

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

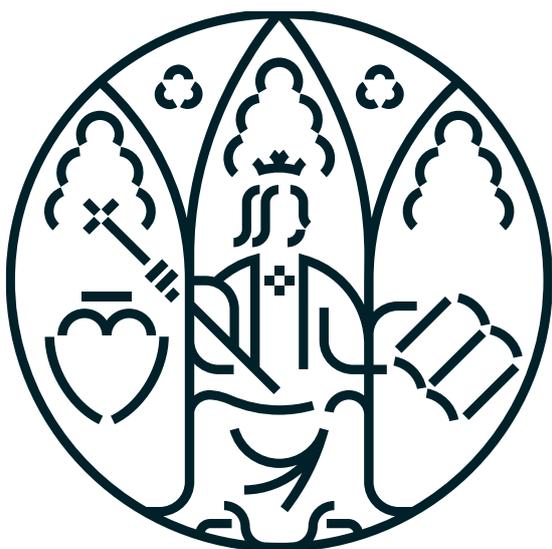
TESIS DOCTORAL

*Modulación del ácido abscísico en plantas
de tomate: respuesta integral a la
combinación de estreses abióticos*

AUTOR/A Miriam Pardo Hernández

DIRECTOR/ES Rosa María Rivero Vargas

2024



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

*Modulación del ácido abscísico en plantas
de tomate: respuesta integral a la
combinación de estreses abióticos*

AUTOR/A Miriam Pardo Hernández

DIRECTOR/ES Rosa María Rivero Vargas

2024



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

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

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D^ª. Miriam Pardo Hernández, habiendo cursado el Programa de Doctorado Biología Vegetal de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Modulación del ácido abscísico en plantas de tomate: respuesta integral a la combinación de estreses abióticos

y dirigida por:

D^ª.: Rosa María Rivero Vargas

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.

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.

Murcia, a 18 de noviembre de

2024 (*firma*)

Firmado digitalmente por
Miriam Pardo Hernández el
día 18/11/2024 con un
certificado emitido por
ACCVCA-120

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

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

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del proyecto “Descifrando la Interacción entre ABA, ROS y el Nitrógeno Bajo Condiciones de Estrés Abióticos Combinados Mediante Aproximaciones Fisiológicas, Bioquímicas y Moleculares (Referencia del proyecto: PGC2018-095731-B-I00)” por parte del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Además, la autora de la presente tesis doctoral ha disfrutado de un contrato predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), con referencia FPU20/03051, y de una ayuda complementaria de movilidad destinada a beneficiarios del programa FPU, con referencia EST22/00211, para realizar una estancia en la Universidad de Universidad Católica del Sagrado Corazón de Milán, ambas concedidas por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Los resultados obtenidos durante el periodo de realización de la presente tesis doctoral se han incluido en las siguientes publicaciones científicas:

- **Pardo-Hernández M**, Arbona V, Simón I, Rivero RM (2024a) Specific ABA-independent tomato transcriptome reprogramming under abiotic stress combination. *The Plant Journal* doi.org/10.1111/tpj.16642
- **Pardo-Hernández M**, García-Pérez P, Lucini L, Rivero RM (2024b) Multi-Omics Exploration of ABA Involvement in Identifying Unique Molecular Markers for Single and Combined Stresses in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* erae372
- **Pardo-Hernández M**, García-Pérez P, Lucini L, Rivero RM (2024c) ABA deficiency and its impact on ion and metabolite profiles in tomato roots under single and combined stress conditions. *Plant Stress* 100644
- **Pardo-Hernández M**, Zhang L, Lucini L, Rivero RM (2024d) Seasonal Influence on Tomato Fruit Metabolome Profile: Implications for ABA Signaling in Multi-Stress Resilience. *Plant Physiology and Biochemistry* 109234

*Solo unos pocos encuentran el camino,
otros no lo reconocen cuando lo encuentran,
otros ni siquiera quieren encontrarlo.*

Lewis Carroll

Muchos de los que leerán estos agradecimientos conocen mucho sobre mí y saben que he dado muchas vueltas antes de empezar este doctorado. Y aquí estoy, terminado de nuevo una etapa de mi vida y deseando ver qué me depara el futuro. Sin embargo, he llegado hasta aquí gracias a muchas personas que me han acompañado en el camino y les quiero agradecer todo lo que han hecho por mí.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora y tutora, la Dra. Rosa M. Rivero Vargas. Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y formar parte de un proyecto que contribuye, aunque sea en una ínfima parte, a uno de los problemas más importantes a nivel mundial, el cambio climático. También gracias por la supervisión, el gran apoyo y el tiempo que me has dedicado. Asimismo, muchas gracias por enseñarme distintas formas de hacer ciencia a los doctores y cabezas del departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC que he tenido el placer de conocer: Paco García, Vicente, Mica, Manolo, Paco Rubio, Huertas, Tere y Silvia.

Por otro lado, quiero agradecer a todos los servicios del CEBAS que han ayudado mucho a la realización de esta tesis y gracias a todos los de mantenimiento por su gran labor y su multidisciplinariedad. También gracias a la Universidad de Murcia y, en especial, al departamento de Fisiología Vegetal de la facultad de Biología por dejarme colaborar impartiendo prácticas universitarias y por ser tan amables conmigo.

Mis días en el CEBAS habrían sido muy diferente sin la fortuna de haber conocido a un montón de buenas personas dispuestas siempre a echarme un cable. A María “la gallega”, desde el primer día sentí su amabilidad y supe que haríamos un buen equipo en el laboratorio, gracias por enseñarme todas las claves para hacer el doctorado y sobrevivir. Ulises y Juanan, gracias por vuestra constante disposición a ayudarme cuando estaba perdida y por “obligarme” a salir a almorzar para tomar un respiro. Silvia, gracias por sacarme tantas sonrisas y por ser una buenísima persona. Adri, Jesús y Almu, gracias por esas comidas charlando de cualquier tema y también gracias por estar siempre para echar una mano. David y José, gracias por enseñarme tantísimo sobre el campo y por tantos bonitos recuerdos en la finca. Juan, Lucía, Paula y Álvaro gracias por esas charlas, risas y desahogos en “el despachillo”, he tenido mucha suerte de coincidir con científicos como vosotros. Agradezco también a muchos otros compañeros a quienes no he tenido la oportunidad de conocer en profundidad, pero que han sido siempre muy simpáticos

conmigo. Mi sincero agradecimiento a Mery, Elisa, Adela, Rosi, Marina, Cristián, Reyes, Rafa, Alberto, Nidia, May, Puri, Juanjo, Juan Antonio, Ángela, Cristina, Lourdes, Alba,...

Por último, quiero hacer una mención especial a cuatro personitas que han sido mis pilares fundamentales entre las paredes del CEBAS. Valeria, gracias por acompañarme y apoyarme durante toda la tesis, tanto en los buenos como en los malos momentos, y gracias por tu sinceridad a veces dolorosa. Jose Manuel, gracias por aportar el toque de humor, la ironía y el buen rollo al grupo y gracias por comprenderme. Lidia, gracias por enseñarme una nueva forma de ver la vida y, por supuesto, por las incontables risas que nos hemos echado juntas; adoro tu risa malévola. Sara, gracias por enseñarme tanto y por ser tan sensata, dulce y comprensible, no podría haber tenido una mejor compañera de laboratorio que tú.

Por otro lado, no toda la tesis la realicé en España, sino que tuve la oportunidad de pasar tres meses en la bella Italia, en un sitio remoto en el norte de Italia llamado Piacenza. Allí el grupo del profesor de universidad Luigi Lucini me acogió con los brazos abiertos. "Grazie mille per la vostra gentilezza e per aver condiviso con me le vostre conoscenze Luigi, Pascual, Leilei, Vero, Gianmarco, Pier, Hajar, Marco, Bianca ed Elena". También quiero agradecer a Isa, Patri y Adriana por los bonitos recuerdos que me llevo de esos viajes juntas por todo el norte de Italia.

Por descontado, quiero agradecer a la familia que he elegido a lo largo de mi vida, a mis amigas y amigos, a los de siempre y a los nuevos. Gracias por hacerme sentir arropada durante toda la tesis, por vuestra preocupación y, por supuesto, por evadirme la mente de la tesis cada finde. No hay nada como una cerveza en buena compañía.

Pero, no podría haber llegado hasta aquí sin el apoyo incondicional de mi familia: mis abuelos, mis tíos, mis primos, Laura y la más reciente alegría, mi sobrino Bruno. En especial, agradezco profundamente a mis padres y a mi hermano. Víctor, gracias por ser uno de mis ejemplos a seguir desde pequeña, no pude elegir mejor. Mamá y papá, gracias por nunca frenar mis sueños, por apoyarme en cualquier decisión y por todo lo que habéis hecho para que yo esté donde estoy ahora mismo. No tengo palabras para agradecerlos lo suficiente.

Por último, la persona que más ha estado a mi lado estos años de tesis ha sido Antonio. No sé ni cómo puedo agradecerte todo lo que has hecho y haces por mi cada día. Gracias por ser mi principal oyente en los dramas de la tesis, por escuchar explicaciones de tecnicismos científicos y por comprenderme. También gracias por darme a conocer a tu maravillosa familia, que nos dan tanto cariño y unas comilonas deliciosas. Además, en esta última etapa de la tesis, hemos estado bajo el mismo techo tantísimas horas y ahí has estado, ya sea jugando al Elden Ring, trabajando o haciéndome la comida. En definitiva, gracias por ser esa persona que, sin importar lo que suceda, siempre consigue sacarme una sonrisa. ¡Equipo uva!

En definitiva, mi más profundo agradecimiento a todos vosotros. Gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	13
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	23
1. El tomate	23
1.1 Origen y domesticación	23
1.2 Taxonomía y descripción botánica	24
1.3 Distribución geográfica del cultivo y valor comercial	26
1.4 Valor nutricional	28
1.5 Planta modelo en el contexto de la investigación	29
2. Efecto del cambio climático	30
3. Estrés abióticos	31
3.1 Estrés por salinidad	32
3.2 Estrés por altas temperaturas	36
3.3 Estrés por déficit hídrico	41
3.4 Combinación de estrés	44
4. El ácido abscísico (ABA)	50
4.1 Biosíntesis de ABA	51
4.2 Mutantes deficientes de ABA	52
4.3 Catabolismo de ABA	54
4.4 Transporte de ABA	56
4.5 Percepción y cascada de señalización de ABA en plantas	58
4.6 Actividad biológica de ABA	60
4.7 Papel de ABA en la respuesta de las plantas al estrés abiótico	61
4.8 Interacción de ABA con otras fitohormonas en respuesta al estrés abiótico	62
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	73
MATERIALES Y MÉTODOS	79

1. Plantas de tomate	79
2. Cámaras de cultivo	80
3. Invernadero	80
4. Germinación de semillas	81
5. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom	83
5.1 Cultivo hidropónico en cámara de cultivo	83
5.2 Crecimiento y tratamientos en las plantas	84
5.3 Aplicación de ABA exógeno	85
6. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm	85
6.1 Cultivo en sustrato en el invernadero	85
6.2 Crecimiento y tratamientos en las plantas de tomate	87
6.3 Estación de crecimiento y muestreo de las plantas de tomate	87
7. Análisis de parámetros fisiológicos o fenómica	88
7.1 Medición de estomas mediante microscopía óptica	88
7.2 Parámetros fotosintéticos mediante el uso de LI-6800	89
7.3 Medición de otros parámetros biométricos	91
7.4 Análisis estadísticos	91
8. Molienda del material vegetal	91
8.1 Molienda del material vegetal congelado a -80 °C	91
8.2 Molienda de material vegetal secado en la estufa a 60 °C	92
9. Cuantificación de ácido abscísico	92
10. Análisis transcriptómico dirigido	93
10.1 Extracción de RNA	93
10.2 Comprobación de la cantidad y calidad del ARN extraído	93
10.3 Síntesis de ADN complementario	94
10.4 PCR cuantitativa a tiempo real o análisis transcriptómico dirigido	94
10.5 Cuantificación relativa del ARN mensajero: Método comparativo C _T	96
11. Análisis transcriptómico no dirigido	96
11.1 Extracción ARN	96
11.2 Comprobación de la cantidad y calidad del ARN extraído	97
11.3 Secuenciación de ARN o análisis transcriptómico no dirigido	97
11.4 Análisis de enriquecimiento con los datos de transcriptómica	98
12. Determinación de la concentración de componentes minerales en hojas y raíces	99
13. Análisis metabolómico no dirigido	100
13.1 Liofilización de las muestras vegetales	100

13.2	Extracción de metabolitos	100
13.3	Espectrómetro de masas	100
13.4	Interpretación y anotación de los compuestos	101
13.5	Análisis comparativo de los compuestos metabólicos	102
13.6	Estudio de enriquecimiento metabólico	103
13.7	Análisis semicuantitativo de fenoles en fruto	103
14.	Análisis de correlación entre los datos ionómicos y metabólicos	103
15.	Análisis multiómico	104
CAPÍTULO I		107
1.	Introducción	107
2.	Material y metodología específica	110
3.	Resultados y discusión	111
3.1	Fenotipo de los mutantes <i>flc</i> sin (<i>flc</i> -) y con (<i>flc</i> +) ABA exógeno	111
3.2	Expresión diferencial de genes de biosíntesis de ABA y su relación con la concentración endógena de esta hormona	115
3.3	Regulación de los transcritos obtenidos específicamente en mutantes <i>flc</i> - bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas	116
3.4	Metabolismo oxidativo, transcripción y transporte como rutas enriquecidas específicamente en mutantes <i>flc</i> - bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas	120
3.5	La transcripción y la ruta de biosíntesis de la serina/treonina quinasa como rutas enriquecidas e independientes de la señalización de ABA bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas	123
3.6	SIMYB50 y SIMYB86 como principales factores de transcripción en la señalización independiente de ABA bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas	125
4.	Conclusiones	131
CAPÍTULO II		135
1.	Introducción	135
2.	Material y metodología específica	136
3.	Resultados y discusión	137
3.1	Respuesta del tomate a la deficiencia de ABA bajo estrés abiótico simple o combinado: modelo <i>flc</i> -	138

3.2 Niveles suficientes de ABA en mutantes deficientes en ABA no restauran el metabolismo WT: modelo <i>flc+</i>	154
3.3 Validación de marcadores moleculares <i>flc-</i> y <i>flc+</i> mediante el modelo WT	164
4. Conclusiones	166
CAPÍTULO III	171
1. Introducción	171
2. Materiales y metodología específica	173
3. Resultados	174
3.1 Parámetros fisiológicos	174
3.2 Análisis ionómico	175
3.3 Análisis metabolómico	178
3.4 Análisis de correlación entre ionoma y metaboloma	185
4. Discusión	188
4.1 Respuesta al estrés específica del ionoma y el metaboloma en raíces de plantas deficientes de ABA	188
4.2 La aplicación de ABA no recupera los niveles iónicos y metabólicos en raíces de plantas ABA deficientes bajo condiciones de estrés simple o combinado	192
4.3 Acumulación o deficiencia de iones en la raíz asociados a la deficiencia de ABA y al perfil metabolómico	194
5. Conclusiones	195
CAPÍTULO IV	199
1. Introducción	199
2. Material y metodología específica	200
3. Resultados	201
3.1 Los niveles de ABA y la estación de crecimiento afectaron al grado de impacto de los estreses simples o combinados en el rendimiento de frutos de tomate	201
3.2 Efecto de los niveles de ABA, el estrés y la estación de crecimiento en el metabolismo del fruto del tomate	204
3.3 Efecto de los niveles de ABA, el estrés y la estación de crecimiento sobre el perfil de los compuestos fenólicos en frutos de tomate	210
4. Discusión	216

4.1 Efecto de la estación y el estrés en plantas de tomate silvestre cultivadas en invernadero	216
4.2 Efecto de la deficiencia de ABA en la respuesta de los frutos al estrés múltiple	219
5. Conclusiones	222
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>227</u>
<u>CONCLUSIONS</u>	<u>231</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>235</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>273</u>

ABREVIATURAS

ϕPSII	Rendimiento cuántico de la transferencia de electrones del PSII
ϕCO₂	Rendimiento cuántico de la asimilación de CO ₂ por la hoja ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$).
A	Tasa de asimilación de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
AAO	Abscísico aldehído oxidasa
ABA	Acido abscísico
ABA-GE	ABA- éster glucosílico
ABA2	ABA alcohol deshidrogenasa
ABRE	Elemento sensible al ABA
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHK	Histidin-quinasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AHs/Cs	Parámetro de Ball-Berry
AMOPLS-DA	Análisis discriminante ANOVA mínimos cuadrados parciales ortogonales multibloque
ANOVA	Análisis de la varianza
AO	Aldehído oxidasa
AQP	Acuaporinas
ARN	Ácido ribonucleico
AUX	Auxina
BR	Brasinoesteroide
C	Condiciones control
C2Sfc	Concentración superficial de CO ₂
CEBAS	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
ChIH / ABAR	Subunidad H del complejo magnesio-quelatasa del cloroplasto/ receptor de ABA
CHS	Chalcona sintasa
Ci/Ca	Intercelular CO ₂ / Ambiental CO ₂
Ci_Pa	Presión de CO ₂ intercelular
CK	Citoquinina
Co	Cofactor
CT	Ciclo umbral
CTleaf	Temperatura calculada de la hoja (°C)
DAI	Ión diferencialmente acumulado
DAM	Metabolito diferencialmente acumulado

DEG	Gen diferencialmente expresado
DF4R	Dihidroflavonol 4-reductasa
DPA	Ácido dihidrofaseico
E	Tasa de transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
EE	Error Estándar
ET	Etileno
ETR	Tasa de transporte de electrones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Fo'	Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
F3'H	Flavanona 3'-hidroxilasa
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FCA	Receptor proteico de control del tiempo de floración
FDR	Tasa de falsos positivos
<i>flc</i> o <i>flc-</i>	<i>flacca</i> , mutante deficiente en ABA sin aplicación exógena de ABA
<i>flc+</i>	<i>flc</i> con aplicación exógena de ABA
Fm'	Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz
FPKM	Fragments por cada millón de kilobases
Fs	Fluorescencia basal o fluorescencia en estado estable
FT	Factor de transcripción
Fv'	Fluorescencia variable en hojas iluminadas
Fv'/Fm'	Rendimiento intrínseco del PSII
GA	Giberelinas
GO	Ontología génica
Grx	Glutaredoxina
gs	Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
H	Estrés por altas temperaturas
H₂O_i	H ₂ O intercelular
HCA	Análisis de conglomerados jerárquico
HKT	Transportador de K ⁺ de alta afinidad
HSF	Proteínas de choque térmico
HSP	Factores de transcripción de choque térmico
Jas	Ácido jasmónico
KAT1	Canal de K ⁺ 1 en <i>Arabidopsis thaliana</i>

KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LEA	Proteínas de embriogénesis tardía
MOCOS	Sulfurasa del cofactor de molibdeno
NCED	9-cis-epoxi carotenoide dioxigenasa
NPF	Transportador de nitrato/transportador de péptidos
NR	Nitrato reductasa
NSY	Neoxantina sintasa
PA	Ácido faseico
PF	Peso fresco
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
	Familia de receptores resistencia a la pirabactina/ resistencia similar a la pirabactina/
PYR/PYL/RCAR	el componente regulador de los receptores ABA
qP	<i>Quenching</i> fotoquímico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSR	Relación de Estructura Residual
RSS	Suma Relativa de Cuadrados
S	Estrés salino
S+H	Combinación los estreses salinidad y altas temperaturas
S+WD	Combinación los estreses salinidad y déficit hídrico
SA	Ácido salicílico
SnRK	Quinasa serina/treonina relacionada con SNF1
sPLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales dispersos
tp	Contribución del bloque
VIP₂	Importancia Variable en la Proyección versión 2
VpdL	Déficit de presión de vapor en función de la temperatura de la hoja (kPa)
WD	Estrés por deficit hídrico
WT	Planta silvestre
XDH	Xantina deshidrogenasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa

RESUMEN

RESUMEN

La presente tesis doctoral aborda la complejidad de las respuestas de las plantas a múltiples estreses abióticos y destaca cómo las combinaciones de estos factores ambientales generan respuestas únicas que no pueden deducirse a partir del estudio de estreses individuales. Aunque se han caracterizado numerosos marcadores moleculares relacionados con la tolerancia de las plantas bajo condiciones de estrés simples, en el campo las plantas se suelen enfrentar a la combinación de múltiples factores de estrés. Por ello, muchos de estos marcadores identificados en estudios de estrés simple pueden no ser tan efectivos en cuanto al rendimiento y la adaptación de estas plantas a condiciones de campo. En este contexto, el ácido abscísico (ABA) actúa como un regulador clave en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Sin embargo, las respuestas que las plantas generan frente al estrés pueden ser tanto dependientes como independientes del ABA. En este trabajo nos focalizamos en entender ambas respuestas, ya que este conocimiento es necesario para la identificación de marcadores directamente implicados en la adaptación de las plantas a situaciones complejas como el cambio climático.

En primera instancia, en el **Capítulo I**, se utilizaron las hojas del mutante de tomate deficiente en ABA, *flacca (flc)*, para evaluar la respuesta de las plantas a salinidad, altas temperaturas y su combinación. Un análisis profundo del transcriptoma reveló que la combinación de salinidad y altas temperaturas induce una reprogramación significativa de la expresión génica, destacándose que, de los 685 genes regulados específicamente bajo esta combinación, 463 lo fueron a través de mecanismos independientes de ABA. Entre estos genes, se identificaron varios factores de transcripción pertenecientes a la familia R2R3-MYB y directamente relacionados con la biosíntesis de flavonoles, sugiriendo su papel en la adaptación de las plantas a estreses combinados. Estos hallazgos proporcionan una nueva perspectiva sobre los componentes moleculares de las respuestas independientes de ABA y su potencial para incrementar la tolerancia de las plantas a condiciones ambientales complejas.

Por otra parte, en el **Capítulo II** se demuestra cómo los análisis multiómicos realizados en las hojas de mutantes *flc* bajo las mismas condiciones estresantes daban

lugar a cambios significativos en la fenómica (biomasa y fotosíntesis), la ionómica, la metabolómica y la transcriptómica y permitió la identificación de marcadores exclusivos de cada condición de estrés que no se detectaron cuando cada ómica fue estudiada por separado.

Además, en el **Capítulo III** se estudiaron como las raíces de los mutantes *flc* respondían a condiciones control, salinidad, altas temperatura y salinidad + altas temperaturas a nivel ionómico y metabolómico y se demostró que el ABA juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis iónica y el metabolismo de compuestos secundarios, como los fenilpropanoides y los terpenoides. Asimismo, se observó que la combinación de salinidad y altas temperaturas intensificaba la vulnerabilidad de los mutantes *flc*, con alteraciones significativas en la acumulación de iones y metabolitos que no se presentaron en las plantas sometidas a estreses simples. Esto resalta la complejidad de la respuesta de las plantas a estreses simultáneos y la importancia de ABA en la modulación de estas respuestas.

Paralelamente se realizó un estudio para evaluar si la aplicación exógena de ABA a mutantes *flc* producía su recuperación a nivel fenotípico y molecular (transcritos, metabolitos e iones). Nuestros resultados demostraron que estos mutantes no recuperaban por completo el fenotipo silvestre, pero sí desencadenó una reprogramación celular específica a nivel transcriptómico, metabólico e iónico.

Por último, en el **Capítulo IV** exploramos cómo el ABA regula la respuesta de plantas de tomate (variedad comercial Rheinlands Ruhm) a estreses abióticos (salinidad, déficit hídrico y su combinación) en condiciones de campo y en distintas estaciones (otoño-invierno y primavera-verano). Se evaluó el rendimiento y el metabolismo de frutos de tomate en plantas silvestres y en los mutantes *flc*. Los resultados mostraron que las respuestas metabólicas variaron según la estación y el estrés aplicado. Por ejemplo, solo el incremento de antocianinas y flavonoles estuvo asociado a la combinación de estreses en ambas estaciones en plantas silvestres. Además, la deficiencia de ABA provocó cambios significativos en la síntesis de compuestos fenólicos. En resumen, estudiamos las respuestas de la interacción multifactorial entre el ABA, las condiciones ambientales y el metabolismo de la planta.

En conjunto, esta tesis doctoral resalta la importancia de considerar múltiples factores de estrés en la investigación de la biología vegetal, destacando la necesidad de identificar marcadores específicos y rutas de señalización dependientes e independientes de ABA para mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones climáticas adversas. Los resultados obtenidos proporcionan nuevas herramientas para la selección y desarrollo de cultivos más resilientes que puedan adaptarse a los desafíos derivados del cambio climático, asegurando la sostenibilidad agrícola y la seguridad alimentaria en escenarios futuros.

SUMMARY

SUMMARY

This PhD thesis addresses the complexity of plant responses to multiple abiotic stresses and highlights how combinations of these environmental factors generate unique responses that cannot be deduced from the study of single stresses. Although numerous molecular markers related to plant tolerance under single stress conditions have been characterised, in the field plants are often exposed to a combination of stresses in the field. Therefore, many of these markers identified in single stress studies may not be as effective in terms of yield and adaptation of these plants to field conditions. In this context, abscisic acid (ABA) acts as a key regulator of plant responses to abiotic stress. However, plant stress responses can be both ABA-dependent and ABA-independent. In this work we focus on understanding both responses, as this knowledge is necessary for the identification of markers directly involved in plant adaptation to complex situations such as climate change.

In the first instance, in **Chapter I**, leaves of the ABA-deficient tomato mutant *flacca* (*flc*) were used to study the response of plants to salinity, heat and their combination. An in-depth transcriptome analysis revealed that the combination of salinity and heat induced a significant reprogramming of gene expression, and of the 685 genes specifically regulated under this combination, 463 were regulated by ABA-independent mechanisms. Among these genes, several transcription factors belonging to the R2R3-MYB family directly related to flavonol biosynthesis were identified, suggesting their role in plant adaptation to combined stresses. These findings provide new insight into the molecular components of ABA-independent responses and their potential to enhance plant tolerance to complex environmental conditions.

Moreover, **Chapter II** demonstrates how multi-omics analyses performed on *flc* mutant leaves under the same stress conditions resulted in significant changes in phenomics (biomass and photosynthesis), ionomics, metabolomics and transcriptomics, and allowed the identification of markers unique to each stress condition that were not detected when each omics was studied separately.

In addition, **Chapter III** studied how the roots of *flc* mutants responded to control conditions, salinity, heat and salinity + heat at the ionic and metabolomic levels and showed that ABA plays a fundamental role in the regulation of ion homeostasis and the metabolism of secondary compounds, such as phenylpropanoids and terpenoids. It was also observed that the combination of salinity and heat intensified the vulnerability of *flc* mutants, with significant changes in ion and metabolite accumulation that were not present in plants subjected to single stresses. This highlights the complexity of plant responses to simultaneous stresses and the importance of ABA in modulating these responses.

In parallel, a study was carried out to determine whether the exogenous application of ABA to *flc* mutants would lead to their recovery at the phenotypic and molecular level (transcripts, metabolites and ions). Our results showed that these mutants did not fully recover the wild-type phenotype, but did trigger specific cellular reprogramming at the transcriptomic, metabolic and ionic levels.

Finally, in **Chapter IV** we explored, under field conditions and using a commercial variety (Rheinlands Ruhm), how ABA regulates the response of tomato plants to abiotic stresses (salinity, water deficit and their combination) in different seasons (autumn-winter and spring-summer). Tomato yield and fruit metabolism were evaluated in wild-type and *flc* mutants. The results showed that metabolic responses varied according to season and stress applied. For example, only the increase in anthocyanins and flavonols was associated with the combination of stresses in both seasons in wild-type plants. In addition, ABA deficiency caused significant changes in the synthesis of phenolic compounds. In conclusion, we investigated the multifactorial interactions between ABA, environmental conditions and plant metabolism.

Overall, this PhD thesis emphasises the importance of considering multiple stressors in plant biology research and highlights the need to identify specific markers and ABA-dependent and ABA-independent signalling pathways to improve plant tolerance to adverse climatic conditions. The results obtained will provide new tools for the selection and development of more resilient crops that can adapt to the challenges arising from climate change, ensuring agricultural sustainability and food security in future scenarios.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El tomate

1.1 Origen y domesticación

Las evidencias demuestran que la especie *Solanum lycopersicum* diverge de su pariente más cercano *Solanum pimpinellifolium*, el progenitor silvestre de tomate cultivado que produce grandes cantidades de frutos rojos, redondos y muy pequeños. De *S. pimpinellifolium* se originó en Ecuador o Perú la variedad cerasiforme de *Solanum lycopersicum* también caracterizada por una gran cantidad de frutos redondos y pequeños. A su vez, de ella se obtuvo el tomate domesticado que conocemos actualmente *Solanum lycopersicum* variedad *lycopersicum* (Ranc et al. 2008; Klee and Resende 2020). La domesticación de la planta de tomate aún presenta cierta incertidumbre. Sin embargo, Raxifard *et al.* (2020) con el uso de la secuenciación del ácido desoxirribonucleico o ADN, llegaron a la conclusión de que *S. lycopersicum* variedad cerasiforme surgió como especie en Ecuador y que probablemente se propagó hasta México como maleza. Ya en México, hace siete mil años, la selección humana dio lugar a los que hoy conocemos como tomate domesticado *S. lycopersicum* variedad *lycopersicum* (Raxifard et al. 2020). Curiosamente, Jenkins *et al.* en 1948 llegaron prácticamente a la misma conclusión, a pesar de no tener la tecnología que tenemos actualmente (Jenkins 1948).

La llegada del tomate domesticado a Europa aún conduce a la comunidad científica a discrepancia. Sin embargo, los datos analizados en Blanca *et al.* (2012) indican que en el siglo XVI los españoles llevaron plantas de Mesoamérica a España y desde allí se exportaron al resto del mundo (Blanca et al. 2012). Desde entonces, la variabilidad en los frutos del tomate es inmensa, abarcando una gama de colores que va desde amarillos hasta rojos y morados, además de presentar una diversidad significativa en tamaños y formas (**Imagen 1**).

1.2 Taxonomía y descripción botánica

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie de planta perteneciente a la familia de las solanáceas. La familia *Solanaceae* es una de las principales familias de angiospermas por su importancia económica, amplia distribución y por ser una principal fuente de alimento. Incluye aproximadamente 100 géneros y 2500 especies, entre ellas, especies comestibles como la berenjena, la patata, el pimiento; especies tóxicas como el tabaco o las uvas del diablo; y especies de plantas decorativas como la petunia o la trompeta de ángel (Motti 2021). Concretamente, la clasificación taxonómica del tomate es: clase *Dicotyledoneas*, orden *Solanales/Personatae*, familia *Solanaceae*, subfamilia *Solanoideae*, género *Solanum* y especie *Lycopersicum*. Asimismo, la variabilidad en el color, la forma y el tamaño de *S. lycopersicum* es inmensa, según la *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2022) se estiman unas 10000 variedades diferentes (**Imagen 1**).



Imagen 1. Muestra de la diversidad global en la forma, color y tamaño de los tomates. Imagen adquirida en “Southern Living”.

El tomate es una planta dicotiledónea de porte arbustivo, perenne, cultivo generalmente anual, con frutos recolectados principalmente en verano. Esta planta se puede clasificar según su crecimiento: determinado o indeterminado. Las plantas de crecimiento determinado se caracterizan por tener tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas y terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado y, además, no se entutoran. Sin embargo, las plantas de crecimiento indeterminado son las más comunes y se caracterizan por la presencia en los tallos de segmentos uniformes con tres hojas y una inflorescencia, acabando con un ápice vegetativo y, debido a su crecimiento “ilimitado”, necesitan ser entutoradas. Los tallos tienen un diámetro de 2-4 cm, son de color verde, gruesos y están recubiertos por pelos glandulares y no glandulares. El sistema radicular se compone de una raíz principal de la que emergen las raíces secundarias y, también, presenta raíces adventicias. Las hojas son anchas y están compuestas por folíolos parcialmente lobulados con un borde dentado. La inflorescencia se compone de 4-12 flores que se caracterizan por ser hermafroditas, simétricas, e hipóginas. La flor contiene una corola de 5 pétalos amarillos y lanceolados, sépalos de menor tamaño que los pétalos, 5 estambres, un pistilo con carpelos dispuesto de forma oblicua y compuesto por un ovario bilocular o plurilocular. Por otro lado, el fruto es una baya generalmente roja y con forma esférica, aunque no se puede generalizar con una única forma, tamaño y color, ya que el tomate es uno de los frutos más diversos debido a su extensa domesticación. Del fruto si se puede fijar que presenta una placenta espesa y numerosas semillas de forma discoidal-lenticular con un embrión enrollado, todas ellas cubiertas por una sustancia mucilaginosa. Además, éste se une a la planta a través de un pedicelo engrosado y articulado que contiene la zona de abscisión (**Imagen 2**) (Chamarro 1995; Knapp and Peralta 2016).



Imagen 2. Hoja, flores y ramillete de tomates de una planta *Solanum lycopersicum* variedad Rheinlands Ruhm.

1.3 Distribución geográfica del cultivo y valor comercial

El tomate es una de las frutas más cultivadas y consumidas a nivel mundial. Según la FAO (2024) el cultivo de tomate es de gran importancia y cada vez aumenta más su producción a nivel global. En 2012 la FAO registró más de 163 millones de toneladas de tomate y en el último registro realizado en 2022 se contabilizó la producción de más de 186 millones de toneladas de tomate. El principal productor de tomate, por un amplio margen, es China continental, ya que solo en 2022 produjo más de 68 millones de toneladas de tomate fresco, lo que refleja aproximadamente el 36,7% de la producción mundial. A China continental le siguen con aproximadamente 20, 13 y 10 millones de toneladas los países India, Turquía y Estados Unidos, respectivamente. Además, dentro de los 10 principales países productores en 2022 encontramos en orden descendente Egipto, Italia, México, Brasil, Nigeria y España (**Figura 1**). Por tanto, entre los países en territorio europeo, España se posiciona el tercero después de Turquía e Italia, demostrando la importancia del territorio español a nivel europeo y, en menor medida, a nivel mundial. Además, en España según la FAO (2024) en el año 2022 los productos agrícolas más producidos fueron en orden descendente: cebada, trigo, uvas, aceitunas u olivas, tomates, maíz y naranjas, por tanto, los tomates son el quinto producto agrícola más producido.

Producción de tomates a nivel mundial (2022)

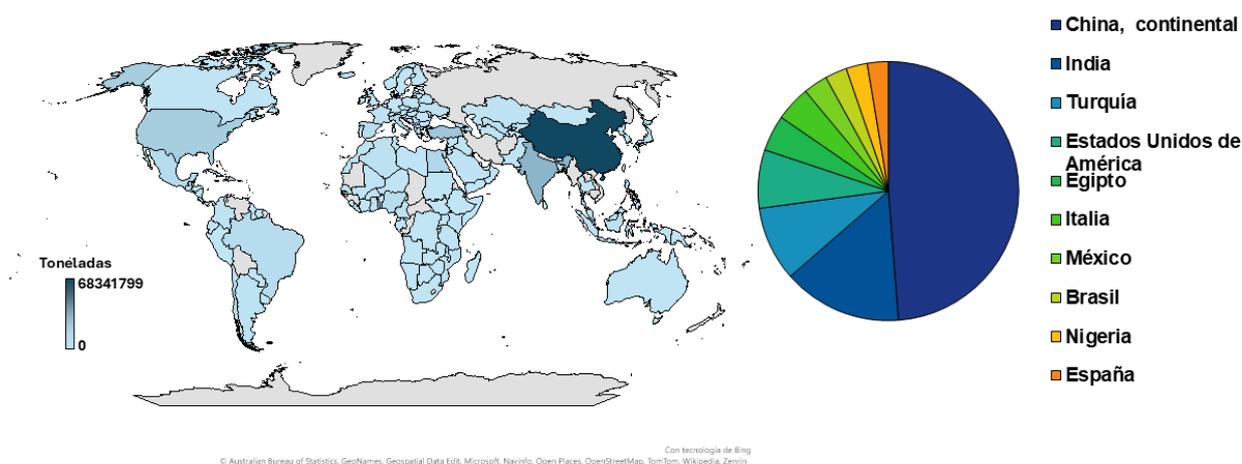


Figura 1. Mapa del mundo y gráfico circular sobre la producción de tomates según la FAO (2024) en 2022. El gráfico circular solo muestra los 10 primeros países productores de tomate.

Por otro lado, la exportación del producto nacional es de relevancia económica para muchos países. La FAO clasifica la exportación de tomate en cuatro categorías distintas: tomate fresco, pasta de tomate, jugo de tomate y tomate pelado (excepto en vinagre). Teniendo en cuenta los cuatro grupos en conjunto, los 5 principales países exportadores en 2022 fueron en orden descendiente: Italia, México, China, España y Países Bajos. Por otra parte, según la FAO los 5 países con mayor beneficio monetario debido a la exportación de los cuatro grupos de productos de tomate en 2022 fueron en orden decreciente Italia, México, Países Bajos, España y China. Más específicamente, España en 2022 exportó en total 1196734,55 toneladas y, con ello, ganó 1770072 mil dólares de los Estados Unidos (1000US\$). Además, España fue el país que más exportó jugo de tomate (24570,28 toneladas) y, a su vez, el que más beneficio económico (21583 1000US\$) consiguió de esa exportación.

Considerando el producto del tomate solo en territorio español, no todas las comunidades autónomas y provincias lo producen en las mismas cantidades (**Figura 2**). Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2024) la producción de tomate en 2021 de entre las 17 comunidades autónomas, fue principalmente en Extremadura y Andalucía, produciendo aproximadamente 2,2 y 1,7 millones de toneladas, respectivamente. Por tanto, el 46,8% y el 36% de la producción española

perteneció a estas dos comunidades, respectivamente. En Extremadura la mayor producción en 2021 fue en la provincia de Badajoz y en Andalucía fue en la provincia de Almería. La comunidades autónomas Murcia y Navarra les siguieron con una producción de 221 y 180 mil toneladas de tomate, respectivamente. En definitiva, en España resulta crucial investigar sobre la mejora del rendimiento en el cultivo de tomate debido a la importancia y contribución de este producto a nuestra economía.

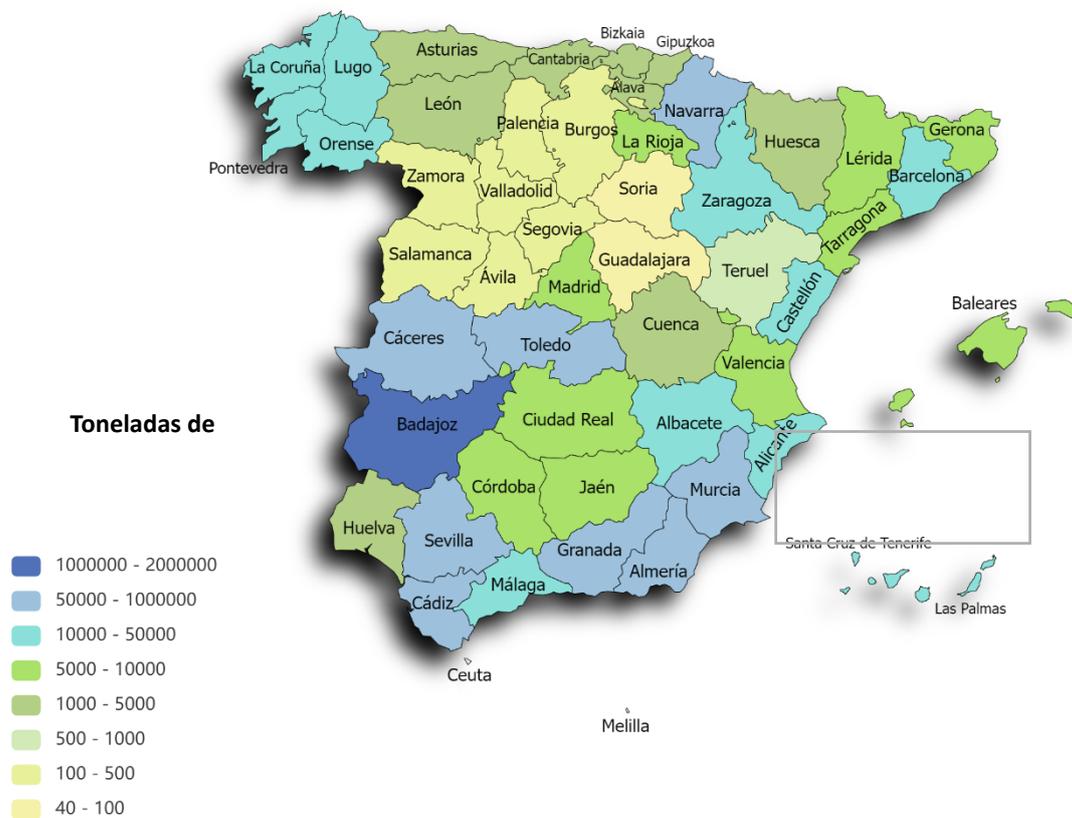


Figura 2. Producción de tomates en el territorio español según el MAPA (2024) en 2021. Figura creada con “paintmaps”.

1.4 Valor nutricional

Desde el punto de vista nutricional y agronómico, es fundamental comprender los metabolitos predominantes en los productos vegetales. En el tomate los compuestos principales son fibras, azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y minerales. Los azúcares (glucosa y fructosa) y los ácidos orgánicos (cítrico y málico) son los que principalmente

influyen en el sabor. El contenido de aminoácidos, lípidos y minerales es muy bajo, por lo que son considerados poco relevantes en este fruto. Asimismo, el tomate contiene compuestos con propiedades antioxidantes como flavonoides, fenilpropanoides, carotenoides, tocoferoles y vitamina C, todos ellos beneficiosos para la salud. El tomate es muy rico en carotenoides, entre los que destacan el licopeno y el β -caroteno. No obstante, aún queda mucho por investigar, ya que varios miles de otros metabolitos secundarios aún no han sido identificados (de Vos et al. 2011; García-Valverde et al. 2013; García-Caparrós et al. 2019).

Cabe destacar que el cambio climático global ha exacerbado problemas como la escasez de agua, la salinidad y las altas temperaturas, lo que altera de manera importante la composición nutricional de los tomates. Se ha observado que en condiciones de estrés abiótico se induce la acumulación de metabolitos secundarios, como ácidos fenólicos y antocianinas, aumentando así el efecto antioxidante beneficioso para la salud humana (Kishor et al. 2023). Por ejemplo, Abdel-Farid *et al.* (2020) encontraron que los niveles de fenoles y flavonoides aumentan en respuesta a la salinidad en plantas de tomate y pepino (Abdel-Farid et al. 2020). Por lo tanto, es evidente la importancia de controlar las condiciones ambientales del cultivo, e incluso la incorporación de estreses controlados podría servir como estrategia agronómica eficaz para incrementar la cantidad de compuestos antioxidantes en los frutos.

1.5 Planta modelo en el contexto de la investigación

Aunque *Arabidopsis thaliana* es la planta modelo más utilizada, la planta de tomate también desempeña un papel crucial en la investigación. Además del valor nutricional y económico, *Solanum lycopersicum* L. es una de las especies que ha permitido obtener grandes avances en genética y mejora, llegando a ser un formidable modelo en investigación básica y aplicada. La planta de tomate, además de por su valor agronómico, fue seleccionada debido a características como su ciclo de vida relativamente corto, sus hojas compuestas, sus frutos climatéricos carnosos de tipo baya y su facilidad para ser transformada genéticamente (Anwar et al. 2019b; Xia et al. 2021).

En esta tesis se han utilizado dos variedades de tomate: Micro-Tom y Rheinlands Ruhm. La variedad de Micro-Tom se obtuvo del cruzamiento de las variedades Florida

Basket y Ohio 4013-3 (Scott and Harbaugh 1989) y se ha empleado ampliamente como modelo de estudio debido a su pequeño tamaño, crecimiento rápido, ciclo de vida corto, fácil de transformar genéticamente y alta producción de frutos pequeños. Por otra parte, se utilizó la variedad Rheinlands Ruhm como representante de la plantas comerciales, ya que ésta presenta un desarrollo, tamaño y producción de tomates similar a otras variedades de tomate comerciales.

2. Efecto del cambio climático

En el transcurso de la historia nuestro planeta ha experimentado cambios ambientales graduales o abruptos debido principalmente a causas naturales. Sin embargo, en la actualidad el principal causante del cambio climático es el ser humano. El cambio climático actual consiste en el aumento de la temperatura global causado por el efecto invernadero, siendo el efecto invernadero el fenómeno por el que la radiación térmica emitida por la superficie del planeta es absorbida por los gases de efecto invernadero y, a su vez, irradiada en todas direcciones. Además del calentamiento global, el cambio climático también está relacionado con fenómenos meteorológicos de gran intensidad e impredecibilidad que nos afectan a todos los seres vivos. Este cambio climático causado por el humano se planteó desde la antigüedad clásica griega y romana, pero no fue hasta el siglo XIX cuando los científicos argumentaron que las emisiones del efecto invernadero causadas por los humanos podrían estar cambiando nuestro clima (Neumann 1985; Archer 2016; Croll 2023). Por todo ello, desde 1995 la Conferencia de las Partes (COP) se convirtió en la cumbre anual que realiza la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) donde se reúnen los países integrantes para discutir y negociar las medidas para la estabilización de la emisión de gases de efecto invernadero y abordar la interferencia antropogénica considerada como peligrosa para el sistema climático.

El cambio climático intensifica el efecto de los estreses ambientales a través de la mayor frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos extremos (sequías, inundaciones, incendios forestales, olas de calor y olas de frío) y a través del fomento de la propagación de plagas y patógenos. Los efectos de estos factores se traducen en grandes pérdidas ganaderas, agrícolas y, en definitiva, económicas. A esto se le suma un

aumento exponencial de la población humana, estimándose un aumento de casi 2000 millones de personas para los próximos 28 años, pasando de 8000 millones en 2022 a 9700 millones de personas en 2050 (Naciones Unidas, 2022). La suma de la sobrepoblación a la problemática ambiental compromete seriamente a la producción ganadera y agrícola en los próximos años y, por tanto, intensifica el aumento de la hambruna (FAO, 2022).

Esta amenaza a la seguridad alimentaria y nutricional mundial ha hecho que muchos países presenten propuestas de mitigación y adaptación al cambio climático. Entre los objetivos encontramos el desarrollo de una agricultura sostenible, la generación de cultivos con mayor tolerancia a los estreses ambientales o más productivos, la adopción de nuevas tecnologías (como el uso de las ómicas o los inoculantes microbianos) y la colaboración entre equipos interdisciplinarios (Benitez-Alfonso et al. 2023). Además, aún es necesario el perfeccionamiento de las metodologías actuales y la búsqueda de nuevas mejoras genéticas que nos permitan conseguir un aumento de la tolerancia de las plantas a estreses tanto abióticos como bióticos y un mayor rendimiento agrícola.

3. Estreses abióticos

Las plantas estresadas son aquellas que están sometidas a unas condiciones diferentes a las óptimas para la vida, lo que impacta negativamente en su desarrollo. Los estreses en plantas pueden dividirse en estreses bióticos o estreses causados por seres vivos o virus y en estreses abióticos o estreses causados por factores químicos o físicos (Bieto et al. 2008). Los estreses abióticos han sido ampliamente estudiados debido a que provocan importantes limitaciones en el crecimiento y la productividad de las plantas y, por tanto, causan grandes pérdidas económicas. Las plantas responden a estos estreses de una forma compleja y dependiente del tipo o los tipos de estreses a los que estén sometidas. Estos cambios se reflejan directamente en la expresión de genes, en la actividad de proteínas y en la síntesis y acumulación de metabolitos, todos ellos importantes para incrementar la tolerancia al estrés o estreses reinantes en el momento. En este sentido, la biología de sistemas intenta identificar núcleos reguladores en redes complejas de transcritos, proteínas y metabolitos de un organismo e intenta predecir las respuestas dinámicas del organismo en diferentes entornos (Cramer et al. 2011).

Además, en los últimos años el uso de la integración de conjuntos de datos ómicos está permitiendo la identificación de muchas dianas moleculares relacionadas con la respuesta de las plantas a los estreses específicos (Debnath et al. 2011). Por último, debido a la especificidad de la respuesta de las plantas al estrés simple o al estrés combinado es necesario el estudio de todos ellos por separado.

3.1 Estrés por salinidad

Según la FAO, en 2021 más de 833 millones de hectáreas de suelo estaban afectadas por la salinidad y, además, estimaron que más del 10% de los cultivos se vieron afectados por la salinidad, por tanto, esto representa un sustancial riesgo para la seguridad alimentaria mundial. Las regiones más afectadas son Asia central, Oriente Medio, América del Sur, África del Norte y el Pacífico. Igualmente, la salinidad en España es considerada un problema de gran importancia, especialmente en el Sur de España, donde los cultivos son más abundantes y las precipitaciones más escasas (Castañeda et al. 2020).

3.1.1 Efecto del estrés salino en las plantas

Las plantas adquieren del suelo las sales minerales necesarias para su crecimiento, sin embargo, las altas concentraciones de sales en el suelo producen efectos perjudiciales a las plantas, por ejemplo, la salinización por NaCl. La salinización del suelo puede ser de dos tipos: primaria o secundaria. La salinización primaria está asociada a las condiciones climáticas y geológicas que suceden de forma natural, mientras que, la salinización secundaria es antropogénica, por ejemplo, la inducida por una irrigación inadecuada o por una mala calidad del agua de riego (Allbed and Kumar 2013). Además, el efecto que produce la salinidad en las plantas depende de muchos factores: la concentración de sal en el suelo, la etapa de desarrollo de la planta, la especie de la planta y otros factores ambientales que produzcan un efecto combinado con esta salinidad, por ejemplo, la sequía o las altas temperaturas ambientales (Munns and Tester 2008; Rivero et al. 2014).

Las plantas obtienen el agua a partir de sus raíces cuando su potencial hídrico es menor que el del suelo donde crecen. Sin embargo, cuando hay un exceso de sales solubles en el suelo se reduce el potencial hídrico del suelo y, por tanto, disminuye la

absorción de agua a través de las raíces. Por ende, el estrés salino provoca déficit hídrico o estrés osmótico a las plantas (Kirkham et al. 1969). A su vez, el estrés osmótico reduce la turgencia celular, afecta al uso eficiente del agua, induce el cierre estomático, reduce la tasa fotosintética, altera la síntesis de proteínas y la actividad enzimática y aumenta el daño oxidativo producido por acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Thiel et al. 1988; Liao et al. 2024).

Por otro lado, la salinidad del suelo también provoca un estrés iónico en las plantas, normalmente por la absorción y acumulación excesiva en las células vegetales de iones como Cl^- y Na^+ (Zhou et al. 2024). Los canales de cationes no selectivos (NSCC), el transportador de K^+ de alta afinidad (HKT), el transportador de K^+ de baja afinidad AKT1, la conductancia no selectiva de rectificación hacia el exterior (NORC) y el canal independiente de voltaje participan en el transporte de Na^+ a través de la membrana plasmática, produciendo una rápida acumulación de Na^+ en el citosol de las células vegetales de las plantas crecidas bajo estrés salino (Blumwald 2000; Demidchik and Tester 2002; Pottosin and Dobrovinskaya 2014; Su et al. 2015). Debido a que el Na^+ y el K^+ comparten muchos de los sistemas de transporte conocidos en plantas, el transporte de K^+ hacia el interior de la planta se ve disminuido por competencia con el Na^+ , dando lugar a la deficiencia de K^+ en plantas estresadas por salinidad. A causa de su importancia como macronutriente en la planta, la deficiencia de K^+ da lugar a alteraciones en el desarrollo de la planta (Pardo and Rubio 2011). El estrés salino también induce una rápida acumulación de Ca^{2+} citosólico en raíces, un catión que actúa como segundo mensajero en numerosos sistemas biológicos (Knight et al. 1997; Manishankar et al. 2018). Por otra parte, la acumulación excesiva del anión Cl^- podría producir toxicidad en algunos órganos sensibles a este anión (E et al. 2011; Shelke et al. 2019). Sin embargo, en los últimos años, el Cl^- ha pasado de ser considerado un ion nocivo a un micronutriente beneficioso, crucial para crecimiento de las plantas y la eficiencia en el uso del agua y del nitrógeno en las plantas. En este sentido, algunos autores han apuntado que el Cl^- , al contrario de perjudicar la nutrición de NO_3^- , facilita la utilización de NO_3^- y mejora la eficiencia del uso del nitrógeno en las plantas (Colmenero-Flores et al. 2019; Rosales et al. 2020).

Por último, la salinización de los suelos da lugar a una sobreproducción de ROS en las plantas causado por la fuga de electrones de la cadena de transferencia electrónica o por el aumento de la fotorrespiración (García-Caparrós et al. 2019). En primera instancia, las ROS y las RNS intervienen y son fundamentales en los procesos de transducción de señales durante la respuesta de la planta al estrés. Sin embargo, una acumulación excesiva de ROS y RNS inducida por un estrés intenso y/o duradero conlleva a un gran daño e incluso a la muerte celular (Turkan 2018; Mittler et al. 2022).

3.1.2 Mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés salino

Las plantas responden a la salinización del suelo o sustrato de crecimiento mediante cambios a nivel molecular, metabólico y fisiológico que dan lugar a alteraciones en su morfología, transcripción génica, síntesis y degradación de proteínas, metabolitos y lípidos.

Las plantas se defienden contra el estrés osmótico reduciendo las pérdidas de agua a partir de la inhibición de la transpiración estomática y residual o cuticular y la reducción del número de estomas (Hasanuzzaman et al. 2017; Dourado et al. 2022). Entre las hormonas vegetales implicadas en la regulación de la apertura estomática encontramos el ácido abscísico (ABA) (MacRobbie et al. 1997), fitohormona que desarrollaremos en el apartado 4 de esta Introducción. Los canales proteicos denominados acuaporinas (AQP) también desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del agua celular. Además, se ha observado que las plantas sometidas a estreses osmóticos producidos por salinidad o desregulaciones hídricas (inundaciones o déficits hídricos) incrementan la expresión de los genes codificadores de AQPs (Martínez-Ballesta et al. 2003). También bajo estrés osmótico la plantas responde aumentando la síntesis de proteínas como las proteínas de embriogénesis tardía (LEA), enzimas involucradas en la eliminación de ROS y en la síntesis de factores de transcripción (FTs) específicos (Muñoz-Mayor et al. 2012; Li et al. 2020a; Liu et al. 2023b). Por otro lado, las plantas aumentan la producción de osmoprotectores, ya que su acumulación permite la disminución del potencial osmótico celular sin interferir en el metabolismo celular y, por tanto, facilitan el movimiento del agua hacia el interior de las células radiculares. Los osmoprotectores ampliamente conocidos son los aminoácidos (p.ej. prolina), los compuestos de amonio cuaternario (p.

ej. betalaínas), los azúcares (p.ej. trehalosa o manitol) y algunos iones como el K^+ (Zulfiqar et al. 2019).

