V., Quintero, F. J., Nieves-Cordones, M., Botella, M. A., & Rubio, F. (2020). Arabidopsis K⁺ transporter HAK5-mediated high-affinity root K⁺ uptake is regulated by protein kinases CIPK1 and CIPK9. *Journal of Experimental Botany*, *71*(16), 5053-5060.
- Lee, J., Chen, H., Lee, G., Emonet, A., Kim, S., Shim, D., & Lee, Y. (2022). MSD2-mediated ROS metabolism fine-tunes the timing of floral organ abscission in Arabidopsis. *New Phytologist*, *235*(6), 2466-2480.

- Lee, T. S., Eid, T., Mane, S., Kim, J. H., Spencer, D. D., Ottersen, O. P., & De Lanerolle, N. C. (2004). Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta neuropathologica*, *108*, 493-502.
- Lee, U., Rioflorido, I., Hong, S., Larkindale, J., Waters, E. R., & Vierling, E. (2007). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *The Plant Journal*, *49*(1), 115-127.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., Fernández, J. A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Quintero, F. J. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, *61*(3), 495-506.
- Leisner, C. P., Potnis, N., & Sanz-Saez, A. (2022). Crosstalk and trade-offs: Plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses. *Plant, Cell & Environment*.
- Leng, G., & Hall, J. (2019). Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future. *Science of the Total Environment*, *654*, 811-821.
- Leng, Q., Mercier, R. W., Hua, B.-G., Fromm, H., & Berkowitz, G. A. (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology*, *128*(2), 400-410.
- Li, D., Quan, C., Song, Z., Li, X., Yu, G., Li, C., & Muhammad, A. (2021). High-throughput plant phenotyping platform (HT3P) as a novel tool for estimating agronomic traits from the lab to the field. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 623705.
- Li, D.-D., Xia, X.-L., Yin, W.-L., & Zhang, H.-C. (2013). Two poplar calcineurin B-like proteins confer enhanced tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis thaliana. *Biologia plantarum*, *57*, 70-78.
- Li, H. A. O., Liu, S., Yi, C., Wang, F., Zhou, J. I. E., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., & Yu, J. (2014). Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP 70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants. *Plant, Cell & Environment*, *37*(12), 2768-2780.
- Li, K., Debernardi, J. M., Li, C., Lin, H., Zhang, C., Jernstedt, J., Korff, M. von, Zhong, J., & Dubcovsky, J. (2021). Interactions between SQUAMOSA and SHORT VEGETATIVE PHASE MADS-box proteins regulate meristem transitions during wheat spike development. *The Plant Cell*, *33*(12), 3621-3644.
- Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., & Luan, S. (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(33), 12625-12630.
- Li, Q., Chai, L., Tong, N., Yu, H., & Jiang, W. (2022). Potential Carbohydrate Regulation Mechanism Underlying Starvation-Induced Abscission of Tomato Flower. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 1952.
- Li, Q., Hu, B., Yang, Q., Cai, X., Nie, M., Jin, Y., Zhou, L., Xu, Y., Pan, Q., & Fang, L. (2020). Interaction mechanism between multi-layered MoS₂ and H₂O₂ for self-generation of reactive oxygen species. *Environmental Research*, *191*, 110227.
- Li, R., Wang, J., Li, S., Zhang, L., Qi, C., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., & Guo, Y.-D. (2016). Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2; 1, SIPIP2; 7 and SIPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific reports*, *6*(1), 1-15.

- Li, Z., Peng, R., Tian, Y., Han, H., Xu, J., & Yao, Q. (2016). Genome-wide identification and analysis of the MYB transcription factor superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plant and Cell Physiology*, 57(8), 1657-1677.
- Li, Z., Zhou, J., Dong, T., Xu, Y., & Shang, Y. (2021). Application of electrochemical methods for the detection of abiotic stress biomarkers in plants. *Biosensors and Bioelectronics*, 182, 113105.
- Lin, C.-Y., Roberts, J. K., & Key, J. L. (1984). Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiology*, 74(1), 152-160.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K. S., Pardo, J. M., & Guo, Y. (2009). Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(5), 1607-1619.
- Lin, M., Chai, K., Ko, S., Kuang, L., Lur, H.-S., & Charng, Y. (2014). A positive feedback loop between HEAT SHOCK PROTEIN101 and HEAT STRESS-ASSOCIATED 32-KD PROTEIN modulates long-term acquired thermotolerance illustrating diverse heat stress responses in rice varieties. *Plant physiology*, 164(4), 2045-2053.
- Ling, Q., Huang, W., & Jarvis, P. (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in Arabidopsis thaliana. *Photosynthesis research*, 107, 209-214.
- Linnaeus, C. Von. (1753). Species plantarum. *Laurentii Salvii, Stockholm, 1*.
- Liu, B., Martre, P., Ewert, F., Porter, J. R., Challinor, A. J., Müller, C., Ruane, A. C., Waha, K., Thorburn, P. J., & Aggarwal, P. K. (2019). Global wheat production with 1.5 and 2.0° C above pre-industrial warming. *Global Change Biology*, 25(4), 1428-1444.
- Liu, H., Song, S., Zhang, H., Li, Y., Niu, L., Zhang, J., & Wang, W. (2022). Signaling Transduction of ABA, ROS, and Ca²⁺ in Plant Stomatal Closure in Response to Drought. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14824.
- Liu, J., & Zhu, J.-K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280(5371), 1943-1945.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lodeyro, A. F., Krapp, A. R., & Carrillo, N. (2021). Photosynthesis and chloroplast redox signaling in the age of global warming: stress tolerance, acclimation, and developmental plasticity. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5919-5937.
- Logan, D. C., & Knight, M. R. (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiology*, 133(1), 21-24.
- Lombardi, M., De Gara, L., & Loreto, F. (2021). Determinants of root system architecture for future-ready, stress-resilient crops. *Physiologia Plantarum*, 172(4), 2090-2097.
- Lopez-Delacalle, M., Camejo, D. M., García-Martí, M., Nortes, P. A., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Rubio, F., Mittler, R., & Rivero, R. M. (2020). Using tomato recombinant lines to improve plant tolerance to stress combination through a more efficient nitrogen metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1702.