En cuanto al desequilibrio iónico causado por la salinidad, las plantas también han desarrollado varias estrategias para solucionar o, al menos, mitigar los daños que éstos puedan causar a las células. El más común es la regulación de la homeostasis iónica a través de transportadores de membrana con el fin de evitar la concentración de niveles Na^+ tóxicos en el citoplasma. La exclusión de Na^+ , basada en la baja permeabilidad de los iones salinos en la raíz, en el antiporte Na^+/H^+ por la H^+ -ATPasa de membrana que produce la salida de Na^+ desde el citoplasma al medio externo y, también, en su almacenamiento en vacuolas (Munns and Tester 2008). Los transportadores principales pertenecen a las familias: HKT, NHX (transportador Na^+/H^+) y SOS (*Salt Overly Sensitive*) (Munns and Tester 2008; Fu et al. 2018). Otra estrategia consiste en la acumulación de iones Na^+ en los tejidos de la parte aérea (Albaladejo et al. 2017).

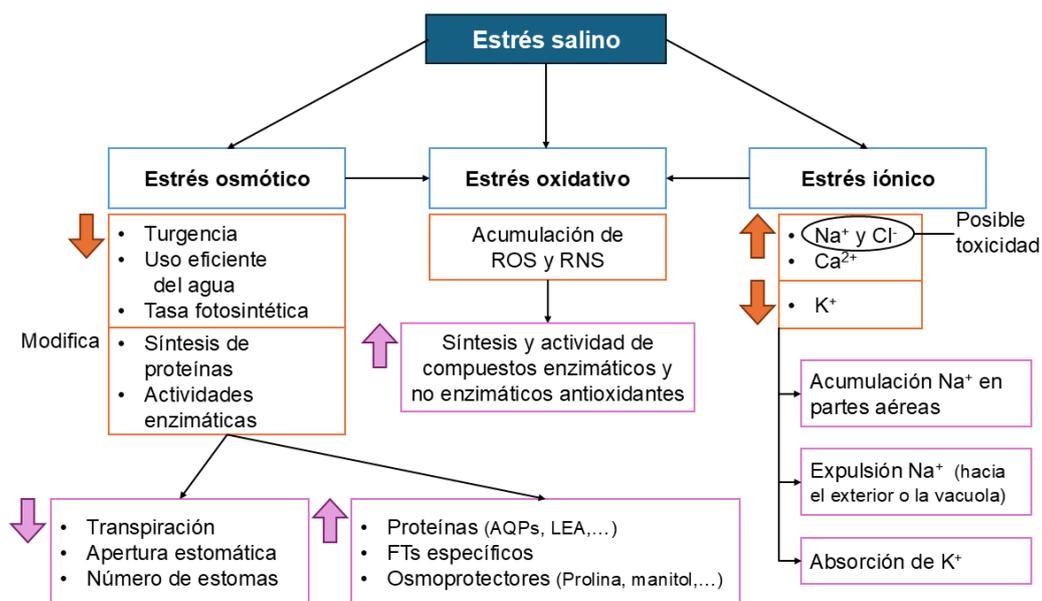


Figura 3. Efectos y mecanismos de tolerancia de las plantas frente al estrés salino. El recuadro azul representa los efectos generales, el naranja los efectos más específicos y el morado los mecanismos de tolerancia. ROS: especies reactivas de oxígeno, RNS: especies reactivas de nitrógeno, AQPs: acuaporinas, LEA: proteínas de embriogénesis tardía, FTs: factores de transcripción, HKT: transportador de alta afinidad a K^+ , NHX: transportador de Na^+/H^+ , SOS: *Salt Overly Sensitive*, HAK/KUP/KT: transportadores de K^+ de alta afinidad/permeasas de captación de K^+ /transportadores de K^+ , canal volt. dep.: canal de K^+ dependiente del voltaje.

Además, como ya comentamos anteriormente la salinidad da lugar a una disminución de las concentraciones de K^+ en la planta y, por tanto, un efecto negativo debido a su deficiencia. Las plantas responden a esta deficiencia absorbiendo K^+ con el uso de los transportadores de K^+ de alta afinidad/permeasas de captación de K^+ /transportadores de K^+ (HAK/KUP/KT) y canales de K^+ dependientes de voltaje, siendo la importancia de cada uno de los transportadores anteriores dependiente de la especie (Nieves-Cordones et al. 2016; Ródenas et al. 2021; Zhu et al. 2023). Por último, en respuesta al estrés salino se produce un aumento en la síntesis y actividad de diversas enzimas antioxidantes, así como de compuestos antioxidantes no enzimáticos, como el ácido ascórbico, el glutatión reducido, carotenoides, flavonoides y α -tocoferol, que ayudan a mitigar el estrés oxidativo (García-Caparrós et al. 2019). En la **Figura 3** se resumen los efectos y los mecanismos de tolerancia que desencadena el estrés salino en las plantas.

3.2 Estrés por altas temperaturas

La temperatura global ha aumentado a lo largo de los años y no se prevé que esta tendencia se detenga a menos que todos los países cumplan los objetivos propuestos por el Panel Internacional del Cambio Climático (IPCC, 2024). El verano 2023 ha sido el más caluroso para la Tierra desde que se iniciaron los registros mundiales de temperatura en 1880 (Instituto Goddard de Estudios Espaciales de la NASA en Nueva York, 2023). Este aumento ha hecho que se registren numerosas olas de calor con temperaturas extremas, lo que incrementa los índices de mortalidad, reduce drásticamente la productividad en ganadería y en agricultura y, además, reduce la capacidad de los ecosistemas de ofrecer bienes y servicios, como el agua limpia (Comisión Europea, 2024). Actualmente se están observando cambios en la distribución de la geografía climática debido al aumento de la temperatura global y, con ello, cambios en la distribución de la fauna y la flora. Además, estos cambios serán más pronunciados debido a que la temperatura global sigue aumentando. En la agricultura europea, la zona meridional será la más afectada debido a que sufrirá un mayor aumento de temperatura y una mayor escasez de agua (Comisión Europea, 2024). Por tanto, es necesario que se realicen inversiones significativas en el estudio de los mecanismos moleculares de

respuesta a este estrés que, a su vez, permitirán generar variedades de plantas resistentes a estas condiciones extremas (Saini et al. 2022).

3.2.1 Efecto del estrés por altas temperaturas en las plantas

El efecto de las altas temperaturas en los cultivos depende en gran medida de la intensidad y la duración de esta temperatura. En otras palabras, un aumento moderado de la temperatura en un largo tiempo puede producir cambios reversibles, sin embargo, una temperatura extrema en poco tiempo puede causar daños irreversibles e, incluso, la muerte de la planta (Chen et al. 1982; Lee et al. 2018). El efecto de las altas temperaturas también depende de la planta de estudio, el órgano de estudio, el estado de desarrollo de la planta y otros factores ambientales (Wahid et al. 2007). En particular, la planta de tomate (*Solanum lycopersicum*), planta objeto de esta tesis, tiene su temperatura óptima entre 18 °C y 30 °C durante el día y entre 15 °C y 20 °C durante la noche, dependiendo de la variedad, y la mayoría de sus variedades no pueden crecer por encima de los 38 °C (Camejo et al. 2005; Liu et al. 2023a).

Primeramente, las plantas crecidas bajo estrés por altas temperaturas inducen la apertura estomática que les permite reducir la temperatura de sus hojas mediante un aumento de la transpiración. En este sentido, la pérdida de agua por la transpiración induce secundariamente un déficit hídrico y, por tanto, las plantas responden cerrando los estomas y reduciendo la capacidad de la planta para asimilar CO₂ (Urban et al. 2017). Por tanto, se ha observado que el proceso de la fotosíntesis es muy sensible al estrés por altas temperaturas, debido principalmente al cierre estomático, la alteración de los cloroplastos, la degradación de la clorofila o los daños en la maquinaria fotosintética (Zahra et al. 2023). Además, este estrés produce un gran número de cambios a nivel molecular, bioquímico y fisiológico que se refleja en última instancia en una disminución del crecimiento y la producción de los cultivos.

Otros efectos negativos inducidos por este tipo de estrés se reflejan en alteraciones en la estabilidad de proteínas, cambios en la fluidez y permeabilidad de las membranas y alteraciones en las funciones de los orgánulos celulares (Djanaguiraman et al. 2018; Khan and Shahwar 2020). Incluso se ha observado que las altas temperaturas pueden provocar desequilibrios en la homeostasis iónica a partir de la activación de bombas y

transportadores de iones de la membrana plasmática o del tonoplasto, como la H⁺-ATPasa (Zhang et al. 2006; Janicka-Russak and Kabała 2012). Por último, el estrés por altas temperaturas, al igual que otros estreses, produce un aumento excesivo en la producción y acumulación ROS y RNS y, por tanto, la inducción de un estrés oxidativo asociado (Turkan 2018; Mittler et al. 2022). En general, todas las partes de la planta se ven afectadas por el estrés por altas temperaturas ya que produce efectos negativos en la germinación de semillas, la emergencia de la plántula, la fertilidad de la flores y el rendimiento y la calidad de los frutos (Wahid et al. 2007; Singh et al. 2017).

3.2.2 Mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés por altas temperaturas

La respuesta de las plantas a las altas temperaturas implica cambios a nivel molecular, metabólico y fisiológico. Las plantas en respuesta al estrés son capaces de alterar su morfología, transcripción génica, síntesis y degradación de proteínas, metabolitos y lípidos con el objetivo de aumentar el umbral de tolerancia al mismo.

Las plantas pueden responder a las altas temperaturas mediante la termomorfogénesis, un proceso que se define como el conjunto de cambios morfológicos que ocurren en respuesta a temperaturas estresantes, permitiendo a la planta adaptarse al estrés térmico. El aumento de la elongación del hipocótilo mediada por la auxina (AUX), el aumento de la elongación del peciolo de la hoja, la hiponastia de las hojas, la aceleración de la senescencia de las hojas mediada por etileno (ET) (plantas de soja) o cambios en la dirección del crecimiento radicular en respuesta a termogradientes (plantas de maíz bajo temperaturas no superiores a 34 °C) son algunas de las principales respuestas evasivas al estrés por altas temperaturas que promueven la capacidad de enfriamiento de la planta (Fortin and Poff 1991; Djanaguiraman and Prasad 2010; Zheng et al. 2016; Ibañez et al. 2017; Yu et al. 2022). También existen respuestas de escape a altas temperaturas por parte de los órganos reproductivos. La temperatura moderadamente alta puede influir adelantando o retrasando la fase de anthesis para proteger órganos sensibles como las flores y los frutos de los efectos negativos del aumento de la temperatura de forma dependiente o independiente del fotoperiodo (Capovilla et al. 2015; del Olmo et al. 2019; Zhu et al. 2021). Además, los

cambios inesperados de temperatura, provocados en gran medida por el cambio climático, pueden acelerar el proceso de floración en las plantas. Esto ocurre porque muchas especies dependen de la vernalización, un periodo de exposición al frío que promueve la floración una vez que la planta detecta temperaturas más cálidas. Si las temperaturas suben de forma impredecible o antes de lo esperado, la planta puede interpretarlo como una señal para florecer antes de lo previsto. La duración adecuada de la vernalización es clave en este proceso, ya que una exposición insuficiente al frío podría desajustar el ciclo natural de la planta y afectar su desarrollo (Dixon et al. 2019).

Como respuesta a un estrés térmico, primeramente, las plantas van a intentar utilizar las defensas de evitación y escape explicadas anteriormente. Sin embargo, no siempre es suficiente y las plantas deben responder aumentando su tolerancia al estrés a través de la activación de ciertos mecanismos específicos para ello. Entre los mecanismos de tolerancia se encuentran los cambios en la composición lipídica y proteica de las membranas celulares, que van a dar lugar a cambios en la integridad y fluidez de las membranas en respuesta al estrés (Shiva et al. 2020; Ding and Yang 2022; Sun et al. 2022). Sin embargo, las proteínas de choque térmico (HSPs) junto con los factores de transcripción de choque térmico (HSFs) son los protagonistas principales de los mecanismos de inducción de tolerancia al estrés térmico en las plantas (Jacob et al. 2017). Las proteínas HSP son las chaperonas que protegen y ayudan a conseguir que la estructura nativa de las proteínas desplegadas o mal plegadas se recupere sin necesidad de un gasto energético, y la expresión de estas HSPs está regulada por los HSF (Jacob et al. 2017). Por tanto, su función en plantas sometidas a altas temperaturas consiste en la protección de proteínas termolábiles y reparación de las proteínas dañadas por este estrés.

Al igual que en el estrés salino, el estrés por altas temperaturas aumenta los niveles de ROS y RNS, que en primera instancia funcionan como señalizadores del estrés, pero su acumulación excesiva puede causar un estrés oxidativo (Turkan 2018; Mittler et al. 2022). Las plantas responden a este estrés aumentando la transcripción de genes relacionados con actividades antioxidantes (Khurshid et al. 2021). También, las plantas responden al estrés por altas temperaturas aumentando los niveles de osmoprotectores como prolina o compuestos de amonio cuaternario (Rivero et al. 2004; Raza et al. 2023).

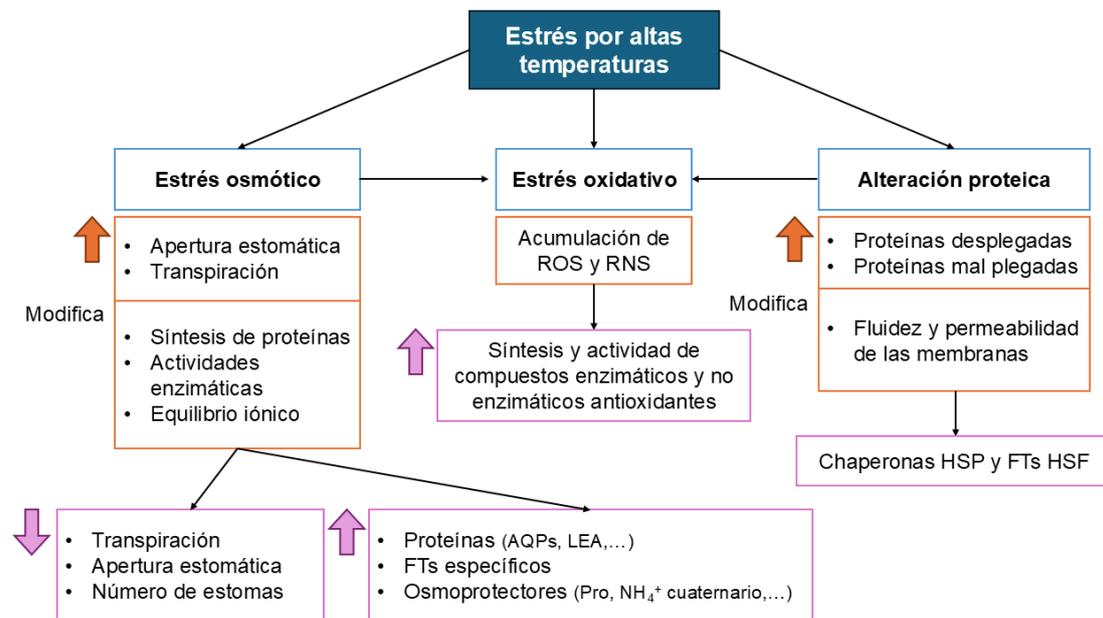


Figura 4. Efectos y mecanismos de tolerancia de las plantas frente al estrés por altas temperaturas. El recuadro azul representa los efectos generales, el naranja los efectos más específicos y el morado los mecanismos de tolerancia. ROS: especies reactivas de oxígeno, RNS: especies reactivas de nitrógeno, AQPs: acuaporinas, LEA: proteínas de embriogénesis tardía, FTs: factores de transcripción, NH_4^+ cuat.: amonios cuaternarios, HSP: proteínas de choque térmico, HSF: factores de transcripción de choque térmico.

Por último, las plantas sometidas a altas temperaturas puntuales pueden adquirir termotolerancia en las próximas exposiciones a altas temperaturas, adquiriendo el denominado “efecto *priming*” inducido (Bäurle 2016). Por tanto, las plantas almacenan información mediante la llamada “memoria de estrés” que les permite responder de una forma más precisa en futuras condiciones de estrés térmico. Los procesos implicados en la memoria al estrés por altas temperaturas están relacionados con los cambios en los patrones de expresión de los genes de memoria térmica, las modificaciones de las histonas, el posicionamiento de los nucleosomas y la acumulación de ciertos mi-ARNs (Yamaguchi 2022). En la **Figura 4** se resumen los efectos y mecanismos de tolerancia que desencadena el estrés por altas temperaturas en las plantas.

3.3 Estrés por déficit hídrico

Según la FAO (2023), la escasez de agua se ve exacerbada por el cambio climático y el crecimiento demográfico mundial, lo que aumenta la demanda de este recurso. A medida que la disponibilidad de agua se vuelve más limitada e impredecible, la situación se torna aún más crítica. El cambio climático provoca patrones de precipitación repentinos, alcanzando nuevos niveles extremos en sequías e inundaciones, lo que dificulta la planificación de los recursos hídricos disponibles.

La agricultura utiliza cerca del 70% de la extracción de agua dulce y, por tanto, juega un papel crucial en esta dinámica. Por ende, la escasez de agua reduce la producción agrícola, lo que a su vez disminuye la disponibilidad de alimentos y amenaza la seguridad alimentaria. Según el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2023), el 14,6% del territorio español está en emergencia por escasez de agua y el 27,4% está en alerta debido a la escasez de precipitaciones en los últimos años. Por lo tanto, es crucial realizar inversiones en la investigación de los mecanismos moleculares de respuesta al estrés por déficit hídrico, ya que esto permitirá desarrollar variedades de plantas que sean más resistentes a este tipo de estrés. Por ejemplo, investigadores españoles han generado una molécula agonista del receptor de ABA (iSB09) y han diseñado un receptor de ABA CsPYL1, denominado CsPYL15m, que se une eficientemente a iSB09. En plantas *Arabidopsis thaliana* observaron que la unión receptor-agonista condujo a la activación de la señalización de ABA (hormona relacionada con la tolerancia de las plantas al estrés) y a una marcada tolerancia de estas plantas a la sequía (Lozano-Juste et al. 2023).

3.3.1 Efecto del estrés por déficit hídrico en las plantas

Las plantas sufren déficit hídrico cuando no hay la suficiente disponibilidad de agua en la zona radicular (potencial hídrico del suelo inferior al potencial hídrico de las raíces) o cuando la transpiración excede el agua absorbida radicularmente (Steudle 2000). Como ya vimos en el apartado de “Efectos del estrés salino en las plantas”, la salinidad en el suelo provoca en la planta un déficit hídrico y un estrés osmótico asociado y esto se asemeja a lo que ocurre cuando la disponibilidad de agua no es suficiente, provocando ambos estreses efectos similares en la planta. Al igual que los estreses simples definidos

anteriormente, el efecto producido por déficit hídrico en plantas depende de la intensidad y duración del mismo, la etapa de desarrollo de la planta, la especie de planta y otros factores ambientales que produzcan un efecto combinado con este déficit hídrico, como pueden ser la salinidad o las altas temperaturas (Chai et al. 2015; Jumrani and Bhatia 2018; Angon et al. 2022).

Primeramente, la falta de agua provoca reducción del potencial hídrico y de la turgencia y el volumen celular, alteraciones de actividades enzimáticas, producción de radicales libres (ROS o RNS), alteraciones en la fotosíntesis y, todas ellas, conllevan a una reducción de la tasa fotosintética (Zlatev and Lidon 2005). Una de las primeras respuestas es la acumulación de ABA, generando una señalización que desencadena cambios metabólicos implicados en la tolerancia de la plantas al estrés, siendo una de las señales principales el cierre estomático (Peng and Weyers 1994). El cierre estomático permite a la planta reducir la pérdida de agua por los estomas, pero también da lugar a una menor asimilación de CO₂ y, por tanto, a una menor tasa fotosintética. Al cierre estomático, también se le unen las alteraciones en el transporte de electrones de la maquinaria fotosintética y de la maquinaria relacionada con la respiración celular, así como alteraciones en la actividad de enzimas esenciales, como la rubisco (Zlatev and Lidon 2005; Galmés et al. 2013). Por último, al igual que se observó en los otros estreses, el estrés por déficit hídrico produce un aumento excesivo de los ROS y RNS que puede dar lugar a un estrés oxidativo (Samanta et al. 2024). Por tanto, el estrés hídrico limita el desarrollo y crecimiento de la planta.

3.3.2 Mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés por déficit hídrico

Al igual que en los estreses anteriormente explicados, las plantas responden al déficit hídrico mediante cambios a nivel molecular, metabólico y fisiológico, ya que las plantas son capaces de modificar su morfología, transcripción génica, síntesis y degradación de proteínas, metabolitos y lípidos en respuesta al estrés.

Algunas especies de plantas crecidas en zonas con estaciones muy secas completan su ciclo vital antes del inicio de la estación seca, escapando así del estrés hídrico (Meyre et al. 2001). Las plantas también pueden evitar la pérdida de agua regulando el sistema de transporte del agua, favoreciendo su adquisición o reduciendo su pérdida. Entre estos

mecanismos destacan el cierre estomático, un sistema radicular más amplio y profundo, reducción del tamaño de las hojas, orientación vertical de las hojas, abscisión de las hojas y engrosamiento de la cutícula (Farooq et al. 2012).

Asimismo, las plantas alteran su fisiología o metabolismo para tolerar el estrés por déficit hídrico. Una estrategia de las plantas para mantener la capacidad de absorción de agua del medio es la acumulación de forma pasiva de iones sin gasto energético. Además, las plantas presentan una estrategia alternativa donde aumentan la síntesis y acumulación de solutos orgánicos compatibles. De esta forma se disminuye el potencial osmótico de las células y se facilita el movimiento del agua desde el medio exterior hacia el interior de las células radiculares. Los osmoprotectores pueden ser desde monosacáridos, aminoácidos, alcoholes, polioles hasta azúcares complejos y compuestos de amonio cuaternario (Ozturk et al. 2021).

Por otra parte, las plantas sometidas a este tipo de estrés aumentan la síntesis de los canales proteicos AQPs, que son los principales canales involucrados en el transporte de agua y otras moléculas pequeñas a través de las membranas celulares (Martínez-Ballesta et al. 2009). Como ya se describió anteriormente en los mecanismos relacionados con el estrés por salinidad, las plantas sintetizan numerosas familias de proteínas que dependen del tipo de estrés al que estén sometidas, destacando las proteínas LEA y las dehidrinas (subfamilia de proteínas LEA) en el caso del estrés hídrico. Las proteínas LEA actúan como chaperonas para prevenir la desnaturalización de proteínas y, por tanto, contribuir a la integridad celular (Li et al. 2020a). Además de las proteínas anteriores, existen una gran diversidad de proteínas y FTs sintetizados en respuesta al estrés que ayudan en la tolerancia de las plantas, muchas de ellas implicadas en rutas antioxidantes (Muñoz-Mayor et al. 2012; Li et al. 2020a; Liu et al. 2023b). Por último, como ya vimos anteriormente, compuestos como ABA, el ácido jasmónico (Jas) y el ácido salicílico (SA) también están implicados en la respuesta al estrés por déficit hídrico (Muñoz-Espinoza et al. 2015; Ilyas et al. 2017). En definitiva, el estrés por déficit hídrico se asemeja, en términos generales, a lo que se muestra sobre el estrés osmótico en la **Figura 4**.

3.4 Combinación de estreses

A lo largo de la historia, el estudio del efecto del estrés en las plantas y la respuesta de estas se ha realizado aplicando estreses simples a plantas en condiciones controladas. Estos estudios han sido y son muy trascendentales, ya que han permitido a los investigadores entender los mecanismos de tolerancia y señalización de las plantas bajo un estrés abiótico concreto (Gantait et al. 2019). Además, muchos de estos estudios han dado lugar a plantas modificadas genéticamente que toleran ciertos niveles del estrés en condiciones de laboratorio. Sin embargo, un número reducido de estas plantas han conseguido ser eficaces en campo, lo que hace pensar que cuando este estrés se combina con otro u otros estreses, los mecanismos responsables de la tolerancia al estrés varían.

El Dr. Mittler y su grupo de investigación fueron los primeros en afirmar que la respuesta producida por las plantas a la combinación de estreses no es el sumatorio de las respuestas de los estreses estudiados separadamente, sino que la respuesta es específica de la combinación de estreses aplicada (Rizhsky et al. 2002, 2004; Mittler 2006). Además, la combinación de los diferentes estreses puede provocar una influencia positiva (sinérgica) o negativa (antagónica) en el rendimiento de las plantas cuando se estudian a nivel morfológico, bioquímico y fisiológico. Mittler (2006) elaboró la primera “matriz de estrés” donde se mostraban estas sinergias y antagonismos conocidos hasta ese momento (Mittler 2006). Posteriormente, nuestro grupo de investigación publicó una serie de artículos en los que se demostraba que la combinación de salinidad y temperatura en plantas de tomate generaba una respuesta específica y que la combinación daba lugar a plantas más vigorosas (efecto sinérgico) que cuando la salinidad era aplicada de manera individual. Esta respuesta específica en nuestras plantas de tomate se reflejaba en patrones fisiológicos (crecimiento, parámetros fotosintéticos, producción...), bioquímicos (detoxificación de ROS, acumulación de osmoprotectores específicos y de flavonoles, entre otros) y moleculares (patrón de expresión génica) (Rivero et al. 2014; Martínez et al. 2018; García-Martí et al. 2019; Lopez-Delacalle et al. 2020, 2021a, 2021b). Sin embargo, el grupo del Dr. Mittler había visto un efecto antagónico de esta misma combinación en plantas de *Arabidopsis*, lo que

mostraba también la especificidad de estas combinaciones dependiendo de la especie estudiada (Suzuki et al., 2014).

En la última década, el número de estudios centrado en la respuesta de las plantas a la combinación de varios estreses ha aumentado en gran medida como resultado de la gran importancia que está adquiriendo entre la comunidad científica, y, con esto, la “matriz de estrés” presentada en 2006 por el Mittler cada vez está más completa. Así, Anwar *et al.* (2021) dibujaron una nueva “matriz de estrés” basada en todos los estudios hasta la fecha (**Figura 5**) sobre la interacción entre distintos estreses. Aun así, quedan muchas interacciones por definir, como muestran los campos marcados como “desconocido” (**Figura 5**)(Anwar et al. 2021).

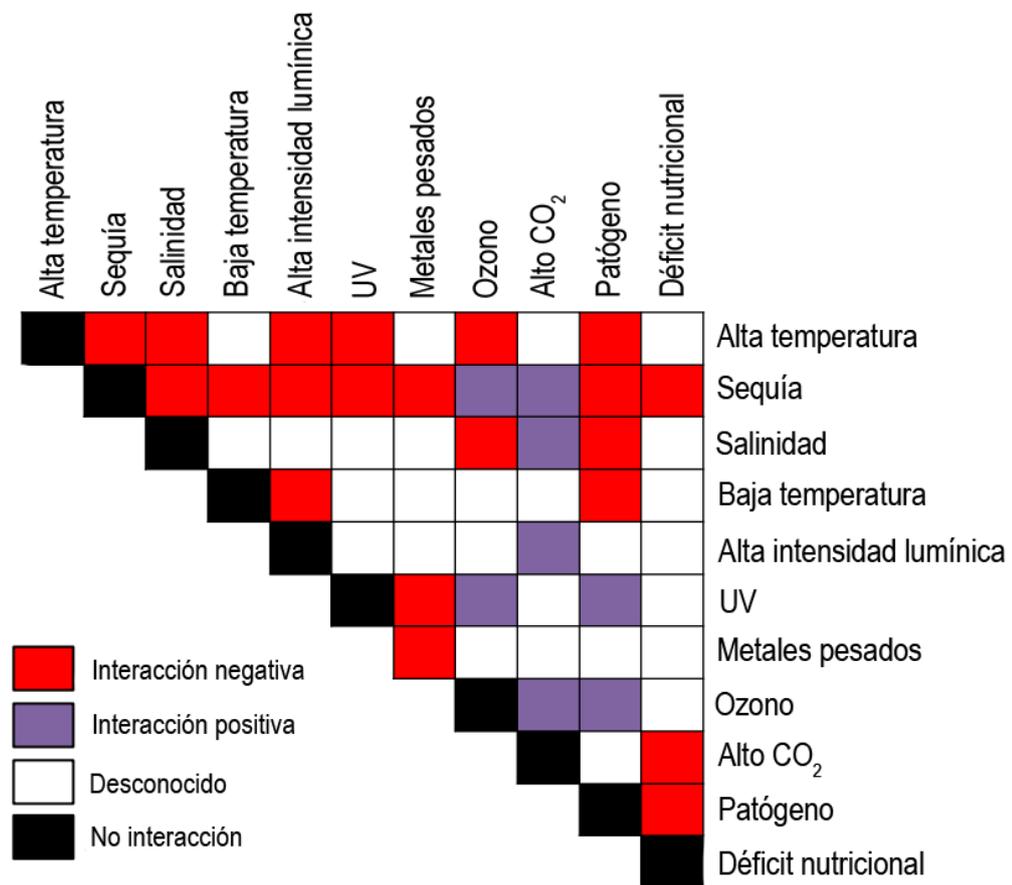


Figura 5. “Matriz de estrés” donde se representan las diferentes combinaciones de estreses ambientales. El color de la matriz indica las interacciones entre estreses que se han estudiado y su efecto global sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas. Rojo: antagónica; morado: sinérgica; blanco: desconocida hasta el momento; negra: no existe interacción que se conozca. Figura modificada y adquirida de Anwar *et al.* (2021).

3.4.1 Estrés por la combinación de salinidad y altas temperaturas

Las plantas bajo el estrés salinidad y bajo el estrés por altas temperaturas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, cada vez hay más investigadores que estudian el efecto y la respuesta de las plantas a la combinación de ambos estreses. En las respuestas y los mecanismos de defensa ante la combinación de estos estreses, se observan muchas similitudes con las respuestas a estreses simples. Sin embargo, también se han identificado diferencias significativas e, incluso, se ha demostrado que la aplicación simultánea de ambos estreses puede resultar beneficiosa para la planta. Rivero *et al.* (2014) observó que la combinación de salinidad y altas temperaturas proporciona a la planta una protección frente a los efectos de la salinidad. En resumen, el efecto positivo se debió a la acumulación de compuestos como la betaína y la trehalosa y a un ratio menor de Na^+/K^+ que proporcionó un mejor rendimiento del estado hídrico celular en plantas bajo la combinación de los estreses (Rivero *et al.* 2014). En otro estudio en plantas de berenjena africana (*Solanum aethiopicum* L.) bajo la misma combinación de estreses también se observó que una temperatura moderadamente alta (37 °C) ofrecía cierta protección contra el estrés por salinidad reflejado en los parámetros de fluorescencia de las clorofilas en hojas, la estabilidad de la membrana celular y los niveles de potasio y zinc, lo que pone de manifiesto algunos efectos positivos de la combinación de estreses en determinadas condiciones (David-Rogeat *et al.* 2024). De igual forma, en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), la combinación de salinidad y altas temperaturas proporcionó una protección significativa contra los efectos adversos de la salinidad. Esta protección se manifestó en la mejora de la absorción y el transporte de Na^+ y K^+ , la mitigación de la limitación hídrica, la acumulación de osmoprotectores, la expresión de transcritos específicos y la síntesis de enzimas eliminadoras ROS (Nahar *et al.* 2022).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la acumulación de Na^+ en la planta de tomate fue superior bajo la combinación que bajo el estrés salino simple, lo que condujo al agotamiento de otros nutrientes y a un efecto negativo más severo sobre el crecimiento de la planta (Sousa *et al.* 2022). A pesar de ello, los impactos de la combinación de ambos estreses fueron menores en el metabolismo del carbono, el daño oxidativo y la acumulación de ROS, debido principalmente a la acumulación de

metabolitos antioxidantes y a la activación de enzimas antioxidantes (Sousa et al. 2022; Rodrigues et al. 2024). No obstante, este estudio indica que el deterioro del crecimiento en plantas bajo la combinación de estreses podría atribuirse a una distribución ineficiente de los recursos hacia los mecanismos de defensa (Rodrigues et al. 2024).

En la bibliografía también existen estudios más específicos centrados en un gen o un metabolito y estudios más amplios donde se utiliza el recurso de las ómicas. Por ejemplo, Zhao *et al.* (2017) demostraron que en plantas *Arabidopsis thaliana* la aldehído deshidrogena 7B4 (ADLH7B4), enzima implicada en la eliminación de aldehídos tóxicos, es fuertemente inducida por el estrés por altas temperaturas, pero sus niveles son aún más altos cuando las altas temperaturas se combinaban con salinidad (Zhao et al. 2017). Por otro lado, estudios de proteómica y metabolómica en los pericarpios muertos de *Brassica juncea* han demostrado que el perfil proteico obtenido bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas mostraba una mayor correlación con la salinidad que con las altas temperaturas. Sin embargo, el análisis de metabolitos mostró que el perfil de la combinación tiene mayor correlación con las altas temperaturas que con la salinidad. Por tanto, la salinidad parece dominar la respuesta de la planta bajo la combinación de estreses a nivel proteico, mientras las altas temperaturas parece ser el principal factor que afecta a la acumulación de metabolitos en los pericarpios muertos (Singiri et al. 2021). También estudios transcriptómicos y metabolómicos previos de nuestro grupo de investigación hicieron posible la identificación de FTs específicos de esta combinación de estreses en plantas de tomate (Lopez-Delacalle et al. 2021b). Igualmente, también se han hecho investigaciones en plantas resistentes a la salinidad como la planta *Suaeda salsa*. Estos estudios mostraban que bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas la asimilación de CO₂ y la eficiencia del fotosistema II se suprimían y se producía una inducción específica de la expresión de los genes que codifican las proteínas nucleósido difosfato quinasa 1 (proteína de unión a la clorofila a/b y el principal miembro de la familia I del transportador ABC) y de la síntesis de otras 57 proteínas específicas relacionadas con la defensa, fotosíntesis, producción de energía, transporte de materiales y transducción de señales (Li et al. 2011).

3.4.2 Estrés por la combinación de salinidad y déficit hídrico

El déficit hídrico y la salinidad elevada son de los principales estreses abióticos que afectan a la productividad de los cultivos y, además, suelen darse simultáneamente en la naturaleza. Por lo tanto, el desarrollo de cultivos mejor adaptados a ambos estreses en conjunto es importante para garantizar la seguridad alimentaria global a una población mundial cada vez mayor (Cominelli et al. 2013).

Diversos estudios han demostrado que la salinidad y el déficit hídrico pueden producir un efecto positivo o negativo cuando se aplican conjuntamente y este efecto varía dependiendo de la planta y de la intensidad y la duración de los estreses aplicados. Por ejemplo, Li *et al.* (2020) observaron que el efecto negativo del estrés por sequía sobre la fotosíntesis foliar fue significativamente mayor que el causado por el estrés salino. Sin embargo, la aplicación del estrés salino moderado alivió el efecto negativo del estrés por sequía sobre el rendimiento fotosintético del Hybrid *Pennisetum* (Li et al. 2020b). Por otro lado, Hussain *et al.* (2020, 2023) demostraron en las plantas halófitas *Panicum antidotale* que los efectos de la combinación de los estreses déficit hídrico y salinidad varían según la concentración de sal. A bajas concentraciones de sal (100 mM), se observó un efecto positivo, donde la baja salinidad fue capaz de reducir los efectos deletéreos producidos por el déficit hídrico relacionados con el crecimiento, el contenido de clorofila, la integridad celular, la fotosíntesis, el potencial hídrico foliar, la capacidad antioxidante y la homeostasis iónica. Por el contrario, la combinación de alta salinidad y déficit hídrico produjo un efecto más deletéreo en estas plantas en comparación con el estrés único (Hussain et al. 2020, 2023). Asimismo, otro estudio realizado en mandarinos tardíos variedad Fortune (injertado en el mandarino Cleopatra) crecidos en condiciones mediterráneas demostró que un riego deficitario con aguas salinas moderadas no redujo su rendimiento durante las dos primeras temporadas de crecimiento. Sin embargo, cuando el periodo de estrés superó los dos años, el estrés hídrico salino redujo drásticamente tanto el rendimiento como el crecimiento de la planta, promovido por la elevada acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en las hojas, y también debido a un efecto osmótico (Pagán et al. 2022). Por tanto, estos dos trabajos demuestran que puede haber un efecto positivo o negativo dependiendo de la duración y la intensidad de la combinación de ambos estreses.

Al contrario, en *Callistemon laevis*, una planta ornamental, la combinación de estrés hídrico y salino causó una disminución notable en el crecimiento, además de afectar el color de las hojas y la floración. Estos últimos efectos se debieron a la deshidratación del tejido foliar y a las altas concentraciones de cloruro y sodio acumuladas en las hojas. En cambio, en estas plantas sometidas individualmente a la salinidad, el Na⁺ tendió a permanecer en las raíces y los tallos, y, por tanto, alcanzando las hojas en menor medida. Sin embargo, las plantas sometidas simultáneamente a estrés hídrico y salino no fueron capaces de retener este ion en las partes leñosas. Todo ello conllevó a una marcada disminución de la conductancia estomática (gs) y de la fotosíntesis en las plantas sometidas a ambos estreses. Por tanto, la combinación del riego deficitario y la salinidad en *C. laevis* no fue aconsejable, ya que magnificó los efectos adversos de cualquiera de éstos cuando eran aplicados individualmente (Álvarez and Sánchez-Blanco 2015). Asimismo, Goussi *et al.* (2021) observaron que en las plantas halófitas *Eutrema salsugineum* (berro de agua salada) el NaCl no tuvo efecto protector sobre la actividad fotosintética cuando se aplicó junto con un déficit hídrico. A nivel fisiológico, la combinación de ambos estreses produjo un estrés osmótico asociado severo que afectó a la fluorescencia de la clorofila a, la fotoquímica primaria y el estado de la plastoquinona. Sin embargo, la aplicación de estrés salino o hídrico por separado no produjo una disminución significativa en estos parámetros. Además, un análisis proteómico de membranas tilacoidales reveló que la combinación de salinidad y déficit hídrico conllevó a una disminución de la expresión de toda la subunidad del núcleo del fotosistema II (PSII) y de algunas proteínas implicadas en la homeostasis del redox celular (Goussi *et al.* 2021). También Obadi *et al.* (2024) indicaron que la salinización del agua y la disminución de los niveles de riego afectaba negativamente al rendimiento y a las propiedades del fruto del tomate (Obadi *et al.* 2024).

Por otro lado, se han hecho estudios más específicos como el de Stavridou *et al.* (2019) donde demostraron que la respuesta fotosintética fue distinta dependiendo del grado de tolerancia a la sequía de los distintos genotipos de *Miscanthus* usados en su estudio y de las condiciones de estrés aplicadas (salinidad, estrés hídrico y la combinación de ambos). Además, demostraron que la biosíntesis de prolina fue específica de cada genotipo y fue desencadenada por la salinidad y la combinación de

estreses, principalmente en *Miscanthus floridulus* (Stavridou et al. 2019). También se han realizado estudios en órganos más específicos, como el estudio desarrollado en raíces seminales de plántulas de cebada de primavera “Scarlett” crecidas bajo la combinación de estreses salino y déficit hídrico. En este estudio se hizo un análisis transcriptómico que demostró la existencia de un transcriptoma único que no pudo predecirse a partir de las respuestas a los estreses simples (Osthoff et al. 2019).

4. El ácido abscísico (ABA)

La *abscisina II*, encontrada en frutos de algodón e implicada en acelerar el proceso de abscisión aislada, y la *dormina*, encontrada en las hojas de sicomoro con la función de inducir el letargo, fueron los primeros nombres que se le designó a lo que actualmente conocemos como ácido abscísico o ABA (Ohkuma et al. 1963; Cornforth et al. 1965). Cornforth *et al* (1965) determinaron que la *dormina* y la *abscisina II* eran el mismo compuesto y fue en 1968 cuando se estableció una terminología consensuada de estas dos moléculas que pasaban a denominarse ácido abscísico o ABA. Desde entonces, ABA se consideró un regulador del crecimiento en plantas o una fitohormona (Cornforth et al. 1965; Addicott et al. 1968; Wasilewska et al. 2008).

La estructura química del ABA se determinó por espectroscopía, confirmándose posteriormente mediante síntesis química (Ohkuma et al. 1963; Cornforth et al. 1965). El ABA es un sesquiterpenoide apocarotenoide de 15 carbonos con el carbono 1 anomérico que da lugar a dos posibles enantiómeros (S o + y R o -), siendo la forma natural la S (Abrams et al. 1989). Su nombre es (S)-5-(1-hidroxi-2,9,6-trimetil-4-oxo-1-ciclohexil)-3-metil-cis, trans-penta-2,4-dienoico y su fórmula $C_{15}H_{20}O_4$. La cadena lateral del ABA contiene dos dobles enlaces conjugados hacia el extremo carboxílico. En la molécula biológicamente más activa, el doble enlace más cercano al anillo está en conformación *trans*, mientras que el más cercano al grupo ácido está en configuración *cis*. La orientación del grupo carboxilo del C2 da lugar, por consiguiente, a la existencia de isomería *cis-trans*. En la molécula de ABA se produce la fotoisomerización por la luz natural desde el isómero *cis*, biológicamente más activo, al isómero *trans*, casi inactivo (Brabham and Biggs 1981).

4.1 Biosíntesis de ABA

Se ha demostrado extensivamente que la hormona ABA está presente tanto en plantas como en hongos (McAdam and Susmilch 2021). Además, existen pruebas de que esta hormona se sintetiza en bacterias asociadas a plantas, hongos patógenos de plantas, cianobacterias, algas, líquenes, protozoos, esponjas e incluso, al parecer, en granulocitos humanos (Zocchi et al. 2003; Hartung 2010; Hauser et al. 2011; Bruzzone et al. 2012).

La biosíntesis de ABA (**Figura 6**) se desarrolla principalmente en los plastidios y finaliza en el citosol celular. La ruta de biosíntesis de ABA es un proceso dividido en varios pasos regulados por enzimas en su mayoría conocidas (Nambara and Marion-Poll 2005; Finkelstein 2013). El ABA deriva de un compuesto de 5C denominado isopentenil pirofosfato, sintetizado a partir de la condensación de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. El isopentenil pirofosfato continúa por la ruta independiente de mevalonato hasta la formación del compuesto intermediario denominado zeaxantina (40C). La formación de zeaxantina se produce con la ciclación de los extremos del licopeno formándose el β -caroteno, que a su vez es hidroxilado. A continuación, la conversión de zeaxantina a *trans*-violaxantina está catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) a través del intermediario anteraxantina. Después, la *trans*-violaxantina pasa a *trans*-neoxantina a partir de la enzima neoxantina sintasa (NSY). Posteriormente, tanto la *trans*-neoxantina como la *trans*-violaxantina cambian a su isómero *cis* a partir de una isomerasa que hasta hace poco era totalmente desconocida. Sin embargo, varias evidencias apuntan a que las “D₂₇-like proteins” podrían estar implicadas directa o indirectamente en estas isomerizaciones (Liu et al. 2020; Tolnai et al. 2024). El siguiente paso catalizado por la enzima 9-*cis*-epoxi carotenoide dioxigenasa (NCED) consiste en la escisión oxidativa de 9-*cis*-violaxantina y 9-*cis*-neoxantina que da lugar a la xantoxina (15C) y a un metabolito de 25 carbonos. La xantoxina producida es transportada desde el plastidio al citosol debido a que las siguientes reacciones se producen en el citosol.

En el citosol, la xantoxina es convertida a ABA-aldehído a través de la enzima ABA alcohol deshidrogenasa (codificada por el gen ABA2 en *Arabidopsis*). Por último, se produce la oxidación del aldehído a ácido carboxílico produciéndose el ABA a través de la enzima abscísico aldehído oxidasa (AAO). La enzima AAO requiere de un cofactor

molibdeno (MoCo) sulfurado para ser catalíticamente activa y, por tanto, depende a su vez de la enzima sulfurasa del cofactor de molibdeno (MOCOS) (**Figura 6**).

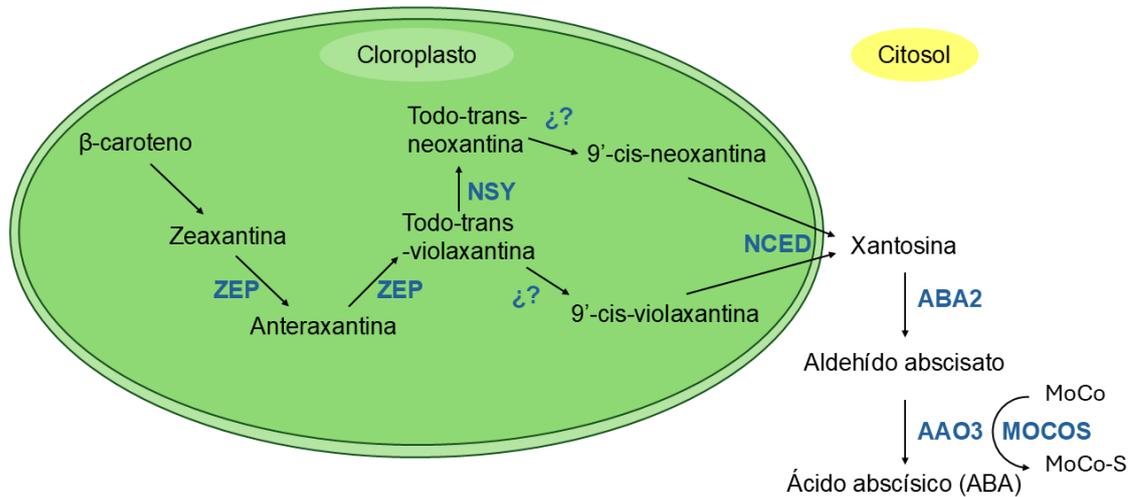


Figura 6. Ruta de biosíntesis de ABA en *Arabidopsis thaliana*. En color azul están representadas la enzimas que participan en la ruta. ZEP: zeaxantina epoxidasa, NSY: neoxantina sintasa, NCED: 9-*cis*-epoxi carotenoide dioxigenasa, ABA2: ABA alcohol deshidrogenasa, AAO3: abscísico aldehído oxidasa 3, MoCo: cofactor molibdeno, MOCOS: sulfurasa de cofactor de molibdeno.

4.2 Mutantes deficientes de ABA

La identificación y caracterización de mutantes deficientes en ABA ha contribuido enormemente al conocimiento de la ruta biosintética de ABA y al clonaje de los genes que codifican para las enzimas de su ruta de biosíntesis. Asimismo, los mutantes deficientes en ABA se caracterizan fenotípicamente por tener: germinación precoz, susceptibilidad al marchitamiento, aumento de la gs y mayor capacidad para germinar y crecer en medios que contienen una alta concentración de sal (Schwartz et al. 2003). La revisión de Schwartz et al. (2003) reúne la mayoría de los mutantes deficientes en ABA conocidos (Schwartz et al. 2003).

En esta tesis se ha utilizado el mutante *flacca* o *flc* en plantas de tomate, cuya mutación está asociada a una deficiencia en la síntesis de MOCOS (Solyc07g066480), (Tal 1966; Tal and Imber 1971). El MoCo se encuentra en los sitios catalíticos de varios molibdoenzimas presentes en las plantas superiores: nitrato reductasa (NR), xantina

deshidrogenasa (XDH), sulfito oxidasa (SO), aldehído oxidasa (AO) (Zdunek-Zastocka and Lips 2003). Sin embargo, solo la XDH y la AO, pero no la SO y la NR, requieren la sulfuración postraduccional de su sitio Mo para ser activas. Su maduración está catalizada por la enzima MOCOS, que moviliza el azufre de la L-cisteína de una manera dependiente del fosfato de piridoxal (Mendel and Bittner 2006). En los mutantes *flc* no se detectaron actividades significativas de XDH o AO en la parte aérea, pero, sin embargo, en las raíces de los mutantes se han observado mayores cantidades de ABA y una actividad considerable de hidroxilasas que contienen MoCo. También en los mutantes *flc* la tasa de carga xilemática de ABA fue significativamente inferior a la de las plantas silvestres (WT o *Wild-Type*), lo que demuestra que *flc* también es defectuosa en el transporte de ABA a la parte aérea. Los resultados en *flc* indican que la actividad MOCOS está alterada de forma dependiente del tejido (Sagi et al. 1999, 2002). Por último, he de destacar que las XDH y las AO de las plantas *Arabidopsis* y tomate son capaces de producir superóxido (O_2^-) y peróxido (H_2O_2), respectivamente. Por ello, que la producción de ROS en plantas y los niveles de transcripción de AO y XDH aumenten rápidamente con la aplicación de ABA en hojas y raíces sometidas a estrés hídrico. Teniendo en cuenta esto, Yesbergenova *et al.* (2005) demostraron que la AO y la XDH podrían ser nuevas fuentes enzimáticas de producción de ROS durante el estrés hídrico (Yesbergenova et al. 2005).

Los estudios del mutante *flc* siguen siendo relevantes en la actualidad, ya que nos permiten investigar los mecanismos en los que el ABA está implicado. González-Hernández *et al.* (2020) demostraron que en mutantes *flc* se produjo una disminución del número de raíces laterales con una nutrición nitrogenada a base de NO_3^- , mientras que las plántulas alimentadas con NH_4^+ mostraron una disminución únicamente de la longitud de las raíces primarias que se revirtió cuando se suministró ABA de forma exógena. Además, los mutantes *flc* mostraron una reprogramación de los genes de asimilación N/C (González-Hernández et al. 2020). Por otro lado, estos mutantes también han sido de ayuda en el descubrimiento de FTs importantes en los mecanismos de señalización orquestados por ABA. Gupta *et al.* (2022) identificaron a SIDREB3 como un regulador negativo de las respuestas al ABA en todos los tejidos y un regulador importante en la maduración del tomate (Gupta et al. 2022a). Por último, es importante

tener en cuenta que los estudios con mutantes deficientes en ABA pueden depender de la especie de estudio. Innes *et al.* (2021) observaron que los mutantes en el mismo locus de la ruta biosintética de ABA, *Az34* en plantas de cebada y *flc* en plantas de tomate, mostraron respuestas variables tanto a la humedad relativa elevada como a la deficiencia de ABA, lo que dificulta la generalización del papel del ABA en la regulación del crecimiento en diferentes especies. Estos investigadores observaron que los mutantes *flc* se diferencian de los mutantes *Az34* en que presentan estomas más grandes y abundantes en comparación con su planta WT y que en condiciones de humedad relativa alta hubo un incremento del crecimiento relativo de los brotes (Innes et al. 2021).

4.3 Catabolismo de ABA

Los procesos de degradación de ABA en moléculas menos activas se pueden dividir en dos tipos: hidroxilación de ABA y conjugación de ABA con glucosa (**Figura 7**). La hidroxilación de ABA se produce en los carbonos 7, 8 y 9, siendo la modificación más común la hidroxilación en la posición C8 (Nambara and Marion-Poll 2005). La 8-hidroxilación del ABA es catalizada por una citocromo P450 mono-oxigenasa y el 8'-hidroxi ABA se isomeriza espontáneamente a ácido faseico (PA) y la ciclación causada da lugar a una reducción significativa de la actividad biológica (Krochko et al. 1998). Los estudios demuestran que la actividad biológica del ABA hidroxilado depende del proceso fisiológico, es decir, esta molécula seguirá siendo activa en algunos procesos e inactiva para otros. Después el PA es catabolizado por una reductasa soluble a ácido dihidroxifaseico (DPA), el cual ha resultado ser inactivo en varios bioensayos y, por tanto, es considerada como la forma de ABA inactiva. Por tanto, el ABA parece que se inactiva escalonadamente durante su proceso catabólico (Naumann and Dörffling 1982). Por otro lado, se ha demostrado en varios estudios que el 7'-hidroxi ABA es inactivo biológicamente, pero la 7'-hidroxilasa de ABA parece aún ser desconocida (Shimomura et al. 2007). Por último, la ruta minoritaria de hidroxilación es la del carbono 9 de ABA. Esta hidroxilación de ABA también está catalizada por una citocromo P450 mono-oxigenasa y, después este compuesto se cicla dando lugar al ácido neo-faseico (neo-PA) (Zhou et al. 2004).

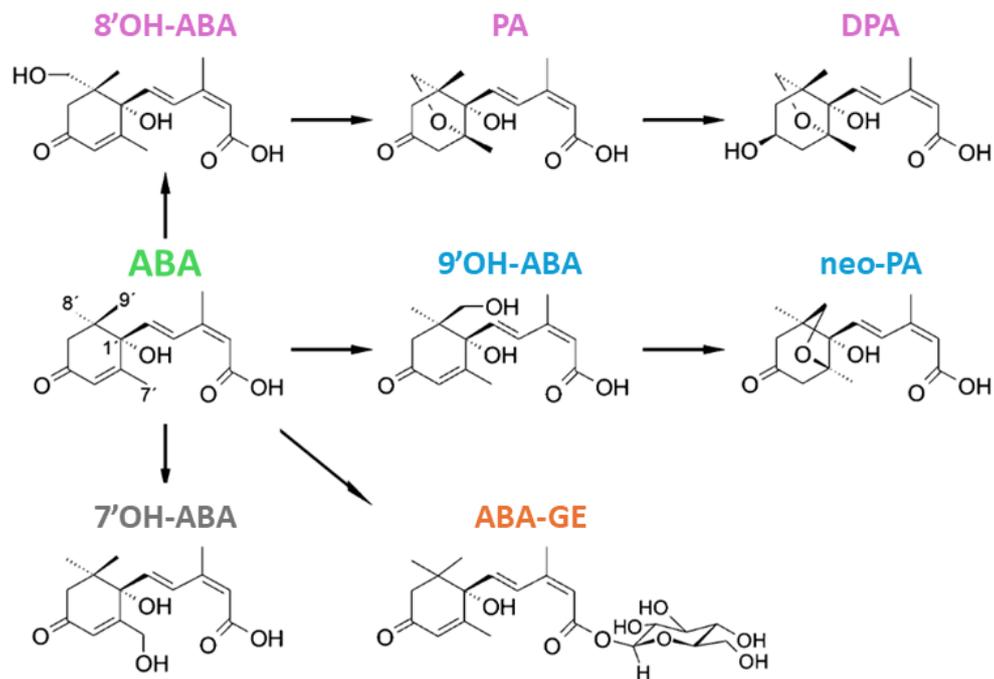


Figura 7. Catabolismo del ABA. El color morado, azul y gris representan la ruta de las tres hidroxilaciones conocidas. El naranja la conjugación más frecuente. ABA: ácido abscísico, PA: ácido faseico, DPA: ácido dihidrofaseico, ABA-GE: ABA éster glucosílico.

En segundo lugar, ABA puede ser catabolizado por la conjugación con glucosa de sus grupos carboxilo (C1) e hidroxilo (Chen et al. 2020). El conjugado más común y conocido es el ABA éster glucosílico (ABA-GE), un conjugado inactivo y sintetizado por la enzima UDP-glucosiltransferasa codificada por UGT71C5 en plantas de *Arabidopsis* (Liu et al. 2015). El conjugado ABA-GE es considerado como una forma de almacenamiento o transporte a larga distancia de ABA. Asimismo, esta conjugación está regulada por la inducción de la síntesis glucosiltransferasas, que reduce los niveles de ABA libres, y por la inducción de la síntesis de glucosidasas, que aumenta los niveles libres de ABA (Chen et al. 2020). Por ejemplo, se ha observado que estas glucosidasas aumentan en respuesta a estreses abióticos como el déficit hídrico (Li et al. 2012). Por último, varios investigadores han demostrado que ABA-GE puede actuar como molécula señal del estrés. Sauter et al. (2002) demostraron que ABA-GE era generada en la raíz y de aquí se

transportaba a la parte aérea, donde se disociaba y el ABA era liberado en las células diana, como por ejemplo las células guarda de los estomas (Sauter et al. 2002).

4.4 Transporte de ABA

En primer lugar, el ABA puede moverse entre órganos utilizando el “modelo de trampa iónica”, donde el movimiento de ABA depende del pH del medio. Por ende, la difusión de ABA través de la membrana es un paso limitante en su transporte y está regulado por cambios en el pH (Jia and Davies 2007; Jiang and Hartung 2008). El ABA es considerado un ácido débil ($pK_a:4,7$) y a un pH más ácido la forma predominante es ABA-H, mientras que a un pH básico es predominante la forma ABA^- , siendo ABA^- la forma cargada y no difusible. En segundo lugar, en 1980 se demostró por primera vez un transporte de ABA mediado por proteínas y, por tanto, un transporte saturable (Astle and Rubery 1980). Estos transportadores facilitan la interacción de ABA con los receptores intracelulares en comparación con el transporte no mediado por proteínas o difusión simple. Asimismo, la expresión específica y localizada de estos transportadores permite controlar la vía de señalización de ABA (Iyer-Pascuzzi et al. 2011). Los transportadores de ABA reconocidos en plantas de *Arabidopsis* se dividen en los que transportan a ABA al interior celular (ABCG17/18, ABCG30, ABCG40, AIT1-4 y NPF2.12/2.13) y los que hacen el transporte en sentido contrario (ABCG25, ABCG31 y DTX50). Por otro lado, también se han encontrado transportadores de ABA en *Solanum lycopersicum*, *Medicago truncatula* y *Oryza sativa* (Anfang and Shani 2021; Zhang et al. 2023). En la **Figura 8** se muestra con más detalle estos transportadores.

A su vez, los resultados de multitud de estudios demuestran que el ABA es sintetizado en raíces bajo estrés hídrico y transportado por la savia del xilema hasta llegar a las células de elongación y células guarda donde ejerce su función (Wilkinson and Davies 2002). Sin embargo, casi todos los tipos celulares que son capaces de sintetizar receptores de ABA son capaces de sintetizar ABA, por ejemplo, las venas y células guarda, lo que genera incertidumbre acerca de la existencia y la relevancia del transporte de ABA desde las raíces hacia las partes aéreas de la planta (Koiwai et al. 2004; Endo et al. 2008). Sin embargo, existen ciertas evidencias que respaldan este transporte. En primer lugar, en células “muertas” del xilema (esenciales para el transporte de agua), las cuales no son capaces de sintetizar ABA por sí mismas, se ha encontrado

concentraciones de esta hormona (Goodger and Schachtman 2010). En segundo lugar, las membranas celulares son permeables al ABA, el cual puede penetrar por difusión o también a través de transportadores de membrana, como se ha indicado anteriormente. En definitiva, el transporte de ABA desde las raíces a otras partes de la planta parece ser importante para la correcta señalización en toda la planta (Boursiac et al. 2013). Asimismo, puede haber diferencias dependiendo de la presencia o ausencia de estrés en la planta. Yang *et al.* (2024) propusieron un modelo de trabajo en el que el ABA derivado de la raíz que es transportado por AtABCG25 (transportador de ABA en *Arabidopsis*) a través del xilema media los movimientos estomáticos en el brote en condiciones de no sequía, pero mostró poco efecto en los movimientos estomáticos bajo condiciones de sequía (Yang et al. 2024). Por último, como se comentó en el apartado de catabolismo del ABA, la conjugación ABA-GE es una forma importante de almacenamiento y transporte de ABA a larga distancia, ya que la capacidad limitada del ABA-GE para difundirse a través de la membrana celular lo convierte en un compuesto ideal para ser transportado a largas distancias (Jiang and Hartung 2008). Además, en plantas de *Arabidopsis* han descubierto transportadores que introducen ABA desde el citosol al interior vacuolar (Figura 8) (Anfang and Shani 2021; Zhang et al. 2023).

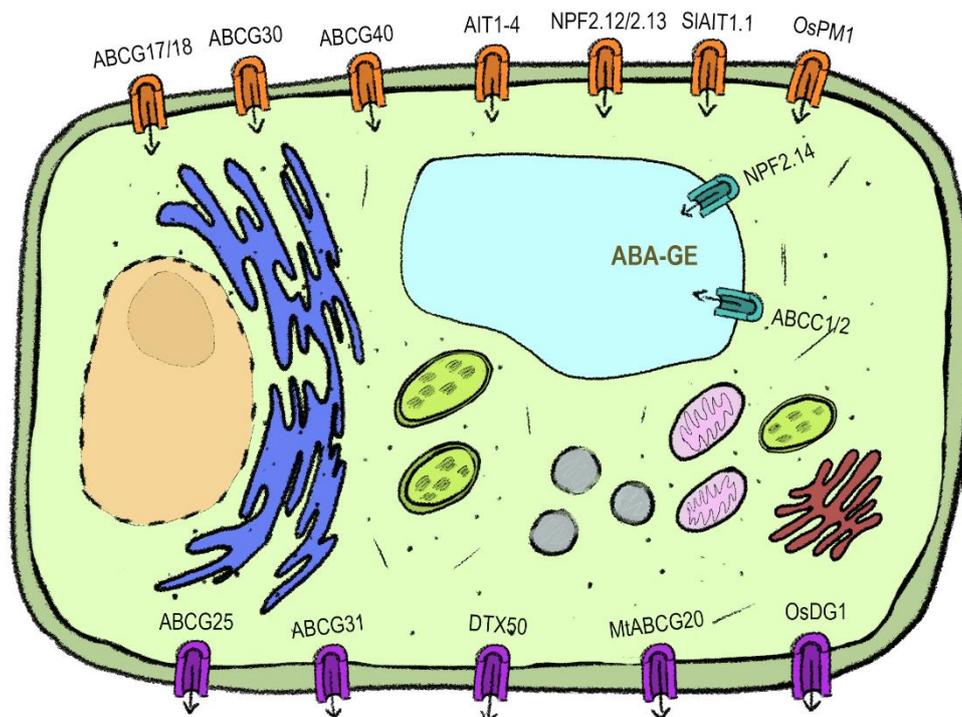


Figura 8. Transportadores de ABA a nivel celular. Las flechas muestran el sentido del transporte de ABA o ABA-GE. Las siglas de los transportadores se detallan a continuación. ABCDG (17/18,30,40,25,31,20): *ATP-binding cassette G-family proteins*, AIT1-4: *ABA-importing transporter 1-4*, NPF: *nitrate transporter/peptide transporter*, ABCC: *ATP-binding cassette proteins family*, DTX: *multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type transporter*, DG: *Defective Grain-filling 1 (MATE family)*. Los transportadores han sido identificados en distintos tipos de plantas: Sl: *Solanum lycopersicum*, Mt: *Medicago truncatula*, Os: *Oryza sativa* y los que no tiene estas siglas fueron identificados en *Arabidopsis thaliana*.

4.5 Percepción y cascada de señalización de ABA en plantas

El ABA está implicado en la regulación de multitud de procesos que engloban el desarrollo de la planta y la tolerancia al estrés en las plantas. Existen tres grupos receptores de ABA (Fidler et al. 2022):

- La subunidad H del complejo magnesio-quelatasa del cloroplasto/ receptor de ABA (ChlH/ABAR) localizado en la membrana del cloroplasto.
- Receptor acoplado a la proteína G tipo G 1/2 (GTG1/GTG2) localizado en la membrana plasmática.
- La familia de receptores resistencia a la pirabactina/ resistencia similar a la pirabactina/ el componente regulador de los receptores ABA (PYR/PYL/RCAR) localizados tanto en el citosol como en el núcleo.

También se creía que el receptor proteico de control del tiempo de floración (FCA) localizado en el núcleo se unía a ABA. Sin embargo, Risk *et al.* (2008) declaró que el ABA no puede unirse a FCA, retractando el artículo publicado por Razem *et al.* (2006) donde aseguraban la unión entre ABA y FCA (Razem et al. 2006; Risk et al. 2008).

Los receptores PYR/PYL/RCAR son los principales responsables de la regulación de la vía de señalización del ABA (Zhang et al. 2015). Estos receptores tienen un dominio conservado de transferencia de lípidos relacionados con la regulación aguda esteroideogénica (START) y, por tanto, pertenecen a la superfamilia de proteínas START. Estas proteínas pueden unir simultáneamente moléculas, como ABA, e inhibir la proteínas-fosfatasa tipo 2C (PP2C), lo que conduce a la activación de otros elementos de la vía de señalización del ABA (Park et al. 2009).

Por otro lado, los receptores ChlH/ABAR se han identificado como proteínas de unión a ABA en diversas plantas, pero en otras como *Hordeum vulgare* no se ha observado tal capacidad de unión (Müller and Hansson 2009). Se ha visto que la unión de los receptores ChlH/ABAR a ABA no promueve directamente la expresión de genes dependientes de ABA, sino que se da a través de una interacción de ChlH con la familia citosólica de factores de transcripción WRKY. Dependiendo del contenido de ABA en los tejidos y de su unión a estos receptores, los factores de transcripción WKRY pueden regular la expresión de genes dependientes de ABA (Shang et al. 2010; Sun and Shen 2024).

Por último, los receptores GTG se unen a ABA en su estado GTG-GDP e inician la transducción de señales (Pandey et al. 2009). Sin embargo, en la literatura estos receptores no parecen tener un papel significativo en una amplia gama de condiciones (Fidler et al. 2022).

Tras haber enumerado y explicado los receptores de ABA, es fundamental comprender cómo la unión receptor-ABA inicia la cascada de señalización. Una vez el ABA se une a su receptor, empieza una cascada de transducción en la que participan fosfolipasas, proteínas-fosfatasa, proteínas-quinasas, proteínas G y segundos mensajeros, como el Ca^{2+} , ácido fosfatífico, ROS y NO y fosfolípidos (IP_3) (Israelsson et al. 2006; Finkelstein 2013; Postiglione and Muday 2020; Xu et al. 2024). En general, después de la actuación de los segundos mensajeros, actúan una red compleja de proteínas-quinasas y proteínas-fosfatasa. Por ejemplo, la SnRK2 (Quinasa serina/treonina relacionada con SNF1 tipo 2) desarrolla un papel fundamental en las respuestas mediadas por ABA (Hasan et al. 2022). Respecto a las PP2Cs dentro del grupo A encontramos varias implicadas en la ruta de señalización de ABA: ABI1, ABI2, HAB1 y ATpp2CA. Como ya vimos anteriormente, el receptor PYR/PYL/RCAR puede unir simultáneamente moléculas de fitohormonas e inhibir la PP2C, lo que conduce a la activación de otros elementos de la vía de señalización del ABA (Park et al. 2009). En el estado basal, la PP2C desfosforila la SnRK2, y, como resultado, suprime la actividad quinasa de SnRK2. En presencia de ABA, se forma el complejo ternario compuesto por ABA, PYR/PYL/RCAR y PP2C que inhibe la actividad de PP2C y, por tanto, inhibe la desfosforilación de SnRK2. En este sentido, las proteínas quinasas B2 y B3 Raf-like tienen

la capacidad de activar a SnRK2. Todo esto permite la fosforilación de SnRK2 y la activación de las proteínas diana, facilitando la respuesta al estrés mediada por ABA (Nishimura et al. 2010; Danquah et al. 2014; Lin et al. 2021).

Además de lo anteriormente descrito, otros mecanismos importantes e implicados en la cascada de señalización de ABA son los FTs. Primeramente, la presencia de ABA permite la activación de los SnRKs por fosforilación. Después, los SnRKs median la fosforilación y activación de los factores de transcripción ABF (“ABA-responsive Element Binding Factor”), los cuales pertenecen a la familia de FTs bZIP y son específicos de la señalización de ABA. Los ABF activados se unen directamente al elemento sensible al ABA (ABRE), un elemento *cis* importante en los genes sensibles a la presencia de ABA, y, además, activan la transcripción de otros FTs sensibles al estrés, como algunos NAC y algunos AP2/ERF, que también están implicados en modificar la expresión de genes de respuesta al estrés. Esta cascada transcripcional modifica el perfil transcriptómico, induciendo el sistema de defensa de la planta, para adaptarse y sobrevivir al estrés abiótico (Furihata et al. 2006; Yoon et al. 2020). De igual forma, otros FTs pertenecientes a la familia MYC7MYB y NAC también están modulados por las respuestas al estrés mediadas por el ABA. Pero aún se desconoce si las SnRK activadas por ABA desempeñan un papel en la regulación de estos FTs (Rehman et al. 2021).

4.6 Actividad biológica de ABA

El ABA es considerado la fitohormona de mayor importancia en los mecanismos de resistencia al estrés abiótico en plantas, por lo que los científicos la denominan como “hormona del estrés”. Los estudios iniciales revelaron que ABA regulaba la abscisión de las hojas y la latencia de las semillas (Ohkuma et al. 1963; Cornforth et al. 1965). No obstante, estudios posteriores demostraron que ABA no regula directamente la senescencia, sino que regula procesos que conducen a la senescencia (Xu et al. 2020). Actualmente se conoce que esta hormona está implicada en multitud de procesos en la planta: embriogénesis, maduración, latencia y germinación de las semillas, senescencia foliar, modulación de la arquitectura del sistema radicular, crecimiento y maduración de los frutos, transición foliar, reloj circadiano y en la defensa frente a agentes estresantes abióticos y bióticos (Ali et al. 2022; Gupta et al. 2022b; Kozaki and Aoyanagi 2022; Pizzio 2022). En esta tesis, nos centraremos en el papel crucial que desempeña ABA en la

mitigación de los efectos negativos del estrés abiótico en plantas mediante el cierre estomático, regulación de la expresión génica y de la síntesis de metabolitos y otros procesos bioquímicos relacionados con la tolerancia al estrés.

4.7 Papel de ABA en la respuesta de las plantas al estrés abiótico

El ABA es una de las fitohormonas más importantes en la regulación de las respuestas de las plantas frente a situaciones de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y el déficit hídrico. Esta hormona actúa como una señal clave que permite a las plantas ajustar su fisiología y metabolismo para minimizar los efectos adversos que producen a la plantas estos estreses ambientales (Sah et al. 2016; Dar et al. 2017). El ABA regula diversos procesos, incluyendo el cierre estomático, la acumulación de osmoprotectores y la expresión de genes relacionados con la tolerancia al estrés (Dar et al. 2017; Malini et al. 2023).

De igual forma, la respuesta al estrés abiótico mediada por ABA dependerá específicamente del estrés abiótico presente. Por ejemplo, Kumar *et al.* (2012) demostraron la importancia de la acumulación de osmoprotectores mediada por ABA en plántulas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) sometidas a altas temperaturas. En este estudio observaron que los osmolitos prolina, glicina betaína y trehalosa funcionan aguas abajo de ABA, mediando parcialmente el efecto protector de esta hormona (Kumar et al. 2012). Asimismo, en la revisión publicada por Yoshida et al. (2015) se muestra como los estudios de integración del mapa de interacción proteína-proteína con los datos del transcriptoma permiten dar un enfoque novedoso para determinar los FTs que actúan de forma específica al estrés. Así por ejemplo, la hélice-bucle-hélice básica (BHLH) 1 inducida por ABA (AIB1) está relacionada más estrechamente con el estrés salino que con el estrés osmótico (Yoshida et al. 2015). Además, esta respuesta mediada por ABA dependerá de si se trabaja con estreses simples o combinados. Por ejemplo, Liang *et al.* (2024) observaron que la aplicación de sal sensibilizó la respuesta estomática al estrés por sequía, un proceso que fue mediado tanto por ABA como por señales hidráulicas. Además, este grupo de investigadores demostró que la incorporación de la sequía a la salinidad podría favorecer que las plantas mantuvieran la relación Na^+/K^+ en las raíces, un proceso que fue altamente dependiente de la sensibilidad de la conductancia estomática al estrés y que podría verse afectada por los niveles endógenos

de ABA (Liang et al. 2024). No obstante, la respuesta de ABA varía según el tipo de estrés aplicado, como se observó en diversos estudios que destacaron la especificidad de los mecanismos de ABA en estreses simples y combinados. Por ello, comprender estas interacciones en profundidad es esencial para desarrollar estrategias de mejora en la tolerancia de las plantas frente a múltiples estreses abióticos.

4.8 Interacción de ABA con otras fitohormonas en respuesta al estrés abiótico

Pese a que el ABA regula una amplia gama de procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento, el desarrollo y la tolerancia a condiciones adversas, estos procesos no dependen únicamente de la acción de esta hormona. Las vías de respuesta al estrés abiótico en plantas están interconectadas mediante "nodos" o conexiones de diafonía, donde diferentes vías de señalización comparten componentes comunes. Las respuestas fisiológicas de las plantas a estos estreses surgen de la interacción antagónica o sinérgica entre varias fitohormonas, lo que resulta en cambios morfológicos, anatómicos, citológicos y bioquímicos (Kundu and Gantait 2017; Singh and Roychoudhury 2023).

4.8.1 Interacción entre ABA y giberelinas

El ABA y las giberelinas (GAs) funcionan como antagonistas en varios procesos de desarrollo como en la latencia, maduración y germinación de semillas, el crecimiento de las raíces y el control del tiempo de floración (Shu et al. 2016a, b; Yang et al. 2014; Wang et al. 2013). Por ejemplo, las GAs promueven la germinación de las semillas mediante la inhibición de la latencia, mientras que el ABA promueve la latencia de las semillas (Tuan et al. 2018).

De igual forma, las GAs tienen un papel en la mediación de la respuesta al estrés abiótico en plantas. En condiciones de estrés la forma bioactiva de la GA se inactiva por un incremento de la expresión de los genes GA2ox que codifican enzimas inactivadoras de GA. Con ello se conduce a la activación del represor DELLA en plantas como *Arabidopsis* y, por tanto, a un crecimiento restringido en condiciones de estrés regulado por DELLA (Magome and Kamiya 2018). Además, se ha observado que DELLA, específicamente el RGL2, estimula la actividad de algunas ABI y la formación de ABA mediante la proteína XERICO (Piskurewicz et al. 2008), lo que puede llevar a la

interacción entre ABI5 y RGA (un represor DELLA) que también regula la germinación bajo estrés térmico a través de la modulación de la expresión del gen SOM (SOMNUS). La proteína SOM liberada de este modo aumenta simultáneamente la biosíntesis de ABA y frena la biosíntesis de GA generando un bucle de retroalimentación positiva con ABI5 y RGA (Skubacz et al. 2016). Asimismo, se demostró que ABI4 regula al alza la función de NCED6 y GA2ox7, lo que resulta en una mayor formación de ABA y la inactivación de la GA, respectivamente y, finalmente, en la latencia prolongada de las semillas (Shu et al. 2016). Toda esta regulación permite asegurar la germinación de la semillas en condiciones ambientales favorables.

4.8.2 Interacción entre ABA y auxinas

Las interacciones entre auxina (AUX) y ABA regulan una amplia variedad de procesos de desarrollo, como la germinación, la elongación del hipocótilo o de las raíces y el crecimiento de los cotiledones (Emenecker and Strader 2020). Por ejemplo, las AUXs son indispensable para la inhibición de la germinación de las semillas dependiente del ABA, lo que sugiere la interacción entre el ABA y la AUX durante la latencia de las semillas (Liu et al. 2013).

Igualmente, la diafonía AUX-ABA está implicada en la regulación de las respuestas relacionadas con el estrés abiótico. Yuan *et al.* (2014) observaron que en *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés se producía el aumento de ABA que conllevaba a una sobreexpresión de ABI5, que a su vez inhibía la expresión del transportador de AUXs PIN1. Esto da lugar a una reducida translocación de AUX y, con ello, una reducción del meristemo de la raíz (Yuan et al. 2014). También Zhang *et al.* (2020) demostraron que el tratamiento exógeno con ácido indol-3-acético en el trébol blanco bajo estrés hídrico aumentaba significativamente la concentración de ABA (Zhang et al. 2020b). Por otro lado, el ARN pequeño regulado por auxinas 3 (SAUR3) implicado en la regulación del crecimiento adaptativo al estrés abiótico era inducido por ABA en plantas de *Arabidopsis* sometidas a sequía (He et al. 2021). Por último, un descubrimiento crucial en plantas de *Arabidopsis* realizado por Perez-Alonso et al. (2021) mostró que AMIDASE1, una enzima clave en la producción de ácido indol-3-acético a partir de indol-3-acetamida, regulaba la homeostasis de las AUXs al influir en la señalización de ABA. Además, este proceso

favoreció la acumulación de ABA y, con ello, desencadenó la respuestas al estrés en *Arabidopsis* mediada por ABA (Pérez-Alonso et al. 2021).

4.8.3 Interacción entre ABA y citoquininas

La interacción entre ABA y citoquininas (CKs) regula antagónicamente procesos como la latencia de los brotes, la senescencia de las hojas, la germinación de las semillas y la respuesta al estrés abiótico (Corot et al. 2017; Parwez et al. 2022; Singh and Roychoudhury 2023). Por ejemplo, ABI4 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4) desempeña un papel clave en la señalización de ABA y de CKs mediante la inhibición de la transcripción del regulador de respuesta ARR (*Arabidopsis*) para inhibir el enverdecimiento de cotiledones y la germinación de semillas (Huang et al. 2017).

La investigación con mutantes de las histidin-quininas de *Arabidopsis* (AHKs, “*Arabidopsis* histidine kinases”) ha permitido descifrar la conectividad entre ABA y CKs. Las AHKs funcionan como receptores de CK durante el estrés por sal y sequía y, además, AHK1 actúa como regulador positivo de la señalización del ABA, mientras que AHK2 y AHK3 ejercen como reguladores negativos del ABA durante las condiciones de estrés mencionadas (Tran et al. 2007; Skalak et al. 2021). La interacción entre ABA y CK también está mediada por el regulador de respuesta ARR y SnRK2. ABA regula negativamente la señalización de CK a través de la fosforilación de ARR5 mediada por SnRK2 que resulta en la represión de la vía de señalización de CKs (Huang et al. 2018). Asimismo, Nguyen et al. (2016) demostraron que el triple mutante de *Arabidopsis arr1arr10arr12* era más resistente al estrés por sequía debido a la supresión de la señalización de CK y a un aumento en la síntesis de ABA (Nguyen et al. 2016). Por otro lado, las enzimas citoquinina oxidasa (CKX) median en la degradación de la CK y algunas de ellas (CKX1, CKX3, CKX4, y CKX6) están reguladas por ABA (Werner et al. 2006). Así, la sobreexpresión constitutiva de CKX1 se asocia a una mayor tolerancia tanto a la sequía como al estrés térmico (Macková et al. 2013).

4.8.4 Interacción ABA y etileno

El etileno (ET) también es considerado una fitohormona asociada al estrés. La interacción entre ABA y ET depende del proceso de desarrollo de la planta y de sus niveles endógenos. No obstante, la diafonía entre ABA y ET puede ser tanto positiva

como negativa. Por ejemplo, la senescencia floral se acelera en presencia de estas dos hormonas en flores de petunia (Chang et al. 2014) y la maduración del fruto del mango está regulada por ABA y la producción de ET mediada por ABA (Zaharah et al. 2013).

Entre los procesos que regulan ambas fitohormonas cabe destacar la regulación del cierre estomático, debido a su relevancia en la tolerancia al estrés. Tanto el ABA como el ET son fitohormonas que inducen el cierre estomático en plantas sometidas a estreses como el déficit hídrico. Sin embargo, existe cierta controversia en cómo estas hormonas interactúan para producir este cierre estomático (Tissera and Ayres 1986; Tanaka et al. 2005; Ge et al. 2015; Wang et al. 2020a). Algunos estudios defienden el antagonismo de estas dos fitohormonas, por ejemplo, Song et al. (2023) demostraron que el ET inhibe el cierre estomático inducido por ABA al regular la biosíntesis de flavonol mediada por NtMYB184 en el tabaco (Song et al. 2023). Sin embargo, otros estudios han demostrado que ambas fitohormonas actúan de forma sinérgica. Hassan et al. (2024) observaron que el ET podría actuar sinérgicamente con el ABA para inducir el cierre estomático en plantas sometidas bajo ciertos estreses, como bajas temperaturas o contaminación por metales pesados (Hasan et al. 2024). Asimismo, ET y ABA tienen la capacidad de influir mutuamente en sus rutas biosintéticas o de señalización, que a su vez regulan el movimiento estomático dependiendo de las condiciones ambientales (Daszkowska-Golec and Szarejko 2013; Munemasa et al. 2015). Por ejemplo, contenidos elevados de ABA, como los que ocurren en condiciones de estrés hídrico, modulan negativamente la biosíntesis de ET (Sharp 2002). Esta inhibición posiblemente esté mediada por el factor de transcripción ABI4, a través de la represión de los genes de biosíntesis de ET ACS4 y ACS8 en *Arabidopsis* (Dong et al. 2016). En resumen, el ABA parece aumentar los niveles de H₂O₂ que finalmente dan lugar al cierre estomático; sin embargo, el ET promueve el cierre estomático a través del aumento de H₂O₂ dependiente de AtrbohF mediante la activación de la proteína Gα (Shi et al. 2015). Por último, la presencia tanto de ABA como de ET aumenta la actividad antioxidante y reduce el contenido de H₂O₂, lo que provoca una disminución del cierre. En cualquier caso, se necesitan más investigaciones para dilucidar si este proceso es regulado por la interacción ABA-ET, o si ambos operan de manera independiente y en paralelo (Müller 2021). Por otro lado, hay estudios específicos que explican la diafonía entre ABA y ET en respuesta al estrés. Li *et al.* (2019)

demonstraron que ABA regulaba positivamente la acción del ET bajo estrés osmótico en raíces de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Li et al. 2019a). También se ha propuesto que el ET es un activador de la biosíntesis de ABA bajo estrés UV-B (Rakitin et al. 2009).

En resumen, la interacción entre ABA y ET parece depender de sus niveles endógenos. Las altas concentraciones de ambos conducen a una inhibición mutua; las concentraciones bajas parecen activar la biosíntesis del otro bajo ciertas condiciones ambientales; y la presencia conjunta de ABA y ET fomenta la producción de antioxidantes (Müller 2021). No obstante, el mecanismo específico de cómo se reprimen o se estimulan mutuamente a nivel transcripcional, o si actúan de manera independiente o en paralelo, requiere de más investigación.

4.8.5 Interacción entre ABA y melatonina

La melatonina (MEL) en un principio fue considerada un antioxidante, pero actualmente es un regulador maestro que desempeña un papel en el crecimiento y desarrollo de la planta y en la respuesta de la planta al estrés (Arnao and Hernández-Ruiz 2009, 2018). La MEL interacciona con el ABA de forma sinérgica y antagónica dependiendo de la especie y de las diferentes condiciones de estrés (Singh and Roychoudhury 2023).

Por un lado, la MEL puede reducir la respuesta al estrés mediada por ABA. Li et al. (2015) observaron que el pretratamiento con MEL aumenta significativamente la tolerancia al estrés por sequía tanto de plantas de *Malus prunifolia* tolerantes a la sequía como de plantas de *M. hupehensis* sensibles a la sequía al mismo tiempo que los genes catabolizadores de ABA (MdCYP707A2 y MdCYP707A1) y un gen anabolizador de ABA (MdNCED3) fueron regulados al alza y a la baja, respectivamente (Li et al. 2015). También, la MEL suprimió la expresión de genes relacionados con la síntesis y señalización de ABA, específicamente LpABI5, LpABI3 y LpNCED3 en hojas de *Lolium perenne* sometidas al estrés por altas temperaturas y NCED1, PYL4, AAO, y PP2Cs en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) bajo estrés por sequía, lo que resultó en el retraso de la senescencia de sus hojas (Zhang et al. 2017; Wang et al. 2021a). Por último, la aplicación de MEL en plantas de patatas crecidas bajo estrés por sequía aumentó la tolerancia de estas a pesar de reducir los niveles de ABA. Los resultados parecieron

indicar que la MEL puede regular el proceso de tuberización de las plantas de patata, por un lado, dificultando el transporte de ABA desde la raíz al sistema de brotes y, por otro, aumentando los azúcares no reductores (El-Yazied et al. 2022).

En contraste con las investigaciones anteriores, varios estudios han demostrado una interacción positiva entre el ABA y la MEL. Fu *et al.* (2017) demostraron que la aplicación de MEL inducía la acumulación de ABA y que tanto las vías dependientes como las independientes de ABA inducidas por MEL pudieron contribuir a la tolerancia al frío en *Elymus nutans* (Fu et al. 2017). También, Li et al. (2016) demostraron que en plantas de cebada deficientes en ABA (mutantes Az34), la aplicación exógena de MEL mejoró significativamente el contenido de clorofila bajo estrés por frío. Sin embargo, la aplicación de MEL en plantas no deficientes en ABA permitió un mejor estado hídrico debido a la acción conjunta de estas dos hormonas (Li et al. 2016). De otra forma, Li et al. (2019) mostraron que la MEL aumentaba la formación de ABA a través de la inducción en la expresión de genes biosintéticos de ABA y de la inhibición de la transcripción de un gen catabolizador de ABA, confiriendo así un mayor nivel de tolerancia contra el estrés por sequía en la sandía (Li et al. 2019c). Asimismo, la MEL también aumentó el nivel de ABA en *Fragaria ananassa* crecida bajo estrés salino, lo que resultó en un mayor nivel de tolerancia de las plantas (Zahedi et al. 2020).

4.8.6 Interacción entre ABA y el ácido jasmónico

El ácido jasmónico (Jas) también desempeña un importante papel en la tolerancia al estrés en plantas. La interacción entre el ABA y el Jas regula procesos importantes en las plantas como la senescencia de las hojas, el cierre estomático y la adaptación a una amplia gama de estreses (Singh and Roychoudhury 2023).

Varios estudios han demostrado la implicación de ambas fitohormonas en la señalización del estrés. No obstante, aún quedan muchas preguntas por responder sobre la manera en que interactúan. El modelo SAPK10-WRKY72-AOS1 deducido por Hou *et al.* (2019) explica una de las interacciones positiva entre ABA y Jas en plantas de arroz infectadas por el tizón bacteriano (*Xanthomonas oryzae*). WRKY72 es un represor de la actividad de AOS1 que finalmente cesa la formación de Jas. Sin embargo, ABA puede activar efectivamente SAPK10 (una quinasa SnRK2) que a su vez fosforila y desactiva

WRKY72 y, por lo tanto, restaura el nivel de Jas restaurando la actividad de AOS1 (Hou et al. 2019). De Olla et al. (2012) también propusieron un modelo para las raíces de cítricos sometidas a estrés por sequía severa, en el que se observó una explosión de Jas que conducía a una acumulación gradual de ABA, lo cual a su vez inducía respuestas subsecuentes en la planta. Este modelo demuestra que la acumulación de Jas es esencial para el incremento de los niveles de ABA (de Ollas et al. 2013). Por otro lado, un regulador clave de los genes implicados en las respuestas al estrés abiótico y biótico, que está relacionado con el Jas y el ABA, es el FBS1 ('F-BOX STRESS INDUCED 1'). Su relevancia radica en que FBS1 modula el equilibrio entre Jas y la red de genes asociados con el estrés inducido por ABA, sugiriendo que juega un papel crucial en la regulación de las respuestas al estrés mediadas por ambos, ABA y Jas (Gonzalez et al. 2017).

Asimismo, las proteínas señalizadoras de Jas y las proteínas señalizadoras de ABA interactúan para formar una respuesta conjunta. Por ejemplo, Aleman *et al.* (2016) demostraron la interacción entre MYC2, regulador clave en la señalización de Jas, y el receptor de ABA PYL6 en plantas *Arabidopsis* (Aleman et al. 2016). También Sun *et al.* (2020) identificaron la interacción entre JAZ1, molécula señalizadora de Jas, y otro receptor de ABA llamado PYL4 en plantas *Arabidopsis* (Sun et al. 2020). Otros importantes FTs en la señalización de ABA son los ABIs y se ha demostrado que ABI3 y ABI5 interactúan con JAZs, lo que permite la germinación de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*) y de *Arabidopsis* (Varshney and Majee 2021). Además, Gupta *et al.* (2021) confirmaron que las proteínas JAZ en conexión con la señalización mediada por ABA dan lugar a una mayor tolerancia a la sequía (Gupta et al. 2021). Por otra parte, en plantas *Arabidopsis* un mediador de la señalización de ABA y Jas es MED25. MED25 se asocia físicamente con el factor de transcripción MYC2, regulador clave en la señalización de Jas, en regiones promotoras de genes diana de MYC2 y ejerce un efecto positivo sobre la transcripción génica regulada por MYC2. Sin embargo, cuando MED25 se asocia físicamente con el factor de transcripción ABI5, regulador clave en la señalización por ABA, en regiones promotoras de genes diana de ABI5 parece producir un efecto negativo en la transcripción de genes regulados por ABI5 (Chen et al. 2012).

4.8.7 Interacción entre ABA y ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es conocido por regular la resistencia a estreses bióticos y, también, es de importancia en la tolerancia a diversos estreses abióticos (Wang et al. 2021b). Sorprendentemente, la sobreexpresión de los genes PR, que inicialmente están vinculados a la resistencia a patógenos y se inducen por SA, también están implicados en el aumento de la tolerancia a varios estreses abióticos (Sarowar et al. 2005; Wu et al. 2016).

La interacción de ABA y SA puede ser positiva o negativa dependiendo de la concentración de estas hormonas y el estrés de estudio. Por un lado, ABA produce una supresión de la vía de señalización dependiente de SA cuando las plantas están infectadas por patógenos, lo que provoca una mayor susceptibilidad frente al patógeno en plantas de tomate, de arroz o de cebada (Jiang et al. 2010; Ulferts et al. 2015; Kusajima et al. 2017; Urban et al. 2017). Sin embargo, ABA y SA parecen ser capaces de regular positivamente la respuesta frente a algunos estreses abióticos (Koo et al. 2020). La aplicación de SA en plantas de tomate, cebada y trigo bajo las condiciones de estrés por sequía, déficit hídrico y cadmio o frío, respectivamente, aumentó la síntesis de ABA y, a su vez, la tolerancia al estrés (Bandurska and Stroi ski 2005; Muñoz-Espinoza et al. 2015; Shakirova et al. 2017; Wang et al. 2018a). Por tanto, parece existir un efecto sinérgico entre ambas hormonas en respuesta a diferentes estreses abióticos en distintas plantas. En definitiva, el ABA parece modular de forma antagónica la resistencia a enfermedades causadas por agentes bióticos a través de la vía del SA; sin embargo, ABA y SA también pueden cooperar para promover la tolerancia al estrés abiótico.

4.8.8 Interacción entre ABA y brasinoesteroides

La interacción entre ABA y brasinoesteroides (BRs) aún es poco estudiada. Hay autores que defienden una interacción sinérgica y otros la interacción antagónica. Por ello, la información sobre su papel en la respuesta a ambientes estresantes es aún limitada.

Estas dos fitohormonas se comportan de forma antagónica en la mayoría de los casos, por ejemplo, procesos como la germinación de semillas o el crecimiento de la raíz

primaria, están inducidos y reprimidos por la señalización de BRs y ABA, respectivamente (Wang et al. 2020b).

Sin embargo, en algunos casos, los BRs activan la señalización del ABA para incrementar la expresión de genes específicamente regulados por ABA. Wang *et al.* (2019) observaron que la aplicación exógena de 24-epibrasinólida (EBR) en *Vitis vinifera* bajo estrés por sequía incrementaba la expresión de VvNCED1, VvNCED2 y VvZEP (genes biosintéticos de ABA) y VvaBF1, VvaBF2, VvPP2C4 y VvSnRK2.6 (genes de señalización de ABA) (Wang et al. 2019b). También la aplicación de EBR en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo estrés hídrico aumentó la concentración de ABA y la tolerancia al estrés (Yuan et al. 2010). Además, Zhou *et al.* (2014) observaron que BRs y ABA actúan sinérgicamente aumentando la producción de H₂O₂, la actividad de la enzima NADPH oxidasa y la tolerancia al estrés por altas temperaturas y por paraquat en plantas de tomate (Zhou et al. 2014). En cambio, entre los mecanismos moleculares que regulan la interacción antagónica de ABA y BRs cabe destacar el papel de la quinasa BIN2 (“Brassinosteroid-Insensitive2”). BIN2 actúa como regulador negativo en la vía de señalización de BRs a través de la inactivación de BZR1 y BES1, que son FTs en *Arabidopsis thaliana* y los principales componentes que inducen la expresión génica regulada por BR (Yu et al. 2011). En contraste, BIN2 podría fosforilar y activar quinasas que son reguladoras positivas de la señalización de ABA y que actúan aguas arriba de ABI5 (Cai et al. 2014). Por último, Hu and Yu (2024) también observaron que la aplicación de BRs exógenos suprime la asociación BIN2-ABI5 y antagoniza la inhibición mediada por ABA durante la germinación de las semillas de *Arabidopsis* (Hu and Yu 2014).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sudeste español, y particularmente la Región de Murcia, se caracteriza por un clima semiárido con altas temperaturas y una escasez crónica de recursos hídricos. Estas condiciones climáticas hacen que las plantas cultivadas en esta región, como el tomate, estén constantemente expuestas a diversos estreses abióticos, como las altas temperaturas, la sequía y la salinidad. La tolerancia de las plantas a estos factores de estrés es crucial para asegurar la productividad y sostenibilidad agrícola en esta área geográfica.

El estudio de la respuesta de las plantas de tomate a estos estreses abióticos resulta fundamental para comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares que subyacen a su capacidad de adaptación y supervivencia en entornos hostiles. La mayoría de los estudios sobre la respuesta de las plantas al estrés abiótico se han enfocado en cómo éstas reaccionan a un solo estrés. Sin embargo, en la última década ha aumentado el interés en analizar cómo responden ante la combinación de múltiples estreses abióticos. Esto es especialmente relevante en zonas agrícolas con problemas de salinidad, ya que suelen ubicarse en regiones áridas o semiáridas, donde el efecto de la salinidad se ve influenciado por factores ambientales como las altas temperaturas y el déficit hídrico. Comprender las complejas respuestas de las plantas a la combinación de estreses podría ser clave para desarrollar cultivos más resistentes a las condiciones climáticas adversas, lo que contribuiría a mejorar la producción global de alimentos y garantizar un suministro sostenible en el futuro.

En esta tesis doctoral se utilizaron mutantes de tomate *flacca* o *flc* deficientes en ácido abscísico (ABA), una hormona que desempeña un papel central en la respuesta al estrés en las plantas. El ABA juega un papel fundamental en la modulación de mecanismos fisiológicos y moleculares que permiten a las plantas adaptarse y sobrevivir a condiciones adversas. No obstante, el entendimiento actual sobre cómo el ABA actúa frente a diferentes situaciones de estrés combinado y cómo éste influye en las respuestas integradas de las plantas aún es limitado.

Este estudio se enfoca en dos variedades de tomate *Solanum lycopersicum* con características genéticas bien definidas: la variedad Micro-Tom y la variedad comercial Rheinlands Ruhm. Utilizando mutantes deficientes en la síntesis y acumulación de ABA, específicamente mutantes *flc*, se investigó el impacto de la ausencia de ABA en la respuesta a estrés salino, altas temperaturas y la combinación de ambos estreses en la variedad Micro-Tom. Con el objetivo de estudiar la combinación de estreses abióticos en entornos de campo real y sus efectos en el fruto de tomate, se empleó la variedad Rheinlands Ruhm bajo condiciones de estrés salino, déficit hídrico y la combinación de ambos durante dos estaciones anuales bien diferenciadas: primavera-verano y otoño-invierno. Es importante destacar que esta variedad comercial, al desarrollarse en condiciones de campo durante dos estaciones diferentes, también se vio influenciada por la temperatura del entorno, la intensidad luminosa y la humedad ambiental predominantes en esas épocas del año.

Durante esta tesis doctoral se realizará un análisis exhaustivo que abarcará aspectos fisiológicos, ionómicos, transcriptómicos y metabolómicos para obtener una comprensión más completa de los mecanismos implicados en la respuesta de las plantas a estreses simples o combinados y el papel que el ABA juega en esas respuestas.

A través de una serie de objetivos bien definidos, este estudio tiene como propósito:

1. Caracterizar fisiológicamente la parte aérea y las raíces de los mutantes ABA-deficientes *flacca (flc)* de plantas de tomate variedad Micro-Tom, bajo condiciones control, estrés por salinidad, estrés por altas temperaturas, y la combinación de ambos estreses.
2. Identificar genes independientes de ABA implicados en las rutas de transducción de señales frente a la combinación de salinidad y altas temperaturas en plantas de tomate variedad Micro-Tom.
3. Entender la implicación de ABA en la respuesta integrada de multiómicas (fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica) en hojas de plantas de tomate ABA deficientes variedad Micro-Tom bajo condiciones control, estrés salino, estrés por altas temperaturas y la combinación de ambos estreses.
4. Comprender el papel de ABA en el crecimiento de las raíces, la absorción de iones y el perfil metabólico de las raíces de plantas de tomate, variedad Micro-Tom,

bajo condiciones control, estrés salino, estrés por altas temperaturas y la combinación de ambos estreses.

5. Determinar la dosis óptima de ABA exógeno requerida para restaurar el fenotipo silvestre en las líneas mutantes ABA-deficientes *flacca* (*flc*) de plantas de tomate variedad Micro-Tom.
6. Dilucidar la respuesta fisiológica e identificar marcadores metabólicos en los frutos de plantas tomate deficientes en ABA de la variedad comercial Rheinlands Ruhm bajo condiciones control, estreses simples (salinidad y déficit hídrico) o la combinación de ambos estreses.

Este enfoque integral permitirá identificar nuevas vías y mecanismos asociados con la regulación del estrés en plantas, y contribuirá a desarrollar estrategias para mejorar la resistencia de los cultivos en un contexto de cambio climático.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Plantas de tomate

Las variedades de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* utilizadas en esta tesis doctoral fueron: Micro-Tom (planta modelo) para los experimentos detallados en los capítulos I, II y III y Rheinlands Ruhm (planta comercial) para aquellos descritos en el capítulo IV. A su vez, de cada una de estas variedades se utilizaron dos genotipos: silvestres (WT) y mutantes deficientes en ABA (*flacca*, *flc*) (**Imagen 3**). Los mutantes fueron generosamente donados por *Rick Tomato Genetics Resource Center* (TGRC), UC Davis, CA, EE.UU., acceso LA4479. Los mutantes *flc* se caracterizan por una mutación en el gen que codifica la sulfurasa del cofactor de molibdeno o MOCOS (Solyc07g066480). Esta enzima sulfura al MoCo, un paso necesario para la activación de las AOs (Tal et al. 1970). La activación de esta enzima es necesaria para el paso de aldehído abscísico a ABA catalizado por la AAO y, por tanto, su mutación da lugar a unas plantas deficientes en ABA (ver apartado “4.2 Mutantes deficientes de ABA” de la sección Introducción).



Imagen 3. Plantas de tomate *Solanum lycopersicum* bajo condiciones control. A) Variedad Rheinlands Ruhm y genotipo silvestre. B) Variedad Rheinlands Ruhm y genotipo mutante *flc*. C) Variedad Micro-Tom y genotipo silvestre. D) Variedad Micro-Tom y genotipo mutante *flc*.

2. Cámaras de cultivo

Las cámaras de cultivo pertenecen a la infraestructura científica del Centro de Edafología y Biología Aplicada de Segura (CEBAS), localizada en el campus universitario de Espinardo, Murcia. Estas cámaras de 11 m² disponen de 8 bancadas con tubos de lueces LEDs regulables en intensidad y cada cámara está equipada con sensores y sistemas de control de humedad, temperatura e intensidad lumínica, lo que nos permitió realizar experimentos bajo condiciones muy controladas. Además, las cámaras disponen de un sistema regulable de aireación mediante tubos, necesario para los sistemas de hidroponía empleados en esta tesis (**Imagen 4**).

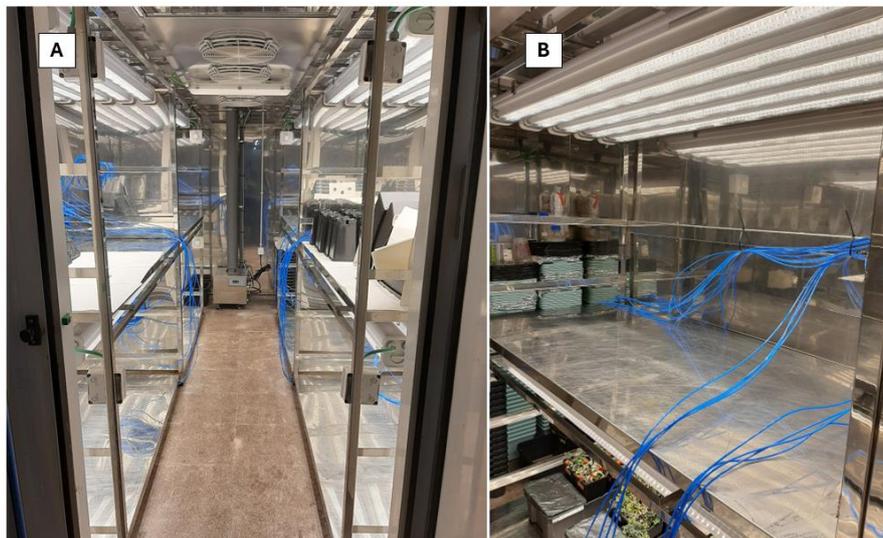


Imagen 4. Cámaras de cultivo controladas. A) Cámara de cultivo con 8 bancadas. B) Detalle de una bancada de la cámara de cultivo.

3. Invernadero

El invernadero utilizado en el capítulo IV de esta tesis doctoral se sitúa en la finca experimental del CEBAS, situada en La Matanza, en el municipio de Santomera de la Región de Murcia. El invernadero es de tipo multitúnel construido con placas de policarbonato y techo de polietileno y su tamaño es de 650 m² de superficie y 4,5 m de altura (**Imagen 5**). Además, está equipado con un sistema de refrigeración del tipo *cooling-system* que mantiene la temperatura por debajo 35 °C y dispone de ventiladores en la parte trasera del invernadero. En invierno se utilizan generadores de aire caliente

por combustión indirecta (SIAL Mirage 65) que mantiene la temperatura por encima de 9 °C. Además, dispone de mallas térmicas para retener el calor.



Imagen 5. Invernadero tipo multitúnel en la finca experimental del CEBAS, situada en La Matanza, en el municipio de Santomera de la Región de Murcia.

4. Germinación de semillas

Primeramente, las semillas se esterilizaron con lejía al 5% durante 15 min y después se hicieron aproximadamente 5 lavados con agua destilada estéril para retirar la mayor cantidad posible de lejía. Las semillas esterilizadas se germinaron en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada y se guardaron en oscuridad a aproximadamente 28 °C hasta la aparición de la radícula. Después las semillas fueron traspasadas a bandejas con vermiculita humedecida con agua destilada y se taparon con Parafilm agujereado para crear un ambiente húmedo. Estas bandejas se mantuvieron bajo condiciones óptimas de germinación y crecimiento para plantas de tomate (25/20 °C día/noche, intensidad luminosa de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, fotoperíodo de 16/8 h

día/noche y humedad relativa del 60-80%). El parafilm transparente fue retirado una vez que aparecieron los cotiledones (**Figura 9**).

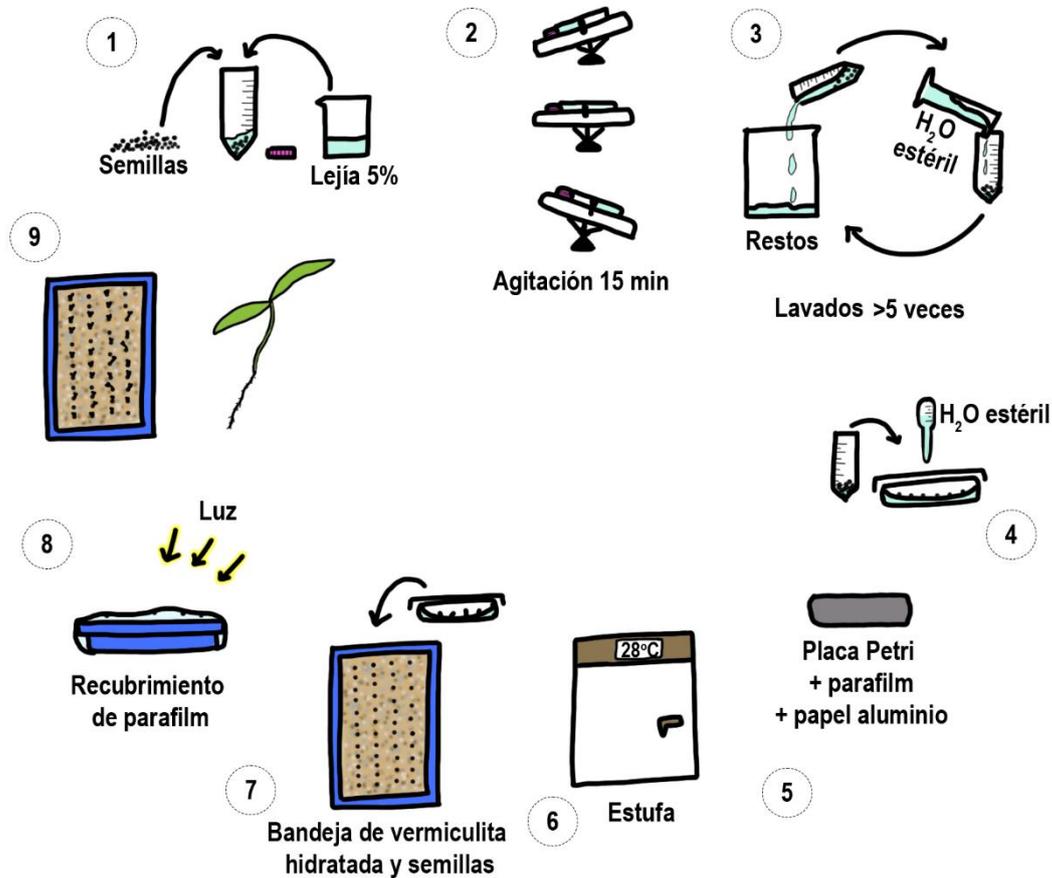


Figura 9. Proceso de esterilización y germinación de semillas.

Una vez retirado el Parafilm, las plántulas se riegan con solución Hoagland modificada hasta que éstas fueron lo suficientemente grandes para ser trasplantadas (tras la aparición de las 2-3 primeras hojas verdaderas bien desarrolladas) a cultivo hidropónico en el caso de la variedad Micro-Tom o cultivo en sustrato en la variedad Rheinlands Ruhm. La solución Hoagland modificada tenía la siguiente composición: KNO₃ (6 mM), Ca(NO₃)₂ (4 mM), MgSO₄ (1 mM), KH₂PO₄ (1 mM), KCl (50 μM), Fe-EDTA (20 μM), H₃BO₃ (25 μM), MnSO₄·H₂O (2 μM), ZnSO₄·4·7H₂O (2 μM), CuSO₄·5H₂O (0,5 μM) y (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0.5 μM) (Hoagland and Arnon 1950).

5. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom

El cultivo hidropónico llevado a cabo en las cámaras de cultivo, así como los tratamientos y la aplicación de ABA exógena descritos en este apartado, forman parte de la metodología desarrollada en los experimentos correspondientes a los capítulos I, II y III de esta tesis doctoral.

5.1 Cultivo hidropónico en cámara de cultivo

Una vez las plantas de la variedad Micro-Tom tuvieron al menos dos hojas verdaderas, las plantas se trasplantaron a un sistema hidropónico aireado que contenía una solución Hoagland modificada (igual a la mencionada en el apartado anterior), y se cultivaron en las mismas condiciones controladas hasta que todas desarrollaron cuatro hojas verdaderas. Este sistema hidropónico consiste en una cuba con capacidad 7,5 L o 9 L llenas de solución Hoagland modificada (**Imagen 6**). El pH de la solución nutritiva se medía diariamente y se mantuvo 5,2-5,7 (phmetro CRISON PH25) durante todo el experimento. La solución nutritiva se renovó cada 3-5 días, dependiendo del tamaño de las plantas.

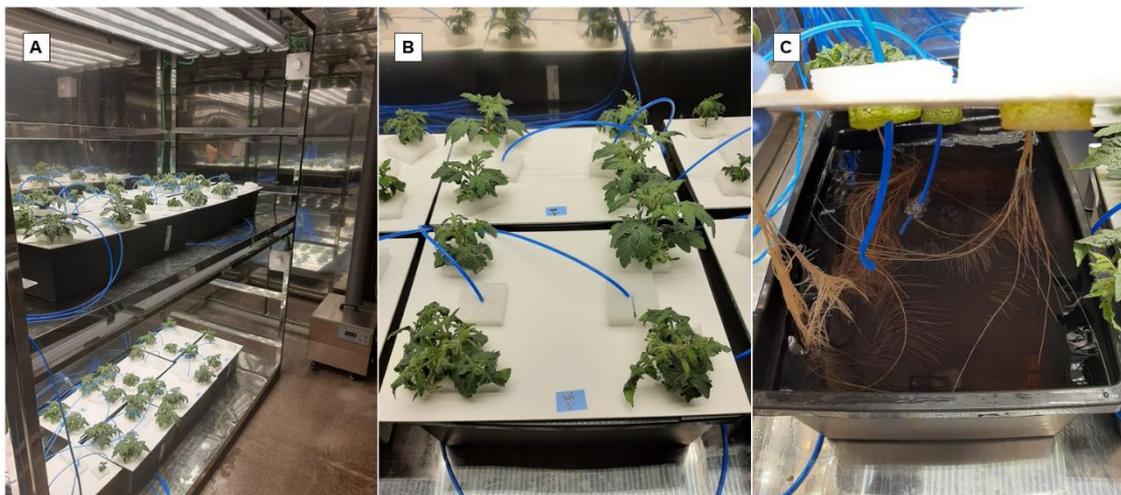


Imagen 6. Cultivo hidropónico. A) Sistema de cultivo hidropónico con el uso de cubas de 7,5 litros. B) Visión más cercana del sistema de aireación y de la disposición de las plantas en el cultivo hidropónico. C) Raíces sumergidas en la solución nutritiva aireada por tubos de aireación.