- Lü, P., Yu, S., Zhu, N., Chen, Y.-R., Zhou, B., Pan, Y., Tzeng, D., Fabi, J. P., Argyris, J., & Garcia-Mas, J. (2018). Genome encode analyses reveal the basis of convergent evolution of fleshy fruit ripening. *Nature plants*, 4(10), 784-791.
- Lu, T., Meng, Z., Zhang, G., Qi, M., Sun, Z., Liu, Y., & Li, T. (2017). Sub-high temperature and high light intensity induced irreversible inhibition on photosynthesis system of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). *Frontiers in plant science*, 8, 365.
- Lu, T., Zhang, G., Sun, L., Wang, J., & Hao, F. (2017). Genome-wide identification of CBL family and expression analysis of CBLs in response to potassium deficiency in cotton. *PeerJ*, 5, e3653.
- Lu, Y., Gao, X., Jiang, L., Chen, Z., Wang, T., Jie, J., Kang, H., Zhang, Y., Guo, S., & Ruan, H. (2017). Directly cast bulk eutectic and near-eutectic high entropy alloys with balanced strength and ductility in a wide temperature range. *Acta materialia*, 124, 143-150.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., & Gruissem, W. (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The Plant Cell*, 14, S389-S400.
- Ludwig, W., Hayes, S., Trenner, J., Delker, C., & Quint, M. (2021). On the evolution of plant thermomorphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7345-7358.
- Lychuk, T. E., Moulin, A. P., Lemke, R. L., Izaurralde, R. C., Johnson, E. N., Olfert, O. O., & Brandt, S. A. (2021). Modelling the effects of climate change, agricultural inputs, cropping diversity, and environment on soil nitrogen and phosphorus: A case study in Saskatchewan, Canada. *Agricultural Water Management*, 252, 106850.
- Lynch, J. P. (2022). Harnessing root architecture to address global challenges. *The Plant Journal*, 109(2), 415-431.
- Ma, C., Jiang, C., & Gao, J. (2018). Regulatory mechanisms underlying activation of organ abscission. *Annual Plant Reviews online*, 27-56.
- Ma, L., Ye, J., Yang, Y., Lin, H., Yue, L., Luo, J., Long, Y. U., Fu, H., Liu, X., & Zhang, Y. (2019). The SOS2-SCaBP8 complex generates and fine-tunes an AtANN4-dependent calcium signature under salt stress. *Developmental Cell*, 48(5), 697-709.
- Maathuis, F. J. M. (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 849-858.
- Maeshima, M. (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 37-51.
- Maike C. Rentel, David Lecourieux, Fatma Ouaked, Sarah L. Usher, Lindsay Petersen, Haruko Okamoto, Heather Knight, Scott C. Peck, Claire S. Grierson, Heribert Hirt & Marc R. Knight
- Marin, M., Feeney, D. S., Brown, L. K., Naveed, M., Ruiz, S., Koebernick, N., Bengough, A. G., Hallett, P. D., Roose, T., & Puértolas, J. (2021). Significance of root hairs for plant performance under contrasting field conditions and water deficit. *Annals of Botany*, 128(1), 1-16.
- Marschner, H. (1997). Functions of mineral nutrients, macronutrients. *Mineral nutrition of higher plants*.

- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V., & Rubio, F. (2005). High-affinity K⁺ uptake in pepper plants. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1553-1562.
- Martínez-Rodríguez, M. M., Estañ, M. T., Moyano, E., Garcia-Abellan, J. O., Flores, F. B., Campos, J. F., Al-Azzawi, M. J., Flowers, T. J., & Bolarín, M. C. (2008). The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an 'excluder' genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 392-401.
- Massaretto, I. L., Albaladejo, I., Purgatto, E., Flores, F. B., Plasencia, F., Egea-Fernández, J. M., Bolarin, M. C., & Egea, I. (2018). Recovering tomato landraces to simultaneously improve fruit yield and nutritional quality against salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1778.
- Mata-Nicolás, E., Montero-Pau, J., Gimeno-Paez, E., Garcia-Carpintero, V., Ziarsolo, P., Menda, N., Mueller, L. A., Blanca, J., Cañizares, J., & Van der Knaap, E. (2020). Exploiting the diversity of tomato: the development of a phenotypically and genetically detailed germplasm collection. *Horticulture research*, 7.
- Matsumoto, C., Yada, H., Hayakawa, C., Hoshino, K., Hirai, H., Kato, K., & Ikeda, H. (2021). Physiological characterization of tomato introgression line IL5-4 that increases Brix and blossom-end rot in ripening fruit. *The Horticulture Journal*, 90(2), 215-222.
- McAdam, S. A. M., Sussmilch, F. C., & Brodribb, T. J. (2016). Stomatal responses to vapour pressure deficit are regulated by high speed gene expression in angiosperms. *Plant, cell & environment*, 39(3), 485-491.
- McAinsh, M. R., & Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist*, 181(2), 275-294.
- Meco, V., Egea, I., Albaladejo, I., Campos, J. F., Morales, B., Ortíz-Atienza, A., Capel, C., Angosto, T., Bolarín, M. C., & Flores, F. B. (2019). Identification and characterisation of the tomato parthenocarpic mutant high fruit set under stress (hfs) exhibiting high productivity under heat and salt stress. *Annals of Applied Biology*, 174(2), 166-178.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Sundaresan, S., Selvaraj, K. S. V., Burd, S., Ophir, R., Kochanek, B., Reid, M. S., Jiang, C.-Z., & Lers, A. (2010). Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. *Plant Physiology*, 154(4), 1929-1956.
- Mesa, T., Polo, J., Arabia, A., Caselles, V., & Munné-Bosch, S. (2022). Differential physiological response to heat and cold stress of tomato plants and its implication on fruit quality. *Journal of Plant Physiology*, 268, 153581.
- Meza, S. L. R., Egea, I., Massaretto, I. L., Morales, B., Purgatto, E., Egea-Fernández, J. M., Bolarin, M. C., & Flores, F. B. (2020). Traditional tomato varieties improve fruit quality without affecting fruit yield under moderate salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 587754.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L., & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2(84), ra45-ra45.
- Miller, P. (1754). *The gardeners dictionary: containing the methods of cultivating and improving all sorts of trees, plants, and flowers, for the kitchen, fruit, and pleasure gardens; as also those which are used in medicine. With Directions for the culture of vineyards and making*

of wine in England. In which likewise are included the practical parts of husbandry (Vol. 3). author.