5.2 Crecimiento y tratamientos en las plantas

Después de la aclimatación de las plantas al sistema hidropónico y cuando las plantas tuvieron al menos 4 hojas verdaderas se les aplicó los tratamientos de estudio. La mitad de las plantas de cada genotipo (24 *flc* y 12 WT) se transfirieron de la cámara A (cámara control de las plantas; 25/20 °C día/noche, intensidad luminosa de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, fotoperíodo de 16/8 h día/noche y humedad relativa del 60-80%) a la cámara B, con parámetros de luz, fotoperíodo y humedad idénticos a los de la cámara A, excepto la variable de temperatura ambiental, que se fijó en 35 °C, mientras que en la cámara A la temperatura se mantuvo en 25 °C. Al mismo tiempo, la mitad de las plantas (12 *flc* y 12 WT) de cada genotipo recibieron 100 mM NaCl en su solución nutritiva. Por tanto, el experimento consistió en cuatro tratamientos (**Figura 10**): control (25 °C y 0 mM NaCl; C), salinidad (25 °C y 100 mM NaCl; S), altas temperaturas (35 °C y 0 mM NaCl; H), y salinidad + altas temperaturas (35 °C y 100 mM NaCl; S+H). En paralelo, la mitad de nuestros mutantes *flc* de cada grupo de tratamiento (24 plantas, con 6 plantas por tratamiento) recibieron una aplicación exógena de 100 μM de ABA mediante una pulverización foliar (concentración de ABA basada en un experimento preliminar, descrito en el apartado siguiente). Las plantas *flc* sin ABA exógeno se nombraron *flc*- y las que recibieron ABA exógeno fueron denominadas *flc*+

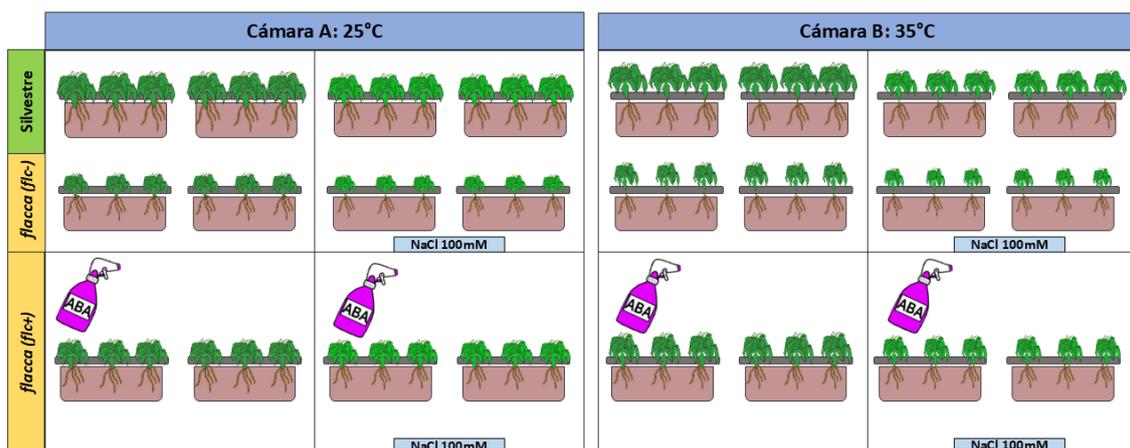


Figura 10. Experimento en hidroponía de plantas de tomate variedad Micro-Tom. De izquierda a derecha se diferencian los tratamientos: control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. De arriba abajo los distintos grupos de plantas: silvestres o WT, *flc*- (sin ABA exógeno), *flc*+ (con ABA exógeno).

Las plantas estuvieron bajo condiciones de estrés durante 10 días. Después se separaron las plantas en raíces y hojas para ser almacenadas. Este experimento fue repetido 3 veces teniendo en cuenta las mismas condiciones. Dependiendo del objetivo del experimento y de las aproximaciones experimentales a realizar, las muestras se almacenaron en un congelador a -80 °C o en una estufa de aire forzado a 60 °C.

5.3 Aplicación de ABA exógeno

La aplicación de ABA se llevó a cabo en dos tipos de experimentos. El primero se realizó con el objetivo de determinar cuál era la aplicación foliar más eficiente para estas plantas, buscando lograr la mejor recuperación fenotípica posible. Así, se llevó a cabo la aplicación foliar de 0, 50, 100, 150 μM de ABA, resultando 100 μM de ABA como el tratamiento más efectivo. Estos tratamientos se repitieron tres veces por semana durante aproximadamente dos meses. Tras esto, se realizó el segundo experimento, explicado en el subapartado anterior, con una aplicación foliar de ABA a 100 μM . Las soluciones de aplicación foliar se suplementaron con 100 μl del detergente Tween 20 (Thermo Scientific™) por cada 500 ml, lo que favoreció una mayor adhesión de las gotas a la parte aérea de la planta.

6. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm

Los distintos subapartados desarrollados en este apartado 6 forman parte de la metodología correspondiente a los experimentos llevados a cabo en el capítulo IV de esta tesis doctoral.

6.1 Cultivo en sustrato en el invernadero

El cultivo sin suelo consiste en el crecimiento de las plantas sin utilizar suelo como medio nutritivo, de enraizamiento y de sostén en plantas. En la literatura comúnmente utilizamos como sinónimos “cultivo sin suelo” y “cultivo hidropónico”, ya que ambos son cultivos que no utilizan el suelo. Sin embargo, y debido a la controversia entre ambos términos, en los últimos años algunos autores han clasificado en dos grupos los cultivos sin suelo: el “cultivo en sustrato” donde las raíces crecen en un sustrato inerte irrigado con solución nutritiva y el “cultivo hidropónico” donde las raíces de las plantas no usan

sustrato y están inmersas en la solución nutritiva líquida (Olubango and Alade 2018; Resh 2022). En nuestro caso, las plantas de la variedad Micro-Tom crecieron en “cultivo hidropónico”, y las plantas de variedad comercial crecieron en “cultivo en sustrato”. El motivo principal de esta forma de cultivo fue controlar el aporte nutritivo en las plantas, con vistas a los ensayos de ionómica, factor no controlable en un suelo convencional.

Tras aproximadamente un mes desde la germinación, las plantas de tomate fueron trasplantadas desde las bandejas de germinación almacenadas en cámaras de cultivo bajo condiciones controladas a los ladrillos de fibra de coco (sustrato inerte) bajo condiciones de invernadero (Finca experimental del CEBAS, Santomera, Murcia, España). Las plantas fueron regadas automáticamente con una solución nutritiva Hoagland modificada preparada en cubas de 500 L y la periodicidad del riego fue llevada a cabo mediante un sistema de riego por goteo programado. Además, las plantas fueron entutoradas mediante hilos gruesos y clips entutoradores y una o dos veces por semana se podaban y se quitaban los vástagos que brotaban de las ramas principales, siguiendo los estándares de manejo agronómico típicos para las plantas de tomate (**Imagen 7**).



Imagen 7. Cultivo en sustrato de las plantas del experimento de plantas de tomates comerciales. A) Visión general. B) Enfoque detallado del sistema de entutoramiento de las plantas en fase vegetativa.

6.2 Crecimiento y tratamientos en las plantas de tomate

Tras tres semanas de aclimatación y crecimiento de los diferentes genotipos de tomate empleados en esta tesis en los ladrillos de fibra de coco, se empezaron a aplicar los distintos tratamientos de estrés. La salinidad se aplicó con la solución nutritiva y consistió en 75 mM de NaCl y, por otro lado, el déficit hídrico se aplicó reduciendo el riego hasta llegar al 20-40% de la capacidad de campo total de las plantas bien irrigadas. Con este fin, se utilizaron dos goteros con distinta velocidad de riego: 1,3 l/h y 2 l/h. Los tratamientos finales fueron (**Figura 11**): control (C), salinidad (S), déficit hídrico (WD) y salinidad + déficit hídrico (S+WD). La aplicación del estrés perduró hasta el final del experimento. El mismo experimento se realizó en dos épocas del año: otoño-invierno (octubre 2022-febrero 2023) y primavera-verano (marzo 2023-julio 2023). Los frutos rojos se recolectaron en febrero (invierno) y en junio (verano), respectivamente. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

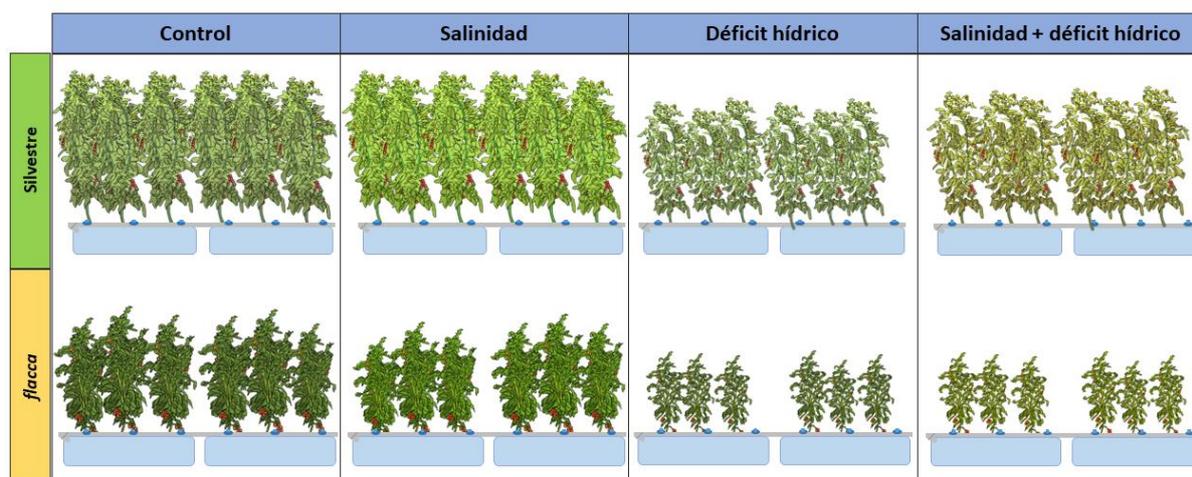


Figura 11. Experimento de plantas de tomate variedad Rheinlands Ruhm en invernadero. De izquierda a derecha se diferencian los tratamientos: control, salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico. De arriba abajo los distintos genotipos: WT o silvestre y *flacca* o *flc*.

6.3 Estación de crecimiento y muestreo de las plantas de tomate

Las plantas variedad Rheinlands Ruhm se cultivaron en invernadero en dos épocas del año diferentes: otoño-invierno (octubre-febrero, 2022-2023) y primavera-verano (abril-julio, 2023). Las plantas de otoño-invierno las hemos denominado como “plantas de la época fría” y las plantas de primavera-verano las hemos denominado como

“plantas de época cálida”. El motivo de este estudio fue determinar si la temperatura, la humedad y la radiación luminosa en un invernadero de condiciones controladas interaccionaba con los estreses que aplicamos a nuestras plantas (salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico), partiendo de la base de que el efecto multifactorial cambia la respuesta de las plantas a su entorno (Zandalinas and Mittler 2022). Por ello, en los invernaderos se registraron medidas de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad (%) y radiación (W m^{-2}) cada 5 minutos desde el mes de octubre de 2022 hasta el mes de julio de 2023.

7. Análisis de parámetros fisiológicos o fenómica

7.1 Medición de estomas mediante microscopía óptica

El número de estomas y la apertura estomática en hojas de la variedad Micro-Tom se determinó mediante impresiones epidérmicas de la hoja en portaobjetos de 50 x 75 mm con ayuda de celo semitransparente y de acetona pura (**Imagen 8**). La acetona derrite el plástico del celo y tras presionar la hoja contra el porta se consigue la impresión de los estomas que son posteriormente observados y fotografiados mediante microscopía invertida (Olympus CKX41, Olympus LifeScience, Tokio, Japón) (Gitz and Baker 2009). Después, para el procesamiento de imágenes se utilizó el software ImagenJ diseñado por el *National Institutes of Health* (Schneider et al. 2012). El software permitió determinar la densidad estomática (n° estomas mm^{-2}) y el grado de apertura estomática (μm). Esta metodología se llevó a cabo en los capítulos I y II de esta tesis doctoral.



Imagen 8. Impresión estomática y visión de los estomas y las células epidérmicas mediante microscopía invertida.

7.2 Parámetros fotosintéticos mediante el uso de LI-6800

En el capítulo I y II de estas tesis doctoral, y con el objetivo de determinar los distintos parámetros relacionados con el intercambio gaseoso en plantas, se utilizó el LI-6800 (LI-COR) (**Imagen 9**), que permite de forma no destructiva analizar multitud de parámetros fotosintéticos a tiempo real y, a su vez, almacenarlos. En nuestros experimentos se utilizó una cámara con fluorómetro acoplado de 2 cm². Los parámetros fotosintéticos y fotoquímicos se midieron al final del experimento en la hoja más joven completamente expandida de cada planta entre las 9:00-12:00 h de la mañana en cámara de cultivo. Los parámetros constantes que se fijaron en el LI-COR fueron una concentración de CO₂ a 400 ppm, una Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) de 1000 μmol m⁻² s⁻¹ y una presión de vapor de 2,1 kPa. Dentro de los datos adquiridos y calculados por el sistema operativo con respecto a parámetros fotosintéticos o a parámetros que pueden afectar a la asimilación de CO₂ por las plantas se tuvieron en cuenta los siguientes:

- **A o asimilación de CO₂**. Mide la absorción neta de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹).
- **E o transpiración**. Mide la transpiración a través de la liberación de vapor de agua (mmol H₂O m⁻² s⁻¹).
- **Gs o conductancia estomática**. Mide la conductancia estomática del vapor de agua (mol H₂O m⁻² s⁻¹).
- **Ci/Ca**. Concentración Intercelular de CO₂ / Concentración Ambiental de CO₂.
- **VpdL**. Déficit de presión de vapor en función de la temperatura de la hoja (kPa).
- **CTleaf**. Temperatura calculada de la hoja (°C).
- **H₂O_i**. Concentración intercelular de H₂O (mmol mol⁻¹).
- **C2Sfc**. Concentración superficial de CO₂ (μmol mol⁻¹).
- **Ci_Pa**. Concentración Intercelular de CO₂ (Pa).
- **AHs/Cs**. Parámetro Ball-Berry.

El uso de la cámara de fluorescencia acoplada al LI-6800 permitió adquirir también los siguientes datos:

- **F_o'**. Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz.
- **Fm'**. Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz.

- **F_s**. Fluorescencia basal o fluorescencia en estado estable.
- **F_v'**. Fluorescencia variable en hojas iluminadas ($F_v' = F_m' - F_o'$).
- **F_v'/F_m'**. Rendimiento intrínseco del fotosistema II (PSII) o eficiencia de los centros abiertos (oxidados) del PSII ($F_v'/F_m' = F_m' - F_o' / F_m'$).
- **ϕPSII**. Rendimiento cuántico de la transferencia de electrones del PSII ($\phi_{PSII} = F_m' - F_s - F_m'$)
- **ϕCO₂**. Rendimiento cuántico de asimilación de CO₂ por la hoja ($\phi_{CO_2} = (A - A_o) / Q_{abs}$, donde Q_{abs} ($\mu\text{mol s}^{-1}$) es cuantos absorbidos s^{-1} a F_s ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$).
- **ETR**. Tasa de transporte de electrones ($\mu\text{mol m}^{-2} s^{-1}$). Se calcula a partir de la siguiente fórmula $ETR = (F_m' - F_s / F_m') f l \alpha_{leaf}$; donde f es la fracción de cuantos absorbidos utilizada por PSII, y normalmente se asume que es 0,5 para plantas C3, y 0,4 para algunas plantas C4 (Earl and Tollenaar 1998).
- **qP o quenching fotoquímico**. Proporción de centros del PSII que se encuentran en estado abierto (oxidado). Permite estimar la atenuación fotoquímica. Su valor es entre 0 (alta irradiancia) y 1 (oscuridad) ($F_m' - F_s / (F_m' - F_o')$).

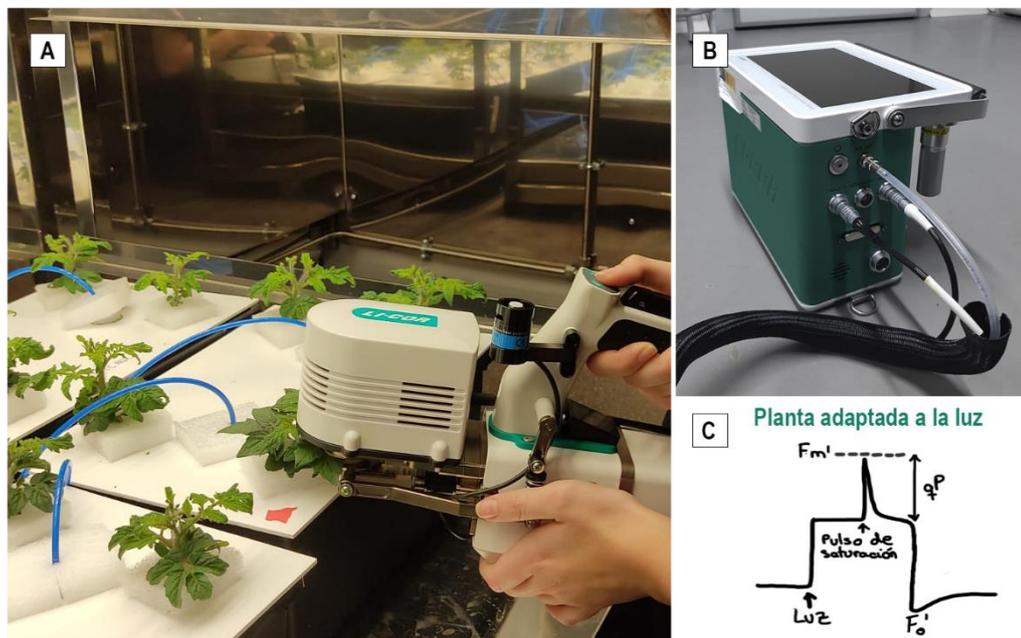


Imagen 9. Medición de parámetros relacionados con la fotosíntesis. A) Foto midiendo con LI-COR. B) Monitor del LI-COR. C) Esquema explicativo de algunos parámetros medidos.

7.3 Medición de otros parámetros biométricos

Los parámetros fisiológicos analizados fueron los siguientes:

- Peso fresco y peso seco de hojas y raíces de la variedad Micro-Tom al final de cada experimento (capítulos I y II, y capítulo III, respectivamente).
- Peso fresco de tomates maduros de la variedad Rheinlands Ruhm. Los tomates fueron muestreados y pesados al final de cada experimento (capítulo IV).
- El número de cluster/planta y el número de frutos/cluster fueron contabilizados en las plantas de la variedad Rheinlands Ruhm (capítulo IV).

Para estos estudios se analizaron un número de al menos seis plantas de cada genotipo, tratamiento y, en el caso del capítulo IV, de cada estación anual ensayada. El número de frutos por racimo fue de 3 por planta, muestreándose un total de 18 racimos.

7.4 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS Statistics v.27 y v.28 (IBM Corporation). La comparación entre las medias se realizó mediante las pruebas de comparaciones múltiples prueba de Tukey o prueba de Duncan utilizando un p-valor <0,05. Los datos utilizados fueron la media de las muestras, su error estándar (EE) y el valor de significancia, en forma de letras, de las pruebas de comparaciones múltiples.

8. Molienda del material vegetal

8.1 Molienda del material vegetal congelado a -80 °C

El material vegetal congelado a -80 °C debe seguir la cadena de frío para asegurar la veracidad de los resultados obtenidos de los análisis moleculares y bioquímicos. Se molieron hojas (capítulos I y II de esta tesis), raíces (capítulo III de esta tesis) y el pericarpio de los frutos (capítulo IV de esta tesis). Para la molienda del material vegetal destinado a pruebas moleculares o bioquímicas se utilizaron dos técnicas:

1. Mortero de porcelana y nitrógeno líquido
2. Molinillos diseñados para ser utilizados con nitrógeno líquido.

Ambas moliendas fueron efectivas, aunque en el segundo caso el tiempo empleado es mucho menor y, por tanto, es menos probable que el material vegetal pierda su calidad inicial.

8.2 Molienda de material vegetal secado en la estufa a 60 °C

Por otro lado, en esta tesis doctoral se realizaron análisis con material vegetal secado en estufas de aire forzado a 60 °C. Específicamente, se molieron hojas (capítulo II de esta tesis) y raíces (capítulo III de esta tesis). En este caso, para la molienda se utilizaron molinillos de café (en las muestras con mayor cantidad de material vegetal) y un mortero de porcelana (en el caso donde el material vegetal fue escaso), ya que el uso del molinillo de café conlleva pérdida de material vegetal.

9. Cuantificación de ácido abscísico

La extracción de ABA se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Müller & Munné-Bosch con pequeñas modificaciones (Müller and Munné-Bosch 2011). 100 mg de material fresco congelado y molido se mezclaron con 400 µL del solvente de extracción (metanol:isopropanol, 20:80, v/v con 1% de ácido acético glacial) y se le aplicaron 10 minutos de ultrasonido tres veces seguidas a baja temperatura (~4 °C). Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Al pellet conseguido tras la centrifugación se le aplicó de nuevo 200 µl del solvente de extracción y se repitió el proceso extracción descrito anteriormente. Esto se repitió dos veces más, por tanto, al mismo material vegetal se le hicieron un total de 4 extracciones. Por último, se filtró con filtros de 0,22 µm de fluoruro de polivinilideno (Merck SLGVX13TL). A continuación, las muestras fueron cuantificadas en el Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia. Los extractos orgánicos se analizaron por Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento- Cuadrupolo de Tiempo de Vuelo- Espectrometría de Masas en Tándem (UPLC-QToF-MS/MS; Waters I-Class UPLCy Bruker Daltonics' maXis impact Series QToF-MS con una resolución de $\geq 55\ 000$ FWHM). Se utilizó ionización por *electrospray* como fuente en la espectrometría de masas con polaridades positiva y negativa. Para el análisis MS/MS (espectrometría de masas en tándem) se utilizó la disociación inducida por colisión de banda ancha (\pm bbCID) con energías de colisión aplicadas entre 20 y 24 eV. Otros parámetros establecidos

fueron: una fuente de tensión de 4,0-4,5 kV, una presión del nebulizador de 2,0 bar, una temperatura de secado de 200 °C, un caudal de N₂ con flujo de 9 l/min y un intervalo de masas de 50-1200 Da. Se utilizó formiato sódico como patrón de referencia y una curva estándar de ABA (2-1000 ppm) para calcular la concentración endógena de ABA en muestras de hojas y raíces. La estadística realizada fue igual que la descrita en el subapartado 7.4 de la sección de Materiales y métodos.

10. Análisis transcriptómico dirigido

10.1 Extracción de RNA

En esta tesis doctoral se han utilizado dos métodos de extracción, dependiendo del fin del ARN extraído (PCR cuantitativa o qPCR, en el capítulo I, y descrita a continuación; y secuenciación del transcriptoma, en los capítulos I y II de esta tesis, y descrita detalladamente en el apartado 11 de la sección de Materiales y métodos).

Para las muestras que fuese extrajeran utilizadas en qPCRs se utilizó el siguiente método. Primeramente, 100 mg de material vegetal congelado y molido se mezclaron con 1 ml TRI Reagent™ (Thermo Fisher) y se homogeneizó con el agitador “vortex”. El TRI Reagent™ contiene el fenol y la guanidina tiocianato en una solución de monofasa que facilita la inhibición inmediata de la actividad de la ARNasa. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo y se volvió a homogeneizar con el agitador “vortex”. Después de 15 minutos, se centrifugó a 1200 g durante 15 minutos a 4 °C. El cloroformo provoca la separación del homogeneizado en fases acuosa y orgánica. La fase acuosa corresponde al ARN, la interfase al ADN, y la orgánica a las proteínas. En este caso, se recogió la fase acuosa y se le añadieron 500 µl de 2-propanol, volviéndose a homogeneizar con el agitador “vortex”. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante, ya que el 2-propanol facilita la precipitación del ARN de la fase acuosa. Por último, el pellet que contiene el ARN fue resuspendido en agua MiliQ (Millipore®) estéril.

10.2 Comprobación de la cantidad y calidad del ARN extraído

Primeramente, la calidad y la cantidad del ARN extraído se evaluó por espectrofotometría (NanoDrop® Spectrophotometer) teniendo en cuenta los valores de

absorbancia de las longitudes de onda de 280 nm, 260 nm y 230 nm. Los índices de pureza Abs260/Abs280 y Abs260/Abs230 se utilizaron para valorar la contaminación del extracto de ARN. Las muestras de ARN utilizadas en esta tesis tuvieron el valor del ratio Abs260/Abs280 próximo a 2 pero no inferior a 1,7 y el del ratio Abs260/Abs230 entre 1,8-2,2.

La degradación del ARN y la contaminación de ADN fueron examinadas mediante geles de 1% (p/v) de agarosa en tampón TAE 1x (40 mM Tris/ Acetato, 1 mM EDTA) con una proporción 1:20 (v/v) de GelRed® Nucleic Acid Stain 10000X Water como agente intercalante del ARN (referencia SCT123) que permite su visualización con luz UV. A las muestras que contenían el ARN se les añadía tampón de carga de ARN y se disponían en los pocillos del gel dispuesto en la cubeta de electroforesis cubierta con TAE 1X. El voltaje aplicado fue entre 80-100 V durante unos 40-45 min.

10.3 Síntesis de ADN complementario

El ARN obtenido para la cuantificación por qPCRs se trató con la enzima ADNasa, tratamiento que asegura la eliminación total de posibles restos de ADN de las muestras (Kit de extracción de ADN DNA-free™, Thermo Fisher). Posteriormente, se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg ARN utilizando el kit Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). En el caso de la cuantificación de la expresión génica mediante qPCR debe retrotranscribirse toda la secuencia de ARN mensajero (ARNm) para lo que se utilizaron “random primers”. El programa usado para esta retrotranscripción fue el siguiente: 1) 42 °C durante 30 minutos 2) 95 °C durante 2 minutos 3) 4 °C tiempo indeterminado.

10.4 PCR cuantitativa a tiempo real o análisis transcriptómico dirigido

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) detecta, amplifica y cuantifica los niveles del ARNm de una secuencia diana determinada o un gen específico, informándonos de sus niveles de transcripción. Por tanto, las qPCRs permitieron amplificar varios genes de interés a partir del ADNc. El número de copias obtenidas en cada uno de los ciclos de la PCR se observó y detectó a tiempo real mediante el uso del agente intercalante “FastGene® IC Green 2 x qPCR Universal Mix”. Además, la especificidad del gen amplificado se consiguió utilizando cebadores específicos que ya habían sido probados

anteriormente en nuestro grupo de trabajo. En la **Tabla 1** se especifica los componentes necesarios y las proporciones utilizadas en la reacción.

Componentes	Volumen (μ l)
ADNc (50ng/ μ l)	2
FastGene® IC Green	10
Cebador 3' (20 μ M)	0,4
Cebador 5' (20 μ M)	0,4
Colorante pasivo de referencia ROX	0,02
H ₂ O miliQ	7,2

Tabla 1. Componentes de cada reacción de qPCR.

Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos, PCR® Microplate (Axygen INC). Para evitar evaporaciones por altas temperaturas las placas se sellaron con un film transparente autoadhesivo (Fisherbrand™ Cierres adhesivos para placas, Fisher Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo mediante el sistema '7500 Real-Time PCR System' (Applied Biosystems) y siguiendo el protocolo que se indica en la **Tabla 2**.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Activación polimerasa	95	120
Desnaturalización	95	5
Alineamiento y extensión	60	30
Curva de Melt	95	15
	60	60
	95	30
	60	15

Tabla 2. Programa del termociclador para las qPCRs.

10.5 Cuantificación relativa del ARN mensajero: Método comparativo C_T

La cuantificación de los genes de interés determinados se basó en la expresión relativa de dicho gen diana con respecto a un gen de referencia. Los genes referencia o constitutivos se caracterizan por no variar su expresión bajo ninguna condición experimental. En nuestro caso utilizamos el factor de elongación 1 α (EF1 α), ya que no presenta diferencias entre plantas bajo condiciones control y plantas sometidas a estreses (Mascia et al. 2010).

Para la cuantificación de la expresión génica de un gen determinado se utilizó el valor C_T (ciclo umbral), se entiende como el ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia sobrepasa la línea umbral. Este punto ocurre en la fase exponencial y existe una relación lineal entre el número de ciclos y el logaritmo de la curva de fluorescencia. Para el cálculo de la expresión génica relativa de los genes se llevó a cabo el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak and Schmittgen 2001). Primero, se comparan los C_T s de los genes analizados con el C_T del gen endógeno ($\Delta C_T = C_T$ gen específico – C_T gen normalizador) de cada muestra. Después, el ΔC_T de la muestra x con respecto a la muestra de referencia o control ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{Tx} - \Delta C_T$ referencia o control). A continuación, se calcula el valor *Fold Change* (FC) a partir de la fórmula $FC=2^{(-\Delta\Delta CT)}$. El valor FC indica el incremento o disminución de la expresión del gen estudiado bajo unas condiciones determinadas frente a las condiciones control. El FC de valor 1 indica que no hay cambios; el valor menor de 1 muestra una menor expresión (represión del gen); y el valor mayor de 1 indica una expresión mayor (inducción del gen). Por último, a este valor FC se le aplicó el \log_2 para una representación más simple y visualmente atractiva de los datos obtenidos.

11. Análisis transcriptómico no dirigido

11.1 Extracción ARN

El ARN extraído de hojas de plantas de tomate variedad Micro-Tom enviado a secuenciar se realizó utilizando un kit comercial, siguiendo las indicaciones de la empresa de secuenciación. El ARN total se aisló a partir de 100 mg de hojas de tomate congeladas y molidas utilizando el NucleoSpin® RNA kit (referencia 740949.50). Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada tratamiento y genotipo.

11.2 Comprobación de la cantidad y calidad del ARN extraído

Al igual que para las muestras de ARN destinadas a la cuantificación transcriptómica por qPCR, las muestras de ARN enviadas a secuenciar fueron primeramente evaluadas espectrofotométría (NanoDrop® Spectrophotometer) y por geles de agarosa al 1%. Por último, se comprobó el número de integridad del ARN (RIN) en un bioanalizador (2100 Expert Plant RNA Nano_DE13806178).

11.3 Secuenciación de ARN o análisis transcriptómico no dirigido

La secuenciación del ARN se puede dividir en tres grandes pasos: la formación de librerías, la secuenciación y el análisis de los datos. La formación de librerías consiste en la fragmentación del material genético y la posterior ligación de adaptadores a uno o ambos extremos de las cadenas. Después se lleva a cabo la secuenciación de fragmentos pequeños (*single-end* o lectura simple) o de fragmentos grandes (*paired-ends* o lectura pareada). Cada lectura puede ser de entre 30-400 pb, dependiendo del secuenciador. La alineación de nuestras secuencias se hizo con la ayuda de una secuencia del genoma de referencia. Por último, se llevaron a cabo los análisis estadísticos específicos dependiendo de los objetivos del estudio.

En nuestro caso, la secuenciación del ARN se realizó en un analizador Illumina HiSeq (*paired-ends*) (Macrogen Inc.; Seúl, Rep. de Corea). Las lecturas crudas se presentan en formato Fastq, un formato utilizado para el almacenamiento de secuencias de nucleótidos o péptidos. Además, las lecturas en bruto obtenidas se filtraron (Illumina passed-filter call) y se comprobó la ausencia de contaminantes en la secuencia con fastQC. Las lecturas filtradas libres de contaminantes de cada muestra se mapearon con Bowtie/TopHat frente a la secuencia completa del genoma del tomate SL3.0 (ITAG4.0) (Hosmani et al. 2019) utilizando HISAT2, ya que maneja el mapeo de lecturas empalmadas a través del alineador Bowtie2. Tras el mapeo, se utilizó StringTie para el ensamblaje de transcritos. Esta herramienta también determina la cantidad de transcritos, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. El número de lecturas por transcrito depende de: la profundidad en la secuenciación, la longitud del transcrito y su nivel de expresión. Un método que permite la normalización de los datos es la obtención de los valores de expresión en fragmentos por cada millón de kilobases

(FPKM). Los FPKM se calculan a partir de la fórmula $FPKM = \frac{C}{N \times L} \times 10^9$, donde C es el conteo de cada isoforma, N es el conteo total de la muestra y L es la longitud del transcrito. En definitiva, el perfil de expresión se calculó para cada muestra y transcrito como recuento de lecturas FPKM.

Las lecturas de la secuenciación del ARN fueron depositadas (previamente a la publicación de estos datos) y están disponibles en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) en la base de datos *Sequence Read Archive* (SRA, <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>), con el número de identificación de BioProject PRJNA947059 (ID: SUB12991832).

11.4 Análisis de enriquecimiento con los datos de transcriptómica

Con un valor de corte de 0,1 se seleccionaron los genes diferencialmente acumulados (DEGs) a partir de un análisis por pares de pruebas t de comparación utilizando edgeR. Los resultados significativos se seleccionaron teniendo en cuenta un $|\log_2 FC| \geq 2$ y p-valor $< 0,05$. La lista de DEGs se analizó con *gProfiler* (Raudvere et al. 2019) y el *Panther Classification System* (Mi et al. 2019), permitiéndonos conocer el enriquecimiento de conjuntos de genes por proceso biológico, componente celular y función molecular. Los gráficos de enriquecimiento se crearon en UpSetR (Conway et al. 2017) y los Venn Diagram fueron diseñado mediante el uso de varias plataformas (Bardou et al. 2014; Ge et al. 2018). También se utilizaron herramientas como ShinyGO 0.77 (Ge et al. 2020) con un límite de la tasa en falsos positivos (FDR) de 0,02 y un tamaño mínimo de ruta de 5 transcritos y, también, IDEP.94 e IDEP.96 (Ge et al. 2018). Ambas herramientas permitieron el estudio de distintas clasificaciones de grupos de genes teniendo cuenta la significancia estadística p-valor $< 0,05$ y el $\log_2 FC$.

Por otro lado, la construcción de la red de interacción proteína-proteína se realizó con la herramienta web STRING v. 11.5 (Szklarczyk et al. 2015), basada en una gran base de datos de interacciones proteína-proteína anteriormente descritas por otros autores. STRING también proporciona información para el análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) y dominios proteicos en 5090 especies, incluido el tomate. El análisis de la red de proteínas se realizó a partir de secuencias de proteínas de alta confiabilidad (0,7) con un número máximo de 10 interacciones.

12. Determinación de la concentración de componentes minerales en hojas y raíces

Las muestras de hojas y raíces secas de la variedad Micro-Tom muestreadas al final del experimento, secadas en la estufa a 60 °C y molidas en mortero o molinillo de café, se utilizaron para determinar la concentración de los siguientes nutrientes minerales: Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn, S, Zn, F⁻, NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , B, C, Fe P, Al, Cr y Mo. Dependiendo de si eran cationes o aniones se hicieron dos extracciones y dos análisis diferentes.

La extracción de cationes consistió en la digestión de 100 mg del material con $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (5:3, v/v) utilizando un microondas (MARS 6 Synthesis, CEM corporation, Reino Unido) con una rampa de temperatura en la que se alcanzan 210 °C en aproximadamente 20 minutos y se mantuvo la temperatura durante 2 horas. Después, el análisis se llevó a cabo mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP-EOS-Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA).

Por otro lado, la extracción de aniones consistió en mezclar 100 mg de material vegetal con 10 ml agua desionizada MiliQ (Millipore®) y agitar durante 30 minutos. Después se centrifugó a 4000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y, por último, el sobrenadante se filtró con filtros de 0,45 μm y diámetro de 25 mm (CHROMAFIL® Xtra PA). Finalmente, las muestras se analizaron por cromatografía iónica (Dionex modelo DX-100).

La estadística de los datos ionómicos fue realizada de manera idéntica a la descrita en el subapartado 7.4 de la sección de Materiales y métodos, utilizando la prueba de Tukey.

Por último, en los capítulos II y III de esta tesis doctoral se hizo una comparación por pares para determinar los iones diferencialmente acumulados (DAIs). Los DAIs se obtuvieron mediante la comparación de las plantas WT bajo los tres tipos de estrés, las plantas *flc*- bajo los cuatro tratamientos y las plantas *flc*+ bajo los cuatro tratamientos, todos ellos frente a las plantas WT bajo condiciones control.

13. Análisis metabolómico no dirigido

13.1 Liofilización de las muestras vegetales

Parte de la muestra congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y molida en N_2 líquido de las hojas y las raíces de las plantas de tomate variedad Micro-Tom y de los frutos de la variedad Rheinlands Ruhm fueron liofilizadas mediante el liofilizador LyoQuest (Telstar, Barcelona, España). La liofilización consiste en la congelación del material y, después, bajada de presión que permite la sublimación de agua congelada desde fase sólida a fase gaseosa, permitiendo eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, pero sin afectar a la estructura molecular del mismo. Las muestras fueron liofilizadas para garantizar un transporte más seguro al laboratorio del profesor Luigi Lucini (Italia), donde realicé una estancia doctoral durante 3 meses.

13.2 Extracción de metabolitos

Primeramente, las muestras molidas y liofilizadas se homogeneizaron mecánicamente en un solvente compuesto por metanol al 80% (v/v) acidificado con ácido fórmico al 0,1% (v/v). Dependiendo del material vegetal utilizado, la proporción de material vegetal/solvente (g/ml) fue distinta: 1:40 en hojas (capítulo I y II de esta tesis), 1:20 en raíces (capítulo III de esta tesis) y 1:10 en frutos (capítulo IV de esta tesis). La dilución del material dependió principalmente de lo metabólicamente activos que son cada una de estas partes de la planta, siendo las hojas el órgano más metabólicamente activo. A continuación, los extractos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el sobrenadante se filtró con filtros de celulosa de $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Después, las muestras fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La congelación de las muestras y el tiempo contribuyeron en el depósito de las proteínas que quedan en el extracto, lo que ayudó a observar menos ruido en el espectro de cromatografía.

13.3 Espectrómetro de masas

Para cada muestra se examinaron dos réplicas técnicas y tres biológicas, lo que hace un total de seis réplicas por grupo experimental. Los extractos de plantas se analizaron con un volumen de inyección de $6\text{ }\mu\text{l}$. El análisis metabolómico no dirigido se realizó mediante espectrometría de masas de movilidad iónica por cromatografía líquida de

ultra alta resolución y cuadrupolo de tiempo de vuelo (espectrómetro de masas 6560 UHPLC/IM-QTOF-MS - Agilent[®], Santa Clara, CA, EE.UU.). La separación cromatográfica en fase inversa se realizó utilizando una columna Agilent de pentafluorofenilpropilo (2,0 × 100 mm, 3 μm) (Santa Clara, CA, EE.UU.) con una elución en gradiente de agua a acetonitrilo del 6% al 94% en 32 min. El modo de adquisición de datos fue SCAN 100-1200 m/z. El modo SCAN consiste en un barrido entre dos masas para tener una información total del contenido de la muestra a analizar.

13.4 Interpretación y anotación de los compuestos

Los resultados fueron proporcionados en un cromatograma iónico total (TIC) a partir del programa MassHunter Quantitative Analysis Software (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). En un cromatograma TIC se representa la suma de abundancias de todas las masas adquiridas. Después, los cromatogramas fueron deconvolucionados para extraer los compuestos individuales. A continuación, se realizó la anotación a partir del software Agilent Profinder de Agilent, donde la combinación de patrones monoisotópicos de masas e isótopos permitió la anotación de compuestos en base a la base de datos empleadas cumpliendo con el Nivel 2 (compuestos putativamente anotados) de la *COSMOS Metabolomics Standards Initiative* (Salek et al. 2015). En las hojas y las raíces de las plantas de tomate de la variedad Micro-Tom se empleó la base de datos PlantCyc 15.1 (Plant Metabolic Network; www.plantcyc.org; realizado en noviembre de 2023) y en los tomates maduros de la variedad Rh. Ruhm se emplearon las bases de datos *FoodDB* (www.foodb.ca; realizado en marzo de 2024) y *Phenol-Explorer* (realizado en marzo de 2024) (Rothwell et al. 2013).

Los datos brutos obtenidos del análisis metabolómico en las muestras de hojas y raíces de las plantas de tomate variedad Micro-Tom están disponibles en la base de datos EMBL-EBI MetaboLights con el identificador MTBLS9686. Los datos brutos obtenidos del análisis metabolómico en las muestras de fruto de tomate maduro de las plantas de tomate variedad Rheinlands Ruhm se depositaron en la misma bases de datos con el identificador MTBLS1052.

13.5 Análisis comparativo de los compuestos metabólicos

Primeramente, el conjunto de datos metabólicos obtenido fue filtrado (umbral de área >10.000 recuentos), transformado en Log_2 y normalizado al percentil 75 mediante el software Mass Profiler Professional 15.1 (Agilent Technologies). Los compuestos detectados tomaron de referencia la mediana en el conjunto de datos y se realizó un análisis de conglomerados jerárquico multivariante no supervisado (HCA) para evaluar las similitudes y diferencias entre grupos de plantas, tratamientos y la interacción de ambos en función de su perfil metabólico (utilizando la distancia euclidiana y la regla de vinculación de Ward). Para la comprobación de los datos anteriores, se realizó el análisis discriminante ANOVA (análisis de la varianza) de mínimos cuadrados parciales ortogonales multibloque (AMOPLS-DA) sobre el conjunto de datos metabólicos, utilizando el paquete rAMOPLS en R (v 4.2.1.) (Boccard et al. 2019). El nivel de significancia estadístico de los modelos AMOPLS-DA se fijó en $\alpha = 0,01$ y el modelo se construyó realizando 100 permutaciones. Los resultados se expresaron como la Suma Relativa de Cuadrados (RSS), entendiéndose como el porcentaje de variabilidad atribuida a cada factor; la Relación de Estructura Residual (RSR), que significa la consistencia de cada efecto con respecto a los factores residuales; el p-valor de RSR, representando el nivel de significancia estadística; y la contribución de bloque (tp), en porcentaje, asociada a cada efecto. Además, se utilizó un análisis de Importancia Variable en la Proyección versión 2 (VIP_2) para revelar los metabolitos asociados al tratamiento, grupo de plantas y a la interacción de ambos factores (grupo de plantas x tratamiento) en los capítulos II y III de la tesis y asociados al tratamiento, al genotipo y la interacción de genotipo x tratamiento en el capítulo IV de la tesis doctoral.

Por otro lado, utilizando de nuevo el software Mass Profiler Professional 15.1 (Agilent Technologies) se hizo un estudio comparando todas las muestras con las muestras control. Los cambios significativos en los metabolitos obtenidos en comparación con el control se definieron para un p-valor < 0,05, de acuerdo con el análisis Volcano y ANOVA, extrayendo de esta manera los metabolitos diferencialmente acumulados (DAMs) mediante la corrección de pruebas múltiples de Bonferroni (Ferreira and Zwinderman 2006). Además, solo fueron seleccionados los $|\text{log}_2 \text{FC}| \geq 2$ para los análisis posteriores de enriquecimiento de rutas.

13.6 Estudio de enriquecimiento metabólico

Los DAMs de hojas (capítulo II) y raíces (capítulo III) de la variedad Micro-Tom se utilizaron para realizar un estudio de las rutas de biosíntesis enriquecidas utilizando la herramienta Omics Dashboard de PlantCyc (<https://www.plantcyc.org/>). Por otra parte, los DAMs de frutos de la variedad Rheinlands Ruhm (capítulo IV) se utilizaron para realizar un estudio de las rutas de biosíntesis enriquecidas utilizando la herramienta *Enrichment Analysis* de la web MetaboAnalyst (Xia et al. 2009).

13.7 Análisis semicuantitativo de fenoles en fruto

A parte del estudio metabólico general hecho en hojas y raíces de la variedad Micro-Tom y en frutos de Rheinlands Ruhm, también se llevó a cabo en el capítulo IV de esta tesis doctoral un estudio semicuantitativo de fenoles en los frutos de Rheinlands Ruhm.

El análisis semicuantitativo de las diferentes clases de compuestos fenólicos se realizó mediante el uso de estándares puros (Sigma grade, SigmaAldrich, S. Louis, MO, EE.UU.). Los patrones para cada grupo de fenoles fueron los siguientes (representante-grupo de compuestos): cianidina - antocianinas, galato de espigalocatequina - flavanoles, quercetina - flavonoles, luteolina - otros flavonoides (chalconas, dihidroflavonoles, dihidrochalconas, flavonas, flavanonas e isoflavonoides), ácido ferúlico - ácidos fenólicos, sesamina - lignanos, resveratrol – estilbenos, y tirosol - otros polifenoles y los compuestos de bajo peso molecular. Este análisis semicuantitativo permitió estimar de forma más exacta la cantidad de los distintos compuestos fenólicos en frutos. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes fenólicos/g de extracto liofilizado. Por último, se realizó un análisis estadístico ANOVA (valor $p < 0,05$) seguido de la prueba post hoc de Tukey en las muestras de fenol semicuantificadas (véase subapartado 7.4 de la sección Materiales y métodos).

14. Análisis de correlación entre los datos ionómicos y metabólicos

En el capítulo III de esta tesis doctoral se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para analizar las correlaciones entre los metabolitos y los iones analizados en

raíces de plantas de tomate. Los Log_2FC de los DAMs y de los DAIs obtenidos del análisis metabolómico y el análisis inómico respectivamente, se utilizaron para generar la matriz de correlación. Los datos se filtraron con $|R2| > 0,8$. Los coeficientes de correlación se calcularon mediante el lenguaje R y la prueba estadística se ajustó mediante los p-valores.

15. Análisis multiómico

Los análisis ionómico, transcriptómico, metabolómico y fenómico en hojas de plantas de tomate Micro-Tom permitieron realizar un estudio integral que abarcó las cuatro ómicas y dedujo los cambios producidos en estas plantas considerando el conjunto de los macrodatos (capítulo II de esta tesis doctoral). El estudio multiómico es de gran relevancia ya que nos permite explicar la compleja regulación biológica de fenómenos específicos englobando todas las ómicas, y, por tanto, llega a ser más certero que el estudio de las ómicas por separado (Yang et al. 2023).

Se utilizó el marco derivado de “mixOmics” denominado “Análisis de integración de datos para el descubrimiento de biomarcadores utilizando enfoques de variables latentes para estudios ómicos” (DIABLO; <http://mixomics.org/mixdiablo/>) (Rohart et al. 2017) para la integración de cuatro conjuntos de datos, utilizando el software R (v. 4.2.1.). Este algoritmo confiere un enfoque supervisado para identificar características discriminantes que permitan la diferenciación entre tratamientos considerando conjuntamente la variabilidad de los cuatro conjuntos de datos para construir tres modelos diferentes (WT, *flc-* y *flc+*). En otras palabras, nuestros modelos consistieron en: modelo de plantas WT, donde se compararon los cuatro tratamientos (control, salinidad, altas temperaturas, salinidad + altas temperaturas); modelo plantas *flc-* (plantas de tomate mutantes y deficientes en ABA), donde se compararon los cuatro tratamientos y, por último, modelo *flc+* (plantas de tomate mutantes y deficientes en ABA que recibieron una aplicación exógena de ABA) donde también se compararon los cuatro tratamientos aplicados. Debido a que los conjuntos de datos de transcriptómica y metabolómica fueron muy grandes, se seleccionaron para el análisis multiómico los DEGs y los DAMs en comparación con WT en condiciones control.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

1. Introducción

Los cambios en el clima de la Tierra aumentan la frecuencia y gravedad de los fenómenos meteorológicos extremos, como huracanes, olas de alta temperatura, incendios forestales, sequías e inundaciones, y se prevé que sigan haciéndolo en las próximas décadas. Estos fenómenos extremos están afectando directamente a la producción agrícola mundial, provocando pérdidas anuales que ascienden a billones de dólares/euros (Mariani and Ferrante 2017) y un inevitable aumento del precio de los alimentos. Por ello, la comunidad científica está invirtiendo grandes esfuerzos a la identificación de nuevos marcadores moleculares que puedan ayudar a las plantas a prosperar y ser productivas bajo diversos tipos de estreses abióticos.

En condiciones de campo las plantas se enfrentan a múltiples estreses abióticos simultáneamente y, en tales condiciones, la respuesta de las plantas difiere significativamente de la observada tradicionalmente bajo estreses simples (Mittler 2006; Rivero et al. 2014; Zandalinas et al. 2021; Liu et al. 2023c). La combinación de varios estreses puede causar un efecto positivo o negativo dependiendo de los estreses implicados y de la planta de estudio. Por ejemplo, Rivero *et al.*, (2014) observaron que la combinación de altas temperaturas y salinidad otorgó a las plantas de tomate una tolerancia significativa a la salinidad a través de la acumulación específica de glicina betaína y trehalosa y, contrariamente, Liu *et al.*, 2023 demostraron que la combinación de la inundación y las altas temperaturas afectó más a la fotosíntesis en plantas de jengibre (*Zingiber officinale*) que cuando estos estreses se aplicaron de forma individual.

Las plantas han desarrollado intrincadas rutas de señalización para facilitar su adaptación a condiciones ambientales cambiantes, siendo la fitohormona ABA el regulador clave en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Las respuestas dependientes del ABA abarcan multitud de procesos, desde la inhibición de la germinación, el cierre estomático, la inhibición del crecimiento y la inducción de genes relacionados con el estrés (Fujii et al. 2007; Dittrich et al. 2019). Sin embargo, la regulación de la expresión génica dependiente de ABA en condiciones de estrés abiótico permanece en gran parte inexplorada debido a las complejidades inherentes

involucradas. En general, algunos FTs, como DREB2A/2B, AREB1, RD22BP1, y algunos MYC/MYB, son sensibles a ABA y regulan la expresión génica interactuando con sus correspondientes elementos cis-actores DRE/CRT, ABRE, y MYCRS/MYBRS (Tuteja 2007).

Sin embargo, se conocen un número significativo de genes cuya expresión es independiente de ABA y que son inducidos bajo diversas condiciones de estrés abiótico. Por ejemplo, Du et al. (2018) descubrieron en arroz que ciertos genes relacionados con la floración (OsGL, OsELF3, OsPRR37 y OsMADS50) eran inducidos por el estrés por déficit hídrico, pero no respondían al ABA y tampoco observaron diferencias en su expresión entre mutantes deficientes de ABA y plantas WT. Por tanto, estos genes estaban involucrados en el mecanismo de escape de la regulación del déficit hídrico a través de una ruta independiente de ABA (Du et al. 2018). También, Lee et al. (2017) reveló que el gen OsERF71 en arroz participa en una vía independiente de ABA, mejorando la resistencia a la sequía a través de la regulación de las modificaciones de la pared celular (Lee et al. 2017). En este contexto, se ha dilucidado una vía de transducción de señalización celular independiente de ABA, que opera autónoma a los receptores de ABA o de los componentes de señalización de ABA (Agarwal and Jha 2010; Yoshida et al. 2014; Liu et al. 2018). De igual manera, no todos los FTs implicados en la inducción de la respuesta de las plantas al estrés son dependientes o independientes de ABA. En particular, la sobreexpresión de DREB1 regula al alza los genes inducidos por el estrés independientes y dependientes de ABA (COR15a y rd29B, respectivamente) en *Arabidopsis*, lo que sugiere una posible interacción entre las vías dependientes e independientes de ABA (Yang et al. 2011).

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado las funciones cruciales que desempeñan los factores de transcripción R2R3-MYB en las respuestas de las plantas a los estreses bióticos y abióticos siguiendo una regulación dependiente del ABA, así como su implicación en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Abe et al. 2003; Stracke et al. 2007). De esta forma, los niveles de flavonoides son regulados a través de diferentes factores MYBs específicos dependiendo de la especie vegetal. En este sentido, SIMYB72 en tomate (Wu et al. 2020), CmMYB8 en crisantemo (Zhu et al. 2020), AtMYB4 en *Arabidopsis* (Wang et al. 2020c), CsMYB2 y CsMYB26 en la planta del té (Wang et al. 2018b), y NtMYB3 en *narcissus* chino (Anwar et al. 2019a), han sido identificados con éxito como los principales reguladores de la biosíntesis de flavonoides.

Hay que señalar que la mayoría de las investigaciones han relacionado los FTs R2R3-MYB con la vía dependiente de ABA. Aunque también existen estudios como el de Zhao et al. (2014), cuyo objetivo fue identificar y caracterizar la familia R2R3-MYB en tomate bajo diferentes tratamientos: salinidad, bajas temperaturas y aplicación de ABA 100 μ M. En particular, solo 3 genes (SIMYB62, SIMYB74 y SIMYB102) respondieron a los tres tratamientos y, curiosamente, 9 genes (SIMYB2, SIMYB20, SIMYB21, SIMYB53, SIMYB78, SIMYB92, SIMYB108, SIMYB113 y SIMYB114) no mostraron respuesta al tratamiento con ABA (Zhao et al. 2014).

Así, el objetivo de este capítulo fue la identificación de genes independientes de ABA implicados en las rutas de transducción de señales frente al estrés combinado, dado a que se trata de un campo desconocido hasta el momento. Para alcanzar este objetivo, el presente estudio utilizó mutantes de tomate deficientes en ABA (*flacca*, *flc*, Solyc07g066480) sometidos a estrés simple (salinidad o altas temperaturas) o combinado (salinidad + altas temperaturas). Mediante un extenso análisis de secuenciación de ARN, revelamos que la combinación de salinidad + altas temperaturas reprogramó fuertemente el transcriptoma del tomate en los mutantes *flc*. En particular, entre los 685 genes que fueron regulados específicamente en mutantes *flc* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, 463 genes mostraron una regulación independiente del ABA bajo estas condiciones específicas. Dentro de este grupo de genes, 6 FTs pertenecientes a la familia R2R3-MYB estuvieron significativamente sobreexpresados. Además, un análisis de las interacciones proteína-proteína demostró que SIMYB50 y SIMYB86 estaban directamente implicados en la sobreexpresión de genes relacionados con la vía biosintética de flavonoides. Estos resultados muestran que la regulación al alza de SIMYB50 y SIMYB86 sigue una vía independiente del ABA, y que esta regulación se induce únicamente bajo la combinación de salinidad + estrés térmico en plantas deficientes en ABA. La exploración futura de los datos presentados en este estudio podría conducir a la identificación de nuevas rutas y genes asociados a los procesos de señalización del ABA. Además, estos hallazgos podrían utilizarse para mejorar la resistencia de los cultivos a las olas de calor, la salinidad y su combinación, contribuyendo a abordar los retos de la seguridad alimentaria en un escenario de cambio climático.

2. Material y metodología específica

Este apartado ha sido ampliamente detallado en la sección “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral. En resumen, en este capítulo se utilizaron las hojas de las plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom silvestres (WT) y mutantes deficientes en ABA (*flc*) bajo condiciones control (C), estrés salino (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H). Además, a una parte de los mutantes *flc* se les aplicó ABA exógeno (*flc+*). Las plantas y la germinación, el crecimiento de las plantas y los tratamientos a los que se sometieron las plantas se explican en los apartados “1. Plantas de tomate”, “4. Germinación de semillas” y “5. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Micro-Tom” de la sección “Materiales y métodos”.

En este capítulo se midió el peso fresco, el número de estomas y la conductancia estomática (gs) como se explica en el apartado “7. Análisis de parámetros fisiológicos o fenomica” de la sección “Materiales y métodos”. También se llevó a cabo la cuantificación de ABA endógeno en las hojas de plantas de tomate, como se explica en el apartado “9. Cuantificación de ácido abscísico” de la sección “Materiales y métodos”. Por último, se realizó un análisis transcriptómico dirigido y no dirigido, explicados en profundidad en los apartados “10. Análisis transcriptómico dirigido” y “11. Análisis transcriptómico no dirigido”, respectivamente, de la sección “Materiales y métodos”.

Para la obtención de los genes expresados diferencialmente (DEGs) en ambos genotipos bajo las condiciones ambientales ensayadas, en este capítulo I se llevaron a cabo tres grupos de comparaciones: las plantas WT bajo condiciones de estrés (salinidad, altas temperaturas y la combinación de ambos) frente a las plantas WT bajo condiciones control; los mutantes *flc*- bajo las condiciones de estrés frente a las plantas *flc*- bajo condiciones control; y los mutantes *flc+* bajo condiciones de estrés frente a las plantas *flc+* bajo condiciones control.

3. Resultados y discusión

3.1 Fenotipo de los mutantes *flc* sin (*flc*-) y con (*flc*+) ABA exógeno

El ABA tiene múltiples funciones en las plantas, incluidas las relacionadas con el crecimiento y el desarrollo (Cutler et al. 2010). En consecuencia, una cantidad basal de ABA es esencial para el desarrollo de los tejidos y órganos de las plantas. En nuestros experimentos, las plantas de tomate deficientes en ABA (*flc*-) mostraron un fenotipo significativamente más débil en comparación con el tipo WT en condiciones control (**Figura 12**), con un 70% menos de biomasa que este último (**Figura 12B**), lo que se atribuyó principalmente a la deficiencia en el contenido endógeno de ABA en las hojas (**Figura 12C**; (Imber and Tal 1970)). Curiosamente, cuando las hojas de los mutantes *flc* fueron rociadas con 100 μ M de ABA (*flc*+) (dosis seleccionada de un experimento preliminar, **Figura S1**), se observó una recuperación sustancial del fenotipo. Bajo condiciones de estrés simple, WT mostró una ligera reducción de la biomasa, que se hizo mucho más pronunciada cuando se combinaron salinidad + altas temperaturas (**Figuras 12A y 12B**). Por otro lado, la biomasa de los mutantes *flc*- obtenida en plantas cultivadas bajo estrés térmico no fue significativamente diferente a la de las plantas cultivadas en condiciones control. Sin embargo, los mutantes *flc*- cultivados bajo salinidad o combinación de estreses mostraron una disminución significativa de la biomasa de la planta en comparación con las condiciones control (**Figura 12B**).

La concentración endógena de ABA aumentó en todas las condiciones de estrés aplicadas tanto a las plantas WT como a las *flc*+. Además, la combinación de estreses indujo la mayor acumulación de niveles endógenos de ABA en plantas WT, en comparación con los niveles encontrados bajo condiciones de estrés único en estas plantas (**Figura 12C**). En *flc*+, ya estuvieran expuestos a estrés simple o combinado, también se observó un aumento significativo de la concentración endógena de ABA, sin diferencias discernibles entre los distintos tratamientos de estrés. Por otro lado, en los mutantes *flc*-, la concentración endógena de esta fitohormona se mantuvo muy baja, sin observarse cambios significativos bajo las diferentes condiciones de estrés en comparación con las plantas control (**Figura 12C**). Estos resultados confirman la deficiencia de ABA en nuestras plantas *flc*-, y la eficacia moderada de la aplicación de

ABA (**Figura 12C**). Sin embargo, cabe señalar que no se obtuvo una recuperación fenotípica completa en comparación con el control WT (**Figuras 12A y 12B**), lo que podría apuntar a la participación de otros factores independientes de ABA en el desarrollo de la planta y la respuesta al estrés.

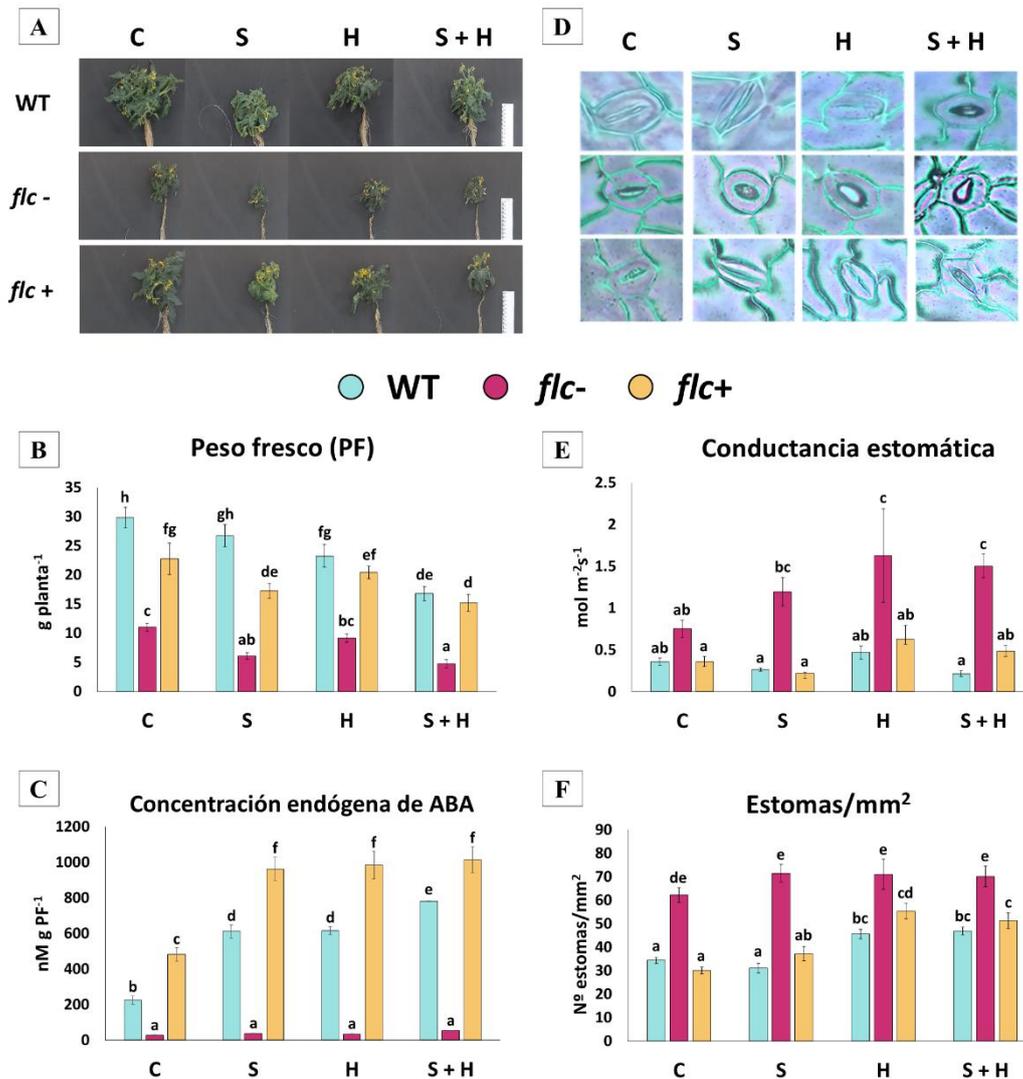


Figura 12. Caracterización fisiológica en plantas de tomate silvestres (WT), mutantes *flacca* (*flc-*) y mutantes *flc* con aplicación de ABA exógeno (*flc+*) bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y combinación de salinidad y altas temperaturas (S+H). (A) Fotografías de las plantas de tomate en el momento del muestreo. (B) Peso fresco (PF) de la planta de tomate. (C) Concentración endógena de ABA. (D) Estoma representativo de cada uno de los grupos de planta y tratamientos. Las micrografías completas de las superficies foliares adaxiales se encuentran en las **Figura S2**. (E) Conductancia estomática. (F) N^o de estomas/mm². Los valores representan las medias \pm EE. Las letras dentro de cada panel corresponden a la prueba de Duncan (p-valor < 0,05).

Por otra parte, el ABA está directamente asociado a los procesos de regulación estomática (Zandalinas et al. 2016a; Yoshida et al. 2019; Hsu et al. 2021), por lo que es importante estudiar cómo se comporta la gs en mutantes *flc*, y si una aplicación de ABA exógeno tiene algún efecto sobre estos mutantes. Las plantas WT y *flc+* mostraron un claro cierre estomático bajo salinidad o altas temperaturas aplicados individualmente, aunque la combinación de estreses indujo la apertura estomática en estas plantas, lo que indicó la especificidad de la combinación en la regulación estomática de las plantas WT y *flc+* (**Figuras 12D, 12E y S2**). De hecho, en las plantas *flc-*, la gs bajo estrés térmico y la combinación de salinidad + altas temperaturas fue significativamente mayor en comparación con *flc-* bajo condiciones control (**Figura 12E**). Es destacable que en las plantas WT, los tratamientos de salinidad y la combinación salinidad + altas temperaturas indujeron una disminución significativa ($p < 0,001^{***}$), mientras que las altas temperaturas indujeron un aumento significativo ($p < 0,001^{***}$) de la gs respecto a las condiciones control, aunque estas diferencias estadísticas se diluyeron al graficarlas con los datos obtenidos en los mutantes *flc-*, con valores hasta tres veces superiores a WT y *flc+*. Resultados similares fueron obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Rivero et al. 2014; Lopez-Delacalle et al. 2020, 2021b).

Al intentar dilucidar si la gs estaba relacionada con el número de estomas, se observó que el número de estomas no seguía la misma tendencia que la gs en todos los grupos de planta estudiados. El número de estomas en las plantas *flc-* no fue significativamente diferente entre las distintas condiciones aplicadas, aunque se observó que era significativamente mayor en comparación con las plantas WT y *flc+* en cualquiera de las condiciones probadas (**Figura 12F**). Sin embargo, se observó un aumento significativo en el número de estomas en las plantas WT y *flc+* bajo estrés por altas temperaturas, y la combinación de altas temperaturas y salinidad, en comparación con sus respectivos controles (**Figura 12F**). En resumen, la deficiencia de ABA aumentó significativamente el número de estomas en todas las condiciones probadas. Sin embargo, en las plantas sin esta deficiencia de ABA (WT y *flc+*) el número de estomas solo fue significativamente mayor bajo altas temperaturas o la combinación de salinidad + altas temperaturas en comparación con sus condiciones control. Nuestro grupo de investigación demostró previamente en plantas de tomate que la tasa de transpiración

aumentó bajo altas temperaturas o la combinación de salinidad + altas temperaturas en comparación con el con plantas bajo estrés salino y bajo condiciones control (Rivero et al. 2014; Lopez-Delacalle et al. 2020, 2021b). Teniendo esto en cuenta, se puede hipotetizar que el estrés térmico (aplicado como estrés único o en combinación con la salinidad) puede estar induciendo un aumento en el número de estomas para aumentar el índice de transpiración foliar, reduciendo así la temperatura foliar sin afectar a la apertura estomática. Por otro lado, la respuesta estomática de las hojas es a menudo diferente de la observada en flores y frutos durante la combinación de estreses (Sinha et al. 2022, 2023). Estos autores demostraron que las plantas de soja bajo la combinación de sequía y estrés térmico priorizaban la transpiración a través de las flores en lugar de las hojas. Esto se conseguía abriendo los estomas de las flores y manteniendo cerrados los de las hojas. Este enfoque adaptativo, conocido como “transpiración diferencial”, da lugar a una reducción de la temperatura interior de las flores de aproximadamente 2-3 °C. Aunque esto protege los procesos reproductivos, se produce a costa del bienestar de los tejidos vegetativos (Sinha et al. 2023).

En resumen, nuestro estudio demuestra que la biomasa vegetal obtenida al final de los experimentos dependió tanto de los niveles endógenos de ABA como de las condiciones de estrés aplicadas, como ya argumentaron investigaciones previas (Zandalinas et al. 2016a; Segarra-Medina et al. 2023). En consecuencia, tal y como indicaban nuestros resultados, era de esperar que la deficiencia de ABA impuesta a los mutantes *flc* diera lugar a un control deficiente del cierre estomático, lo que concuerda con hallazgos anteriores (Tal 1966). Nuestros estudios también demostraron que una deficiencia de ABA conduce a un aumento de la densidad estomática (**Figura 12F**). Caine et al. (2023), en su trabajo en varias variedades de arroz tradicionales, observaron que una alta densidad estomática se asociaba con un aumento de la *gs* y una disminución de la producción de biomasa (Caine et al. 2023). Estas observaciones apoyan nuestros hallazgos en los mutantes *flc*- (**Figuras 12B, 12C, 12E y 12F**), ya que mostramos una correlación positiva entre la *gs* y el número de estomas (**Figuras 12C, 12E y 12F**), que se correlacionó negativamente con la biomasa de la planta.

Además, nuestros resultados revelaron una tendencia específica en la biomasa vegetal y la concentración de ABA en plantas sometidas a condiciones de estrés

combinado en todos los genotipos analizados, lo que indica la especificidad de la respuesta de la planta a la combinación de estreses abióticos (**Figuras 12B y 12C**) (Zandalinas et al. 2016a; Segarra-Medina et al. 2023). Por último, la aplicación de 100µM de ABA no condujo a una recuperación completa del fenotipo WT, lo que sugiere la existencia de mecanismos reguladores independientes de ABA (Li and Liu 2021).

3.2 Expresión diferencial de genes de biosíntesis de ABA y su relación con la concentración endógena de esta hormona

Con el objetivo de elucidar en qué medida estaba afectada la ruta de biosíntesis de ABA en hojas de tomate de los diferentes genotipos empleados en nuestros experimentos y bajo las distintas condiciones de estrés impuestas, se realizó un estudio transcriptómico dirigido a los genes relacionados con la biosíntesis de ABA mediante qPCR.

Los genes más relevantes fueron en orden de participación en la ruta biosintética de ABA: *ZEP1*, *NCED*, *ABA2* y *Flacca*; este último corresponde al gen mutado en nuestros mutantes *flc* (**Figura 13**). En este análisis pudimos observar que las plantas *flc*- en condiciones control reprimieron significativamente la expresión de los genes *ZEP1* y *Flacca* y sobreexpresaron significativamente los genes *NCED1* y *ABA2* si comparamos las plantas WT bajo las mismas condiciones. Resultados similares fueron obtenidos en plantas *flc*- bajo condiciones de salinidad, con la excepción de la sobreexpresión de *ABA2*. Además, las plantas *flc*- bajo el estrés por altas temperaturas significativamente sobreexpresaron *NCED1* y reprimieron la expresión de *ZEP1* en comparación con las plantas WT bajo condiciones control. Sin embargo, solo la sobreexpresión de *NCED1* fue significativa en todas las plantas *flc*- bajo cualquier tratamiento en comparación con las plantas WT bajo condiciones control. Por tanto, deducimos de estos resultados que la expresión de estos cuatro genes relacionados con la biosíntesis de ABA estuvo alterada por la deficiencia de ABA.

Asimismo, se investigó si la aplicación exógena de ABA restauraba la expresión de estos genes a niveles normales. La expresión de los genes *ZEP1* y *Flacca* bajo condiciones control no fueron restauradas con la aplicación de ABA en mutantes *flc* (*flc+*). Por tanto, la aplicación exógena de ABA no fue suficiente para su recuperación (**Figura 13**).

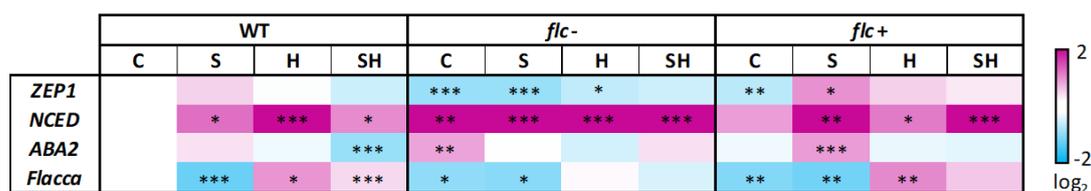


Figura 13. Mapa de calor de la expresión de los genes *ZEP1*, *NCED*, *ABA2*, *Flacca* en plantas WT bajo cada condición de estrés y en los mutantes *flc*- y los mutantes *flc*+ bajo cualquier tratamiento estudiado, comparando con la expresión en las plantas WT bajo condiciones control. C: control, S: salinidad, H: altas temperaturas, SH: salinidad + altas temperaturas.

Por último, y de manera notable, tanto el estrés como la deficiencia de ABA provocaron un aumento en la expresión del gen *NCED*. Este gen es uno de los principales involucrados en la biosíntesis de ABA y está regulado por diversas rutas de señalización, como la del ET. Esto explicaría que en condiciones de deficiencia de ABA o bajo situaciones de estrés, donde el contenido de ABA incrementa, *NCED* se encuentre sobreexpresado (Kraft et al. 2007).

3.3 Regulación de los transcritos obtenidos específicamente en mutantes *flc*- bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas

Para investigar más a fondo cómo la deficiencia de ABA puede afectar a la maquinaria transcripcional de las plantas analizadas, se realizó un análisis de secuenciación de ARN en las hojas de las plantas WT y *flc*- después de 10 días de crecimiento bajo condiciones de control, estrés simple o combinación de estreses (**Figura S3**). Para el análisis se utilizaron muestras WT o *flc*- crecidas en condiciones control para normalizar y obtener los DEGs de plantas WT y *flc*-, bajo un estrés único o combinado.

Considerando todas las condiciones de estrés, nuestros resultados mostraron que los mutantes *flc*- tenían un menor número total de DEGs (5691), en comparación con WT (6451). Esto puede indicar que los mutantes *flc* tienen una maquinaria transcripcional defectuosa, que puede verse afectada por la deficiencia de ABA. Previamente se demostró que la señalización de estrés dependiente de ABA ajusta

primero los FTs expresados constitutivamente, conduciendo a la expresión de activadores transcripcionales de respuesta temprana, que a su vez activan genes efectores de tolerancia al estrés aguas abajo (Hussain et al. 2021). Por lo tanto, los mutantes *flc*- podrían presentar un defecto en este ajuste transcripcional, lo que concuerda con la mayor inhibición del crecimiento observada en estos mutantes bajo cualquier condición de estrés aplicada (**Figuras 12A y 12B**).

La salinidad aplicada como estrés simple dio lugar al menor número de DEGs, tanto en plantas *flc*- (1613) como WT (975) (**Figura 14**), aunque se observó que solo el 10% de los DEGs encontrados en el mutante *flc*- bajo este estrés eran comunes a WT. Esta observación, junto con el hecho de que las plantas WT cultivadas bajo estrés por salinidad compartían solo 40 (22 sobreexpresados y 18 reprimidos) transcritos con las plantas WT cultivadas bajo altas temperaturas, y solo 85 transcritos (18 sobreexpresados y 67 reprimidos) con las plantas WT cultivadas bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, indican que las plantas WT eran más tolerantes al estrés por salinidad que a las altas temperaturas o a la combinación de estreses, y que el metabolismo de la planta necesita menos reajuste del transcriptoma en el estrés por salinidad (Rivero et al. 2014). Por otro lado, en los mutantes *flc*- cultivados bajo salinidad, 1288 transcritos de entre los 1431 DEGs encontrados en este tratamiento fueron específicamente regulados al alza por esta condición (~90%) (**Figura 14**). Esto indica que los mutantes *flc*- son más susceptibles a la salinidad que las plantas WT, y que la vía dependiente de ABA juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta al estrés por salinidad (Hussain et al. 2021; Mathan et al. 2021). Los mutantes *flc*- compartieron el 65% y el 47% de los DEGs con las plantas WT bajo estrés por altas temperaturas y bajo la combinación de estreses, respectivamente, por lo que la mitad de la respuesta del transcriptoma fue dependiente de las altas temperaturas o de la salinidad + altas temperaturas (**Figura 14**). Pero lo más importante es que la otra mitad de los DEGs eran genotipo-dependientes, destacando la importancia de la vía independiente del ABA en la respuesta de la planta a las altas temperaturas y a la salinidad + altas temperaturas.

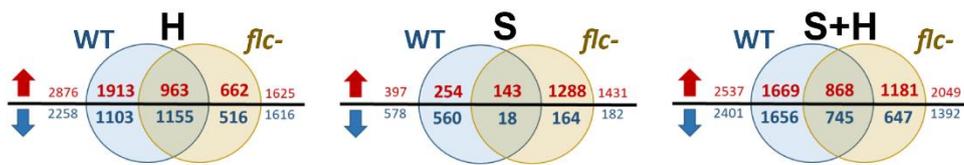


Figura 14. Diagramas de Venn de los DEGs en mutantes WT y *flc-* bajo salinidad (S), altas temperaturas (H) o la combinación de salinidad y altas temperaturas (S+H).

El interés de nuestra investigación se centró en los DEGs presentes en las plantas WT y *flc-* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, y no bajo una única condición de estrés, ya que estas últimas ya han sido ampliamente estudiadas. Con este objetivo, los DEGs obtenidos de ambos genotipos bajo estrés único y combinado se trazaron en diagramas de Venn (**Figuras 15A y 15B**). Nuestros resultados demostraron que la combinación de salinidad + altas temperaturas indujo una respuesta transcriptómica específica, tanto en plantas WT como *flc-*, que fue diferente de la observada bajo salinidad o altas temperaturas aplicadas individualmente (**Figuras 15A y 15B**). Se observó que el número de genes específicamente regulados al alza en los mutantes *flc-* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas fue significativamente mayor (817) que los encontrados en WT (547) (**Figura 15A**). La observación de una reprogramación específica bajo estreses combinados ha sido ampliamente reportada por otros investigadores, y destaca la importancia de estos estudios (Zandalinas et al. 2016b; Lopez-Delacalle et al. 2021b; Mikołajczak et al. 2022).

Un análisis de enriquecimiento GO basado en los procesos biológicos afectados mostró que, en ambos genotipos, los genes relacionados con la modificación del ARN y el plegamiento de proteínas estaban significativamente enriquecidos (**Figura 15A**). Las condiciones ambientales adversas, como el estrés térmico, pueden interrumpir el plegamiento de proteínas, que es un proceso propenso a errores, lo que conduce al estrés en el retículo endoplásmico y, en consecuencia, desencadena la respuesta que resulta en la acumulación de proteínas mal plegadas (Li et al. 2020c). Además, en los mutantes *flc-*, muchos de estos 817 DEGs que fueron específicamente regulados bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas estaban relacionados con el proceso de transcripción, lo que reveló que hay muchos genes específicos independientes de ABA

comprometidos con la maquinaria transcripcional en respuesta a la combinación de salinidad + altas temperaturas (**Figura 15A**).

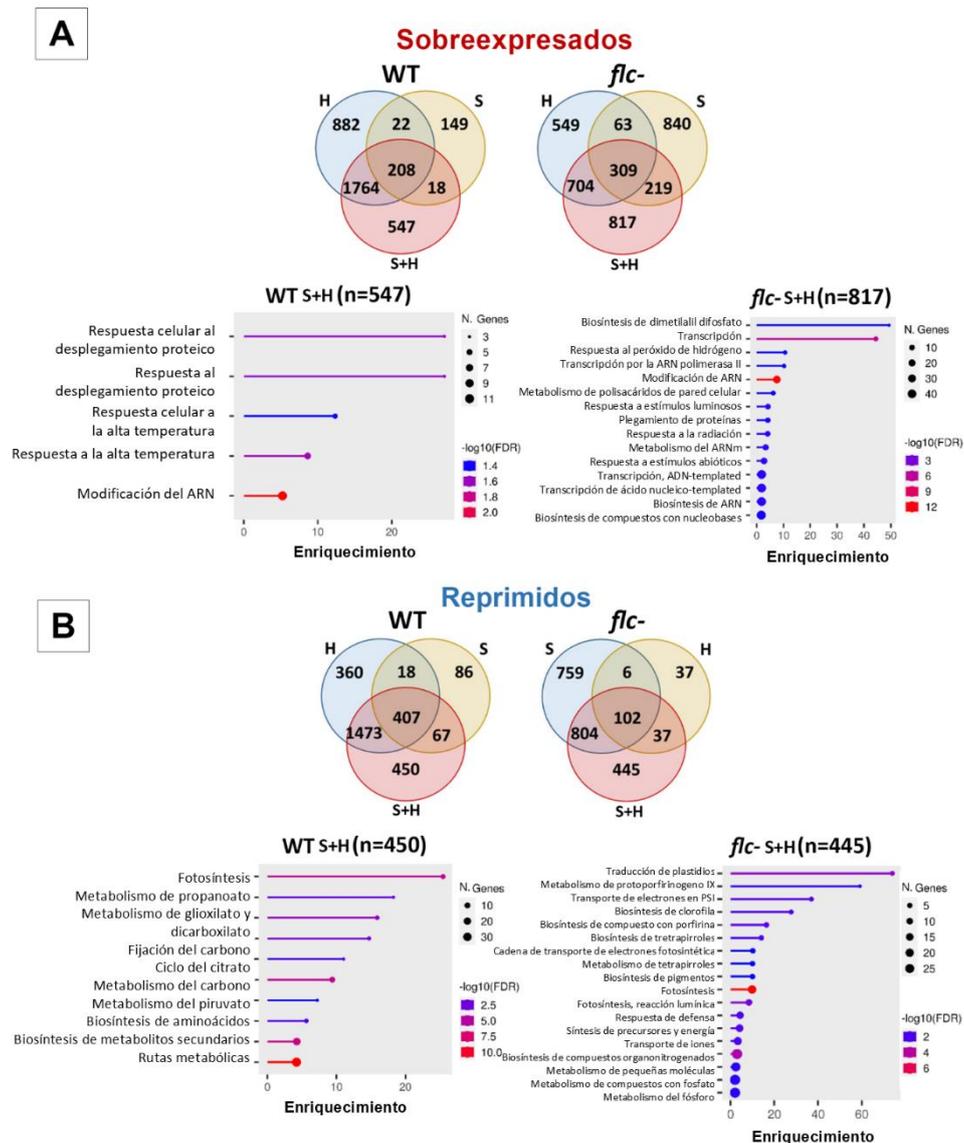


Figura 15. Diagramas de Venn representando los DEGs sobreexpresados (A) y reprimidos (B) en WT y mutantes *flc-* bajo salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H) y análisis de enriquecimiento GO para los DEG específicos sobreexpresados (A) y reprimidos (C) bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H) en plantas WT y mutantes *flc-*.

Además, con respecto al número de genes que fueron específicamente reprimidos en la combinación de salinidad + altas temperaturas (**Figura 15B**), ambos genotipos presentaron un número similar de DEGs (450 en WT y 445 en *flc-*). Sin embargo, un

análisis de enriquecimiento GO reveló que en las plantas WT, la mayoría de los procesos importantes relacionados con el metabolismo primario (fotosíntesis, síntesis de aminoácidos y piruvato, ciclo de Krebs y metabolismo del glioxilato) y secundario estaban significativamente regulados a la baja. En los mutantes *flc-*, estos genes regulados a la baja se asociaron principalmente con la ruta biosintética de la clorofila (traducción en plastidios, síntesis de protoporfirina y síntesis de tetrapirrol), el transporte de electrones en fotosistema I (PSI) y el proceso metabólico del fósforo. Bajo condiciones de estrés, la disminución en la producción de clorofila resulta en la acumulación de sus intermediarios junto con ROS. Se ha sugerido que las ROS, producidas por los mediadores de porfirina, funcionan como moléculas de señalización dentro de la vía de respuesta al estrés. Por lo tanto, se ha postulado previamente que el aumento de ROS activa la red de respuesta al estrés, lo que en última instancia conduce a la regulación a la baja de los genes asociados con el metabolismo de la porfirina y la inhibición del metabolismo de la clorofila (Yun et al. 2013; Karami et al. 2023).

3.4 Metabolismo oxidativo, transcripción y transporte como rutas enriquecidas específicamente en mutantes *flc-* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas

Los estudios sobre la combinación de estreses abióticos pueden proporcionar una mejor comprensión de los marcadores moleculares específicos implicados en la tolerancia al estrés de las plantas. En nuestro caso, los datos transcriptómicos mostraron una clara implicación de la vía independiente del ABA en esta respuesta específica de la combinación. Nuestro estudio se centró en aquellos DEGs que estaban específicamente regulados en los mutantes *flc-* crecidos bajo la combinación de estreses, y al mismo tiempo, no eran compartidos por ninguna otra condición de estrés o con las plantas WT. Con este objetivo, se construyó un Upset Plot (**Figura 16A**), donde los DEGs encontrados en mutantes *flc-* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas (2047 sobreexpresados, 1390 reprimidos, total 3437) se compararon con todos los DEGs encontrados en WT bajo cualquiera de las condiciones de estrés utilizadas o en mutantes *flc-* bajo un único estrés. De esta forma se extrajeron un total de 685 DEGs (**Figura 16A**, marcados en naranja). Curiosamente, esta combinación de estreses produjo el segundo

mayor número de DEGs (685), después de WT bajo altas temperaturas (893). Estos DEGs no se compartieron con ningún otro genotipo o condición utilizada en nuestros experimentos, subrayando la especificidad de esta combinación de estreses en la reprogramación del transcriptoma de las plantas de tomate deficientes en ABA. Suzuki et al. (2016) demostraron que los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en el metabolismo y la señalización del ABA eran más susceptibles a la combinación de los estreses salinidad + altas temperaturas que las plantas de tipo silvestre, lo que respalda nuestros hallazgos y demuestra la importante reprogramación transcripcional de la planta bajo una deficiencia de ABA (Suzuki et al. 2016).

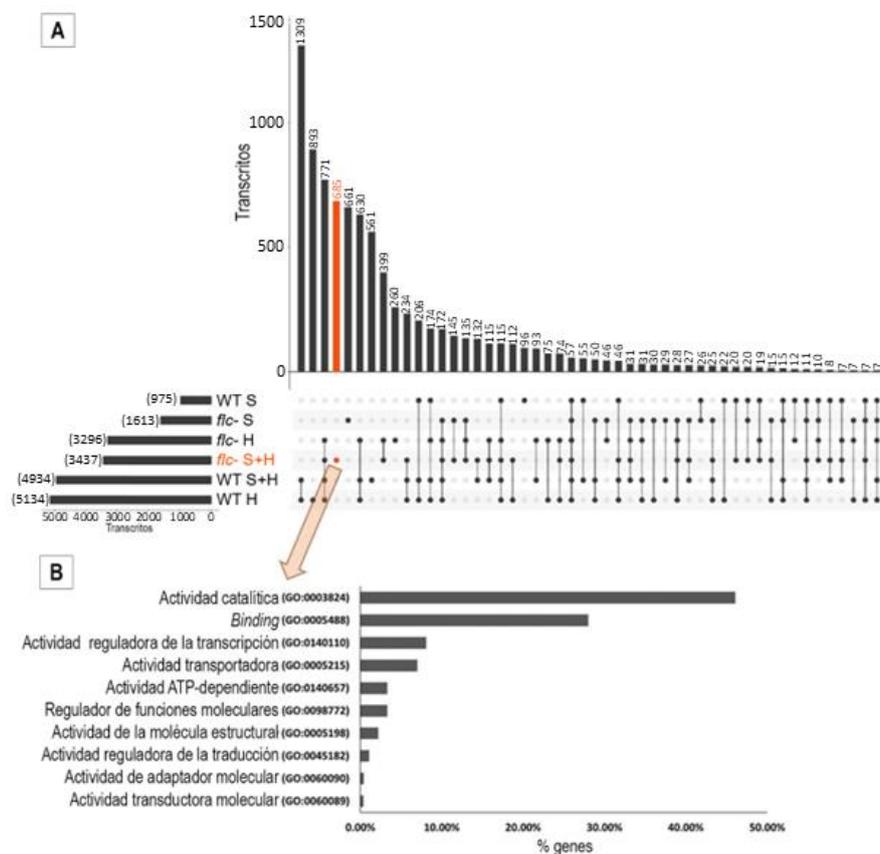


Figura 16. Identificación de los DEGs específicos de la plantas *f1c-* bajo la combinación de estreses (color naranja). (A) Diagrama de superposición que muestra las intersecciones entre los conjuntos de DEGs encontrados bajo estrés simple o combinado. Los genes regulados al alza y a la baja para cada genotipo y condición se colocaron en el mismo conjunto. (B) Análisis de enriquecimiento GO de los 685 DEGs específicos encontrados bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas en mutantes *f1c-*.

A continuación, se extrajeron estos 685 transcritos y se realizó un análisis de enriquecimiento GO mediante la herramienta *Phanter*, donde se observó que la mayoría de ellos estaban relacionados con la actividad catalítica (46%), la transcripción (40%) y el transporte (9%) (**Figura 16B**). Entre los DEGs con enriquecimiento GO para la actividad catalítica, los relacionados con el metabolismo oxidativo representaron casi el 20% del total, y la mayoría de ellos mostraron una expresión aumentada bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas. Considerando que todos estos genes solo están regulados específicamente en los mutantes *flc*- bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, y que no se encontraron entre los DEGs de WT bajo ninguna condición de estrés, se subraya aquí la existencia de una vía independiente de ABA asociada con algunos genes relacionados con el metabolismo oxidativo, la transcripción y la actividad de transporte.

Previamente se demostró que la deficiencia de ABA puede inducir la expresión de genes relacionados con ROS, desencadenando una oleada de ROS, conocida comúnmente como “ROS wave”. Esta oleada es necesaria para el control estomático bajo estrés abiótico, y actúa en coordinación con las oleadas de señalización de Ca^{2+} (Mittler and Blumwald 2015; Postiglione and Muday 2020). La deficiencia de ABA en nuestros mutantes *flc*- también indujo específicamente la expresión de algunos transcritos relacionados con ROS bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas y provocó cambios en la gs. Sin embargo, en mutantes *flc*- perduró la desregulación de la apertura estomática debida a la deficiencia de ABA (**Figuras 12D y 12E**). Los recientes avances en el estudio de la señalización de ROS en las plantas implican el descubrimiento de receptores de ROS y centros reguladores cruciales. Estos componentes establecen conexiones entre la señalización de ROS y otras rutas significativas relacionadas con la respuesta al estrés y las hormonas como ABA (revisado por Mittler et al., 2022).

Por otro lado, los DEGs relacionados con la transcripción también se enriquecieron significativamente entre los transcritos que se regularon específicamente bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas (40%), lo que confirma que la deficiencia de ABA afecta directamente a la reprogramación de la maquinaria transcripcional del tomate bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas.

3.5 La transcripción y la ruta de biosíntesis de la serina/treonina quinasa como rutas enriquecidas e independientes de la señalización de ABA bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas

Los mutantes *flc*- mostraron una concentración basal de ABA (muy baja, pero con cierta síntesis y acumulación de ABA, **Figura 12C**) y este hecho hacía que no se pudiese afirmar con rotundidad que los 685 DEGs que se encontraron específicamente regulados en *flc*- bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas (**Figura 16A**) estuvieran también sujetos a una regulación independiente de ABA. Para poder confirmar lo anteriormente expuesto, se realizó una secuenciación del ARN en las plantas mutantes *flc* suplementadas con 100 μ M ABA (*flc*+), con el objetivo de eliminar aquellos DEGs residuales cuya regulación estuviese sujeta a la mínima concentración de ABA endógeno encontrado en estas plantas.

Tras normalizar los datos obtenidos en *flc*+ bajo estrés simple o combinado, frente a las plantas *flc*+ cultivadas en condiciones control, los DEGs obtenidos se emparejaron en un Diagrama de Venn (**Figura 17A**) con los 685 DEGs que se expresaban específicamente bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas encontrados en nuestro experimento anterior (**Figura 16A**, marcados en naranja). Las plantas *flc*+ cultivadas bajo salinidad + altas temperaturas o bajo altas temperaturas obtuvieron el mayor número de DEGs (6583 y 5978, respectivamente). De éstos, 1386 transcritos fueron regulados específicamente en *flc*+ bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, lo que subrayó de nuevo la especificidad de esta combinación de estreses en la respuesta transcripcional de la planta. En este sentido, 37 genes eran comunes a los 685 genes extraídos anteriormente que estaban específicamente regulados bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas (**Figura 17A**), lo que indica que estos genes posiblemente estaban sujetos a la regulación del ABA. Del mismo modo, otros 185 genes en total se compartieron con las otras condiciones de estrés abiótico aplicadas a *flc*+, que no se tuvieron en cuenta para futuros análisis por considerarse posibles DEGs dependientes del ABA. Así, se eliminaron un total de 222 transcritos de la lista inicial de 685, y los 463 genes restantes se consideraron específicos de la combinación de salinidad + altas temperaturas y, lo que resulta aún más relevante, regulados de manera independiente del ABA (**Figura 17A**).

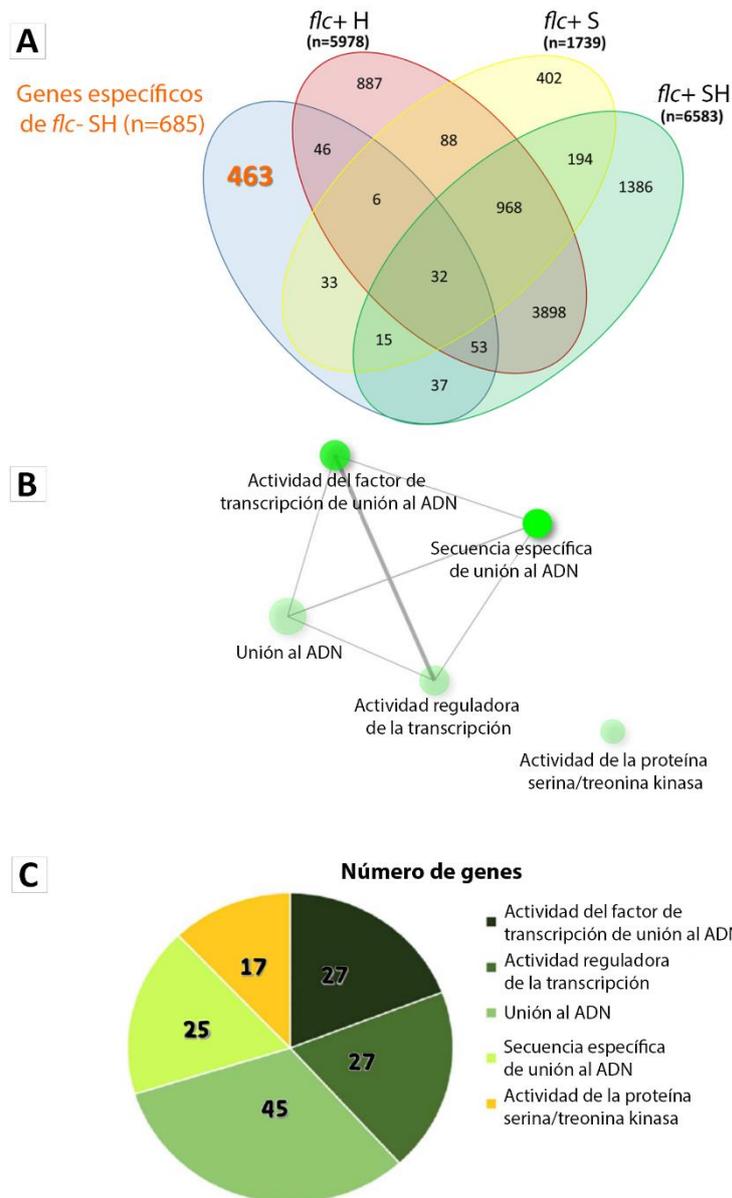


Figura 17. Identificación de genes independientes del ABA regulados específicamente por la combinación de salinidad y altas temperaturas. (A) Diagrama de Venn que muestra las intersecciones entre los conjuntos de DEGs específicos encontrados en mutantes *flc*- bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas (n=685, **Figura 16A**) y los DEGs encontrados en mutantes *flc*+ bajo estrés simple o combinado. (B) Enriquecimiento de las rutas de funciones moleculares de los DEGs independientes del ABA específicos para la combinación de salinidad + altas temperaturas (DEGs naranjas de la **Figura 17A**; corte FDR: 0.02). El tamaño de los círculos es proporcional al número de genes relacionados con esa vía y la intensidad del color está relacionada con el nivel de significación del p-valor de la vía ($p < 0,05$) (C) Número de genes representativos de cada vía.

Estos 463 DEG se sometieron a un análisis de enriquecimiento de red transcriptómica en base a su función molecular (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>; **Figura 17B**) utilizando un corte FDR de 0,02. Este análisis reveló una red enriquecida que incluía 124 genes asociados a la transcripción y 17 genes relacionados con proteínas de actividad serina/treonina quinasa entre los DEGs detectados (**Figuras 17B y 17C**).

En la literatura, se encontraron varias publicaciones que demostraron la regulación transcripcional de la expresión génica gobernada por varias vías clave de FTs que operan en rutas de señalización dependientes e independientes de ABA bajo estrés abiótico (Hussain et al. 2021), que están reguladas por AREB/ABFs (bZIP FTs) y DREB2A (familia AP2/ERF de FTs específicos de plantas), respectivamente (Yoshida et al. 2014). DREB2 se ha identificado como los principales FTs en vías independientes de ABA en *Arabidopsis* y soja bajo estrés único por sequía y/o salinidad (Yoshida et al. 2014; Chen et al. 2016). Además, algunos estudios se han ocupado de la funcionalidad de estos DREBs y de los genes que pueden regular bajo condiciones de estrés abiótico simple. Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, ésta es la primera vez que se muestra una lista enriquecida de 124 genes relacionados con la transcripción bajo regulación independiente de ABA, que están específicamente regulados bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas. Y lo que es más importante, estos FTs no fueron regulados significativamente bajo altas temperaturas o salinidad aplicados como estreses individuales.

De estos 124 genes relacionados con la transcripción (**Figura 17C**), algunos de ellos se repetían entre los distintos grupos de funciones moleculares GO. Así pues, solo se extrajeron 49 transcritos verdaderamente relacionados con la transcripción y se sometieron a análisis adicionales.

3.6 SIMYB50 y SIMYB86 como principales factores de transcripción en la señalización independiente de ABA bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas

Los 49 DEGs extraídos del análisis anterior que codifican FTs específicos de la combinación de salinidad + altas temperaturas e independientes de ABA fueron agrupados según las diferentes familias de FTs conocidas. La mayoría de estas familias

estaban representadas por 2-3 FTs; excepto la familia MYB, que estaba representada por 9 de ellos (**Figura 18**). Además, fue notable que la mayoría de los FTs encontrados entre todas las familias de FTs estuvieron sobreexpresados y solo 4 FTs estuvieron reprimidos. Esto sugiere la necesidad de una reprogramación transcripcional independiente de ABA en los mutantes *flc* bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas.

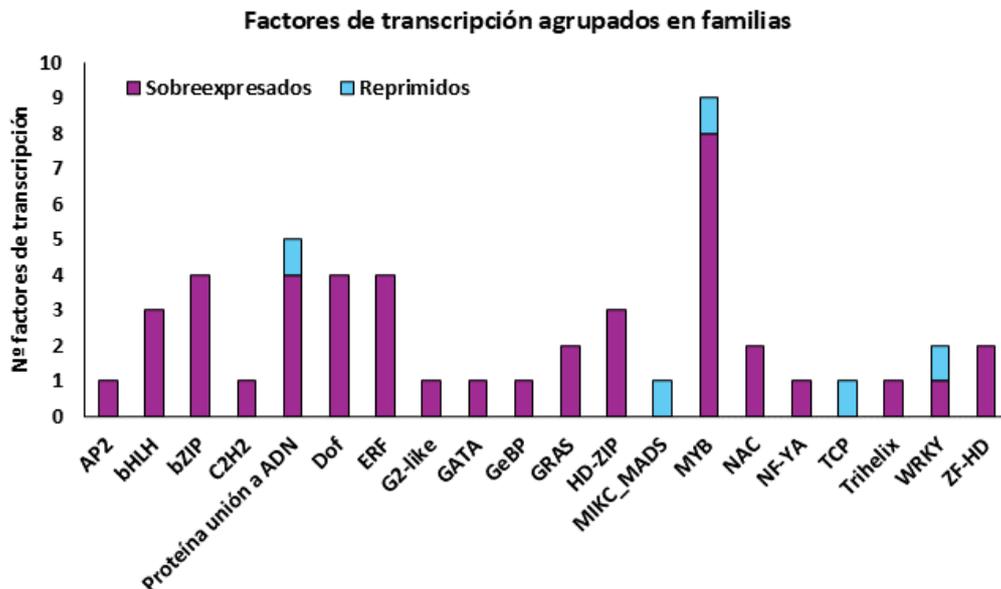


Figura 18. Número de factores de transcripción sobreexpresados y reprimidos e identificados por tener una regulación independiente del ABA y específica bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas.

Hay que tener en cuenta que la familia MYB es la más numerosa, con un total de 140 FTs en tomate (PlantTFDB <http://planttfdb.gao-lab.org/>), y, por ello, parecería obvio que fueran los más numerosos en nuestro análisis. Sin embargo, los 9 FTs de la familia MYB de esta lista, con casi todos ellos sobreexpresados, fueron considerados de suma importancia porque muchos los miembros de la familia MYB están involucrados en muchos procesos celulares, incluyendo el crecimiento de las plantas (Oppenheimer et al. 1991), las respuestas de las plantas a factores ambientales y hormonas (Urao et al. 1993; Magaraggia et al. 1997; Jin and Martín 1999; Lee et al. 2007), los procesos de transducción de señales (Gubler et al. 1995; Hamaguchi et al. 2008; Li et al. 2019d), y la defensa contra patógenos (Shan et al. 2016; Noman et al. 2019), entre otros. También fueron relevantes para este estudio debido a que la regulación de los FTs de la familia MYB puede ser dependiente e independiente de ABA (Zhao et al. 2014).

Existen cuatro clases de proteínas MYB en función del número de repeticiones adyacentes (una, dos, tres o cuatro). Las tres repeticiones de la proteína MYB prototípica c-Myb se denominan R1, R2 y R3 (Kirik and Bäumlein 1996; Dubos et al. 2010). La clase más heterogénea comprende proteínas con una repetición única o parcial de MYB, denominadas colectivamente "relacionadas con MYB" y la clase R2R3- MYB es la más numerosa (Dubos et al. 2010). Nuestros resultados mostraron que, de los 7 genes que contienen el dominio R2R3 MYB, 6 estaban sobreexpresados (SIMYB2, SIMYB102, SIMYB10, SIMYB50, SIMYB32, SIMYB86) y uno (SIMYB84) reprimido bajo nuestras condiciones específicas (**Tabla 3**).

Familia FT	Gen	Anotación	Expresión (FC Log ₂)	p-valor
MYB	Solyc01g057910.3	Factor de transcripción R2R3MYB 2	1.50815967	0.00194724
MYB	Solyc02g079280.3	Factor de transcripción MYB	1.64056619	0.00079907
MYB	Solyc05g055030.2	Factor de transcripción R2R3MYB 10	1.53656306	0.00011098
MYB	Solyc06g071690.3	Factor de transcripción R2R3MYB 50	1.34874388	0.0046613
MYB	Solyc10g055410.2	Factor de transcripción R2R3MYB 32	1.47040198	0.00837457
relacionado _MYB	Solyc03g121840.3	Factor de unión a repeticiones teloméricas 4 (AHRD V3.3 *** A0A2I4FU12_9ROSI)	1.12065279	0.00348618
relacionado _MYB	Solyc06g076270.3	Factor de unión a repeticiones teloméricas 2 (AHRD V3.3 *** A0A2G3CBM6_CAPCH)	1.72629363	6.01E-05
MYB	Solyc02g091980.2	Proteína <i>blind-like7</i>	-1.07388131	0.00027206
MYB	Solyc03g112390.3	Factor de transcripción R2R3MYB 86	1.17780703	0.0004497

Tabla 3. Factores de transcripción (FTs) de la familia MYB o relacionados con MYB identificados en la **Figura 18**.

Las proteínas R2R3MYB desempeñan funciones reguladoras en los procesos de desarrollo y participan en las respuestas de defensa en las plantas (Zhao et al. 2014), con un total de 121 genes R2R3MYB identificados en el genoma del tomate. Además, los SIR2R3MYBs de *Solanum lycopersicum* juegan papeles importantes en la respuesta de la planta a condiciones de estrés abiótico, estando implicados en vías de transducción de señales (Zhao et al. 2014). Asimismo, se ha demostrado que el AtMYB2 de *Arabidopsis* participó en la respuesta a los estreses simples sequía y salinidad de una forma dependiente de ABA (Abe et al. 2003). También, Yang et al. (2012) demostraron que las plantas de arroz que sobreexpresaban OsMYB2 eran más tolerantes al estrés por sal, frío

y deshidratación, y más sensibles al ABA que las plantas WT (Yang et al. 2012a). Sin embargo, nuestros resultados indican una regulación independiente del ABA de este SIMYB2 bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas en plantas de tomate, lo que nos indica de nuevo la especificidad de esta combinación de estreses. Por otro lado, Liao et al. (2008) mostraron que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban GmMYB76, GmMYB92 o GmMYB177 de soja mostraban una sensibilidad reducida al ABA y exhibían una mejor tolerancia a los tratamientos de sal y congelación en comparación con las plantas WT, siguiendo una regulación independiente del ABA (Liao et al. 2008). De forma similar, también se encontró que el OsMYB3R2 de *Oryza sativa* sobreexpresado en plantas de *Arabidopsis* funcionaba bajo regulación independiente de ABA cuando estas plantas eran crecidas en condiciones estrés por frío, sequía o salinidad (Dai et al. 2007). Los resultados de ese estudio sugirieron una regulación independiente del ABA de algunos FTs R2R3MYB bajo estrés abiótico, pero estos experimentos solo se ensayaron bajo la aplicación de un único estrés y, sin demostrar si esta regulación se mantiene cuando los estreses abióticos se aplican en combinación.

Para verificar positivamente una regulación independiente del ABA de estos FTs MYB seleccionados, se analizaron todas sus secuencias promotoras. No se encontró ningún ABRE (ACGTGG/TC) en ninguno de ellos, excepto en SIMYB84 (base de datos *Solanaceae* Genome Network; <https://solgenomics.net/>). Dado que SIMYB84 fue el único gen de esta lista de FTs que estuvo reprimido, se puede hipotetizar que una deficiencia de ABA gobernó su regulación diferencial.

Para profundizar más en la implicación de la sobreexpresión de estos factores de transcripción SIMYB relacionados con la respuesta de las plantas a la combinación de salinidad + altas temperaturas, se realizó un análisis de redes de interacción de proteínas funcionales predictivas utilizando STRING (<https://string-db.org/>) con estos 7 genes R2R3MYB identificados en nuestro análisis anterior. Estas redes de proteínas predictivas pueden ayudarnos a dilucidar las dianas potenciales de estos FTs y su regulación específica. SIMYB2 y SIMYB102 se relacionaron con el espliceosoma; SIMYB32 se relacionó con la biosíntesis de aminoácidos, y SIMYB84 se relacionó con la función de unión al ADN. Sorprendentemente, SIMYB50 y SIMYB86 mostraron una red de interacción proteica idéntica, con un enriquecimiento GO de la *Kyoto Encyclopedia of*

Genes and Genomes (KEGG) en la ruta de síntesis de flavonoides. La primera hipótesis que surgió fue que estos dos genes podrían ser quizás el mismo gen. Sin embargo, tras una comprobación de identidad realizada en la base de datos *Solanaceae* Genome Network (<https://solgenomics.net/tools/blast/>) mediante un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), estos dos transcritos solo compartían un 58,68% de identidad, por lo que se consideraron genes diferentes con una función idéntica. Así, y debido al interés en estudiar la sobreexpresión observada en estos dos FTs (SIMYB50 y SIMYB86), que a su vez pueden regular los mismos genes, se mantuvieron estas dos redes de interacción proteica para los análisis posteriores. Tras realizar un análisis de agrupación de k-means dentro de estas dos redes, así como un análisis de enriquecimiento GO, se encontró que dos rutas específicas estaban enriquecidas: el proceso biosintético de flavonoides (verde) y la translocación de fosfolípidos (amarillo) (**Figura 19**).

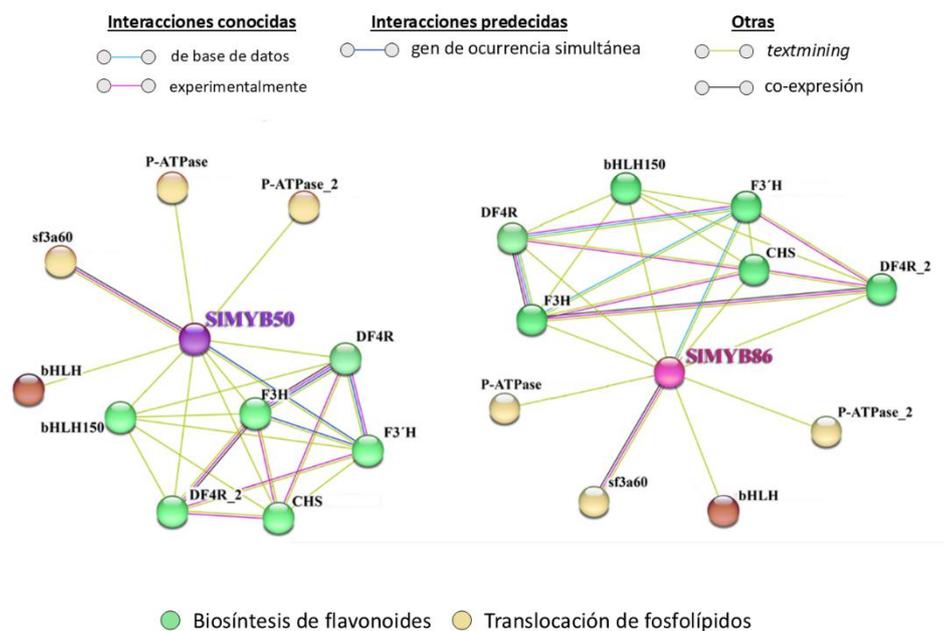


Figura 19. Redes de interacción de proteínas funcionales de SIMYB50 y SIMYB86. *sf3a60*: subunidad 3a del factor de empalme, *DF4R*: dihidroflavonol 4-reductasa, *CHS*: chalcona sintasa, *F3H*: flavanona 3-hidroxilasa y *F3'H*: flavanona 3'-hidroxilasa.

Los flavonoides comprenden un gran grupo de metabolitos secundarios con una amplia gama de funciones biológicas, entre ellas, la protección frente al estrés en plantas (Winkel-Shirley 2002). La vía de la biosíntesis de flavonoides es una rama de la vía general

de los fenilpropanoides, con el primer paso catalizado por la chalcona sintasa (CHS). En esta vía, enzimas como la chalcona isomerasa (CHI), la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), la flavanona 3'-hidroxilasa (F3'H) y la flavonol sintasa (FLS) son fundamentales para la biosíntesis de los flavonoles kaempferol y quercetina, que a su vez pueden ser glicosilados por una serie de glicosiltransferasas (Winkel-Shirley 2002). En 2016 nuestro grupo de investigación demostró que la mayoría de los genes que pertenecen a la vía biosintética de los flavonoides están sobreexpresados de forma diferencial y específica bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas en plantas de tomate, y que los flavonoles se acumulaban por encima de los ácidos hidroxicinámicos (Martinez et al. 2016).