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). *Estudio comparativo de los costes de producción de Naranja, almendra, melocotón y tomate entre países productores y el análisis de impacto de los acuerdos de libre comercio en el marco de la elaboración del plan estratégico de la PAC*.
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., Fletcher, S. J., Carroll, B. J., Lu, G. Q., & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature plants*, 3(2), 1-10.
- Mohan Jain, S. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153-166.
- Mohan Jain, S. (2006). Mutation-assisted breeding for improving ornamental plants. *XXII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding for Beauty 714*, 85-98.
- Møller, I. S., Gilliham, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff, J., & Tester, M. (2009). Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(7), 2163-2178.
- Monihan, S. M., Magness, C. A., Yadegari, R., Smith, S. E., & Schumaker, K. S. (2016). Arabidopsis CALCINEURIN B-LIKE10 functions independently of the SOS pathway during reproductive development in saline conditions. *Plant Physiology*, 171(1), 369-379.
- Monihan, S. M., Ryu, C.-H., Magness, C. A., & Schumaker, K. S. (2019). Linking duplication of a calcium sensor to salt tolerance in *Eutrema salsugineum*. *Plant Physiology*, 179(3), 1176-1192.
- Moshelion, M., Halperin, O., Wallach, R., Oren, R. A. M., & Way, D. A. (2015). Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant, Cell & Environment*, 38(9), 1785-1793.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Munns, R., James, R. A., Gilliham, M., Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, 43(12), 1103-1113.
- Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., Byrt, C. S., Hare, R. A., Tyerman, S. D., & Tester, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature biotechnology*, 30(4), 360-364.
- Munns, R., Passioura, J. B., Colmer, T. D., & Byrt, C. S. (2020). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 225(3), 1091-1096.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J. O., Antón, T., Garcia-Sogo, B., Sanchez-Bel, P., Flores, F. B., Atarés, A., Angosto, T., & Pintor-Toro, J. A. (2012). Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of plant physiology*, 169(5), 459-468.

- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., García-Abellán, J. O., García-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V., & Bolarin, M. C. (2008). The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia plantarum*, *133*(2), 288-297.
- Najeib, U., Tan, D. K. Y., & Bange, M. P. (2016). Inducing waterlogging tolerance in cotton via an anti-ethylene agent aminoethoxyvinylglycine application. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *62*(8), 1136-1146.
- 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*(1), 365-379.
- Nieves-Cordones, M., Al Shiblawi, F. R., & Sentenac, H. (2016). Roles and transport of sodium and potassium in plants. *The alkali metal ions: Their role for life*, 291-324.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2010). The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular plant*, *3*(2), 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 688-695.
- Nieves-Cordones, M., García-Sánchez, F., Pérez-Pérez, J. G., Colmenero-Flores, J. M., Rubio, F., & Rosales, M. A. (2019). Coping with water shortage: an update on the role of K⁺, Cl⁻, and water membrane transport mechanisms on drought resistance. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1619.
- Nieves-Cordones, M., Lara, A., Silva, M., Amo, J., Rodríguez-Sepulveda, P., Rivero, R. M., Martínez, V., Botella, M. A., & Rubio, F. (2020). Root high-affinity K⁺ and Cs⁺ uptake and plant fertility in tomato plants are dependent on the activity of the high-affinity K⁺ transporter SIHAK5. *Plant, Cell & Environment*, *43*(7), 1707-1721.
- Niu, M., Huang, Y., Sun, S., Sun, J., Cao, H., Shabala, S., & Bie, Z. (2018). Root respiratory burst oxidase homologue-dependent H₂O₂ production confers salt tolerance on a grafted cucumber by controlling Na⁺ exclusion and stomatal closure. *Journal of Experimental Botany*, *69*(14), 3465-3476.
- No, D. H., Baek, D., Lee, S. H., Cheong, M. S., Chun, H. J., Park, M. S., Cho, H. M., Jin, B. J., Lim, L. H., & Lee, Y. B. (2021). High-temperature conditions promote soybean flowering through the transcriptional reprogramming of flowering genes in the photoperiod pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), 1314.
- Noctor, G., & Mhamdi, A. (2017). Climate change, CO₂, and defense: the metabolic, redox, and signaling perspectives. *Trends in Plant Science*, *22*(10), 857-870.
- Norris, S. R., Meyer, S. E., & Callis, J. (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant molecular biology*, *21*, 895-906.
- Nuccio, M. L., Rhodes, D., McNeil, S. D., & Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current opinion in plant biology*, *2*(2), 128-134.

- Nuez, F. (1996). *Catálogo de semillas de tomate*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., & Nagata, K. (2008). Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8885-8892.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, M., Tanokura, M., & Kuchitsu, K. (2008). Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca^{2+} and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8885-8892.
- Oh, D.-H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S.-M., Li, Y., Quintero, F. J., Jiang, X., D'urzo, M. P., Lee, S. Y., & Zhao, Y. (2009). Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant physiology*, 151(1), 210-222.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J. U. N., De Morales, P. A., Marin-Manzano, M. C., Pardo, J. M., & Belver, A. (2009a). The plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na^+ between plant organs. *Plant, cell & environment*, 32(7), 904-916.
- Oliás, R., Eljakaoui, Z., Pardo, J. M., & Belver, A. (2009b). The Na^+/H^+ exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na^+ in tomato plants under salinity conditions. *Plant signaling & behavior*, 4(10), 973-976.
- Olmos, E., & Hellín, E. (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Scientia Horticulturae*, 75(1-2), 91-101.
- Orzaez, D., Medina, A., Torre, S., Fernández-Moreno, J. P., Rambla, J. L., Fernández-del-Carmen, A., Butelli, E., Martin, C., & Granell, A. (2009). A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. *Plant physiology*, 150(3), 1122-1134.
- Pandey, S. K., Wright, B. E., & Moynihan, D. P. (2008). Public service motivation and interpersonal citizenship behavior in public organizations: Testing a preliminary model. *International public management journal*, 11(1), 89-108.
- Pang, C.-H., & Wang, B.-S. (2008). Oxidative stress and salt tolerance in plants. *Progress in botany*, 231-245.
- Pangga, I. B., Hanan, J., & Chakraborty, S. (2011). Pathogen dynamics in a crop canopy and their evolution under changing climate. *Plant Pathology*, 60(1), 70-81.
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O., & Quintero, F. J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 57(5), 1181-1199.
- Parent, B., & Tardieu, F. (2012). Temperature responses of developmental processes have not been affected by breeding in different ecological areas for 17 crop species. *New Phytologist*, 194(3), 760-774.
- Park, C. H., Choi, K. J., & Son, Y. S. (2019). Shape memory alloy-based spring bundle actuator controlled by water temperature. *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, 24(4), 1798-1807.