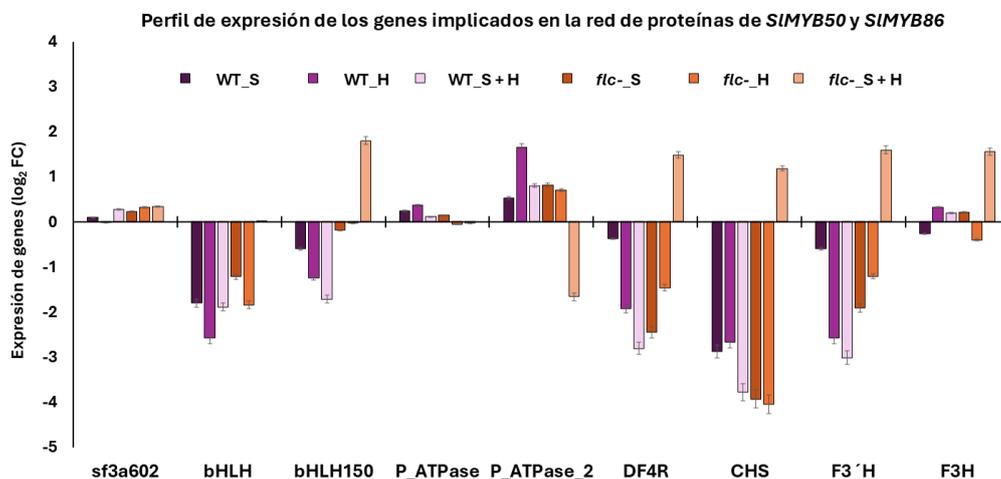


Figura 20. Valores de expresión (log₂FC) de los genes representados dentro de las redes de interacción de proteínas SIMYB50 y SIMYB86 en mutantes WT y *flc*- bajo estrés simple y combinado. *sf3a602*: subunidad 3a del factor de empalme, *DF4R*: dihidroflavonol 4-reductasa, *CHS*: chalcona sintasa, *F3H*: flavanona 3-hidroxilasa y *F3'H*: flavonoide 3'-hidroxilasa.

Los valores de expresión en forma de FC log₂ de los genes contenidos en estas redes de interacción de proteínas SIMYB50 y SIMYB86 fueron determinados en plantas WT y *flc*- bajo estrés simple y combinado (**Figura 20** y **Tabla S1**). Sorprendentemente, los pertenecientes a la rama biosintética de los flavonoides (*DF4R*, *CHS*, *F3H* y *F3'H*) fueron significativamente sobreexpresados en los mutantes *flc*- cultivados bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas, mientras que fueron significativamente reprimidos o no fueron significativos en WT (bajo cualquier condición de estrés aplicada), o en los mutantes *flc*- cultivados bajo condiciones de estrés único. Estos resultados confirman

que la sobreexpresión de SIMYB50 y SIMYB86 siguió una regulación independiente del ABA y específica de salinidad + altas temperaturas, y que estos FTs pueden controlar la sobreexpresión de los genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides. Por lo tanto, en las plantas de tomate, SIMYB50 y SIMYB86 pueden ser marcadores moleculares potenciales para mejorar la biosíntesis de flavonoides y la resistencia de la planta a la combinación de salinidad + altas temperaturas.

Los flavonoides vegetales no solo presentan potentes propiedades antioxidantes, sino que también funcionan como reguladores del metabolismo celular. Existe la hipótesis de que pueden influir en las rutas de señalización celular interactuando con los receptores de la superficie celular o insertándose en la bicapa lipídica de las membranas. Ciertos flavonoides tienen la capacidad de aumentar la viscosidad de los lípidos y reducir la cooperatividad de la fusión de las cadenas de hidrocarburos, mientras que otros pueden reducir significativamente la temperatura de fusión de los lípidos, permitiendo así cambios en la difusión de los lípidos. Por tanto, los flavonoides también pueden modular el metabolismo celular cuando influyen en las balsas lipídicas, ya que estas desempeñan un papel crucial en la transducción de señales celulares, la endocitosis y el movimiento transmembrana de diversos compuestos (Tarahovsky et al. 2008; Karonen 2022). Nuestro análisis de agrupación de GO en SIMYB50 y SIMYB86 mostró un enriquecimiento significativo en el proceso de biosíntesis de flavonoides (verde), pero también en la translocación de fosfolípidos (amarillo) (**Figura 19**), señalando el papel putativo de los flavonoides en el control del metabolismo de los fosfolípidos bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas de una manera independiente de ABA.

4. Conclusiones

En este capítulo se ha logrado identificar genes independientes de la regulación por ABA involucrados en la respuesta de la planta de tomate frente a la combinación de los estreses salinidad y altas temperaturas. Utilizando mutantes de tomate deficientes en ABA (*flc*), se ha demostrado que la combinación de ambos estreses reprograma de manera significativa el transcriptoma de estas plantas, activando un conjunto de 463 genes específicos, cuya regulación es independiente de ABA. Estos genes están relacionados principalmente con la regulación de la transcripción o con las proteínas quinasa. Entre ellos, destaca la sobreexpresión de 2 FTs de la familia R2R3-MYB, SIMYB50

y SIMYB86, los cuales se encuentran directamente relacionados con la biosíntesis de flavonoides. En definitiva, nuestros resultados indican que la regulación de SIMYB50 y SIMYB86 responde exclusivamente a la combinación de salinidad y altas temperaturas, mientras que no se observa esta respuesta bajo la aplicación de estreses individuales, y que estos actúan de manera independiente al ABA en respuesta a esta combinación de estreses.

En conjunto, esta investigación proporciona nuevos conocimientos sobre la adaptación de las plantas a ambientes adversos mediante rutas de señalización alternativas al ABA. La identificación de estos genes y rutas podría ser clave para el desarrollo de estrategias biotecnológicas dirigidas a mejorar la tolerancia de los cultivos a condiciones extremas de estrés ambiental, especialmente en el contexto de cambio climático y seguridad alimentaria global. Futuros estudios en plantas de tomate que sobreexpresen o tengan silenciados estos dos R2R3MYB (SIMYB50 y SIMYB86) aportarán información valiosa sobre su papel en la tolerancia de las plantas al estrés abiótico.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

1. Introducción

Las plantas responden al estrés ambiental mediante mecanismos adaptativos que implican cambios en la expresión génica, la regulación iónica, el equilibrio hormonal, la biosíntesis o degradación de proteínas y de metabolitos, entre otros procesos. Además, las alteraciones de estos procesos metabólicos son específicas de cada estrés o de cada combinación de estreses y dependen de la intensidad y la duración de estos (Gong et al. 2020; Jiang et al. 2022). Hoy en día, la gran disponibilidad de datos -ómicos (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, fenómica) permiten a la comunidad científica conocer de una forma más específica las distintas respuestas de las plantas al estrés. Entender cómo estos mecanismos se integran desde la percepción del estrés hasta los ajustes bioquímicos y fisiológicos es un reto importante en los estudios de señalización del estrés abiótico. Además, todas las ómicas están interconectadas, lo que pone de manifiesto la complejidad de la respuesta del metabolismo vegetal al estrés. Por ende, la multiómica se ha desarrollado como una nueva herramienta para comprender la complejidad de la regulación de esta intrincada red metabólica, y pretende identificar marcadores moleculares específicos en cada ómica (Subramanian et al. 2020; Derbyshire et al. 2022; Roychowdhury et al. 2023).

Como ya vimos en el capítulo anterior, un importante regulador de la respuesta al estrés abiótico en las plantas es la fitohormona ABA que interviene en numerosos procesos metabólicos, como el cierre estomático, el desarrollo vegetal y la expresión de genes relacionados con el estrés (Fujii et al. 2007; Dittrich et al. 2019). El uso de mutantes deficientes en ABA ha permitido la identificación de muchos componentes de la vía dependiente de ABA en cualquier condición de estrés (Min et al. 2000; Sagi et al. 2002; Brookbank et al. 2021). Esta vía dependiente de ABA está implicada en muchos procesos, como la optimización del crecimiento (Cutler et al. 2010), el aumento de ROS y antocianinas (Watkins et al. 2017; Watanabe et al. 2018), la disminución de los niveles de Ca^{2+} (Khan et al. 2013), el aumento de la transcripción de genes relacionados con el estrés oxidativo (Liu et al., 2019b) o el aumento de azúcares solubles (Xu et al. 2023a),

entre otros. No obstante, como vimos en el capítulo anterior, las plantas también pueden responder al estrés de forma independiente del ABA (Pardo-Hernández et al. 2024a). Asimismo, otros investigadores han demostrado que las ubiquitina ligasas ATL31 y ATL6 en *Arabidopsis* y la colina monooxigenasa en *Kochia scoparia* regulan la respuesta de las plantas al estrés salino a través de una vía independiente del ABA (Kalinina et al. 2012; Du et al. 2023). Por lo tanto, investigar tanto las respuestas dependientes como independientes de ABA es crucial para diseñar plantas con mayor tolerancia frente a condiciones extremas de estrés abiótico en un contexto de cambio climático.

En resumen, este capítulo de la tesis se diseñó para investigar la implicación del ABA en la respuesta integrada de multiómicas (fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica) en plantas de tomate bajo condiciones de estrés simples o estreses combinados, utilizando mutantes de tomate deficientes en ABA (*flc*, SOLYC07G066480). Este experimento también contó con plantas mutantes *flc* a las que se le aplicó ABA exógenamente para confirmar si el ABA estaba implicado en los cambios observados en las diferentes ómicas analizadas. Este capítulo confirma de nuevo lo observado en el capítulo anterior con respecto a la existencia de una respuesta específica de las plantas de tomate en función del estrés aplicado y de los niveles celulares de ABA endógeno. Más importante aún, nuestro estudio reveló que los marcadores moleculares identificados al analizar un solo nivel ómico pueden diferir de los obtenidos al considerar de manera conjunta todos los niveles ómicos. Por consiguiente, nuestra investigación identificó algunos marcadores moleculares importantes bajo condiciones control y bajo cada condición de estrés aplicada, lo que podría servir como herramienta útil para los científicos que trabajan en el campo del estrés abiótico y/o el ABA.

2. Material y metodología específica

En este capítulo, el material vegetal empleado fue el mismo que el que se recolectó del experimento realizado en el capítulo I de esta Tesis. En este capítulo II se realizaron las determinaciones que se explican a continuación.

En términos generales, se midió el peso fresco, el número de estomas y todos los parámetros fotosintéticos como se explica en el apartado “7. Análisis de parámetros fisiológicos o fenómica” de la sección “Materiales y métodos”. Además, se cuantificó el

ABA endógeno en las hojas de plantas de tomate, como se explica en el apartado “9. Cuantificación de ácido abscísico” de la sección “Materiales y métodos”.

Por otro lado, en las hojas de las plantas de tomate se llevaron a cabo análisis de transcriptómica, ionómica y metabolómica, tal y como se explica en los apartados “11. Análisis transcriptómico no dirigido”, “12. Determinación de la concentración de componentes minerales en hojas y raíces” y “13. Análisis metabolómico no dirigido (con la excepción del subapartado 13.7 que solo se llevó a cabo en el capítulo IV de esta tesis)”, respectivamente, de la sección “Materiales y métodos”.

En este capítulo II los DEGs fueron obtenidos mediante la comparación de las plantas WT bajo los tres tipos de estrés, las plantas *flc*- bajo los cuatro tratamientos y las plantas *flc*+ bajo los cuatro tratamientos, todos ellos con respecto a las plantas WT bajo condiciones control. Esta misma comparativa se llevó a cabo para obtener los DAMs y DAIs.

Por último, se integraron los cuatro conjuntos de datos (fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica) mediante un análisis multiómico explicado el apartado “15. Análisis multiómico” de la sección “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral.

3. Resultados y discusión

Este trabajo fue diseñado para investigar más a fondo la relación entre ABA y la posible coordinación de las respuestas al estrés de las plantas de tomate a diferentes niveles: fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica. Para ello, se compararon mutantes de tomate deficientes en ABA (*flc*-) cultivados en condiciones de estrés simple o combinado con plantas WT. Además, para corroborar si el ABA estaba relacionado con las respuestas estudiadas en los diferentes niveles -ómicos, la mitad de los mutantes *flc* fueron suplementados con 100 μ M de ABA (*flc*+) y comparados con plantas WT. Así, nuestro estudio pretendía identificar diferentes marcadores moleculares específicos para cada condición ambiental en estas plantas mutantes, tanto *flc*- como *flc*+. Además, con el objetivo de confirmar que los marcadores moleculares identificados son consistentes con el genotipo analizado, también se creó un modelo WT y se comparó con los anteriores modelos *flc*- y *flc*+ generados.

3.1 Respuesta del tomate a la deficiencia de ABA bajo estrés abiótico simple o combinado: modelo *flc*-

3.1.1 Fenómica del modelo *flc*-

Se realizó un análisis fenómico, definido como los rasgos físicos y bioquímicos que definen un genotipo (Jin, 2021), para investigar cómo la deficiencia de ABA podría afectar a las plantas de tomate bajo condiciones control o estrés por salinidad, altas temperaturas y la combinación de salinidad + altas temperaturas. Se determinó el crecimiento de las plantas mediante la medida del peso fresco. Además, se cuantificaron varios parámetros fotosintéticos y de fluorescencia de clorofila, y la concentración endógena de ABA en hojas de tomate en plantas WT y plantas mutantes deficientes en ABA (*flc*-) (**Figuras 12 y 21 y Tabla S2**).

La deficiencia de ABA en nuestros mutantes *flc*- indujo una reducción significativa de la biomasa foliar en comparación con las plantas WT debido a la inhibición del control del cierre estomático y a las altas tasas de transpiración (Dittrich et al. 2019). En el capítulo I solo se consideró el peso fresco foliar y en este capítulo se tuvo en cuenta el peso fresco (PF) total de las plantas de tomate. En resumen, las plantas WT redujeron su peso en un 40,52%, 50,59% y 45,62% debido a la salinidad, las altas temperaturas y la salinidad + altas temperaturas, respectivamente, en comparación con las plantas WT cultivadas en condiciones control. Por otro lado, el PF de los mutantes *flc*- se redujo en un 49,32%, 9,89% y 53,03% debido a la salinidad, las altas temperaturas y la salinidad + altas temperaturas, respectivamente, en comparación con los mutantes *flc*- cultivados en condiciones control. Así, en las plantas WT el estrés abiótico solo o en combinación indujo una reducción de la biomasa de entre el 40-50%, mientras que en los mutantes *flc*- solo la salinidad y la combinación de estreses indujeron esta reducción. Los mutantes *flc*- cultivados bajo estrés térmico no fueron significativamente diferentes de las plantas *flc*- cultivadas bajo condiciones control, posiblemente debido al menor tamaño de estas plantas, que podría contribuir a la tolerancia a las altas temperaturas (**Figura 21**). Como ya se explicó en el capítulo anterior, la concentración endógena de ABA fue significativamente menor en las plantas *flc*- en comparación con WT en todos los tratamientos (**Figura 12C**).

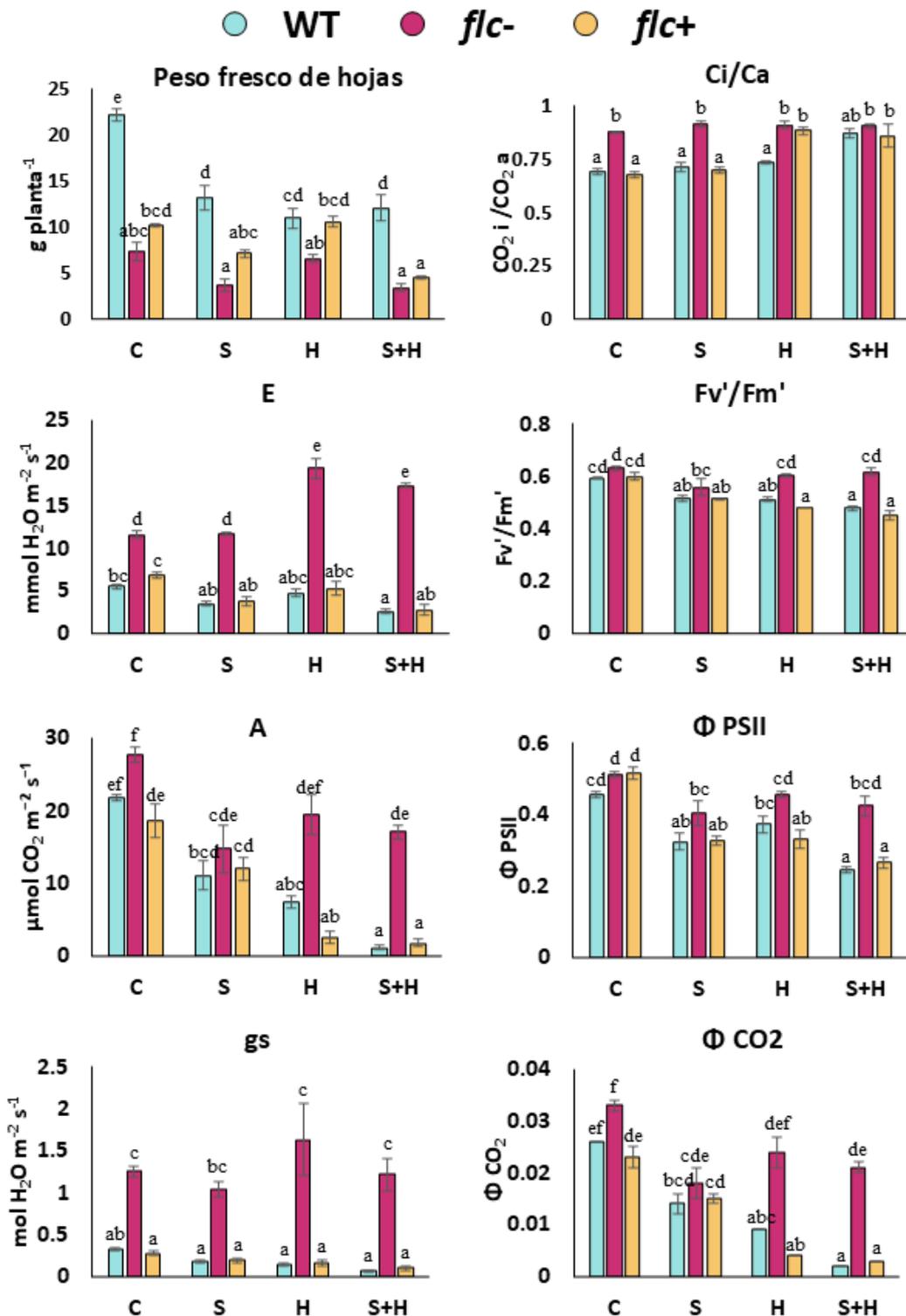


Figura 21. Gráficos de barras de los parámetros fisiológicos medidos en plantas WT y mutantes *flc-* y *flc+* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y combinación de salinidad y altas temperaturas (S+H). A: fotosíntesis, E: transpiración, gs: conductancia estomática, Ci/Ca: CO₂ intercelular/CO₂ ambiente, Fv'/Fm': eficiencia de los centros abiertos (oxidados) del PSII, ΦPSII: rendimiento cuántico del PSII y ΦCO₂: eficiencia cuántica de asimilación de CO₂.

Por otro lado, los parámetros fotosintéticos como la tasa de A, E, gs y la relación Ci/Ca son marcadores fisiológicos altamente correlacionados con el crecimiento de la planta (Peláez-Vico et al. 2024). En nuestros experimentos, A disminuyó en todos los tratamientos de estrés y en todos los genotipos respecto a sus controles. E y gs aumentaron significativamente con la deficiencia de ABA, con los valores más altos en *flc*-. La relación Ci/Ca también se incrementó significativamente en las plantas *flc*- bajo condiciones control y de estrés simple, pero no hubo diferencias significativas entre las plantas WT y *flc*- bajo la combinación de estreses. Investigaciones anteriores han demostrado que E se incrementa en plantas estresadas por altas temperaturas para reducir la temperatura foliar, y se reduce en plantas tratadas con salinidad debido al estrés osmótico asociado (Malini et al. 2023). Sin embargo, y a diferencia de WT, la falta de control estomático en nuestros mutantes *flc*- (Dittrich et al. 2019) causó altas tasas de transpiración en plantas tratadas con salinidad a los mismos niveles que los observados en condiciones control, e incluso a niveles más altos bajo estrés térmico y bajo la combinación de salinidad y altas temperaturas.

Adicionalmente, los parámetros de fluorescencia de la clorofila, como F_v'/F_m' , Φ_{PSII} y Φ_{CO_2} también son buenos marcadores del daño por estrés en la maquinaria fotosintética. Todos estos parámetros se redujeron bajo estrés simple o combinado en WT en comparación con las condiciones control, mientras que en *flc*-, solo se observó una ligera reducción bajo estrés por salinidad (**Figura 21**). Posiblemente, la ausencia de cambios en los parámetros de fluorescencia de la clorofila en *flc*- pudo deberse a la ausencia de regulación de estos parámetros provocada por la deficiencia de ABA. Rock y Zeevaart (1991) demostraron que en plantas de *Arabidopsis aba1-1* (un homólogo de *flc*) la ausencia de diferencias en los parámetros de fluorescencia clorofílica podría deberse a los carotenoides, los cuales a su vez dependen de los niveles endógenos de ABA, y juegan un papel funcional o regulador en la actividad PSII (Rock and Zeevaart 1991). Así pues, estas pruebas podrían confirmar los resultados obtenidos en *flc*- y podrían resultar una herramienta importante para dilucidar los complejos procesos que regulan la fotosíntesis, el ensamblaje de complejos multisubunidad y la transferencia de energía.

3.1.2 Ionómica del modelo *flc*-

Se realizó un análisis ionómico exhaustivo de las hojas de tomate en plantas WT y *flc*- crecidas bajo condiciones control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas (**Figura 22 y Tabla S2**). Como era de esperar, las concentraciones de Cl^- y Na^+ fueron significativamente mayores en los tratamientos de salinidad y salinidad + altas temperaturas, sin diferencias entre los genotipos. El K^+ , como ion antagonista del Na^+ , mostró diferentes patrones de acumulación dependiendo de si el estrés aplicado era simple o combinado y dependiendo del genotipo estudiado. En las plantas *flc*-, el K^+ disminuyó solo bajo condiciones de salinidad, pero no bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas. Rivero et al. (2014) mostraron resultados similares en plantas comerciales de tomate, concluyendo que la acumulación específica de glicina betaína en plantas crecidas bajo la combinación salinidad + altas temperaturas previno el eflujo de K^+ inducido por Na^+ observado bajo salinidad (Rivero et al. 2014). Curiosamente, las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} siguieron el mismo patrón de acumulación descrito para el K^+ bajo condiciones de salinidad y salinidad + altas temperaturas. Algunos autores defienden que la aplicación de NaCl podría inducir un descenso de estos tres cationes (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Tzortzakis 2010; Niu et al. 2022) debido a su relación antagónica dentro de la célula vegetal.

Cabe destacar que la concentración de NO_3^- fue significativamente menor en *flc*- bajo condiciones control en comparación con las plantas WT bajo las mismas condiciones. También se ha establecido que el ABA influye en la expresión de la NR, lo que conduce a una alteración del influjo de NO_3^- (Palmer 1981). Sue et al., (2021) demostraron que la señalización de ABA está ampliamente implicada en la regulación de la respuesta de inanición de N (Su et al. 2021). Por lo tanto, es lógico pensar que nuestros mutantes *flc*- son incapaces de regular el nivel de N dentro de la planta debido a la deficiencia de ABA. El ión PO_4^{3-} siguió el mismo patrón que el descrito para Cl^- en las plantas *flc*-. Sin embargo, en las plantas WT la concentración de PO_4^{3-} no cambió significativamente bajo ninguna de las condiciones de estrés aplicadas. Inesperadamente, la concentración foliar de SO_4^{2-} solo se redujo significativamente bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas en *flc*-, lo que podría considerarse como un efecto específico de la deficiencia de ABA bajo la combinación de estreses.

Para una mejor comprensión en la **Figura 22** se muestra los datos ionómicos de los mutantes *flc*- normalizados frente a las plantas WT bajo condiciones control. En resumen, nuestros resultados demostraron que, dependiendo de la concentración endógena de ABA y del tratamiento de estrés al que se somete la planta, las concentraciones de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} difirieron significativamente.

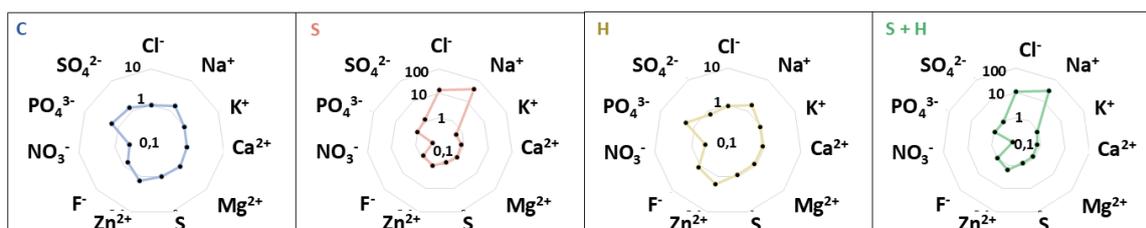


Figura 22. Gráficos radiales de cationes y aniones de mutantes *flc*- crecidos bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y su combinación (S+H) normalizados frente a plantas WT crecidas bajo condiciones control (datos brutos en la **Tabla S2**).

3.1.3 Transcriptómica del modelo *flc*-

Los datos del análisis transcriptómico fueron retomados en este estudio para integrarlos en nuestro análisis multiómico. Para ello, y con el objetivo de unificar todas las ómicas mediante la misma comparativa, en este capítulo II el transcriptoma de plantas *flc*- cultivadas bajo condiciones control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas se comparó con las plantas WT bajo condiciones control, obteniéndose un total de 2578, 3588, 5788 y 4920 DEGs, respectivamente (**Figura 23**). Entre ellos, 344, 610, 1514 y 870 fueron regulados específicamente bajo control, salinidad, altas temperaturas y combinación de estreses, respectivamente. Además, las plantas *flc*- cultivadas bajo estrés único, combinación de estreses y condiciones control compartieron 1078 DEGs, indicando DEGs dependientes del genotipo y no del tratamiento. Nuestros resultados también revelaron que 161 DEGs fueron compartidos por estreses individuales, 272 DEGs por salinidad y combinación de estreses y 1418 DEGs por altas temperaturas y combinación de estreses (**Figura 23**). La deficiencia de ABA condujo a cambios sustanciales a nivel transcriptómico en comparación con WT en condiciones control, con cambios aún mayores observados cuando los mutantes *flc*-

estuvieron sometidos a condiciones de estrés, resultando en el doble de DEGs bajo estrés por las altas temperaturas y por la combinación de estreses (**Figura 23**).

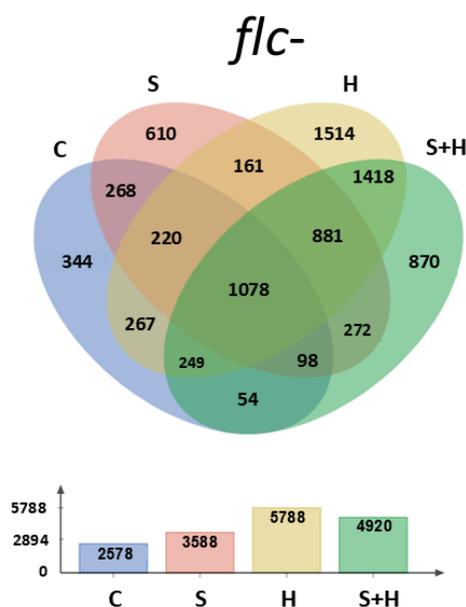


Figura 23. Diagrama de Venn de los DEGs en mutantes *flc-* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H).

Un análisis basado en la construcción de redes génicas de rutas metabólicas enriquecidas entre nuestros DEGs y basado en la base de datos KEGG (**Figura 24**) mostró que una deficiencia de ABA, independientemente del tratamiento aplicado, indujo una regulación a la baja de genes relacionados con la biosíntesis del metabolismo secundario, la fotosíntesis y los metabolismos de la glicina, la serina y la treonina. En condiciones de estrés simple o combinado, los mutantes *flc-* mostraron una regulación a la baja significativa del metabolismo de la porfirina y la clorofila, del metabolismo del carbono, de la fijación del carbono y del metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato. Esto indicaba que la regulación transcripcional de estos genes estaba asociada a las condiciones de estrés aplicadas (Williams et al. 2010; Ashraf and Harris 2013). Además, entre los DEGs encontrados dentro del modelo *flc-* se observó que varios transcritos relacionados con el metabolismo de la porfirina y la clorofila estaban asociados con la señalización retrógrada (Pesaresi et al. 2014). Común a todos los tratamientos, observamos la sobreexpresión de una ferroquelatasa (SOLYC08G065480.3) y la represión de la quelatasa Mg-protoporfirina IX (SOLYC10G008740.3) y de la *subunidad magnesio-*

quelatasa ChlH (SOLYC04G015750.3). Además, el estrés aplicado individualmente o en combinación indujo una represión en la expresión del gene que codifica la *proteína de unión a tetrapirrol* (SOLYC06G073290.1) y de la proteína cinasa serina/treonina *STN7* (SOLYC12G021280.2). Por último, la *hemooxigenasa 1* (SOLYC12G009470.2) estuvo reprimida bajo la combinación de estreses.

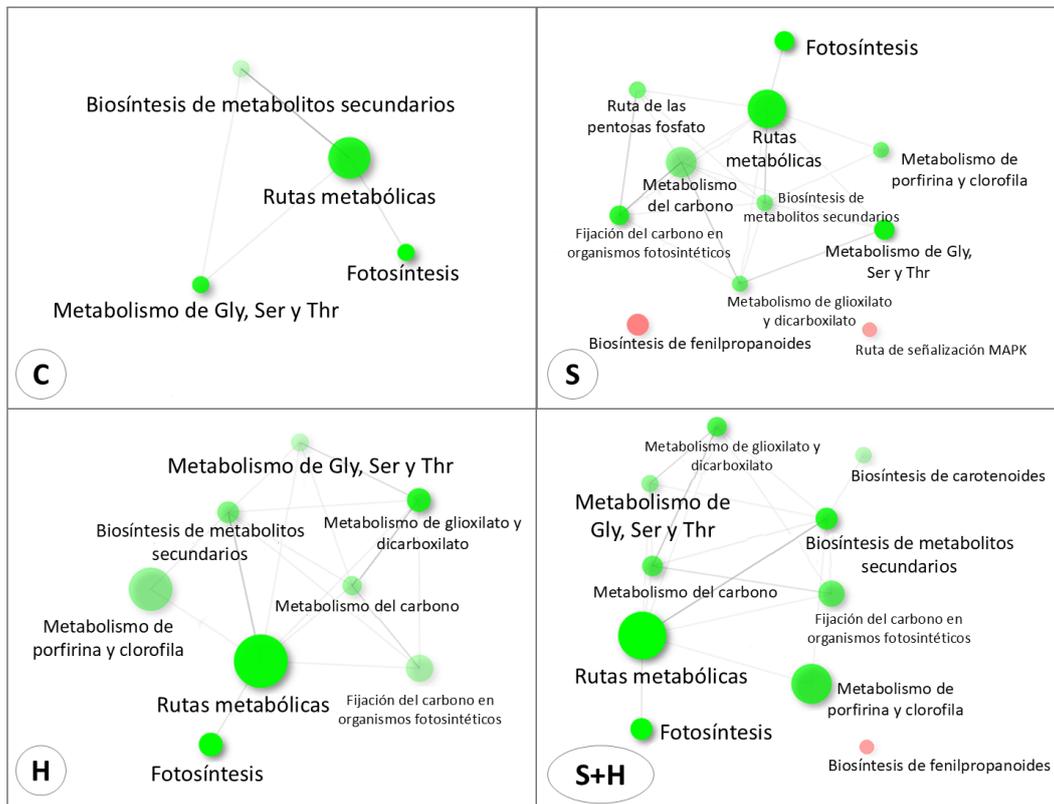


Figura 24. Análisis de enriquecimiento de rutas KEGG de los DEGs en mutantes *f1c-* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H). El tamaño de los círculos es proporcional al número de genes relacionados con esa vía y la intensidad del color está relacionada con el nivel de significación del p-valor de la vía ($P < 0,05$), en rojo los DEGs sobreexpresados y en verde los DEGs reprimidos.

Por otro lado, las plantas *f1c-* cultivadas en condiciones de salinidad mostraron una regulación a la baja específica de la vía de las pentosas fosfato y una regulación al alza de la biosíntesis de fenilpropanoides y de las rutas de señalización MAPK (**Figura 24**). Por el contrario, las plantas WT cultivadas bajo estrés salino mostraron un enriquecimiento de la vía de las pentosas fosfato y de la señalización MAPK (Miransari et al. 2013; Guo et

al. 2021; Hong et al. 2022). Del mismo modo, los mutantes *flc*- crecidos bajo la combinación de estreses mostraron una represión específica de la biosíntesis de carotenoides y una sobreexpresión de la vía fenilpropanoide (**Figura 24**). Martínez et al. (2018) mostraron que bajo condiciones de estrés salinidad + altas temperaturas, los niveles de carotenoides y la expresión de genes relacionados con fenilpropanoides siguieron la misma tendencia que la observada en nuestros mutantes *flc*- bajo estas condiciones ambientales, sugiriendo una regulación independiente de ABA de esta vía (Martinez et al. 2018).

3.1.4 Metabolómica del modelo *flc*-

Para mejorar nuestra comprensión de cómo una deficiencia de ABA podría afectar al metabolismo de la planta bajo el estrés simple o la combinación de estreses, se llevó a cabo un análisis metabolómico no dirigido. Este análisis nos permitió anotar positivamente más de 1515 compuestos entre WT, *flc*- y *flc*+. El HCA (**Figura S4**) reflejó las diferencias entre grupos de plantas (WT, *flc*-, *flc*+) y tratamientos (control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas). Además, mediante el análisis supervisado discriminante AMOPLS-DA se evaluó cuál de los tres factores (grupo de plantas, tratamiento y grupo de plantas x tratamiento) era el más importante para explicar las diferencias observadas (**Tabla S3** y **Figura S5**). Nuestros resultados indicaron que el tratamiento fue el factor más crucial para reflejar las diferencias a nivel metabolómico (RSS 21%, **Tabla S3**). Además, el grupo de plantas y la interacción del grupo de plantas y el tratamiento fueron estadísticamente significativos, con una RSS del 16% y el 15% respectivamente. Sin embargo, casi el 48% de las diferencias metabolómicas observadas no pudieron ser explicadas por ninguno de estos tres factores (Residuales, **Tabla S3**). Así, en base al AMOPLS-DA, se empleó un enfoque de Variable Importante en la Proyección (VIP₂) para identificar los marcadores más relevantes en la discriminación para cada factor (puntuación VIP₂ > 1,2). Los compuestos que obtuvieron una mayor puntuación en este análisis pertenecían a compuestos que contienen nitrógeno, fenilpropanoides, terpenoides y lípidos (**Tabla S4**).

Como el tratamiento fue el factor más discriminante en el análisis AMOPLS-DA, se construyeron dos modelos de estudio que permitieron la separación entre los diferentes grupos de plantas utilizados en nuestro estudio. Un modelo comparó los mutantes *flc*-

bajo cualquier tratamiento aplicado con plantas WT bajo condiciones control (denominado «modelo *flc-*»), y el otro modelo comparó los mutantes *flc+* bajo cualquier tratamiento aplicado con plantas WT bajo condiciones control (denominado «modelo *flc+*»), siendo este último discutido en el subapartado 3.2 de este capítulo.

Centrándonos en el modelo *flc-*, se realizó un análisis Volcano que permitió la identificación de 461 DAMs en *flc-* cultivadas bajo control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas respecto a plantas WT cultivadas bajo condiciones control. Utilizando un diagrama de Venn, se identificaron compuestos específicos o compartidos entre los tratamientos estudiados (**Figura 25A**; (Bardou et al. 2014)). Únicamente 28 DAMs se solaparon entre todos los tratamientos, y solo 26 DAMs se solaparon en los tratamientos de estrés. Los estreses simples compartieron 10 metabolitos, mientras que la salinidad y la salinidad + altas temperaturas compartieron 35 DAMs, y las altas temperaturas y la salinidad + altas temperaturas compartieron 86 DAMs. Por lo tanto, podemos deducir que la combinación de estreses estuvo gobernada principalmente por el componente altas temperaturas a nivel metabolómico. La deficiencia de ABA indujo cambios metabolómicos significativos en condiciones control en comparación con WT y, como era de esperar, estos cambios fueron más pronunciados cuando los mutantes *flc-* estuvieron sometidos a condiciones de estrés. De hecho, el estrés térmico y la combinación de estreses presentaron casi el doble de DAMs que las otras condiciones.

Los 461 DAMs identificados a través del análisis Volcano se emplearon para interpretar biológicamente los resultados mediante un análisis de rutas metabólicas utilizando el software PlantCyc (**Figuras 25B, 25C y 25D**). En los mutantes *flc-* se observó una reducción en la concentración de los compuestos relacionados con las rutas de biosíntesis de aminoácidos, cofactores y hormonas, mientras que los compuestos relacionados con las rutas de biosíntesis de lípidos y metabolitos reguladores aumentaron en comparación con WT bajo condiciones control (**Figura 25B**).

Los resultados también mostraron un aumento general de los metabolitos que contienen N y una disminución general de los fenilpropanoides en las plantas *flc-*. Sin embargo, la biosíntesis de terpenos dependió específicamente de las condiciones ambientales a las que se sometieron las plantas *flc-*, aumentando bajo estrés por

salinidad y combinación de estreses y disminuyendo bajo estrés por altas temperaturas (**Figura 25C**).

A nivel hormonal, los metabolitos relacionados con la biosíntesis de AUXs disminuyeron significativamente en las plantas *flc*- cultivadas en condiciones de control, estrés térmico y combinación de estreses en comparación con el control WT. Además, las CKs mostraron una regulación diferente, disminuyendo bajo condiciones control y estrés simple y aumentando bajo la combinación de estreses (**Figura 25D**). Por otro lado, hormonas como SA y Jas pueden ser relevantes ya que pueden interactuar con ABA de forma sinérgica o antagónica. Algunos autores han observado que Jas y SA aumentaban la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ABA y, a su vez, ABA aumentaba la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de Jas y SA en respuesta a algunos estreses abióticos (De Torres Zabala et al. 2009; Pál et al. 2011; Kim et al. 2021). Nahar et al. (2012) demostraron que en arroz SA, Jas y ET juegan un papel importante en la respuesta de defensa frente a *Hirschmanniella oryzae*, mientras que ABA jugó un papel negativo en esta respuesta de defensa (Nahar et al. 2012). Por lo tanto, estas hormonas no siempre actúan sinérgicamente como reguladores en la respuesta de la planta. En nuestros *flc*- se esperaba que los niveles de Jas y SA disminuyesen. Sin embargo, esto no se observó en todos los tratamientos, lo que sugiere la existencia de otras rutas implicadas en la homeostasis de Jas y SA que son independientes de los niveles endógenos de ABA (**Figura 25D**).

En general, nuestros resultados indicaron que los niveles de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, metabolitos secundarios y hormonas fueron dependientes de las condiciones ambientales (Krasavina et al. 2014; Planchet and Limami 2015; Liu et al. 2019; Jan et al. 2021; Waadt et al. 2022).

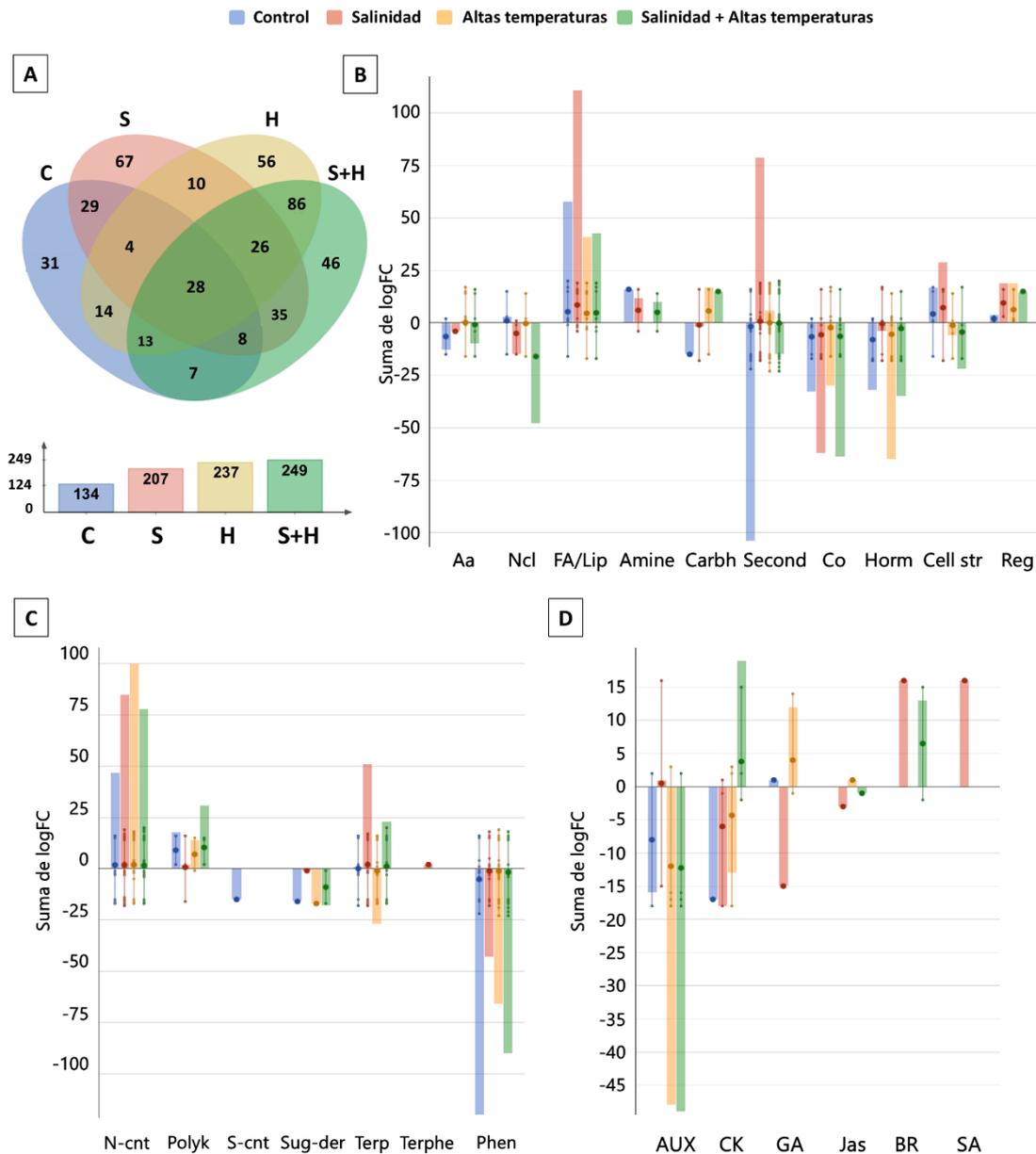


Figura 25. DAMs en mutantes *flc-* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad+altas temperaturas (S+H). Los datos se normalizaron frente al control WT ($p < 0,05$; $|\log_2 FC| \geq 2$). (A) Diagramas de Venn de los DAMs de cada tratamiento. (B) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas. (C) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. (D) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de hormonas. B, C y D se realizaron utilizando el software PlantCyc. Aa: aminoácidos, Ncl: núcleo, FA: ácidos grasos, Lip: lípidos, Carbh: carbohidratos, Second: metabolitos secundarios, Co: cofactores, Horm: hormonas, Cell str: metabolitos de la estructura celular, Reg: regulador, N-cont: compuestos que contienen N, Polyk: policétidos, S-cont: compuestos que contienen S, Sug-der: derivados de azúcares, Terp: terpenoides, Terphe: terpenofenólicos, Phen: fenilpropanoides, AUX: auxinas, CK: citoquininas, GA: giberelinas, Jas: jasmonatos, BR: brasinoesteroides, SA: ácido salicílico.

Como se mencionó anteriormente, la biosíntesis de metabolitos secundarios a nivel transcriptómico y metabolómico disminuyó en *flc*- bajo condiciones control y bajo la combinación de salinidad + altas temperaturas. Sin embargo, bajo un único estrés (salinidad o altas temperaturas) se observó una represión de la expresión de los genes pertenecientes al metabolismo secundario a nivel transcriptómico, pero esto no se reflejó en una menor síntesis de los compuestos secundarios (nivel metabolómico).

Además, la sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides no fue consistente con la disminución observada en los niveles de fenilpropanoides en plantas *flc*- bajo el estrés salino simple y la combinación de estreses. Varias rutas de señalización y múltiples mecanismos reguladores, tales como transcripcionales, post-transcripcionales, post-traduccionales, epigenéticos, señalización fitohormonal, y respuestas a estreses bióticos y abióticos, modulan colectivamente el metabolismo de los compuestos fenilpropanoides. Por ejemplo, Zhang et al. (2020) demostraron que varios microRNAs y otros pequeños RNAs pueden dirigirse a genes estructurales o reguladores dentro de la vía del metabolismo fenilpropanoide, regulando así la acumulación de algunos compuestos fenilpropanoides específicos (Zhang et al. 2020a). Basándonos en estos resultados, podemos confirmar que una mayor transcripción no siempre conduce a una mayor acumulación de metabolitos en una vía concreta. Esto subraya la importancia de estudiar las diferentes ómicas y su interconexión como un todo dentro de la biología de sistemas.

3.1.5 Estudio multiómico del modelo *flc*- e identificación de los principales marcadores clave para cada condición ambiental

En total, hemos identificado y cuantificado 27 parámetros fenotípicos, 20 iones, 28522 transcritos y 1515 metabolitos teniendo en consideración los tres grupos de plantas (WT, *flc*-, *flc*+) cultivadas en condiciones de control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. Debido al gran número de transcritos y metabolitos, se seleccionaron los DEGs y los DAMs con un $|\log_2 FC| \geq 2$ y un p-valor 0,05 mediante el análisis Volcano explicado anteriormente. Los DEGs, DAMs, iones y parámetros fenotípicos se sometieron a un análisis multiómico empleando la herramienta mixOmic

(Rohart et al. 2017). A partir de estos análisis, se diseñaron tres modelos, basados en el grupo de plantas: *flc*-, *flc*+ y WT.

El «modelo *flc*-» resultante del análisis multiómico se presenta en las **Figuras 26 y 27**. Inicialmente, los cuatro conjuntos de datos (fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica) se trazaron individualmente basándose en sus puntuaciones en las primeras componentes para evaluar su distribución antes del análisis multiómico (**Figura 26A**). El análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA; **Figura 26A**) mostró que la «componente 1» separaba claramente control y salinidad de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas, mientras que la «componente 2» discriminaba control y altas temperaturas de condiciones de salinidad y salinidad + altas temperaturas. Esta separación fue coherente con el HCA (**Figura 26B**). Cuando los cuatro conjuntos de datos se combinaron en el mismo análisis, los coeficientes de correlación de Pearson superaron el 0,9 para ambas componentes 1 y 2 (**Figura S6**), lo que validó nuestras observaciones previas.

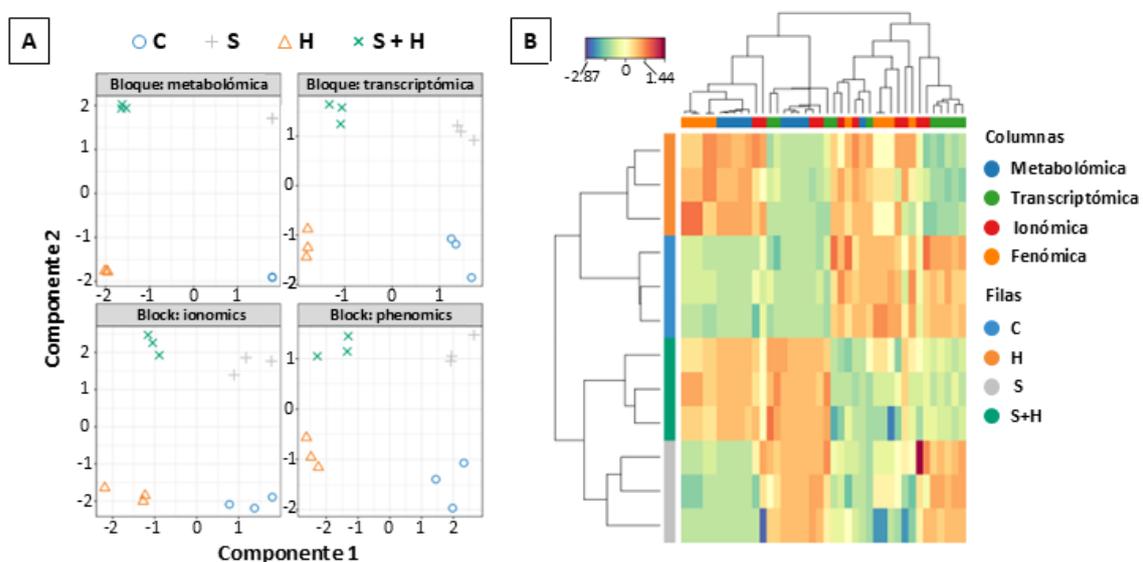


Figura 26. Análisis multiómico en el mutante *flc*- utilizando el software mixOmics. (A) sPLS-DA análisis en cada ómica. (B) Mapa de correlación de las características más discriminantes seleccionadas de los conjuntos de datos fenómicos, ionómicos, transcriptómicos y metabolómicos. Las ómicas se representan en columnas y los tratamientos en filas.

Curiosamente, cuando los datos transcriptómicos y metabolómicos se estudiaron por separado, un elevado número de DEGs y DAMs eran comunes entre la combinación y el estrés por altas temperaturas (**Figuras 23 y 25A**, respectivamente). Sin embargo, cuando se consideraron estos dos conjuntos de datos junto con la ionómica y la fenómica, así como la influencia de cada parámetro en un análisis multiómico, los resultados mostraron que la respuesta celular general inducida bajo estrés salinidad + altas temperaturas era en realidad más similar a la salinidad que a las altas temperaturas (**Figura 26B**). Estos resultados destacaron la relevancia de integrar datos de distintas ómicas, en lugar de centrarse en estudios de ómicas individuales.

El uso del software mixOmics facilitó la extracción de marcadores moleculares de varios grandes conjuntos de datos en un grupo de plantas específico, interconectándolos estadísticamente como un todo, y facilitando así una interpretación biológica de estos marcadores. En consecuencia, se obtuvieron marcadores moleculares de cada conjunto de datos ómicos bajo una condición ambiental específica en función de sus valores de puntuación en las dos primeras componentes para nuestro modelo *flc*- (**Figura 27**).

Para la fenómica, todos los marcadores moleculares se asociaron con las condiciones control, siendo los más relevantes PF, NO_3^- , ϕPSII (ya identificados en los estudios fenómicos e ionómicos individuales), ETR, qP y AHs/Cs. El AHs/Cs tiene en cuenta la asimilación de CO_2 , con respecto a la humedad y la concentración de CO_2 de la superficie foliar (Wolf et al. 2006), que se correlacionó positivamente con la g_s y la E obtenida en los mutantes *flc* (**Figura 21**). A nivel transcriptómico, la sobreexpresión del gen *almidón sintasa* (SOLYC03G083090.4) y del gen que codifica la proteína adagio-like (SOLYC01G005300.4) fueron los marcadores moleculares obtenidos bajo condiciones control. La proteína adagio-like codifica una proteína implicada en la fotosíntesis (Wang et al. 2023) y, junto con todos los parámetros fotosintéticos mencionados, demostró una reprogramación específica de la fotosíntesis en los mutantes *flc*- debido a la deficiencia de ABA. Por otro lado, la sobreexpresión de una almidón sintasa podría indicar que las plantas están invirtiendo en aumentar los niveles de almidón (Thalman and Santelia 2017).

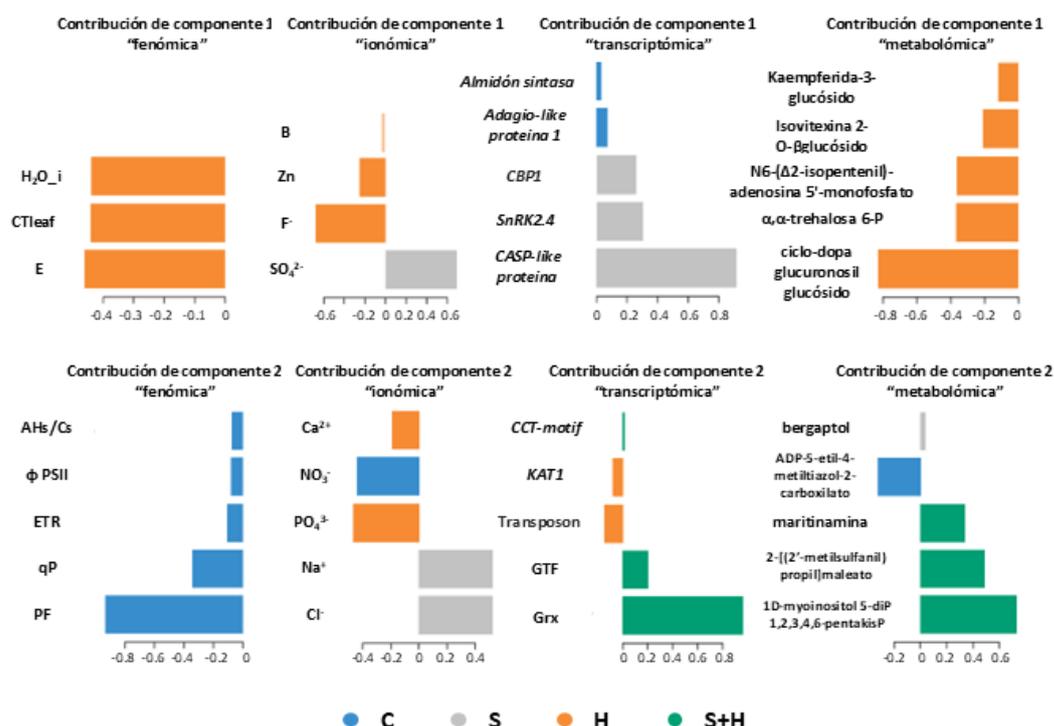


Figura 27. Gráfico de carga de cada característica seleccionada con la máxima capacidad de discriminación en la primera y segunda componente en cada conjunto de datos ómicos del análisis multiómico del modelo *flc*-. El color indica el tratamiento aplicado. H₂O_i: H₂O intercelular, CTleaf: temperatura de la hoja, E: transpiración, AHs/Cs: parámetro Ball-Berry, φPSII: rendimiento cuántico del fotosistema II, ETR: tasa de transporte de electrones, qP: *quenching* fotoquímico, PF: peso fresco de las hojas, *CBP1*: proteína de unión a CCG1, *SnRK2.4*: proteína quinasa 2.4 relacionada con la no fermentación de la sacarosa, *KAT1*: canal de K⁺ en *Arabidopsis thaliana*, GTF: glucosiltransferasa, Grx: glutaredoxina.