- Park, H. J., Gámez-Arjona, F. M., Lindahl, M., Aman, R., Villalta, I., Cha, J.-Y., Carranco, R., Lim, C. J., García, E., & Bressan, R. A. (2023). S-acylated and nucleus-localized SALT OVERLY SENSITIVE3/CALCINEURIN B-LIKE4 stabilizes GIGANTEA to regulate Arabidopsis flowering time under salt stress. *The Plant Cell*, 35(1), 298-317.
- Park, S. J., Eshed, Y., & Lippman, Z. B. (2014). Meristem maturation and inflorescence architecture—lessons from the Solanaceae. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 70-77.
- Park, S., Cheng, N. H., Pittman, J. K., Yoo, K. S., Park, J., Smith, R. H., & Hirschi, K. D. (2005). Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing Arabidopsis H⁺/Ca²⁺ transporters. *Plant Physiology*, 139(3), 1194-1206.
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2007). History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2, 1-27.
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New species of wild tomatoes (Solanum section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424-434.
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., & Knapp, S. (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (Solanum sect. Lycopersicoides, sect. Juglandifolia, sect. Lycopersicon; Solanaceae). *Systematic botany monographs*, 84.
- Pérez, A. R., & Quintero, E. M. (2015). Funciones del calcio en la calidad poscosecha de frutas y hortalizas: una revisión. *Alimentos hoy*, 23(34), 13-25.
- Pérez-Martín, F., Yuste-Lisbona, F. J., Pineda, B., Angarita-Díaz, M. P., García-Sogo, B., Antón, T., Sánchez, S., Giménez, E., Atarés, A., & Fernández-Lozano, A. (2017). A collection of enhancer trap insertional mutants for functional genomics in tomato. *Plant biotechnology journal*, 15(11), 1439-1452.
- Peuke, A. D., Gessler, A., Trumbore, S., Windt, C. W., Homan, N., Gerkema, E., & Van As, H. (2015). Phloem flow and sugar transport in *Ricinus communis* L. is inhibited under anoxic conditions of shoot or roots. *Plant, cell & environment*, 38(3), 433-447.
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016). WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 760.
- Pilarska, M., Bartels, D., & Niewiadomska, E. (2021). Differential regulation of NADPH oxidases in salt-tolerant *Eutrema salsugineum* and salt-sensitive *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10341.
- Pineda, B., García-Abellán, J. O., Antón, T., Pérez, F., Moyano, E., García Sogo, B., Campos, J. F., Angosto, T., Morales, B., & Capel, J. (2012). Tomato: genomic approaches for salt and drought stress tolerance. *Improving crop resistance to abiotic stress*, 1085-1120.
- Plasencia, F. A. (2015). *Identificación y caracterización de mutantes alterados en la tolerancia a la salinidad en especies de tomate: papel del gen SICBL10 en los mecanismos de respuesta a salinidad señalizados por Ca²⁺ en tomate*. Universidad de Murcia (España).
- Plasencia, F. A., Estrada, Y., Flores, F. B., Ortíz-Atienza, A., Lozano, R., & Egea, I. (2021). The Ca²⁺ sensor Calcineurin B-like protein 10 in plants: emerging new crucial roles for plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 599944.
- Porch, T. G., & Hall, A. E. (2013). Heat tolerance. *Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops: Vol. 2 Target Traits*, 167-202.

- Porter, J. R., & Gawith, M. (1999). Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European journal of agronomy*, 10(1), 23-36.
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., & Zhou, J.-M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, 38, 92-100.
- Qian, Z., Song, J., Chaumont, F., & Ye, Q. (2015). Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant, Cell & Environment*, 38(3), 461-473.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8436-8441.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J. M., & Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell*, 19(4), 1415-1431.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., & Van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature plants*, 2(1), 1-9.
- Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., & Pardo, J. M. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 9061-9066.
- Rached, M., Pierre, B., Yves, G., Matsukura, C., Ariizumi, T., Ezura, H., & Fukuda, N. (2018). Differences in blossom-end rot resistance in tomato cultivars is associated with total ascorbate rather than calcium concentration in the distal end part of fruits per se. *The Horticulture Journal*, 87(3), 372-381.
- Ran, X., Chen, X., Shi, L., Ashraf, M., Yan, F., Chen, Y., Xu, J., & Shi, J. (2020). Transcriptomic insights into the roles of HSP70-16 in sepal's responses to developmental and mild heat stress signals. *Environmental and Experimental Botany*, 179, 104225.
- Rao, S., Balyan, S., Jha, S., & Mathur, S. (2020). Novel insights into expansion and functional diversification of MIR169 family in tomato. *Planta*, 251, 1-17.
- Rao, S., Gupta, A., Bansal, C., Sorin, C., Crespi, M., & Mathur, S. (2022). A conserved HSF: miR169: NF-YA loop involved in tomato and *Arabidopsis* heat stress tolerance. *The Plant Journal*, 112(1), 7-26.
- Rawson, H. M. (1988). Effect of high temperatures on the development and yield of wheat and practices to reduce deleterious effects. *Wheat Production Constraints in Tropical Environments, Chiang Mai, Thailand, 19-23 Jan 1987*.
- Reddy, K. J. (2006). Nutrient stress. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*, 187-217.
- Reichardt, S., Piepho, H.-P., Stintzi, A., & Schaller, A. (2020). Peptide signaling for drought-induced tomato flower drop. *Science*, 367(6485), 1482-1485.
- Ren, X., Qi, G., Feng, H., Zhao, S., Zhao, S., Wang, Y., & Wu, W. (2013). Calcineurin B-like protein CBL 10 directly interacts with AKT 1 and modulates K⁺ homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 74(2), 258-266.

- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S., Grierson, C., Hirt, H. & Knight, M. R. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature*, 427(6977), 858-861.
- Reuscher, S., Akiyama, M., Mori, C., Aoki, K., Shibata, D., & Shiratake, K. (2013). Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS one*, 8(11), e79052.
- Rhodes, D., & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 357-384.
- Ribelles, C., García-Sogo, B., Yuste-Lisbona, F. J., Atarés, A., Castañeda, L., Capel, C., Lozano, R., Moreno, V., & Pineda, B. (2019). Alq mutation increases fruit set rate and allows the maintenance of fruit yield under moderate saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, 70(20), 5731-5744.
- Rick, C. M. (1973). *Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats*. Springer.
- Rivero, R. M., Mittler, R., Blumwald, E., & Zandalinas, S. I. (2022). Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *The Plant Journal*, 109(2), 373-389.
- Robertson, D. N. (2013). Modulating plant calcium for better nutrition and stress tolerance. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Ródenas, R., García-Legaz, M. F., López-Gómez, E., Martínez, V., Rubio, F., & Ángeles Botella, M. (2017). NO₃⁻, PO₄³⁻ and SO₄²⁻ deprivation reduced LKT1-mediated low-affinity K⁺ uptake and SKOR-mediated K⁺ translocation in tomato and Arabidopsis plants. *Physiologia Plantarum*, 160(4), 410-424.
- Ródenas, R., Ragel, P., Nieves-Cordones, M., Martínez-Martínez, A., Amo, J., Lara, A., Martínez, V., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Rubio, F. (2021). Insights into the mechanisms of transport and regulation of the Arabidopsis high-affinity K⁺ transporter HAK51. *Plant Physiology*, 185(4), 1860-1874.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Jiang, X., Gálvez, F. J., Aranda, M. N., Cubero, B., & Venema, K. (2008). Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytologist*, 179(2), 366-377.
- Romero-Aranda, M. R., González-Fernández, P., Pérez-Tienda, J. R., López-Díaz, M. R., Espinosa, J., Granum, E., Traverso, J. Á., Pineda, B., Garcia-Sogo, B., & Moreno, V. (2020). Na⁺ transporter HKT1; 2 reduces flower Na⁺ content and considerably mitigates the decline in tomato fruit yields under saline conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 341-352.
- Rothan, C., Diouf, I., & Causse, M. (2019). Trait discovery and editing in tomato. *The Plant Journal*, 97(1), 73-90.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., & Martínez, V. (2010). Studies on Arabidopsis athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia Plantarum*, 139(2), 220-228.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J., & Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, 58(1), 133-145.

- Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2010). Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, 239-256.
- Sadok, W., Lopez, J. R., & Smith, K. P. (2021). Transpiration increases under high-temperature stress: Potential mechanisms, trade-offs, and prospects for crop resilience in a warming world. *Plant, Cell & Environment*, 44(7), 2102-2116.
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J. W., & Fluhr, R. (2004). Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell*, 16(3), 616-628.
- Salatin, J. (2022). *This is Homeschooling. Chapter The Greenhouse Effect* (1st ed.).
- Salava, H., Thula, S., Mohan, V., Kumar, R., & Maghuly, F. (2021). Application of genome editing in tomato breeding: Mechanisms, advances, and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 682.
- Sami, A., Xue, Z., Tazein, S., Arshad, A., He Zhu, Z., Ping Chen, Y., Hong, Y., Tian Zhu, X., & Jin Zhou, K. (2021). CRISPR–Cas9-based genetic engineering for crop improvement under drought stress. *Bioengineered*, 12(1), 5814-5829.
- Samineni, S., Siddique, K. H. M., Gaur, P. M., & Colmer, T. D. (2011). Salt sensitivity of the vegetative and reproductive stages in chickpea (*Cicer arietinum* L.): podding is a particularly sensitive stage. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2), 260-268.
- Sánchez, B., Rasmussen, A., & Porter, J. R. (2014). Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. *Global change biology*, 20(2), 408-417.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M. T., Martínez-Madrid, C., Fernández-García, N., Romojaro, F., Olmos, E., Estrella, E., Bolarín, M. C., & Flores, F. B. (2012). Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 75(17), 5463-5478.
- Sanchez-Bel, P., Egea, I., Sanchez-Ballesta, M. T., Sevillano, L., del Carmen Bolarín, M., & Flores, F. B. (2012). Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery. *Plant and Cell Physiology*, 53(2), 470-484.
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691-706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S401-S417.
- Santa-Cruz, A., Martínez-Rodríguez, M. M., Pérez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R., & Bolarin, M. C. (2002). The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, 162(5), 825-831.
- Santa-María, G. E., Rubio, F., Dubcovsky, J., & Rodríguez-Navarro, A. (1997). The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell*, 9(12), 2281-2289.
- Sanyal, S. K., Pandey, A., & Pandey, G. K. (2015). The CBL–CIPK signaling module in plants: a mechanistic perspective. *Physiologia plantarum*, 155(2), 89-108.

- Sayed, O. H. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*, 41, 321-330.
- Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Lotz, L. A. P., & Smulders, M. J. M. (2016). Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends in Plant Science*, 21(5), 438-449.
- Schlücking, K., Edel, K. H., Köster, P., Drerup, M. M., Eckert, C., Steinhorst, L., Waadt, R., Batistič, O., & Kudla, J. (2013). A new β -estradiol-inducible vector set that facilitates easy construction and efficient expression of transgenes reveals CBL3-dependent cytoplasm to tonoplast translocation of CIPK5. *Molecular plant*, 6(6), 1814-1829.
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Hemmingsen, E. A., & Bradstreet, E. D. (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52(1), 119-125.
- Schwarz, D., Thompson, A. J., & Kläring, H.-P. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in plant science*, 5, 625.
- Selby, A. D. (1896). *Investigations of plant diseases in forcing house and garden*.
- Serrano, R., Culiñán-Maciá, F. A., & Moreno, V. (1998). Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes. *Scientia Horticulturae*, 78(1-4), 261-269.
- Seymour, G. B., & Rose, J. K. C. (2022). Tomato molecular biology—special collection of papers for molecular horticulture. En *Molecular Horticulture* (Vol. 2, Número 1, pp. 1-4). BioMed Central.
- Shabala, S., & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia plantarum*, 133(4), 651-669.
- Shabala, S., & Mackay, A. (2011). Ion transport in halophytes. En *Advances in botanical research* (Vol. 57, pp. 151-199). Elsevier.
- Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia plantarum*, 151(3), 257-279.
- Sharma, J., & Ravindranath, N. H. (2019). Applying IPCC 2014 framework for hazard-specific vulnerability assessment under climate change. *Environmental Research Communications*, 1(5), 051004.
- Shi, H., & Zhu, J.-K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant molecular biology*, 50, 543-550.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B., Wu, S.-J., & Zhu, J.-K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nature biotechnology*, 21(1), 81-85.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J. K. (2002). The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *The plant cell*, 14(2), 465-477.