Los marcadores clave en las plantas *flc*- sometidas a estrés por salinidad fueron SO₄²⁻, la expresión de los genes que codifican la proteína de unión a CCG1 (*CBP1*, SOLYC01G108910), la proteína quinasa 2.4 relacionada con la no fermentación de la sacarosa (*SnRK2.4*, SOLYC02G090390), la proteína *casparian strip membrane domainin* (proteína 4 similar a *CASP*, SOLYC04G005555), junto con el metabolito bergaptol. SO₄²⁻ y ciertas proteínas *CASP-like* se han asociado previamente con la tolerancia al estrés salino en plantas. Algunas proteínas quinasas como SnRK1α están relacionadas con la vía de señalización de ABA y un aumento de la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate (Raziq et al. 2022). Sin embargo, Mazur R. et al. (2021) demostraron que la quinasa SnRK2.4 no se activa por ABA, pero sí se activa en las rosetas de *Arabidopsis thaliana*

durante la respuesta temprana al estrés salino y actúa manteniendo diferentes mecanismos desencadenados por la salinidad (Mazur et al. 2021).

Con respecto al estrés por altas temperaturas en mutantes *flc*-, los marcadores clave incluyeron H₂O_i, CTleaf, E, Zn, F⁻, Ca²⁺ y PO₄³⁻, junto con la sobreexpresión de *kat1* y el aumento de los niveles de ciertos metabolitos, como kaempferida-3-glucósido, isovitexina 2-O-β-glucósido, trehalosa 6-fosfato, adenosina 5'-monofosfato y ciclo-dopa glucuronosilglucósido. La mayoría de estos marcadores se han asociado previamente con el estrés térmico en plantas (Wiebe and Poovaiah 1973; Dias and Lidon 2009; Pacak et al. 2016; Zheng et al. 2020; Laoué et al. 2022; Samineni et al. 2022; Wei et al. 2022). En particular, el canal de K⁺ (KAT1) está implicado en la captación de K⁺ en las células de guarda, regulando la apertura o cierre estomático y la transpiración (Hosy et al. 2003). Su sobreexpresión parece ser tanto dependiente como independiente del ABA (Mulet et al. 2023). En nuestros estudios, la sobreexpresión de este gen parece tener una regulación independiente del ABA en mutantes *flc*-. Los metabolitos identificados, particularmente los fenilpropanoides, juegan un papel como antioxidantes en la respuesta de la planta al estrés oxidativo. Sin embargo, los fenilpropanoides que han resultado de nuestro análisis estaban en sus formas glicosiladas (kaempferida-3-glucósido, isovitexina 2-O-β-glucósido) y, por lo tanto, pueden no estar desempeñando estas funciones antioxidantes en nuestros mutantes (Le Roy et al. 2016).

Por último, los marcadores genéticos y metabólicos específicos de la combinación de estreses identificados incluían la sobreexpresión de genes que codifican la proteína CCT-*motif* (SOLYC03G083400.3), una glucosiltransferasa (GTF, SOLYC04G074380. 4), y una glutaredoxina (Grx, SOLYC06G008760.1), y el aumento de los compuestos maritinamina (compuesto oxidorreductor), 2-[(2'-metilsulfanil)propil]maleato y 1D-mio-inositol 5-difosfato 1,2,3,4,6-pentakisfosfato. La proteína CCT-*motif* se ha asociado con la expresión de genes relacionados con la síntesis de carotenoides (Ye et al. 2015). Asimismo, las glutaredoxinas están asociadas a mejorar la tolerancia de las plantas a algunos tipos de estrés, como la salinidad y las altas temperaturas (Li 2014; Sousa et al. 2022). En nuestros resultados, la Grx identificada (SOLYC06G008760.1) se reguló específicamente en mutantes *flc*- sometidos a la combinación de estreses, lo que podría indicar su papel específico en este tratamiento. La acumulación de maritinamina,

implicada en reacciones de oxido-reducción, podría estar contribuyendo a la detoxificación de ROS en mutantes deficientes en ABA sometidos a combinación de estreses (Kilgore et al. 2016). Además, la acumulación de maritamina también se identificó entre los VIPs₂ dentro de la interacción grupo de plantas x tratamiento. Así, parece que la acumulación de maritamina podría ser específica en plantas deficientes en ABA bajo salinidad + altas temperaturas.

3.2 Niveles suficientes de ABA en mutantes deficientes en ABA no restauran el metabolismo WT: modelo *flc*+

3.2.1 Fenómica del modelo *flc*+

Desde los primeros estudios hasta la fecha, se ha visto que la aplicación de ABA mejora la tolerancia de las plantas a diferentes estreses abióticos (Itai et al. 1978; Rehman et al. 2021). En nuestros estudios, la aplicación exógena de ABA (*flc*+) efectivamente ayudó a la recuperación parcial del fenotipo silvestre y la tolerancia al estrés de los mutantes *flc*-, aunque no lo restauró completamente. Esta observación es consistente con estudios previos que han mostrado los efectos beneficiosos de la aplicación de ABA sobre la tolerancia al estrés de las plantas en mutantes *flc* (Imber and Tal 1970; Li and Liu 2021). Curiosamente, la combinación de salinidad + altas temperaturas resultó en la mayor reducción de biomasa en los mutantes *flc* (Figura 21), indicando una mayor susceptibilidad a la combinación de estreses en comparación con los estreses simples. Como ya observamos en el capítulo anterior (Figura 12C), debido a la aplicación exógena de ABA en las hojas de *flc* se observó una mayor concentración endógena de ABA en comparación con las plantas WT. Además, las plantas *flc* en condiciones de estrés mostraron una mayor acumulación de ABA que las plantas *flc* en condiciones control, lo que podría deberse al estrés aplicado.

Sin embargo, incluso con niveles incrementados de ABA, las plantas *flc* no recuperaron completamente el fenotipo WT, indicando que otros factores podrían estar contribuyendo a las diferencias observadas (Figura 21). Además, otros parámetros fisiológicos, incluyendo Ci/Ca bajo estrés térmico y H₂O_i y CTleaf bajo control y combinación salinidad + altas temperaturas, fueron significativamente diferentes entre

plantas WT y *flc+* (**Figura 21; Tabla S2**), destacando la compleja interacción entre la deficiencia de ABA, la aplicación de ABA y el estrés ambiental en la modulación de la respuesta fisiológica de la planta y las respuestas al estrés simple o combinado.

3.2.2 Ionómica del modelo *flc+*

A nivel ionómico, en mutantes *flc+* las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} fueron significativamente diferentes a las encontradas en plantas WT bajo condiciones control. Las mismas observaciones se confirmaron para el ión Zn bajo salinidad y salinidad + altas temperaturas. Además, los niveles de SO_4^{2-} en *flc+* bajo condiciones control, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas fueron significativamente diferentes a los encontrados en plantas WT o mutantes *flc-* (**Figura 28 y Tabla S2**). Asimismo, la aplicación de ABA incrementó los niveles de PO_4^{3-} bajo condiciones control. Zhang et al. (2022) demostraron que ABA regula positivamente la adquisición de PO_4^{3-} a través de ABI5 en la respuesta de *Arabidopsis* a la deficiencia de fósforo (Zhang et al. 2022). Por lo tanto, los niveles de NO_3^- , PO_4^{3-} , Zn y SO_4^{2-} en hojas de tomate parecen depender de los niveles endógenos de ABA.

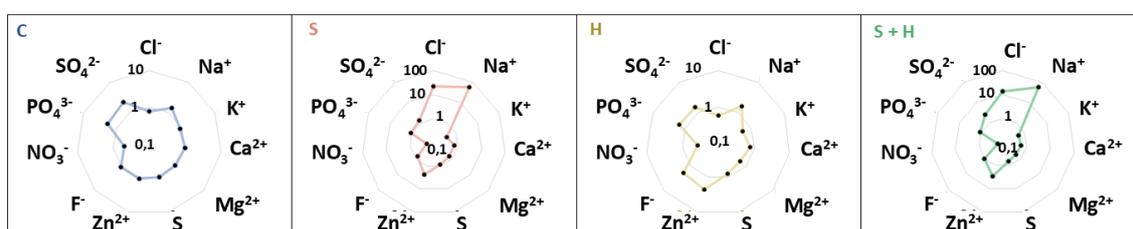


Figura 28. Gráficos radiales de cationes y aniones de *flc-* normalizados frente a plantas WT crecidas bajo condiciones control (datos brutos en la **Tabla S2**).

3.2.3 Transcriptómica del modelo *flc+*

Al estudiar la respuesta transcriptómica obtenida de las plantas *flc+* cultivadas bajo control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas se obtuvo un total de 903, 2908, 6496 y 7423 DEGs, respectivamente, en comparación con las plantas WT cultivadas bajo condiciones control (**Figura 29**). Romero et al. (2012) demostraron que la aplicación de ABA en frutos de naranja dulce de plantas mutantes deficientes en ABA sometidas a déficit hídrico no produjo la recuperación a nivel transcriptómico con respecto a WT, apoyando los resultados encontrados en nuestros experimentos (Romero

et al. 2012). Estos resultados apoyan los encontrados en nuestros estudios, donde en *flc+* se identificaron 903 DEGs diferencialmente expresados con respecto a WT bajo condiciones control. Este análisis coincide, además, con lo presentado en el capítulo anterior de la tesis (Pardo-Hernández et al. 2024a). Por otro lado, un cierto número de DEGs fueron específicos del tratamiento aplicado, obteniéndose 117, 567, 774 y 1426 DEGs regulados específicamente bajo control, salinidad, altas temperaturas y combinación de estreses, respectivamente. Además, los tratamientos de estreses simples y la combinación de estreses compartieron con el tratamiento control un total de 384 DEGs. También cabe mencionar que solo 100 DEGs estuvieron compartidos por la aplicación de estrés único, 345 DEGs estuvieron compartidos por la combinación de estreses y la salinidad y que el mayor número de DEGs (3787) estuvieron compartidos por altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas (**Figura 29**).

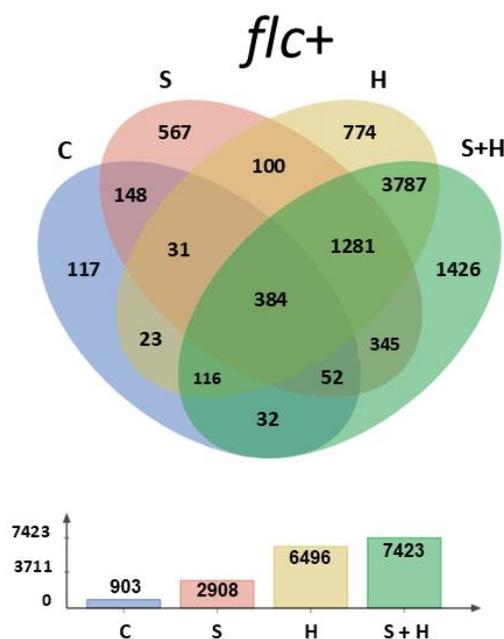


Figura 29. Diagrama de Venn de los DEGs en mutantes *flc+* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad+altas temperaturas (S+H).

El análisis de las rutas de enriquecimiento KEGG de *flc+* en las cuatro condiciones ambientales utilizadas (**Figura 30**) mostró una regulación a la baja de la biosíntesis del metabolismo secundario, el metabolismo del carbono y el metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato. Además, los mutantes *flc+* cultivados bajo estreses simples o en combinación presentaron una regulación a la baja de la ruta de la fotosíntesis. Sin

embargo, muchas de las rutas biosintéticas identificadas en nuestros análisis fueron reprimidas por los diferentes tratamientos de estrés aplicados. Así, los mutantes *flc+* crecidos bajo condiciones control o bajo salinidad mostraron una represión específica de la ruta de la pentosa fosfato y del metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato. Por otro lado, se observó una represión de la expresión de varios genes relacionados con la fijación de carbono en los mutantes *flc+* bajo condiciones control, de salinidad y de salinidad + altas temperaturas. Por último, los mutantes *flc+* bajo salinidad y combinación de salinidad + altas temperaturas presentaron una represión en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la porfirina y la clorofila. Entre los DEGs encontrados en el modelo *flc+* se observó que varios transcritos relacionados con el metabolismo de la porfirina y la clorofila estaban asociados con la señalización retrógrada (Pesaresi et al. 2014).

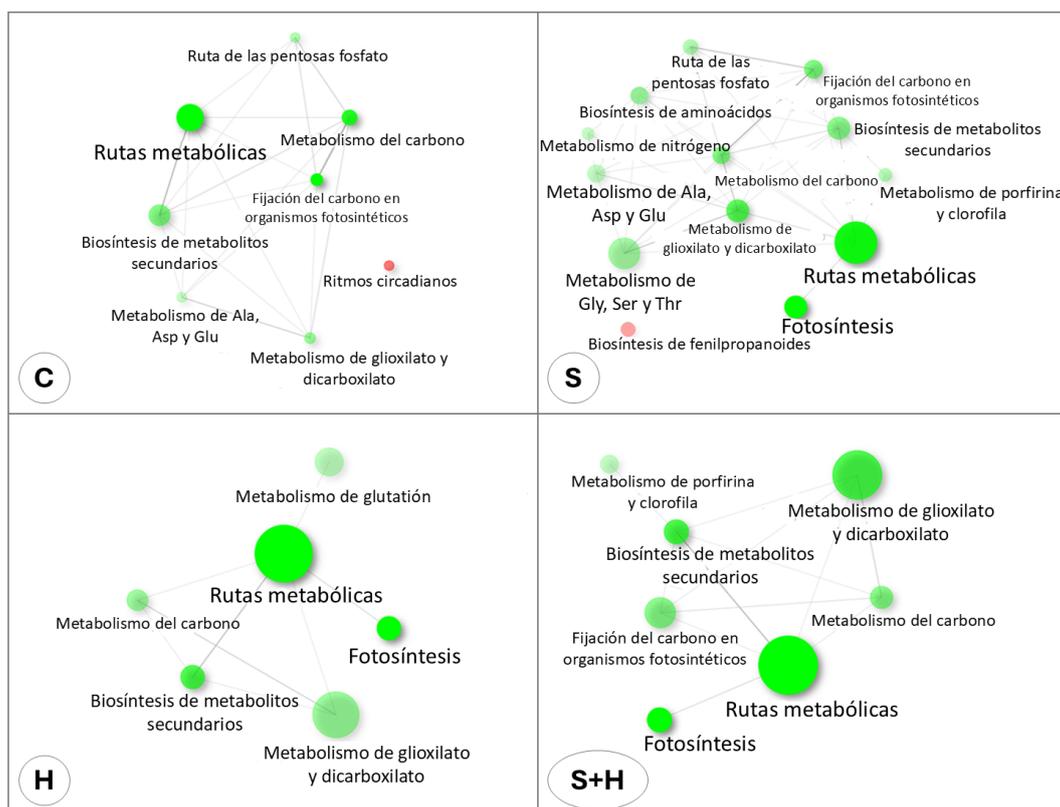


Figura 30. Análisis de enriquecimiento de rutas KEGG de los DEGs en mutantes *flc+* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad+altas temperaturas (S+H). El tamaño de los círculos es proporcional al número de genes relacionados con esa vía y la intensidad del color está relacionada con el nivel de significación del p-valor de la vía ($P < 0,05$), en rojo los DEGs sobreexpresados y en verde los DEGs reprimidos.

Además, bajo cualquiera de las condiciones de estrés aplicadas, la expresión de la subunidad magnesio-quelataza *ChlH* (SOLYC04G015750.3) y de la serina/treonina-proteína quinasa *STN7* (SOLYC12G021280.2) fue reprimida. Asimismo, hubo una represión de la expresión del gen que codifica la proteína de unión a tetrapirrol (SOLYC06G073290.1) debido al estrés por salinidad y combinación de estreses, mientras que la expresión del gen *APRR2-like* (SOLYC08G077230.3) estuvo reprimida bajo estrés por altas temperaturas y combinación de estreses. Por último, se observó una represión de la expresión de *quelataza Mg-protoporfirina IX* (SOLYC10G008740.3) cuando las plantas *flc+* estuvieron sometidas a la combinación de estreses.

Asimismo, en nuestros análisis obtuvimos el enriquecimiento específico de varias rutas KEGG en función del estrés aplicado. Por ejemplo, (i) los genes relacionados con el ritmo circadiano estuvieron sobreexpresados específicamente en *flc+* cultivado bajo control; (ii) los relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo de la glicina, serina y treonina estuvieron reprimidos específicamente bajo salinidad, mientras que los de la biosíntesis de fenilpropanoides estuvieron sobreexpresados y (iii) los relacionados con el metabolismo del glutatión estuvieron reprimidos específicamente bajo el estrés por altas temperaturas.

3.2.4 Metabolómica del modelo *flc+*

Como se menciona en el subapartado 3.1.4 de este capítulo, el análisis metabolómico anotó 1515 compuestos y, con ello, se realizaron estudios no supervisados (HCA, **Figura S4**) y supervisados (AMOPLS-DA, **Tabla S3** y **Figura S5**) considerando los tres grupos de plantas (WT, *flc-* y *flc+*) y los cuatro tratamientos (control, salinidad, altas temperaturas, salinidad + altas temperaturas). En cuanto al modelo *flc+*, las componentes principales (tp5 y tp6) identificadas para la interacción entre tratamiento y grupo de plantas (grupo de plantas x tratamiento) mostraron que las plantas *flc+* eran significativamente diferentes de las WT en los cuatro tratamientos (**Figura S5C**).

Nuestro análisis Volcano identificó 458 DAMs en *flc+* que diferían significativamente de los encontrados en plantas WT bajo condiciones control. Mediante un diagrama de Venn se pudo identificar los compuestos específicos y comunes entre los tratamientos aplicados a los mutantes *flc+* (**Figura 31A**). Únicamente 28 DAMs se solaparon en todas

las condiciones ambientales aplicadas, y solo 35 metabolitos se solaparon en los tratamientos de estrés. Los estreses simples compartieron solo 13 DAMs, mientras que la salinidad y la salinidad + altas temperaturas compartieron 33 DAMs, y las altas temperaturas y la salinidad + altas temperaturas compartieron 103 DAMs. De forma similar a lo observado en el modelo *flc-*, la combinación de estreses estuvo principalmente controlada por el componente altas temperaturas a nivel metabólico.

Posteriormente, los 458 DAMs identificados por el análisis Volcano se utilizaron para el análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas. Se observó un aumento del metabolismo secundario, especialmente en aquellas plantas cultivadas bajo estrés térmico (**Figura 31B**). Al inspeccionar los DAMs pertenecientes al metabolismo secundario, destacó el aumento general de los metabolitos relacionados con los fenilpropanoides, especialmente en las plantas *flc+* cultivadas bajo estrés térmico. Además, también aumentaron significativamente los compuesto nitrogenados, como habíamos observado anteriormente en el modelo *flc-*. Sin embargo, en *flc+* el estrés por salinidad no indujo estas diferencias observadas en el modelo *flc-* con respecto a las plantas WT. Curiosamente, y en contraste con el modelo *flc-*, los terpenoides fueron menos abundantes en las plantas *flc+* bajo estrés por salinidad (**Figura 31C**).

A nivel hormonal, los metabolitos relacionados con las rutas de biosíntesis de AUXs y CKs disminuyeron significativamente en las plantas *flc+* bajo condiciones control y la combinación salinidad + altas temperaturas y, en el caso de las CKs, se observó una disminución de estos metabolitos bajo los estreses simples (altas temperaturas o salinidad) (**Figura 31D**). Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, ABA, SA y Jas pueden interactuar de forma sinérgica o antagónica en respuesta al estrés. Muñoz-Espinoza et al. (2015) demostraron que la aplicación de ABA en mutantes *flc* conducía a una reducción de los contenidos de Jas y SA en respuesta al estrés por déficit hídrico (Muñoz-Espinoza et al. 2015). En nuestro caso, observamos que los niveles de metabolitos implicados en la biosíntesis de Jas se redujeron significativamente bajo el estrés salino y la combinación de estreses. Sin embargo, SA se incrementó significativamente bajo estrés por salinidad. Así, ABA parece que no siempre incrementa los niveles de Jas durante la inducción de la respuesta al estrés abiótico.

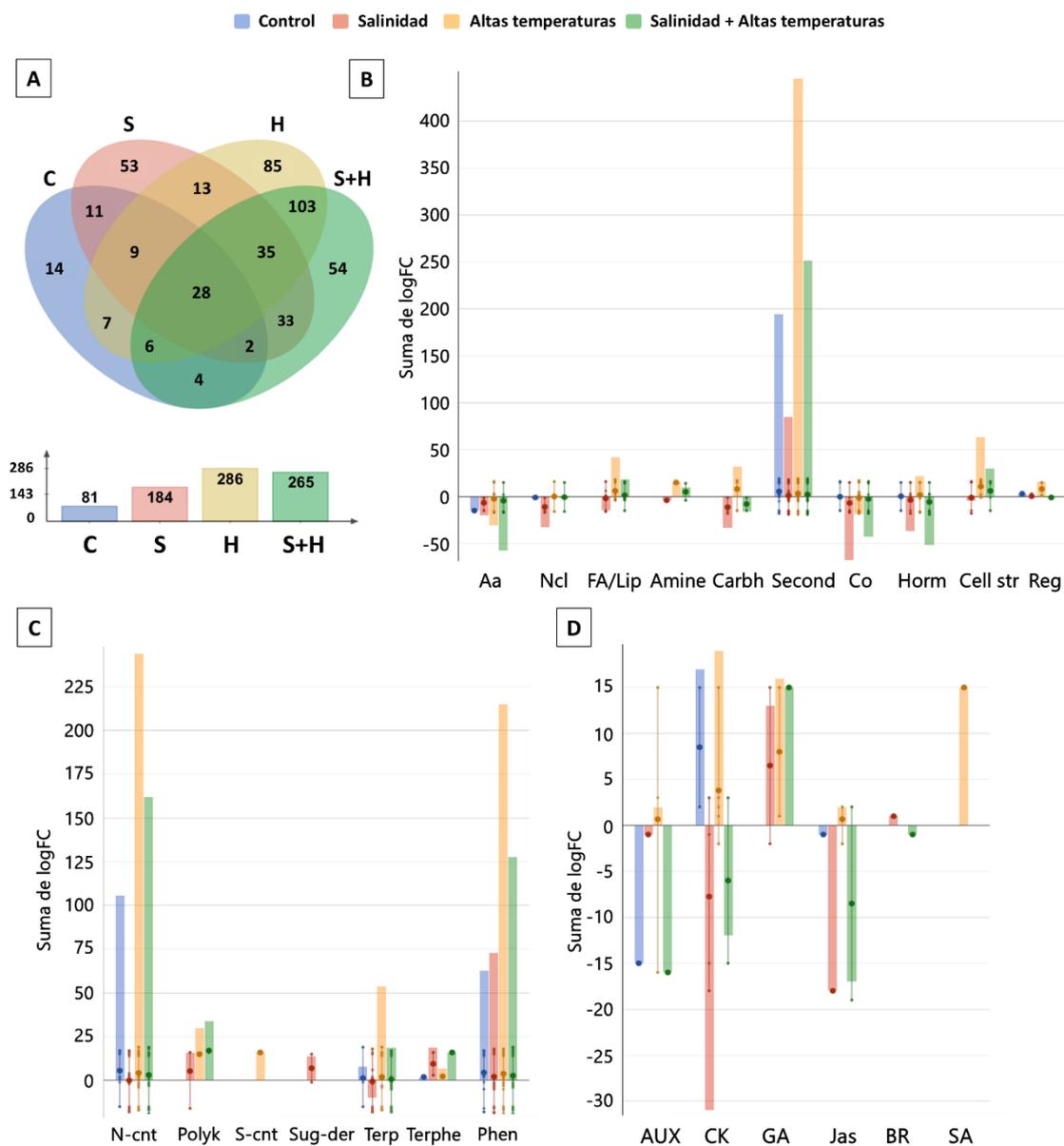


Figura 31. DAMs en mutantes *flc+* bajo condiciones control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad+altas temperaturas (S+H). Los datos se normalizaron frente al control WT ($p < 0,05$; $|\log_2 FC| \geq 2$). (A) Diagramas de Venn de los DAMs de cada tratamiento. (B) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas. (C) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas del metabolitos secundarios. (D) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de hormonas. B, C y D se realizaron utilizando el software PlantCyc. Aa: aminoácidos, Ncl: núcleo, FA: ácidos grasos, Lip: lípidos, Carbh: carbohidratos, Second: metabolitos secundarios, Co: cofactores, Horm: hormonas, Cell str: metabolitos de la estructura celular, Reg: regulador, N-cont: compuestos que contienen N, Polyk: policétidos, S-cont: compuestos que contienen S, Sug-der: derivados de azúcares, Terp: terpenoides, Terphe: terpenofenólicos, Phen: fenilpropanoides, AUX: auxinas, CK: citoquininas, GA: giberelinas, Jas: jasmonatos, BR: brasinoesteroides, SA: ácido salicílico.

3.2.5 Estudio multiómico en el modelo *flc+* e identificación de los principales marcadores clave para cada condición ambiental

Al igual que en el modelo *flc-*, los DEGs y DAMs con un $|\log_2 FC| \geq 2$ y p-valor 0,05 identificados en el modelo *flc+* se seleccionaron mediante el análisis Volcano y, junto con la fenómica y la ionómica, se sometieron al análisis multiómico. Los cuatro conjuntos de datos (fenómica, ionómica, transcriptómica y metabolómica) se trazaron inicialmente de forma individual según sus puntuaciones en las dos primeras componentes mediante el análisis sPLS-DA (**Figura 32A**) (Rohart et al. 2017). Además, los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis de todos los conjuntos de datos ómicos superaron 0,9 para ambas componentes (**Figura S6**). Asimismo, las mismas observaciones realizadas anteriormente para el modelo *flc-* respecto a las separaciones de tratamientos mediante un análisis HCA se observaron en el modelo *flc+* (**Figura 32B**). El HCA dividió control y altas temperaturas, por un lado, y salinidad y salinidad + altas temperaturas, por otro. Aquí, de nuevo, el estudio de las diferentes ómicas en conjunto destaca la importancia de evaluar el efecto de una determinada condición de estrés en todo el metabolismo de la planta (**Figura 32**).

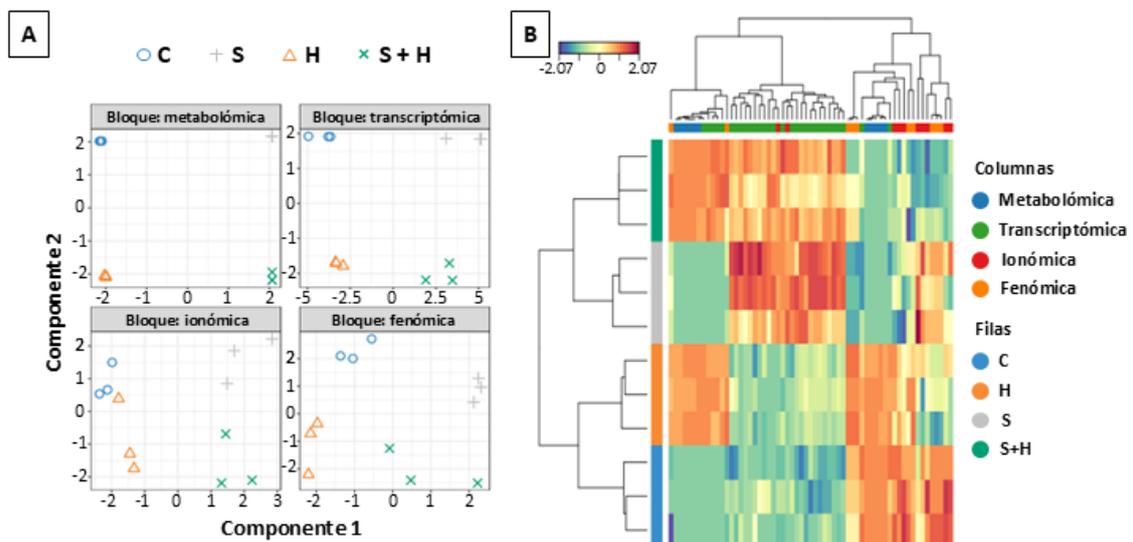


Figura 32. Análisis multiómico en el mutante *flc+* utilizando el software mixOmics. (A) sPLS-DA análisis en cada ómica. (B) Mapa de correlación de las características más discriminantes seleccionadas de los conjuntos de datos fenómicos, ionómicos, transcriptómicos y metabolómicos. Las ómicas se representan en columnas y los tratamientos en filas.

Al igual que en el modelo *flc-*, se obtuvieron marcadores moleculares de cada conjunto de datos ómicos bajo una condición ambiental específica en función de sus valores de puntuación en las dos primeras componentes para nuestro modelo *flc+* (**Figura 33**).

En condiciones control, las plantas *flc+* se asociaron a dos marcadores fotosintéticos clave, ϕCO_2 , A, y a los iones K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , S. Además, el gen que codifica la peptidilprolil isomerasa (SOLYC09G008650.3) también se reveló como un marcador asociado a nivel transcriptómico. Esta proteína podría estar implicada en el plegamiento de proteínas después del daño inducido por el estrés (Bizouerne et al. 2023). Asimismo, otros metabolitos, como el 3-sulfato de isorhamnetina (persicarina), el primer flavonoide sulfatado encontrado en plantas (Harborne 1975), fueron identificados como marcadores clave en *flc+* bajo condiciones control. La función de la sulfatación de flavonoides aún no está clara, pero se ha demostrado que los flavonoides sulfatados pueden estar implicados en el reconocimiento molecular y la desintoxicación de algunas rutas de señalización (Teles et al. 2018).

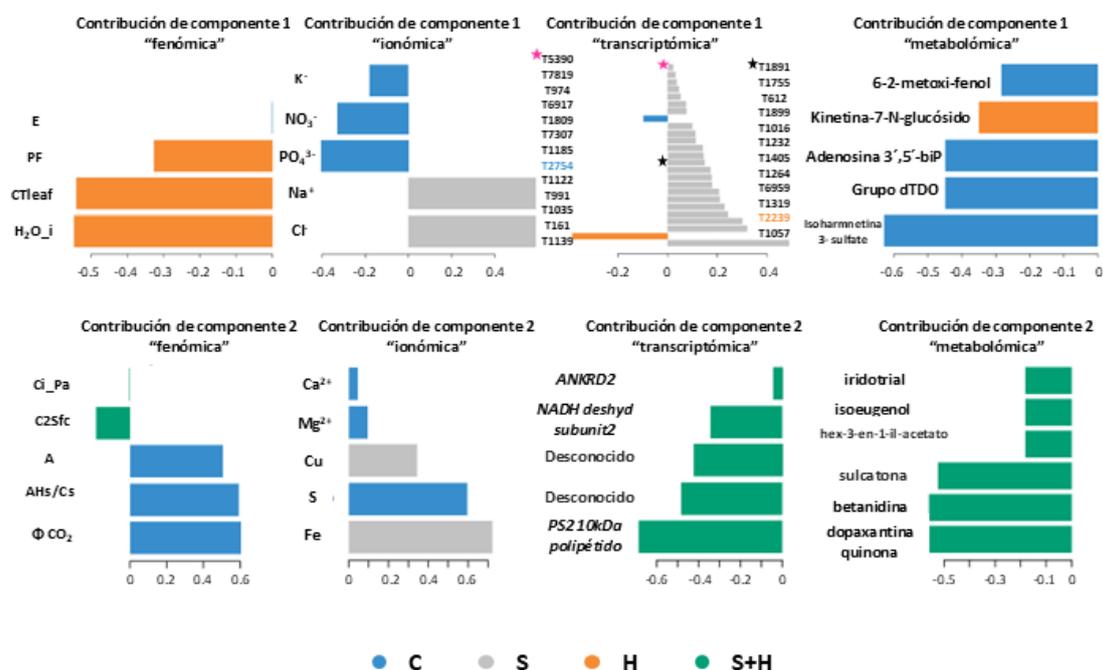
Los marcadores identificados bajo estrés por salinidad en los mutantes *flc+* fueron a nivel iónico Na^+ , Cl^- , Cu y Fe. Cabe señalar que los dos últimos iones (Cu y Fe) no se identificaron previamente como marcadores putativos cuando se analizó la ionómica por separado. El Cu y Fe son cofactores esenciales en las enzimas antioxidantes de las plantas, por lo que pueden ayudar contra el estrés oxidativo (Bhaduri and Fulekar 2012; Verma 2016). Además, se identificaron como marcadores clave en *flc+* bajo salinidad dos FTs (un bHLH y MYB48), una AQP, un transportador de nitrógeno y varios genes relacionados con la respuesta al estrés, como la proteína inducible por ABA y por estrés ambiental TAS14 (**Tabla S5**). Tanto los cambios en los iones como los detectados a nivel de transcripción de genes relacionados con el transporte de iones, ya han sido previamente relacionados con la respuesta de las plantas al estrés salino (Amin et al. 2021; Lopez-Delacalle et al. 2021b), lo que ayuda a confirmar los resultados obtenidos.

Los marcadores de estrés por altas temperaturas identificados en *flc+* fueron un aumento del PF foliar, de la temperatura foliar y del contenido de agua celular. Como era de esperar, se produce un aumento de la tasa de transpiración para reducir la temperatura foliar en estas condiciones, lo que podría inducir una mayor A y un mayor

crecimiento. Además, se observó un aumento en la concentración del metabolito kinetina-7-N-glucósido, que se ha asociado previamente con la tolerancia al estrés en plantas sometidas a altas temperaturas (Itai et al. 1978; Osman et al. 2016; Mei et al. 2023). Sin embargo, no se pudo asegurar que este marcador tuviera un papel determinado bajo estrés térmico en nuestras plantas *flc+*, ya que las formas glicosiladas de CKs se han relacionado recientemente con su inactivación (Hluska et al. 2021; Li et al. 2022). Por lo tanto, se necesita más investigación sobre el papel de este metabolito en la tolerancia al estrés por altas temperaturas.

Por último, la combinación de estreses mostró una regulación específica, identificándose algunos marcadores exclusivos que no se detectaron cuando estos estreses se aplicaron de manera individual. Los niveles de CO₂ intercelulares (C_i) y de la superficie foliar (C₂S_{fc}) fueron significativamente mayores en estas condiciones y se observó una regulación al alza de la expresión del gen que codifica el polipéptido 10kDa del PSII, cloroplástico (SOLYC12G017250.2), lo que indica una posible regulación positiva y específica de la fotosíntesis. El aumento del polipéptido 10kDa del PSII se ha asociado con la tolerancia al estrés salino en raíces de tomate (Li et al. 2022). Sin embargo, en nuestro caso, esta proteína se identificó como un marcador de la combinación de estreses por salinidad + altas temperaturas en hojas de tomate, posiblemente debido a la aplicación exógena de ABA en nuestros mutantes *flc* o debido a una dependencia del órgano de la planta de tomate estudiado. También se identificaron como marcadores de esta combinación de estreses la transcripción de la *subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa* (SOLYC03G063500.1), la *proteína 2 que contiene el dominio de repetición de anquirina* (SOLYC10G024330.3) y dos transcritos sin función conocida (SOLYC08G036540.1 y SOLYC07G021155.1). Además, dos compuestos relacionados con la biosíntesis de betalaína (betanidina y dopaxantina quinona) se reconocieron como marcadores metabólicos en *flc+* bajo la combinación de estreses y, curiosamente, estos dos marcadores también fueron identificados previamente como VIP₂ de la interacción grupo de plantas x tratamiento en el estudio metabolómico (**Tabla S4**). Además, el isoeugenol también se identificó como VIP₂ del grupo de tratamiento en el estudio metabolómico independiente (**Tabla S4**) y, en nuestro estudio multiómico apareció de nuevo como marcador de la combinación de estreses. Sin embargo, estas betalaínas y el

isoeugenol se han relacionado con la respuesta a estreses abióticos, pero nunca con la combinación de los estreses salinidad + altas temperaturas (Sokolova et al. 2022; Yeshi et al. 2022; Zhao et al. 2022), lo que realza la importancia de nuestros estudios.



3.3 Validación de marcadores moleculares *flc-* y *flc+* mediante el modelo WT

Tras realizar los análisis multiómicos en los modelos *flc-* y *flc+*, se procedió a realizar los mismos análisis en plantas WT bajo estreses simples o combinados con el objetivo de validar la especificidad o la asociación general de estos marcadores con el estrés aplicado o el genotipo estudiado. Así, se realizó un estudio similar a los descritos anteriormente de *flc-* y *flc+* pero con plantas WT (**Figuras S6 y S7**).

El HCA mostró dos grupos diferentes: control y salinidad, por un lado, y altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas (**Figura S5B**). Li et al. (2023) demostraron que las altas temperaturas tuvieron una mayor contribución en los niveles transcriptómicos y metabolómicos cuando se aplicaron conjuntamente los estreses altas temperaturas y salinidad a plantas de tomate silvestre (Li et al. 2023). Resultados previos de nuestro grupo de investigación en líneas comerciales de tomate también demostraron estos hallazgos (Lopez-Delacalle et al. 2020, 2021b). Sin embargo, en los modelos *flc-* y *flc+* la combinación de estreses estaba más asociada al estrés por salinidad. Por lo tanto, nuestros resultados mostraron una posible especificidad de genotipo en los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico (**Figuras 26B y 32B**). Los marcadores clave más relevantes asociados con parámetros fisiológicos, iones, transcritos y metabolitos identificados en el «modelo WT» se reportan en la **Figura S7**.

Comparando los marcadores obtenidos en el modelo WT con los obtenidos previamente para *flc-* y *flc+* (**Figuras 27, 33 y S7 y Tabla S5**) se encontraron varios marcadores comunes (**Figura 34**). Los marcadores específicos en condiciones control en al menos dos de los tres grupos de plantas fueron AHs/Cs, NO_3^- , ϕPSII , ETR, qP, A y ϕCO_2 , siendo los dos últimos dependientes de ABA, ya que solo estaban presentes en plantas WT y *flc+*. Los marcadores comunes al estrés por salinidad fueron únicamente Na^+ y Cl^- , lo cual es lógico teniendo en cuenta que estos iones se aplicaron en la solución nutritiva de las plantas en el tratamiento de estrés salino. Los marcadores obtenidos en el estrés por altas temperaturas fueron CTleaf, H_2O_i y F. Por último, Ci_Pa, C2Sfc, iridotrial, isoeugenol y hex-3-en-1-il acetato (H-EN-YL-AC) fueron marcadores dependientes de la combinación de estreses y del ABA, ya que todos ellos fueron marcadores encontrados tanto en plantas WT como *flc+* bajo este tratamiento.

Por último, dos parámetros fisiológicos (PF y E) y dos iones (Ca^{2+} y Pi) fueron marcadores comunes en al menos dos de los grupos de plantas. Sin embargo, estos marcadores no aparecieron bajo el mismo tratamiento de estrés. El Ca^{2+} y el PO_4^{3-} fueron marcadores en condiciones control en plantas WT y *flc+* y marcadores de estrés térmico en plantas *flc-*. El PF fue un marcador en plantas *flc-* y WT en condiciones control y en plantas *flc+* bajo estrés térmico. Por otro lado, la E fue característica en plantas *flc-* y *flc+*, siendo un marcador para condiciones de altas temperaturas y control, respectivamente.

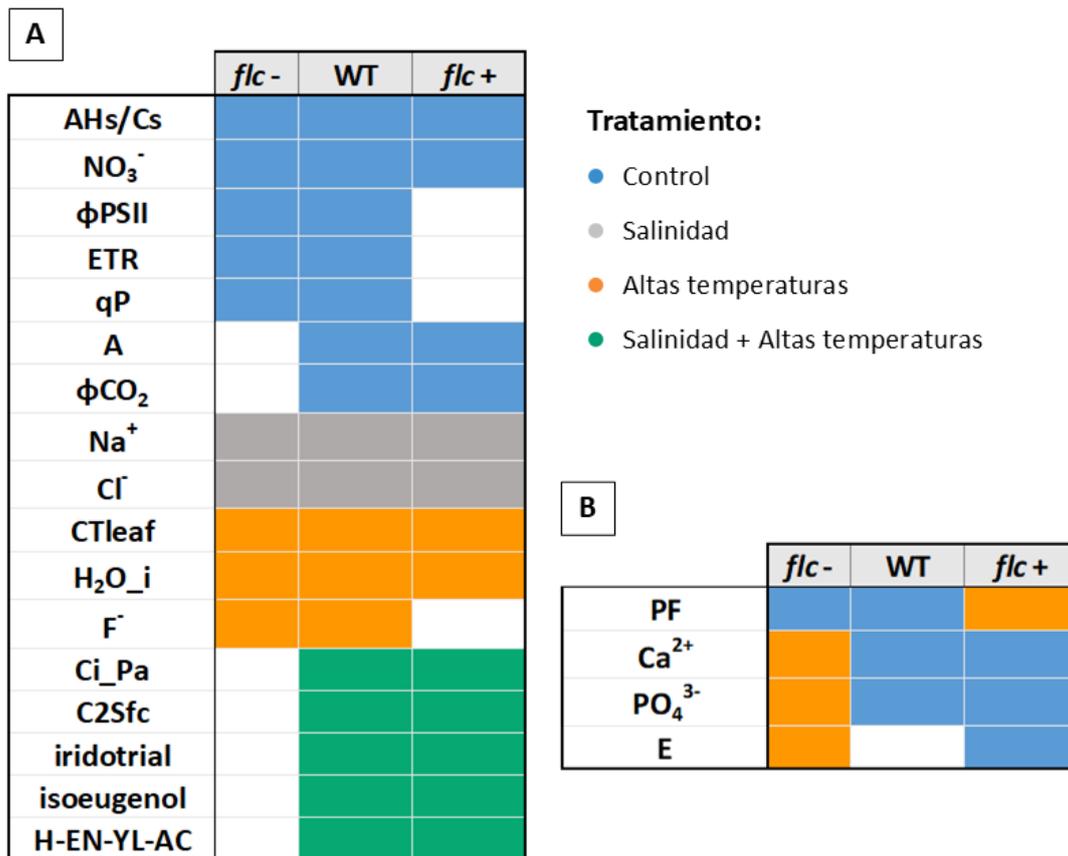


Figura 34. Marcadores multiómicos comunes en al menos dos de los tres grupos de plantas (WT, *flc-* o *flc+*). (A) Marcadores multiómicos que comparten el mismo tratamiento entre diferentes grupos de plantas. (B) Marcadores multiómicos que no comparten el mismo tratamiento entre diferentes grupos de plantas. AHs/Cs: Parámetro Ball-Berry, φPSII: rendimiento cuántico del fotosistema II, ETR: tasa de transporte de electrones, qP: *quenching* fotoquímico, A: tasa fotosintética, φCO₂: eficiencia cuántica de asimilación de CO₂, CTleaf: temperatura de la hoja, H₂O_i: H₂O intercelular, Ci_{Pa}: presión de CO₂ intercelular, C2Sfc: concentración superficial de CO₂, H-EN-YL-AC: hex-3-en-1-il acetato, PF: peso fresco de las hojas, E: tasa de transpiración.

4. Conclusiones

Las plantas deficientes en ABA muestran cambios significativos en biomasa, fotosíntesis, iones, transcritos y metabolitos en comparación con las plantas de tipo silvestre en condiciones control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. Nuestros datos demuestran que algunas de estas respuestas son independientes de la concentración óptima endógena de ABA y dependientes de la condición ambiental aplicada. Por otro lado, la aplicación exógena de ABA en plantas deficientes en ABA no condujo a la recuperación de la planta, ni a nivel fenotípico ni a

nivel metabólico total, pero sí resulta en una reprogramación celular con cambios en marcadores específicos debidos a este ABA exógeno.

La respuesta de las plantas a los estreses ambientales depende del estrés aplicado y existe una respuesta específica a la aplicación de estreses individuales o en combinación. En condiciones de campo, las plantas están sometidas a varios estreses simultáneamente, y su respuesta no es la suma de las respuestas a estreses individuales, sino una respuesta específica a esa combinación de estreses. Además, nuestros análisis multiómicos han demostrado que cada condición ambiental aplicada presenta marcadores específicos en la respuesta de la planta. Los marcadores observados en plantas expuestas a un único estrés (salinidad y altas temperaturas) difieren de los observados en la combinación de ambos estreses.

En este capítulo también hemos demostrado que el estudio conjunto de las diferentes ómicas permite identificar ciertos marcadores específicos para cada condición de estrés que no eran detectables en el estudio de cada ómica por separado. Nuestros resultados ofrecen una nueva vía para identificar marcadores moleculares específicos en la respuesta de las plantas a estreses individuales y, lo que es más importante, a estreses combinados, con implicaciones para las rutas metabólicas, la absorción de iones y las respuestas fisiológicas cruciales para la tolerancia de las plantas al cambio climático.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

1. Introducción

La exploración de la combinación de estreses es vital en el contexto del cambio climático, ya que fenómenos como olas de calor, sequías y salinidad pueden causar pérdidas significativas en la agricultura (Pascual et al. 2022). La mayoría de los estudios se centran en el efecto del estrés en hojas y frutos. Sin embargo, los estudios sobre la combinación del estrés en las raíces son escasos, a pesar de que desempeñan un papel clave en las interacciones planta-medio ambiente. Las raíces cumplen funciones clave en la planta, como conectar la planta con su entorno, absorber agua y nutrientes para transportarlos a los órganos superiores, segregan hormonas y compuestos orgánicos, y optimizar el uso de los nutrientes presentes en la solución nutritiva. Además, las raíces, ante situaciones de estrés, envían señales hormonales u otros marcadores moleculares a diferentes partes de la planta, activando mecanismos que buscan reducir el daño y proteger a la planta (Kul et al. 2020). Con ello, las plantas pueden percibir las condiciones de estrés y adaptar su arquitectura radicular en consecuencia (Karlova et al. 2021). Liu et al. (2022) demostraron que el número de genes transportadores de iones sobreexpresados en las raíces era mayor que en las hojas de plantas de crisantemo sometidas a estrés salino (Liu et al. 2022a). También, Silva et al. (2018) demostraron que las raíces de *Jatropha curcas* sometidas a altas temperaturas presentaban un mayor daño en la membrana, una mayor peroxidación lipídica y una menor actividad de enzimas antioxidantes en comparación con las hojas sometidas al mismo estrés (Silva et al. 2018). Asimismo, la respuesta en las raíces puede ser muy diferente de la que ocurre en otras partes de la planta. Por ejemplo, la regulación del transporte iónico es más comúnmente regulada en las raíces (Cheng et al. 2018; Yang et al. 2022). Por lo tanto, las raíces se consideran un importante órgano de la planta implicado en muchos procesos relacionados con la respuesta al estrés y necesitan de un estudio independiente.

De nuevo, en este capítulo hablaremos del importante papel de la fitohormona sesquiterpenoide ABA en la tolerancia al estrés en plantas y, más específicamente, en raíces (Muhammad Aslam et al. 2022; Yang et al. 2022). Trabajos previos han

demostrado que ABA desempeña papeles importantes a nivel radicular, entre ellos, la modulación de la arquitectura de las raíces (Harris 2015; Chen et al. 2022). Chen et al. (2006) observaron que el tratamiento con ABA en las raíces de arroz aumentaba la actividad de la cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio reductasa y el contenido de K^+ en la savia del xilema, mientras que modulaba la síntesis de proteínas y la morfogénesis a través de mecanismos dependientes de Ca^{+2} , revelando conocimientos sobre los cambios fisiológicos y morfológicos mediados por ABA (Chen et al. 2006). Del mismo modo, se ha observado que ABA está implicado en algunas respuestas específicas al estrés en raíces. Rowe et al. (2016) demostraron que el ABA regulaba el crecimiento de las raíces de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés osmótico a través de una red hormonal donde interactuaba con las AUXs, las CKs y el ET (Rowe et al. 2016). El ABA también se acumula en las raíces del arroz en condiciones de estrés salino e induce la expresión de genes dependientes del ABA, como las EXPANSINAS (clase de proteínas que participan en la extensión de la pared celular y el crecimiento celular) (Huang et al. 2021). Asimismo, el ABA en las raíces integra una vía de señalización que implica factores de choque térmico, proteínas de choque térmico y ROS en respuesta al estrés térmico (Tiwari et al. 2022).

Por ende, el objetivo principal de este estudio fue mejorar nuestra comprensión sobre papel del ABA en el crecimiento, la absorción de iones y el perfil metabólico de las raíces de tomate en condiciones de estrés simple y combinado. Con este propósito, se emplearon, de nuevo, los mutantes de tomate deficientes en ABA (*flc*) y se compararon con plantas no deficientes en ABA bajo las mismas condiciones. Además, se añadió ABA exógeno a las plantas mutantes *flc* para confirmar la implicación del ABA en los cambios observados en los parámetros medidos y ómicas analizadas. Nuestros resultados demostraron una respuesta específica de las raíces de tomate, que dependía del estrés aplicado y de los niveles endógenos de ABA. En particular, la respuesta de las plantas deficientes en ABA bajo una combinación de estreses no reflejaba simplemente los efectos acumulativos de los estreses individuales, sino que mostraba un patrón distinto y específico. En esta línea, las plantas mutantes *flc+* no recuperaron completamente el fenotipo ni tampoco los niveles iónicos y metabólicos de las plantas WT, revelando que los mutantes *flc+* reprogramaban su perfil metabólico dando lugar la acumulación

de compuestos significativamente diferentes en comparación con las plantas WT. En consecuencia, nuestro estudio identificó posibles marcadores moleculares clave y específicos de raíces bajo condiciones control y bajo estrés simple o combinado, ofreciendo una valiosa herramienta para los investigadores que trabajan en el campo de la tolerancia al estrés abiótico y/o las vías de señalización dependientes de ABA.

2. Materiales y metodología específica

En este capítulo III, los estudios se centraron en las raíces de las plantas de tomate. Las plantas de tomate utilizadas y los tratamientos aplicados a las mismas fueron los mismos que los detallados en los capítulos I y II de esta tesis doctoral.

En términos generales, se determinó el peso seco de las raíces, tal y como se detalla en el apartado “7. Análisis de parámetros fisiológicos o fenómica” de la sección “Materiales y métodos”. Además, se cuantificó el ABA endógeno en las raíces de plantas de tomate, como se describe en el apartado “9. Cuantificación de ácido abscísico” de la sección “Materiales y métodos”.

Por otro lado, se llevaron a cabo los análisis ionómicos y metabolómicos, tal y como se detalla en los apartados “12. Determinación de la concentración de componentes minerales en hojas y raíces” y “13. Análisis metabolómico no dirigido (con la excepción del subapartado 13.7 que solo se llevó a cabo en el capítulo IV de esta tesis)”, respectivamente, de la sección “Materiales y métodos”.

Al igual que en capítulo II de esta tesis, los DAMs y DAIs se obtuvieron comparando las plantas WT bajo los tres tipos de estrés, las plantas *flc*- bajo los cuatro tratamientos y las plantas *flc*+ bajo los cuatro tratamientos frente a las plantas WT crecidas bajo condiciones control. Finalmente, se integraron los dos conjuntos de datos (ionómica y metabolómica) para llevar a cabo el análisis de correlación detallado en el apartado “14. Análisis de correlación entre los datos ionómicos y metabolómicos” de la sección “Materiales y métodos” de esta tesis doctoral.

3. Resultados

3.1 Parámetros fisiológicos

El peso seco de las raíces de las plantas se vio influido tanto por la deficiencia de ABA como por el estrés aplicado (**Figura 35**). Los estreses simples o combinados produjeron una disminución significativa del peso seco radicular en las plantas WT en comparación con las plantas WT cultivadas en condiciones control, obteniéndose el menor peso seco radicular en las plantas cultivadas bajo el estrés térmico y la combinación de estreses. Por otro lado, solo las plantas *flc-* bajo la combinación de estreses presentaron una disminución significativa del peso seco radicular en comparación con las raíces *flc-* bajo condiciones control. La deficiencia de ABA (*flc-*) indujo un descenso significativo del peso seco radicular independientemente del estrés al que se sometieron las plantas en comparación con las plantas WT bajo las mismas condiciones ambientales.

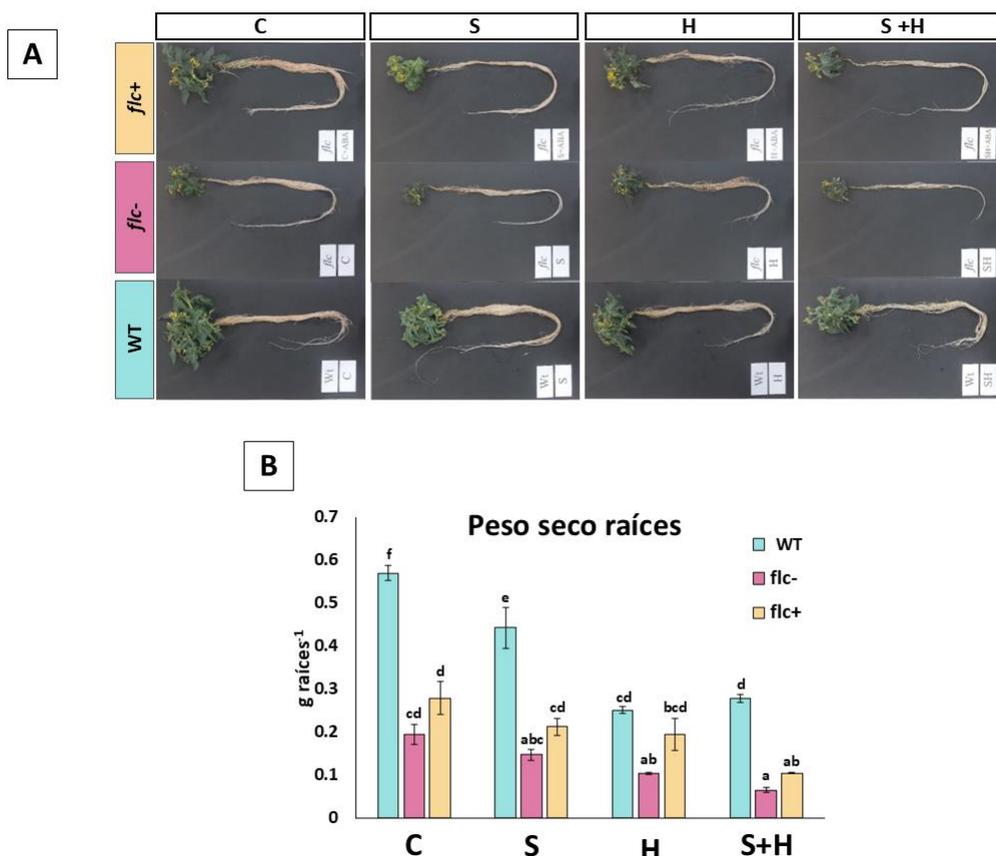


Figura 35. Caracterización fisiológica de los grupos plantas WT, *flc-* y *flc+* bajo condiciones de control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y salinidad + altas temperaturas (S+H) (A) Imágenes de plantas de tomate. (B) Peso seco de las raíces. Los valores representan medias \pm EE (n=6). Letras del panel B son significativamente diferentes a $p < 0,05$ según la prueba de Duncan.

Por último, solo se observó una recuperación significativa del peso seco radicular de las plantas *flc+* bajo estrés térmico en comparación con las plantas WT bajo la misma condición de estrés.