- Shi, K., Li, X., Zhang, H., Zhang, G., Liu, Y., Zhou, Y., Xiaojian, X., Zhixiang, C. & Yu, J. (2015). Guard cell hydrogen peroxide and nitric oxide mediate elevated CO₂-induced stomatal movement in tomato. *New Phytologist*, 208(2), 342-353
- Shi, W., Lawas, L. M. F., Raju, B. R., & Jagadish, S. V. K. (2016). Acquired thermo-tolerance and trans-generational heat stress response at flowering in rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 202(4), 309-319.
- Shukla, P. R., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H. O., Roberts, D. C., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., & Van Diemen, R. (2019). *IPCC, 2019: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.
- Silva, C. J., van den Abeele, C., Ortega-Salazar, I., Papin, V., Adaskaveg, J. A., Wang, D., Casteel, C. L., Seymour, G. B., & Blanco-Ulate, B. (2021). Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune responses. *Journal of experimental botany*, 72(7), 2696-2709.
- Singh, A., Jones, S., Ganapathysubramanian, B., Sarkar, S., Mueller, D., Sandhu, K., & Nagasubramanian, K. (2021). Challenges and opportunities in machine-augmented plant stress phenotyping. *Trends in Plant Science*, 26(1), 53-69.
- Sirault, X. R. R., James, R. A., & Furbank, R. T. (2009). A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. *Functional Plant Biology*, 36(11), 970-977.
- Spooner, D. M., Peralta, I. E., & Knapp, S. (2005). Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, 54(1), 43-61.
- Spurr, A. (1959). Anatomical aspects of blossom-end rot in the tomato with special reference to calcium nutrition. *Hilgardia*, 28(12), 269-295.
- Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure research*, 26(1-2), 31-43.
- Srikanthbabu, V., Krishnaprasad, B. T., Gopalakrishna, R., Savitha, M., & Udayakumar, M. (2002). Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR). *Journal of Plant Physiology*, 159(5), 535-545.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., & Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1525-1542.
- Steinhorst, L., & Kudla, J. (2019). *How plants perceive salt*. Nature Publishing Group UK London.
- Sun, X., Gao, Y., Li, H., Yang, S., & Liu, Y. (2015). Over-expression of SIWRKY39 leads to enhanced resistance to multiple stress factors in tomato. *Journal of Plant Biology*, 58, 52-60.
- Sundaresan, S., Philosoph-Hadas, S., Ma, C., Jiang, C., Riov, J., Kochanek, B., Salim, S., Reid, M. S., & Meir, S. (2021). Role of the KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN PROTEIN 1 (KD1) in regulating abscission of tomato flower pedicels at early and late stages of the process. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 2103-2118.

- Sureshkumar, S., Dent, C., Seleznev, A., Tasset, C., & Balasubramanian, S. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay modulates FLM-dependent thermosensory flowering response in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 2(5), 1-7.
- Szymański, J., Bocobza, S., Panda, S., Sonawane, P., Cárdenas, P. D., Lashbrooke, J., Kamble, A., Shahaf, N., Meir, S., & Bovy, A. (2020). Analysis of wild tomato introgression lines elucidates the genetic basis of transcriptome and metabolome variation underlying fruit traits and pathogen response. *Nature Genetics*, 52(10), 1111-1121.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2007). *Fisiologia vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., & Dolan, L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*, 319(5867), 1241-1244.
- Tang, R., Yang, Y., Yang, L., Liu, H., WANG, C., YU, M., GAO, X., & ZHANG, H. (2014). Poplar calcineurin B-like proteins PtCBL10A and PtCBL10B regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane. *Plant, cell & environment*, 37(3), 573-588.
- Taylor, I. B., Atherton, J. G., & Rudich, J. (1986). *Biosystematics of the tomato. The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall.
- Taylor, M. D., Locascio, S. J., & Alligood, M. R. (2004). Blossom-end rot incidence of tomato as affected by irrigation quantity, calcium source, and reduced potassium. *HortScience*, 39(5), 1110-1115.
- Teixeira, E. I., Fischer, G., Van Velthuisen, H., Walter, C., & Ewert, F. (2013). Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
- Thirumalaikumar, V. P., Devkar, V., Mehterov, N., Ali, S., Ozgur, R., Turkan, I., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2018). NAC transcription factor JUNGBRUNNEN 1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 354-366.
- Thouet, J., Quinet, M., Ormenese, S., Kinet, J.-M., & Périlleux, C. (2008). Revisiting the involvement of SELF-PRUNING in the sympodial growth of tomato. *Plant physiology*, 148(1), 61-64.
- Tian, Z., Wang, J., Li, J., & Han, B. (2021). Designing future crops: challenges and strategies for sustainable agriculture. *The Plant Journal*, 105(5), 1165-1178.
- Tonetto de Freitas, S., McElrone, A. J., Shackel, K. A., & Mitcham, E. J. (2014). Calcium partitioning and allocation and blossom-end rot development in tomato plants in response to whole-plant and fruit-specific abscisic acid treatments. *Journal of experimental botany*, 65(1), 235-247.
- Topcu, Y., Nambesan, S. U., & van der Knaap, E. (2022). Blossom-end rot: a century-old problem in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and other vegetables. *Molecular Horticulture*, 2(1), 1.

- Torres, M. A., Morales, J., Sánchez-Rodríguez, C., Molina, A., & Dangl, J. L. (2013). Functional interplay between Arabidopsis NADPH oxidases and heterotrimeric G protein. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(6), 686-694.
- Tranbarger, T. J., Tucker, M. L., Roberts, J. A., & Meir, S. (2017). Plant organ abscission: from models to crops. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8, p. 196). Frontiers Media SA.
- Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in enzymology*, 428, 419-438.
- UNFCCC. (2015). *The Paris Agreement*. What is the Paris Agreement? <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement>
- United Nations. (2022). World Population Prospects. <https://population.un.org/wpp/>
- Uozumi, A., Ikeda, H., Hiraga, M., Kanno, H., Nanzyo, M., Nishiyama, M., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2012). Tolerance to salt stress and blossom-end rot in an introgression line, IL8-3, of tomato. *Scientia horticultrae*, 138, 1-6.
- USDA National Nutrient Database. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170502/nutrients>
- van Zanten, M., Ai, H., & Quint, M. (2021). Plant thermotropism: an underexplored thermal engagement and avoidance strategy. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7414-7420.
- Verslues, P. E., Bailey-Serres, J., Brodersen, C., Buckley, T. N., Conti, L., Christmann, A., Dinneny, J. R., Grill, E., Hayes, S., & Heckman, R. W. (2023). Burning questions for a warming and changing world: 15 unknowns in plant abiotic stress. *The Plant Cell*, 35(1), 67-108.
- Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annual review of plant biology*, 42(1), 579-620.
- Villalta, I., Reina-Sánchez, A., Bolarín, M. C., Cuartero, J., Belver, A., Venema, K., Carbonell, E. A., & Asins, M. J. (2008). Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 869-880.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal*, 33(5), 949-956.
- Voytas, D. F., & Gao, C. (2014). Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS biology*, 12(6), e1001877.
- Vu, C. Q., Fukushima, S., Wazawa, T., & Nagai, T. (2021). A highly-sensitive genetically encoded temperature indicator exploiting a temperature-responsive elastin-like polypeptide. *Scientific Reports*, 11(1), 16519.
- Vu, L. D., Xu, X., Gevaert, K., & De Smet, I. (2019). Developmental plasticity at high temperature. *Plant Physiology*, 181(2), 399-411.
- Waadt, R., & Kudla, J. (2008a). In planta visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(4), pdb-prot4995.

- Waadts, R., Schmidt, L. K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., & Kudla, J. (2008b). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant Journal*, *56*(3), 505-516.
- Wang, P., Clark, N. M., Nolan, T. M., Song, G., Bartz, P. M., Liao, C.-Y., Montes-Serey, C., Katz, E., Polko, J. K., & Kieber, J. J. (2022). Integrated omics reveal novel functions and underlying mechanisms of the receptor kinase FERONIA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *34*(7), 2594-2614.
- Wang, R., Li, R., Cheng, L., Wang, X., Fu, X., Dong, X., Qi, M., Jiang, C., Xu, T., & Li, T. (2021). SIERF52 regulates SITIP1; 1 expression to accelerate tomato pedicel abscission. *Plant Physiology*, *185*(4), 1829-1846.
- Wang, W., Chen, D., Zhang, X., Liu, D., Cheng, Y., & Shen, F. (2018). Role of plant respiratory burst oxidase homologs in stress responses. *Free Radical Research*, *52*(8), 826-839.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, *218*, 1-14.
- Wang, X., Li, Q., Yang, M., Zhang, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Wollenweber, B., & Jiang, D. (2021). Crosstalk between hydrogen peroxide and nitric oxide mediates priming-induced drought tolerance in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *207*(2), 224-235.
- Wang, X., Zhao, C., Müller, C., Wang, C., Ciaï, P., Janssens, I., Peñuelas, J., Asseng, S., Li, T., & Elliott, J. (2020). Emergent constraint on crop yield response to warmer temperature from field experiments. *Nature Sustainability*, *3*(11), 908-916.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, *217*(6), 1915-1928.
- Wang, Y., Holroyd, G., Hetherington, A. M., & Ng, C. K. (2004). Seeing 'cool' and 'hot'—infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants. *Journal of Experimental Botany*, *55*(400), 1187-1193.
- Wang, Y., Itaya, A., Zhong, X., Wu, Y., Zhang, J., van der Knaap, E., Olmstead, R., Qi, Y., & Ding, B. (2011). Function and evolution of a MicroRNA that regulates a Ca²⁺-ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth. *The Plant Cell*, *23*(9), 3185-3203.
- Wegner, L. H. (2017). Cotransport of water and solutes in plant membranes: The molecular basis, and physiological functions. *Aims Biophysics*, *4*(2), 192-209.
- Weinl, S., & Kudla, J. (2009). The CBL–CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, *184*(3), 517-528.
- White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1465*(1-2), 171-189.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of botany*, *92*(4), 487-511.
- White, P. J., Bowen, H. C., Demidchik, V., Nichols, C., & Davies, J. M. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1564*(2), 299-309.

- Wu, S.-J., Ding, L., & Zhu, J.-K. (1996). SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant Cell*, 8(4), 617-627.
- Xia, X., Gao, C., Song, L., Zhou, Y., Shi, K. A. I., & Yu, J. (2014). Role of H₂O₂ dynamics in brassinosteroid-induced stomatal closure and opening in *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell & Environment*, 37(9), 2036-2050.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L., & Wu, W.-H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell*, 125(7), 1347-1360.
- Yan, S., Chen, N., Huang, Z., Li, D., Zhi, J., Yu, B., Liu, X., Cao, B., & Qiu, Z. (2020). Anthocyanin Fruit encodes an R2R3-MYB transcription factor, SLAN2-like, activating the transcription of SIMYBATV to fine-tune anthocyanin content in tomato fruit. *New Phytologist*, 225(5), 2048-2063.
- Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in plant science*, 8(10), 505-512.
- Yang, T., Ali, M., Lin, L., Li, P., He, H., Zhu, Q., Sun, C., Wu, N., Zhang, X., & Huang, T. (2023). Recoloring tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing. *Horticulture Research*, 10(1), uhac214.
- Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Unravelling salt stress signaling in plants. *Journal of integrative plant biology*, 60(9), 796-804.
- Yang, Y., Zhang, C., Tang, R.-J., Xu, H.-X., Lan, W.-Z., Zhao, F., & Luan, S. (2019). Calcineurin B-Like proteins CBL4 and CBL10 mediate two independent salt tolerance pathways in Arabidopsis. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2421.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D. E., Wu, Y., & Schroeder, J. I. (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2; 1 and OsHKT2; 2 transporters in plant cells. *Plant physiology*, 152(1), 341-355.
- Ye, J., Wang, X., Wang, W., Yu, H., Ai, G., Li, C., Sun, P., Wang, X., Li, H., & Ouyang, B. (2021). Genome-wide association study reveals the genetic architecture of 27 agronomic traits in tomato. *Plant Physiology*, 186(4), 2078-2092.
- Ye, N., Wang, F., Shi, L., Chen, M., Cao, Y., Zhu, F., Wu, Y., Xie, L., Liu, T., & Su, Z. (2018). Natural variation in the promoter of rice calcineurin B-like protein10 (Os CBL 10) affects flooding tolerance during seed germination among rice subspecies. *The Plant Journal*, 94(4), 612-625.
- Yi, C., Yao, K., Cai, S., Li, H., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Yu, J., Foyer, C. H., & Zhou, Y. (2015). High atmospheric carbon dioxide-dependent alleviation of salt stress is linked to RESPIRATORY BURST OXIDASE 1 (RBOH1)-dependent H₂O₂ production in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7391-7404.
- Yin, X., Xia, Y., Xie, Q., Cao, Y., Wang, Z., Hao, G., Song, J., Zhou, Y., & Jiang, X. (2020). The protein kinase complex CBL10-CIPK8-SOS1 functions in *Arabidopsis* to regulate salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1801-1814.
- Yolcu, S., Alavilli, H., & Lee, B. (2020). Natural genetic resources from diverse plants to improve abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8567.

- You, Y., & van Kan, J. A. L. (2021). Bitter and sweet make tomato hard to (b)eat. *New Phytologist*, 230(1), 90-100.
- Yu, J., Han, J., Kim, Y.-J., Song, M., Yang, Z., He, Y., Fu, R., Luo, Z., Hu, J., & Liang, W. (2017). Two rice receptor-like kinases maintain male fertility under changing temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(46), 12327-12332.
- Yuste-Lisbona, F.J., Plasencia, F., Capel, C., Barragán-Lozano, T., Egea, I., Jáquez, M., Pineda, B., Atarés, A., Bolarín, M.C., Moreno, V., Lozano, R., 2019. The SALT-HYPERSENSITIVITY (SHE) gene is required for salt tolerance in tomato via regulating long-distance Na⁺ transport. At the Forefront of Plant Research Conference, 6-8 May 2019. CRAG, Barcelona (Spain), p. 70 (Abstract Book). <https://attheforefrontofplantresearch2019.cragenomica.es/> (Abstract Book).
- Zaveri, E., & B. Lobell, D. (2019). The role of irrigation in changing wheat yields and heat sensitivity in India. *Nature communications*, 10(1), 4144.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J.-K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23(2), 104-119.
- Zhang, J., Klueva, N. Y., Wang, Z., Wu, R., Ho, T.-H. D., & Nguyen, H. T. (2000). Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36, 108-114.
- Zhang, X., Köster, P., Schlücking, K., Balcerowicz, D., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Vissenber., K. & Kudla, J. (2018). CBL1-CIPK26-mediated phosphorylation enhances activity of the NADPH oxidase RBOHC, but is dispensable for root hair growth. *FEBS letters*, 592(15), 2582-2593.
- Zhang, X., Li, X., Zhao, R., Zhou, Y., & Jiao, Y. (2020). Evolutionary strategies drive a balance of the interacting gene products for the CBL and CIPK gene families. *New phytologist*, 226(5), 1506-1516.
- Zhang, Y., Zhou, X. N., Liu, S., Yu, A., Yang, C., Chen, X., Liu, J. & Wang, A. (2019). Identification and functional analysis of tomato CIPK gene family. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 110.
- Zhao, C., Piao, S., Huang, Y., Wang, X., Ciais, P., Huang, M., Zeng, Z., & Peng, S. (2016). Field warming experiments shed light on the wheat yield response to temperature in China. *Nature communications*, 7(1), 13530.
- Zhao, Q., Yu, P., Mahendran, R., Huang, W., Gao, Y., Yang, Z., Ye, T., Wen, B., Wu, Y., Li, S., & Guo, Y. (2022). Global climate change and human health: Pathways and possible solutions. *Eco-Environment & Health*, 1(2), 53-62.
- Zheng, L., Wu, W., Chen, Q., Zhang, G., Gao, F., & Zhou, Y. (2022). Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics identified biological processes and metabolic pathways involved in heat stress response in jojoba. *Industrial Crops and Products*, 183, 114946.
- Zheng, X., Fu, D., Cheng, J., Tang, R., Chu, M., Chu, P., Wang, T., & Yin, S. (2021). Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli*. *Aquaculture*, 543, 736945.
- Zhou, J., Wang, J., Li, X., Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Chen, Z., & Yu, J.-Q. (2014). H₂O₂ mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65(15), 4371-4383.

- Zhou, L., Gao, G., Tang, R., Wang, W., Wang, Y., Tian, S., & Qin, G. (2022). m6A-mediated regulation of crop development and stress responses. *Plant Biotechnology Journal*, 20(8), 1447-1455.
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., Lin, T., Qin, M., Peng, M., & Yang, C. (2018). Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding. *Cell*, 172(1-2), 249-261.
- Zhu, M., Chen, G., Zhang, J., Zhang, Y., Xie, Q., Zhao, Z., Pan, Y., & Hu, Z. (2014). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Reports*, 33, 1851-1863.
- Zhu, T., Fonseca De Lima, C. F., & De Smet, I. (2021). The heat is on: how crop growth, development, and yield respond to high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7359-7373.
- Zhu, T., Herrfurth, C., Xin, M., Savchenko, T., Feussner, I., Goossens, A., & De Smet, I. (2021). Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth. *Nature Communications*, 12(1), 4804.
- Zohner, C. M., Mo, L., Renner, S. S., Svenning, J.-C., Vitasse, Y., Benito, B. M., Ordonez, A., Baumgarten, F., Bastin, J.-F., & Sebald, V. (2020). Late-spring frost risk between 1959 and 2017 decreased in North America but increased in Europe and Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12192-12200.
- Zuluaga, D. L., Gonzali, S., Loreti, E., Pucciariello, C., Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Alpi, A., & Perata, P. (2008). *Arabidopsis thaliana* MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. *Functional Plant Biology*, 35(7), 606-618.