3.2 Análisis iónico

Las diferentes concentraciones obtenidas mediante el análisis iónico de los iones Na^+ , K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cu , Mn , Zn , Mo , B , P , Ca^{2+} , Mg^{2+} , S , Fe en raíces de plantas WT, *flc-* y *flc+* bajo condiciones de control, salinidad, altas temperaturas, salinidad + altas temperaturas nos permitieron estudiar la respuesta iónica a la deficiencia de ABA. La deficiencia de ABA causó cambios significativos en la acumulación de varios iones y la aplicación de ABA en mutantes deficientes en ABA no siempre condujo a la recuperación de los niveles iónicos de las plantas WT (**Figura 36**).

Entre las plantas *flc-* y WT se observaron diferencias significativas en los niveles de Mo y P bajo las cuatro condiciones ambientales estudiadas. La aplicación exógena de ABA (*flc+*) bajo estas condiciones indujo una recuperación general a nivel iónico, con la excepción en la combinación de estreses, donde si se observaron diferencias significativas entre las plantas WT y los mutantes *flc+*. Así, parece que ABA estuvo implicado en la regulación de los niveles de Mo y P en raíces, pero nuestros resultados indicaron que la aplicación exógena de ABA a los mutantes *flc-* crecidos bajo combinación de estreses pudo no ser suficiente para recuperar los niveles iónicos de WT posiblemente debido a la severidad del estrés aplicado. Las diferencias en los iones SO_4^{2-} y B entre las raíces *flc-* y WT solo se encontraron en las plantas crecidas bajo condiciones de estrés (simple o combinado) y, además, una aplicación exógena de ABA indujo la recuperación de los niveles de SO_4^{2-} y B . Por tanto, el ABA parece estar implicado en la regulación de los niveles de SO_4^{2-} y B en las raíces bajo las condiciones de estrés estudiadas. Por otro lado, las plantas *flc-* presentaron niveles significativamente superiores de Zn y S bajo condiciones de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas en comparación con las plantas WT. Además, la aplicación de ABA a los mutantes *flc* (*flc+*) solo indujo una recuperación de los niveles de Zn y S con respecto a los niveles encontrados en WT bajo estrés térmico. Estos resultados se asemejan a los observados anteriormente en Mo y P .

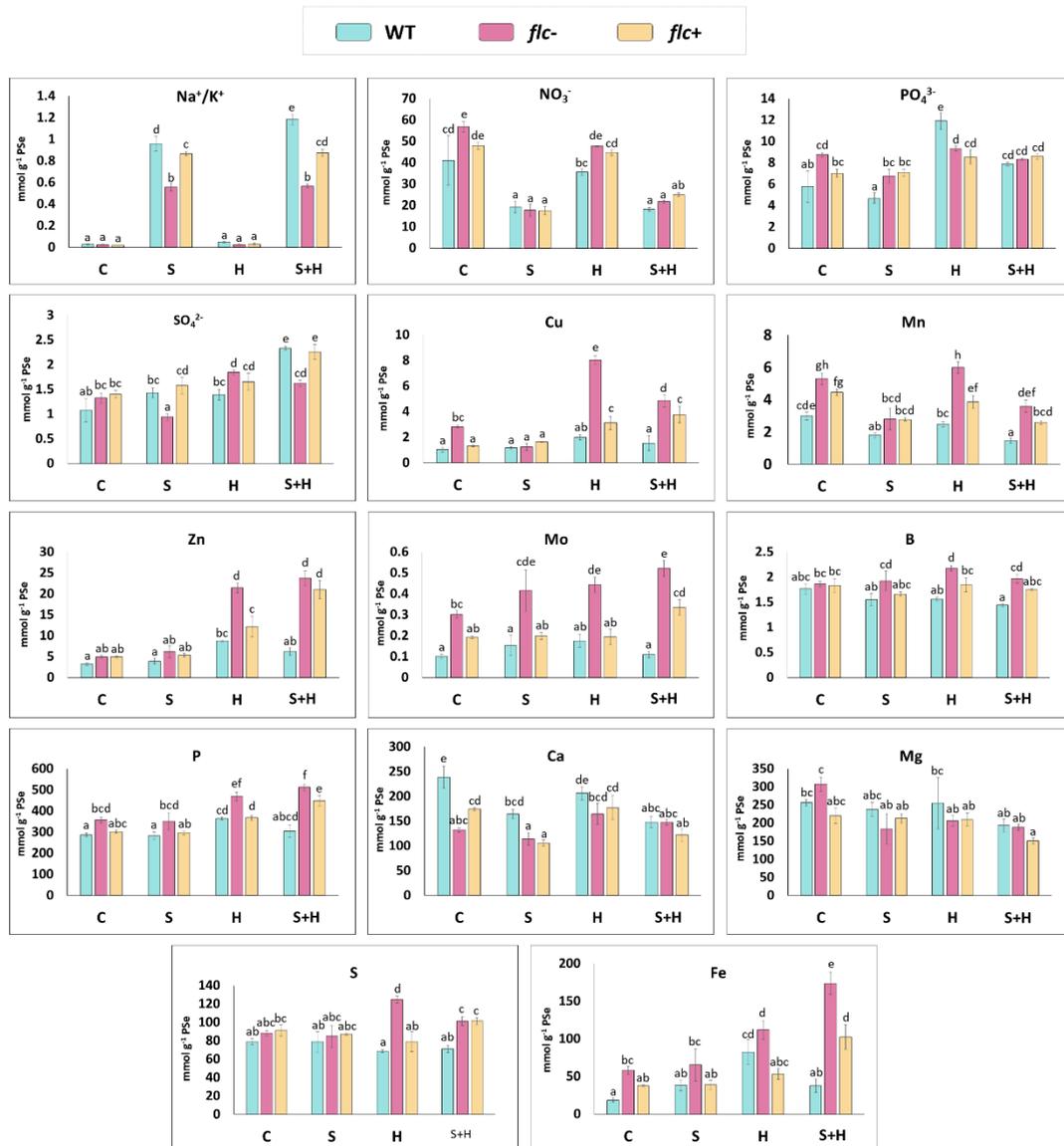


Figura 36. Caracterización iónica en plantas de tomate tipo silvestre (WT), *flc* sin ABA exógeno (*flc*-) y *flacca* con ABA exógeno (*flc*+) bajo condiciones de control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y salinidad + altas temperaturas (S+H). Los valores representan medias ± EE (n=3). Las letras son significativamente diferentes a p < 0,05 según la prueba de Duncan.

Asimismo, las plantas *flc*- presentaron diferencias en la relación Na⁺/K⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻, Cu, Ca²⁺, Mn y Fe con respecto a las plantas WT en al menos dos de las cuatro condiciones estudiadas. Las plantas *flc*+ mostraron una recuperación de los niveles de NO₃⁻ en todas las condiciones. Sin embargo, los niveles de PO₄³⁻, Cu, Mn y Fe solo se recuperaron respecto a los niveles WT en las raíces *flc*+ cultivadas en condiciones control. La aplicación de ABA en mutantes deficientes en ABA (*flc*+) bajo salinidad y la combinación

de estreses no revirtió completamente los niveles de Na^+/K^+ en plantas WT bajo las mismas condiciones. Finalmente, independientemente del tratamiento aplicado, no hubo cambios significativos en la concentración de Mg^{2+} entre los diferentes grupos de plantas.

Por otra parte, los niveles de iones cambiaron en función de las condiciones a las que se sometieron las plantas. Como era de esperar, la relación Na^+/K^+ fue mayor en todos los grupos de plantas a los que se aplicó NaCl y, curiosamente, se observó que la relación Na^+/K^+ fue significativamente mayor bajo la combinación de estreses en las plantas WT. Los tres grupos de plantas compartieron el patrón de aumento de Na^+/K^+ y disminución de NO_3^- y Mn bajo estrés salino y combinación de salinidad + altas temperaturas. Sin embargo, como mostramos anteriormente, estos iones mostraron cambios en mayor o menor medida dependiendo del grupo de plantas estudiado.

Por otro lado, solo unas pocas tendencias iónicas fueron compartidas por las plantas WT y *flc+*, como un aumento de los iones SO_4^{2-} bajo la combinación de estreses y una disminución de los iones Ca^{2+} bajo estrés salino en comparación con las condiciones control. Las plantas WT y *flc+* también tuvieron en común que los estreses estudiados no provocaron cambios significativos en B y S respecto a las condiciones control. Se puede deducir, de nuevo, que la concentración de iones SO_4^{2-} , Ca^{2+} , B y S en las raíces dependía de los niveles endógenos de ABA.

Alternativamente, los iones Zn y P mostraron una tendencia peculiar, ya que en las plantas WT estos iones aumentaron bajo estrés por altas temperaturas, pero en las plantas *flc-* y *flc+* aumentaron bajo estrés por altas temperaturas, pero también con el tratamiento de salinidad + altas temperaturas en comparación con las condiciones control. Del mismo modo, el Fe aumentó en las plantas WT bajo estrés térmico; en los mutantes *flc-* bajo estrés térmico y estrés combinado; y únicamente bajo la combinación de estreses en las plantas *flc+* en comparación con las condiciones control de cada grupo de plantas. Por lo tanto, estos resultados demostraron una relación entre el aumento de los niveles de Zn, P y Fe y el estrés por altas temperaturas.

Por su parte, Cu, PO_4^{3-} y Mo mostraron una acumulación específica dependiente de las condiciones ambientales en cada grupo de plantas estudiadas. Curiosamente, tanto

el Mo como el Cu se acumularon significativamente en las plantas mutantes (*flc-* y *flc+*) sometidas a alguna de las condiciones de estrés aplicadas. Por el contrario, en las plantas WT no se observaron cambios en estos iones cuando las plantas estuvieron sometidas a cualquier condición de estrés. Finalmente, además de observar que la acumulación de Mg^{2+} siguió una tendencia independiente de ABA, no se detectaron diferencias significativas en el patrón de acumulación de Mg^{2+} en las raíces de tomate bajo las diferentes condiciones de estrés aplicadas.

3.3 Análisis metabólico

Para mejorar nuestra comprensión de cómo una deficiencia de ABA podría afectar al perfil metabólico de las raíces bajo estrés individual o una combinación de estreses, se realizó un análisis metabólico no dirigido. Este análisis nos permitió anotar positivamente 1429 compuestos entre WT, *flc-* y *flc+* bajo condiciones de control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. El HCA (**Figura S8**) mostró que las plantas WT se separaban de los otros dos grupos de plantas. Sin embargo, no se observaron diferencias entre las plantas *flc-* y *flc+*. Además, el HCA indicó una estrecha relación entre los tratamientos control y salinidad, así como entre los tratamientos de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas.

Para confirmar los resultados obtenidos en el HCA, se realizó un análisis AMOPLS-DA que determinó los factores principales que contribuían a las varianzas observadas. Estos factores incluían el grupo de plantas, el tratamiento y la interacción entre el grupo de plantas y el tratamiento. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento ejerció la mayor influencia en las diferencias observadas a nivel metabólico (RSS 19%, **Tabla S6**). Además, el grupo de plantas y el grupo de plantas x tratamiento fueron estadísticamente significativos, con un RSS del 16% y 18% respectivamente (**Tabla S6**). Sin embargo, el 47% de las diferencias metabólicas observadas no pudieron ser explicadas por nuestros factores (Residuales; **Tabla S6**). Considerando únicamente el factor grupo de plantas, la componente 2 (tp2) facilitó la diferenciación entre *flc-* y *flc+* de las plantas WT, mientras que la componente 4 (tp4) permitió la discriminación de *flc+* de los otros dos grupos de plantas (**Figura 37A** y **Tabla S6**). En cuanto al factor de

tratamiento, la componente 1 (tp1) separó significativamente los tratamientos de control y salinidad de los tratamientos de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas, mientras que la componente 5 (tp5) separó los tratamientos de control y altas temperaturas de los tratamientos de salinidad y salinidad + altas temperaturas (**Figura 37B** y **Tabla S6**). Finalmente, la interacción entre los dos factores (grupo de plantas x tratamiento) tuvo un impacto significativo en la regulación metabólica de las plantas (**Figura 37C** y **Tabla S6**).

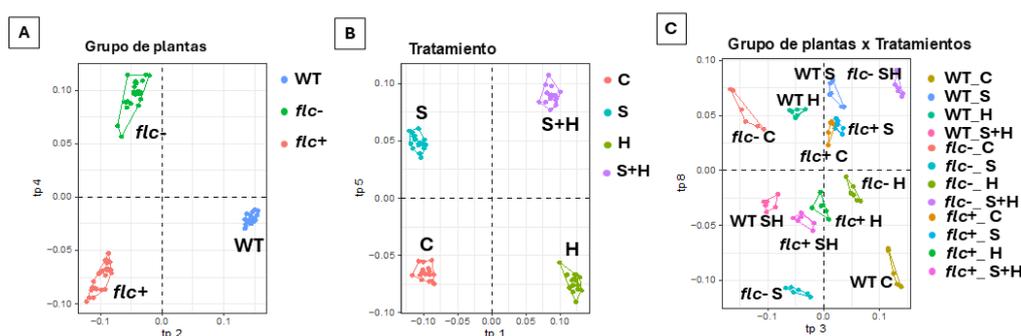


Figura 37. Gráficos de puntuaciones AMOPLS-DA correspondientes a los componentes predictivos (tp) encontrados en el análisis metabólico asociado a tres factores: genotipo (A), tratamiento (B) y genotipo x tratamiento (C).

Utilizando el AMOPLS-DA, se empleó un enfoque de VIP_2 para identificar con precisión los posibles marcadores principalmente implicados en dicha discriminación (puntuación $VIP_2 > 3$) para cada factor. Los compuestos más representativos obtenidos pertenecían a los metabolismos de fenilpropanoides, terpenoides y compuestos que contienen nitrógeno (**Figura 38** y **Tabla S7**). Como el tratamiento fue el factor más discriminante en el análisis AMOPLS-DA, se formularon dos modelos de estudio para permitir la diferenciación entre los diversos grupos de plantas utilizados en nuestra investigación, al igual que en el capítulo anterior. Un modelo contrastó plantas deficientes en ABA (*flc-*) bajo cualquier condición aplicada con plantas WT bajo condiciones control (modelo *flc-*), mientras que el otro modelo comparó plantas deficientes en ABA suplementadas con ABA exógeno (*flc+*) bajo cualquier condición aplicada con plantas WT bajo condiciones control (modelo *flc+*).

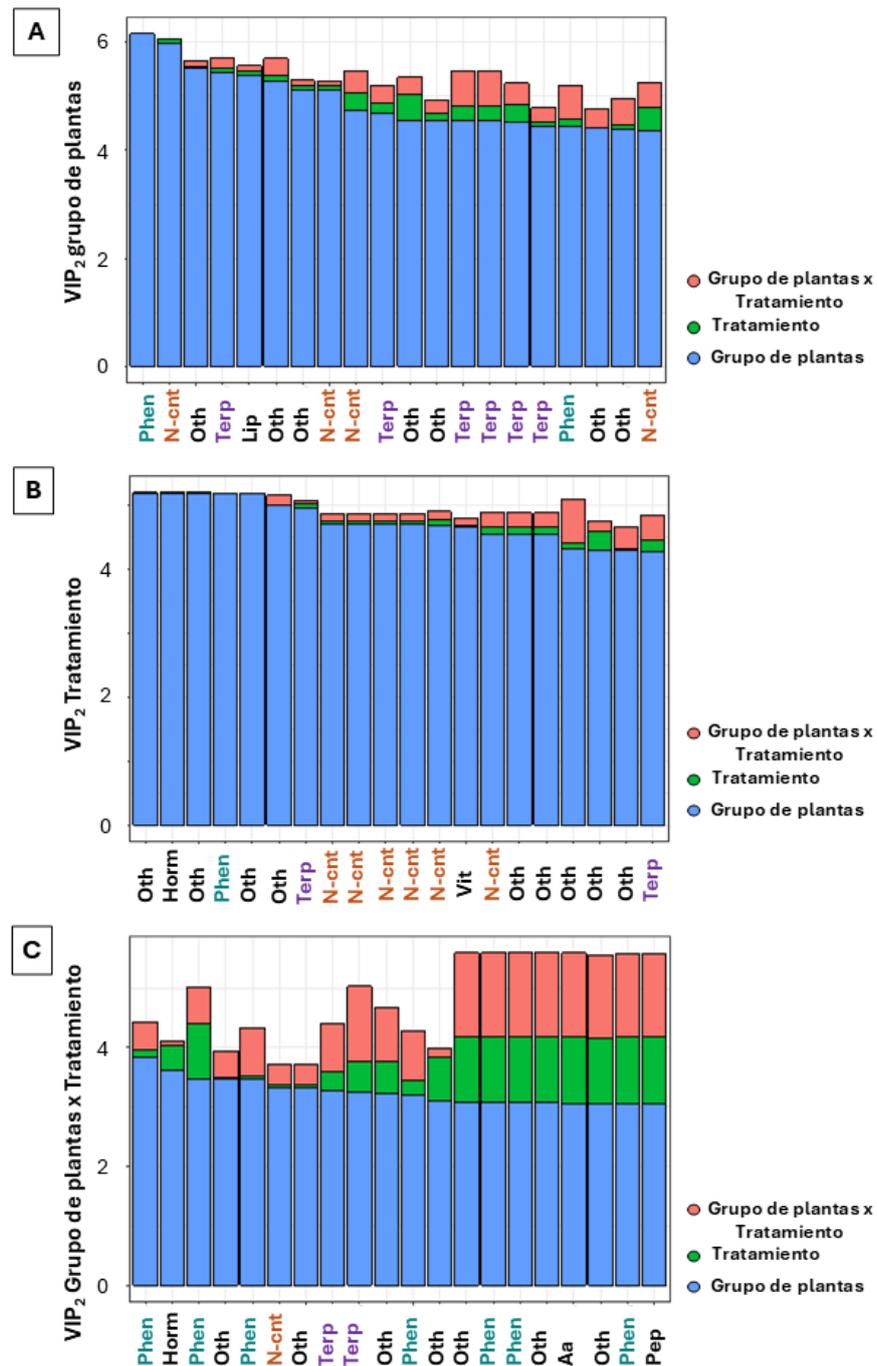


Figura 38. Análisis de Importancia Variable en Proyección (VIP₂) para seleccionar los metabolitos discriminantes atribuidos a la discriminación debida al grupo de plantas (A), tratamiento (B), grupo de plantas y grupo de plantas x tratamiento (C). Phen: fenilpropanoide, N-cnt: compuesto con nitrógeno, Terp: terpenoide, Lip: lípido, Horm: hormona, Vit: vitamina, Aa: aminoácido, Oth: otros.

3.3.1 Modelo *flc*-

Se realizó un análisis Volcano (p -valor $<0,05$) y Log_2FC con el objetivo de obtener la huella metabólica causada por la deficiencia de ABA en raíces de plantas bajo control, salinidad, altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. Así, comparamos plantas *flc*- bajo todas las condiciones con plantas WT bajo condiciones control, obteniendo como resultado los DAMs.

El número de DAMs obtenido de mayor a menor fue altas temperaturas > salinidad > salinidad + altas temperaturas > control (250, 204, 185 y 134 DAMs, respectivamente; **Figura 39A**). Solo 33 DAMs estuvieron compartidos por todos los tratamientos aplicados, y solo 18 DAMs estuvieron compartidos por los estreses simples y la combinación de estos, explicando la especificidad de cada tratamiento. Además, el estrés combinado tuvo aproximadamente el 28% de sus DAMs compartidos solo con el estrés por altas temperaturas y aproximadamente el 5% de sus DAMs compartidos solo con el estrés por salinidad, lo que sugiere una mayor influencia de las altas temperaturas en comparación con la salinidad.

A continuación, se implementó el software PlantCyc para clasificar los diferentes DAMs obtenidos en diferentes rutas metabólicas. La vía biosintética más notable inducida bajo estrés abiótico en raíces *flc*- fue el metabolismo secundario y, en menor medida, las rutas biosintéticas de fosfolípidos/lípidos, cofactores y hormonas (**Figura 39B**). Además, observamos que el metabolismo secundario en las raíces *flc*- estaba significativamente regulado al alza bajo estrés térmico y salinidad + altas temperaturas. Sin embargo, el tratamiento control y el estrés por salinidad indujeron una regulación a la baja de esta vía. Del mismo modo, la vía de la biosíntesis de cofactores se redujo significativamente en las raíces *flc*- bajo condiciones de estrés por salinidad, y se incrementó significativamente bajo estrés térmico y la combinación de estreses. Por otro lado, las rutas de biosíntesis de fosfolípidos/lípidos y metabolitos de la estructura celular se mostraron enriquecidas positivamente en *flc*- independientemente del tratamiento aplicado.

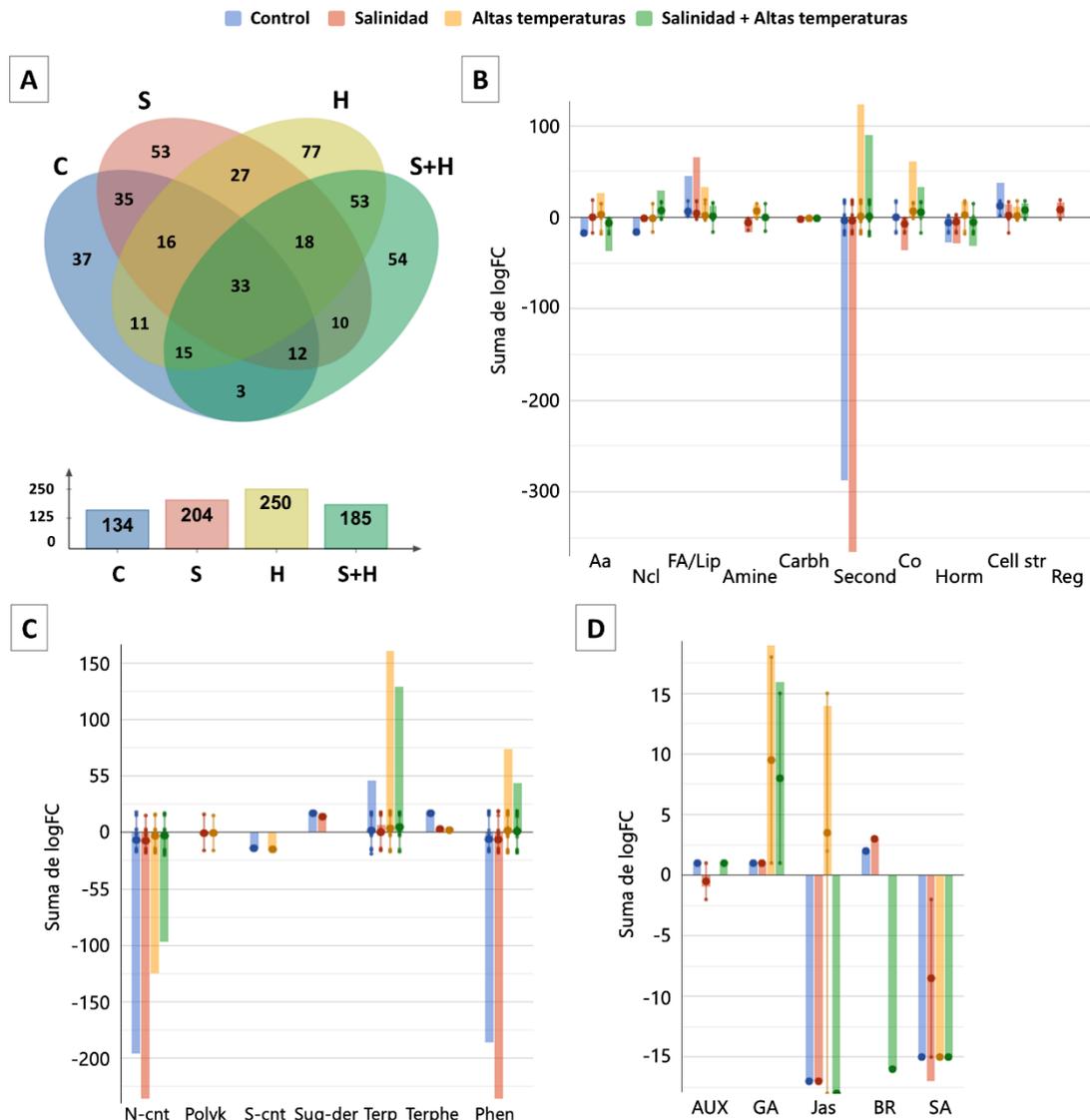


Figura 39. DAMs en la raíz de mutantes *flc-* bajo control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H). Los datos se normalizaron frente al control WT ($p < 0,05$; $|\log_2 FC| \geq 2$). (A) Diagramas de Venn de los DAMs en cada tratamiento. (B) Enriquecimiento de rutas biosintéticas. (C) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios. (D) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de hormonas. B, C y D se realizaron utilizando el software PlantCyc. Aa: aminoácidos, Ncl: núcleo, FA: ácidos grasos, Lip: lípidos, Carbh: carbohidratos, Second: metabolitos secundarios, Co: cofactores, Horm: hormonas, Cell str: metabolitos de la estructura celular, Reg: regulador, N-cont: compuestos que contienen N, Polyk: policétidos, S-cont: compuesto que contienen S, Sug-der: derivados del azúcar, Terp: terpenoides, Terphe: terpenofenólicos, Phen: fenilpropanoides, AUX: auxinas, GA: giberelinas, Jas: jasmonatos, BR: brasinoesteroides, SA: ácido salicílico.

La **Figura 39C** muestra varios grupos importantes pertenecientes al metabolismo secundario. Nuestros datos mostraron que cualquier tratamiento aplicado indujo una regulación a la baja de los compuestos nitrogenados y una regulación al alza de los terpenoides en las raíces *flc*-. Por el contrario, la deficiencia de ABA se relacionó con los niveles de fenilpropanoides, que disminuyeron bajo condiciones de control y salinidad, y aumentaron bajo la combinación de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el contenido de GAs bajo condiciones de altas temperaturas y salinidad + combinación de altas temperaturas en raíces *flc*- (**Figura 39D**). Finalmente, se observó que la deficiencia de ABA podría estar provocando una reducción en la biosíntesis de Jas y SA, excepto en *flc*- bajo el tratamiento de altas temperaturas, donde se detectó un aumento en la síntesis de Jas (**Figura 39D**).

3.3.2 Modelo *flc*+

Al igual que en el capítulo anterior, se implementaron análisis Volcano (valor $p < 0,05$) y Log_2 FC con el objetivo de determinar si los niveles endógenos de ABA estaban directamente relacionados con el perfil metabólico obtenido previamente en nuestros mutantes *flc* y si una concentración suficiente de ABA era capaz de restaurar al perfil metabólico de plantas WT. Así, se compararon plantas *flc*+ bajo todas las condiciones con plantas WT bajo condiciones control, dando como resultado un grupo DAMs.

El número de DAMs obtenido de mayor a menor fue salinidad + altas temperaturas > altas temperaturas > salinidad > control (239, 205, 159, 109 DAMs, respectivamente; **Figura 40A**). Solo 29 DAMs fueron comunes a todos los tratamientos aplicados y solo 19 DAMs estuvieron compartidos entre los estreses aplicados, explicando de nuevo la especificidad de cada uno de los tratamientos utilizados en nuestros experimentos. Además, la combinación de estreses compartió el 32% de sus DAMs con el estrés por altas temperaturas y aproximadamente el 9,6% con el estrés por salinidad, demostrando, como en el modelo *flc*-, que cuando se combinan salinidad y altas temperaturas el estrés por altas temperaturas puede inducir una mayor influencia en los cambios del perfil metabólico que el estrés por salinidad.

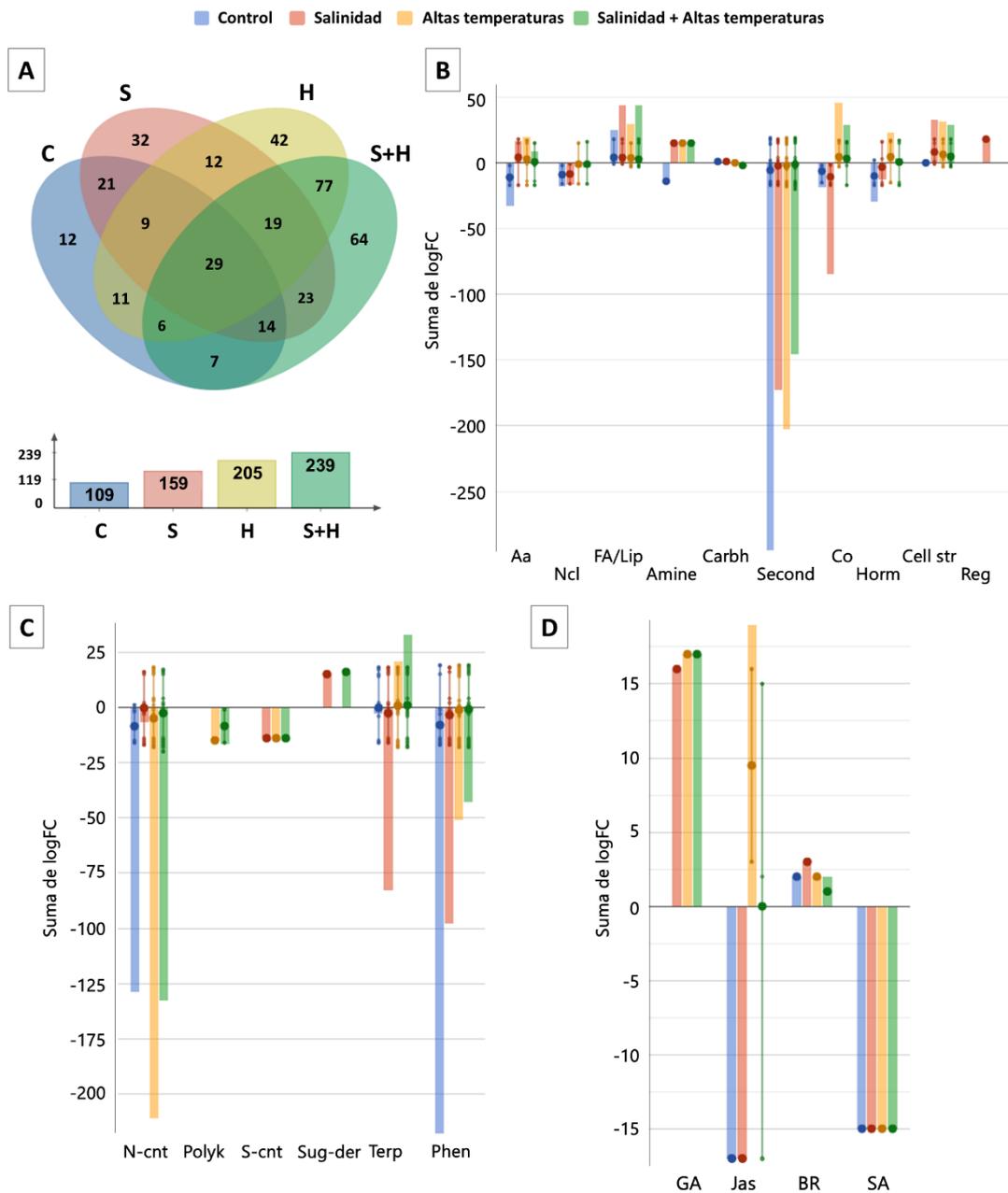


Figura 40. DAMs en la raíz de mutantes *flc+* bajo control (C), salinidad (S), altas temperaturas (H) y la combinación de salinidad + altas temperaturas (S+H). Los datos se normalizaron frente al control WT ($p < 0,05$; $|\log_2 FC| \geq 2$). (A) Diagramas de Venn de los DAMs en cada tratamiento. (B) Enriquecimiento de rutas biosintéticas. (C) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios. (D) Enriquecimiento de las rutas biosintéticas de hormonas. B, C y D se realizaron utilizando el software PlantCyc. Aa: aminoácidos, Ncl: núcleo, FA: ácidos grasos, Lip: lípidos, Carbh: carbohidratos, Second: metabolitos secundarios, Co: cofactores, Horm: hormonas, Cell str: metabolitos de la estructura celular, Reg: regulador, N-cont: compuestos que contienen N, Polyk: policétidos, S-cont: compuestos que contienen S, Sug-der: derivados del azúcar, Terp: terpenoides, Terphe: terpenofenólicos, Phen: fenilpropanoides, GA: giberelinas, Jas: jasmonatos, BR: brasinoesteroides, SA: ácido salicílico.

Al igual que para el modelo *flc-*, se implementó el software PlantCyc para elaborar las rutas biosintéticas más representativas de los DAMs obtenidos. La ruta biosintética más destacada fue, de nuevo, la del metabolismo secundario y, en menor medida, las rutas biosintéticas de aminoácidos, fosfolípidos/lípidos, cofactores, hormonas y metabolitos de la estructura celular (**Figura 40B**). El metabolismo secundario del modelo *flc+* disminuyó significativamente en los cuatro tratamientos, siendo la condición control de las plantas *flc+* la que más disminuyó. Así pues, parece que el estrés abiótico indujo una mayor disminución de la biosíntesis de compuestos del metabolismo secundario en comparación con la condición control. Por otro lado, las rutas biosintéticas de fosfolípidos/lípidos y metabolitos de la estructura celular estuvieron sobreexpresados en plantas *flc+* independientemente del tratamiento aplicado. La biosíntesis de aminoácidos aumentó debido al estrés en las raíces *flc+*. Y los estreses por altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas indujeron un incremento en la biosíntesis de cofactores.

Más específicamente, la **Figura 40C** muestra varios grupos importantes del metabolismo secundario en el modelo *flc+*. Los datos demostraron la regulación a la baja de las rutas biosintéticas de compuestos N y fenilpropanoides en raíces *flc+* bajo cualquiera de los tratamientos aplicados. Así, la pronunciada represión de la biosíntesis de metabolitos secundarios (**Figura 40B**) en raíces *flc+* bajo condiciones control se debió principalmente a la represión de la biosíntesis de fenilpropanoides (**Figura 40C**). Por otro lado, en las raíces *flc+* la vía biosintética de terpenoides aumentó bajo condiciones de altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas y disminuyó bajo condiciones control y estrés salino.

A nivel hormonal, igual que en el modelo *flc-*, hubo un incremento en la biosíntesis de Jas en raíces *flc+* bajo estrés térmico (**Figura 40D**). Por último, cabe destacar que no hubo diferencias significativas en el enriquecimiento de SA entre ambos modelos (*flc-* y *flc+*).

3.4 Análisis de correlación entre ionoma y metaboloma

Se realizó un análisis exhaustivo con el coeficiente de correlación de Pearson para comprender las relaciones entre las concentraciones de iones y metabolitos en raíces de

plantas de tomate con deficiencia de ABA bajo estrés abiótico simple o combinado. Para el análisis, fueron seleccionados los DAMs e DAIs (**Tabla S8**) encontrados en raíces mutantes *flc*- bajo las diferentes condiciones de estrés utilizadas en comparación con plantas WT cultivadas bajo condiciones control. Los datos obtenidos fueron posteriormente filtrados a aquellos con un coeficiente de correlación >0.8 y <-0.8 y los valores más altos ($R < 0.95$) fueron representados en la **Figura 41**. Un total de 36 metabolitos (**Tabla S9**) mostraron un coeficiente de correlación significativo positivo (naranja) o negativo (azul) con Na^+ , K^+ , Zn , Mg^{2+} , Fe y S (**Figura 41**). La descripción de estos metabolitos seleccionados y su valor $\log_2\text{FC}$ en cada condición utilizada se encuentra en la **Tabla S9**.

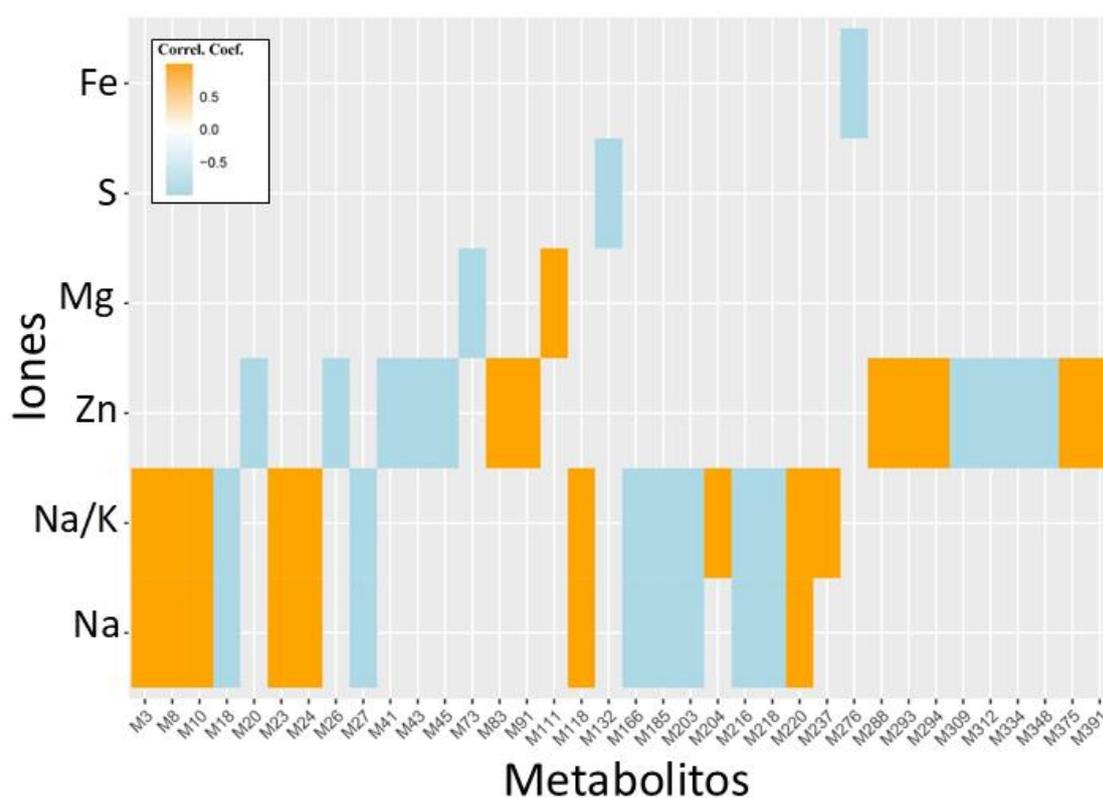


Figura 41. Esquema del análisis de correlación entre ionoma y metaboloma del mutante *flc*- bajo las cuatro condiciones estudiadas comparado con WT en condiciones control.

Los 36 DAMs seleccionados fueron representados en los diagramas de Venn de la **Figura 42**. Así, bajo altas temperaturas y condiciones control, las raíces de los mutantes *flc*- mostraron la disminución de 7 metabolitos relacionados con el metabolismo de los aminoácidos y el aumento de 2 metabolitos relacionados con el metabolismo de

hormonas y terpenoides en comparación con el WT bajo condiciones control. Todos estos metabolitos se asociaron con una deficiencia en Na⁺ y con el índice Na⁺/K⁺ bajo las mismas condiciones. Del mismo modo, bajo estrés salino o la combinación de salinidad + altas temperaturas, estos iones mostraron una acumulación que se asoció a la reducción de 5 metabolitos y el aumento de otros 3 metabolitos, todos ellos descritos como pequeñas moléculas con varias funciones. El Zn siguió una dinámica similar en *flc*- bajo condiciones control y estrés salino, cuya deficiencia se asoció con la reducción de 2 metabolitos relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y con el aumento de 5 metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos. Por otro lado, se observó una acumulación de Zn en los mutantes *flc*- bajo altas temperaturas y salinidad + altas temperaturas y se asoció con la reducción y el aumento de 5 metabolitos específicos en cada caso. Por último, la deficiencia de Mg²⁺ y S se asoció con la acumulación de 2 metabolitos relacionados con el metabolismo de terpenoides en cualquiera de las condiciones utilizadas en nuestros experimentos.

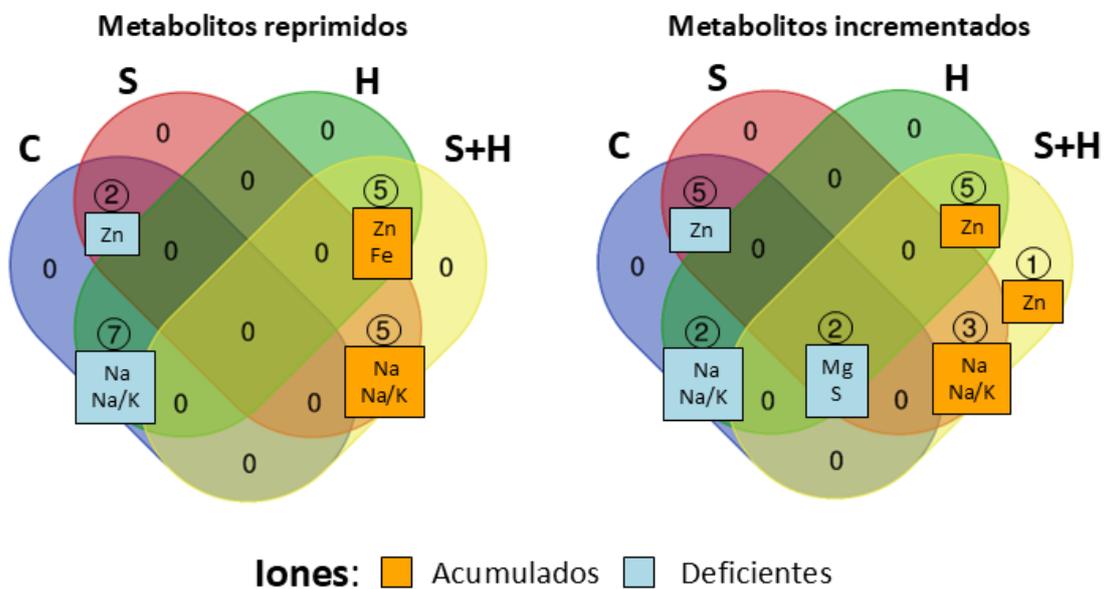


Figura 42. Diagramas de Venn de los DAMs acumulados o reducidos de la **Figura 41**. Los cuadrados representan los DAIs relacionados con ese grupo de DAMs.

4. Discusión

4.1 Respuesta al estrés específica del ionoma y el metaboloma en raíces de plantas deficientes de ABA

La mayoría de los estudios que encontramos en la literatura con respecto a la respuesta específica de las plantas a la combinación de dos o más estreses abióticos se han centrado en las hojas. Teniendo en cuenta el papel fundamental del ABA en la aclimatación al estrés, la señalización celular y el desarrollo radicular (Sah et al. 2016), nuestro estudio pretende discernir si la deficiencia de ABA desencadena una respuesta específica a la combinación de salinidad y altas temperaturas, y si esta especificidad se refleja a nivel iónico y metabolómico en las raíces del tomate. Por ejemplo, Yang et al. (2012) observaron que la combinación de toxicidad por aluminio y sequía causaba un efecto más severo que los estresores individuales debido a la reducción de los niveles de ABA inducida por ambos estreses en las raíces de plantas de judía (Yang et al. 2012b).

En nuestro estudio, el efecto perjudicial de los estreses individuales o combinados dependió del parámetro analizado. Por ejemplo, el estrés por altas temperaturas, tanto aplicado como estrés simple como en combinación con la salinidad, produjo la mayor reducción del peso seco radicular. Sin embargo, las concentraciones de iones variaron en función del estrés aplicado. Los cambios iónicos variaron entre nuestros grupos de plantas (WT, *flc*⁻, y *flc*⁺) y bajo diferentes condiciones de estrés (control, salinidad, altas temperaturas, y salinidad + altas temperaturas). La deficiencia de ABA provocó alteraciones en los niveles de Na⁺/K⁺, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, Cu, Mn, Zn, Mo, B, P, Ca⁺², S y Fe en al menos dos de las condiciones estudiadas. La reducción de la relación Na⁺/K⁺ debido a la deficiencia de ABA estaba probablemente relacionada con el papel del ABA en la tolerancia al estrés por salinidad (Tuteja 2007). La unión de ABA a su receptor PYR/PYL/RCAR desencadena una señal que regula la expresión de transportadores de K⁺, Cl⁻ y Na⁺ en *Arabidopsis* bajo estrés por salinidad, y su deficiencia puede causar desequilibrios iónicos (Shi and Zhu 2002; Wang et al. 2013). Del mismo modo, los niveles de Ca⁺² disminuyeron en las raíces de tomate bajo deficiencia de ABA y salinidad. Liu et al. (2022) demostraron que bajo niveles óptimos de ABA, la concentración de Ca⁺² aumenta en plantas expuestas a algunos estreses (Liu et al. 2022b), apoyando nuestros

hallazgos. Además, la deficiencia de ABA también provocó aumentos en los niveles de Mo, Cu, Mn, Zn, B, P, S, Fe y NO_3^- en al menos dos de los tratamientos estudiados. Estudios previos han demostrado que el ABA ayuda a reducir los niveles de estos iones en condiciones de toxicidad. En nuestros experimentos, la deficiencia de ABA podría estar directamente relacionada con los elevados niveles de estos iones en las raíces (Cao et al. 2014; Lei et al. 2014; Peñarrubia et al. 2015; Harris and Ondzighi-Assoume 2017; Fang Zhu et al. 2018; Song et al. 2019; Chen et al. 2023; Liu et al. 2023d), por lo que podría existir una relación del ABA con la regulación de la concentración de estos iones en raíces.

Sin embargo, la regulación iónica dependiente de ABA también dependió de la condición de estrés aplicada, y la deficiencia de ABA no siempre aumentó significativamente los niveles de estos iones. Por ejemplo, los niveles de SO_4^{2-} aumentaron en condiciones de altas temperaturas, pero disminuyeron bajo salinidad y estrés por salinidad + altas temperaturas, lo que confirma aún más el papel específico del ABA según el tipo de estrés al que se enfrenta la planta. Por último, los niveles de Mg^{2+} no parecen depender de los niveles de ABA o de los tratamientos estudiados, ya que no se encontraron diferencias entre los grupos de plantas bajo un tratamiento específico o entre los tratamientos de un mismo grupo de plantas. Chen et al. (2006) demostraron previamente que la aplicación de ABA en soluciones hidropónicas no alteraba los niveles de Mg^{2+} en las raíces de arroz (Chen et al. 2006), apoyando nuestros resultados. Varios iones aumentaron su concentración en las raíces debido a las altas temperaturas, pero solo Zn, P y Fe aumentaron de forma consistente en todos los grupos de plantas bajo condiciones de altas temperaturas o estrés combinado. Estudios previos han demostrado la relación entre la temperatura y las concentraciones de estos iones en semillas de *Chenopodium quinoa* y hojas de *Cymodocea nodosa* (Tovar et al. 2022; Tsioli et al. 2022), lo que podría apoyar nuestras conclusiones.

Hasta la fecha, no se han realizado estudios metabolómicos no dirigidos en raíces de tomate deficientes en ABA bajo la combinación de los estreses salinidad y altas temperaturas. Nuestra investigación es novedosa al revelar cómo cambia el perfil metabólico en plantas deficientes en ABA bajo condiciones control, salinidad, altas temperaturas y la combinación de ambos. El análisis metabolómico demostró la

influencia de los tres factores: grupo de plantas (niveles de ABA), tratamiento y su interacción. Los tres factores influyeron en el perfil metabólico de la raíz del tomate, aunque el 47% de las diferencias no pudieron explicarse únicamente por estos factores, lo que sugiere que otros factores desconocidos también podrían desempeñar un papel importante en esta regulación. Los metabolitos más afectados por los factores estudiados incluyeron fenilpropanoides, terpenoides y compuestos que contienen nitrógeno, todos ellos asociados con las respuestas de la planta al estrés y los niveles de ABA, lo que explicaría los resultados significativos encontrados en nuestro estudio (Ferrandino and Lovisolo 2014; Jia et al. 2022; Muhammad Aslam et al. 2022).

Además, en el modelo *flc-*, se observó que la combinación de salinidad + altas temperaturas compartía más DAMs con el estrés por altas temperaturas que con el estrés por salinidad. Así, las altas temperaturas tuvieron un mayor impacto en los cambios metabólicos bajo estrés combinado en raíces deficientes en ABA. En el capítulo anterior ya demostramos resultados similares en hojas de tomate (Pardo-Hernández et al. 2024b). Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior y los de este capítulo, se demuestra que el metabolismo primario y secundario, así como la regulación hormonal en plantas bajo salinidad + altas temperaturas, no pueden deducirse de la suma de las respuestas metabólicas a estresores individuales (Pardo-Hernández et al. 2024b).

En particular, las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, cofactores y GAs se incrementaron en las raíces *flc-* en condiciones de altas temperaturas y en condiciones combinadas de salinidad + altas temperaturas. Sin embargo, en las raíces *flc-* bajo condiciones de salinidad, estos dos grupos mostraron una reducción en la concentración de metabolitos en comparación con las plantas WT bajo condiciones control. Jia et al. (2022) observaron un aumento de compuestos fenilpropanoides en raíces de tomate tras 24 horas de tratamiento con NaCl 200 mM (Jia et al. 2022). Nuestro grupo de investigación también demostró que una aplicación de 80 mM de NaCl durante 15 días resultó en la acumulación de fenilpropanoides, específicamente ácidos hidroxicinámicos, debido a la sobreexpresión de genes implicados en esta vía (PAL, C4H, 4CL y C3H), mientras que la síntesis de flavonoles era inhibida (Martinez et al. 2016). Por lo tanto, la regulación a la baja de la biosíntesis de fenilpropanoides observada en

nuestros mutantes *flc*- se debe probablemente a la deficiencia de ABA, lo que indica que el ABA está implicado en la regulación de los genes responsables de la síntesis de fenilpropanoides bajo estrés por salinidad.

Por otro lado, los niveles de GAs exhibieron una respuesta dependiente del tratamiento. Las GAs actúan como antagonistas del ABA en varios procesos de desarrollo de las plantas, incluyendo la maduración, latencia y germinación de semillas, iniciación de raíces, elongación de hipocótilos y tallos, y transición floral (Shu et al. 2018; Singh and Roychoudhury 2023). En los últimos años, también se ha demostrado que las GAs desempeñan un papel en la tolerancia al estrés abiótico, aunque en menor medida si comparamos con el ABA (Shu et al. 2018; Singh and Roychoudhury 2023). Nuestros resultados muestran que en condiciones de altas temperaturas y deficiencia de ABA, las concentraciones de GAs fueron mayores. Varios estudios han demostrado que, en condiciones adversas, los niveles de ABA aumentan y ello conduce a una respuesta al estrés mediada por ABA y a la activación de FTs como ABI o proteínas como SOM. Algunos de estos FTs y proteínas se han relacionado previamente con la sobreexpresión de enzimas que inactivan las GAs (Shu et al. 2016; Skubacz et al. 2016; Magome and Kamiya 2018). Nuestros resultados sugieren que la deficiencia de ABA puede estar relacionada con la activación de la biosíntesis de GAs, lo que confirmaría la relación antagónica entre los FTs que controlan la síntesis de GAs y ABA. Estas observaciones solo se encontraron en mutantes *flc*- bajo estrés por altas temperaturas y condiciones combinadas de salinidad + altas temperaturas, lo que indicaría una interacción reguladora específica entre ABA, los FTs que regulan GA y las condiciones de estrés aplicadas.

También se observó un enriquecimiento general de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y metabolitos de la estructura celular en las raíces de plantas deficientes en ABA, posiblemente debido al papel del ABA en la regulación de la fusión de vesículas de fosfolípidos en las membranas, lo que podría influir directamente en los tipos de fosfolípidos y ácidos grasos acumulados (Huo et al. 2020; Akhiyarova et al. 2021).

Finalmente, en las raíces de las plantas *flc*-, se detectó una regulación a la baja de los compuestos nitrogenados independientemente del tratamiento, en comparación con las

raíces WT en condiciones control. Sin embargo, en el capítulo anterior de esta tesis se observó que los compuestos nitrogenados aumentaban en las hojas de las plantas sometidas a las mismas condiciones (Pardo-Hernández et al. 2024b). Esto sugiere que la deficiencia de ABA podría estar provocando un mayor transporte de compuestos nitrogenados desde las raíces hacia las partes aéreas de la planta, lo que explicaría su acumulación en las hojas. En resumen, el ABA parece desempeñar un papel clave en la regulación del transporte de compuestos nitrogenados entre las raíces y las partes aéreas.

4.2 La aplicación de ABA no recupera los niveles iónicos y metabólicos en raíces de plantas ABA deficientes bajo condiciones de estrés simple o combinado

En principio, una aplicación exógena de ABA a plantas deficientes en esta hormona debería conducir a la recuperación del fenotipo silvestre. Sin embargo, la concentración endógena de ABA depende de la etapa de desarrollo de la planta, del tipo de órgano y de factores externos como el estrés, lo que dificulta la determinación de la concentración exógena de ABA ideal para inducir esta recuperación fenotípica en plantas deficientes en ABA (Chen et al. 2020). Los resultados observados en los capítulos anteriores (Pardo-Hernández et al. 2024a, 2024b), junto con los hallazgos de otros autores (Ramachandran et al. 2022; Ramasamy et al. 2022), mostraron que una aplicación de ABA exógeno de 100 μM proporcionó la mejor recuperación fenotípica en nuestros mutantes *flc* bajo condiciones control.

Sin embargo, esta aplicación foliar exógena de 100 μM de ABA a las plantas *flc*- (*flc*+) no dio lugar a una recuperación completa del peso seco radicular y provocó cambios significativos en los niveles iónicos y metabólicos de las raíces en comparación con las plantas WT. La aplicación de ABA en plantas *flc* (*flc*+) no restauró los niveles de iones como Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Cu, Mn, Fe, Mo, P, Zn y S encontrados en WT bajo al menos uno de los cuatro tratamientos estudiados. Por lo tanto, la aplicación de ABA exógeno no produce el mismo efecto que los niveles de ABA endógeno y depende de las condiciones ambientales aplicadas. Además, las concentraciones de Na^+/K^+ , Cu, Mn, Fe, Mo, P, Zn y S

no pudieron restablecerse a los niveles silvestres cuando las plantas se sometieron a la combinación de estreses, posiblemente debido a la severidad de esta combinación sobre las raíces del tomate, pudiendo ser el impacto de la combinación de estreses más perjudicial para las plantas que los estreses individuales (Pascual et al. 2022). En nuestro estudio, las plantas deficientes en ABA, que ya presentan un estado metabólicamente alterado, mostraron una mayor vulnerabilidad a estos estreses. Como resultado, estas plantas estuvieron más afectadas por la combinación de estreses que por los estreses aplicados individualmente.

El estudio metabolómico comparando plantas *flc+* bajo los cuatro tratamientos con plantas WT bajo condiciones control (modelo *flc+*) reveló diferencias significativas entre estos grupos de plantas. La aplicación de ABA no produjo un aumento de los niveles de fenilpropanoides o compuestos nitrogenados en la mayoría de los tratamientos, lo que indica que esta aplicación fue insuficiente para recuperar estos niveles o que inducía una reprogramación metabólica diferencial. Sin embargo, si se observó un aumento de fenilpropanoides al comparar el modelo *flc-* con el modelo *flc+* en condiciones de estrés por altas temperaturas y estrés combinado. Esto se debe probablemente a la especificidad de cada tipo de estrés aplicado.

Por el contrario, se observó que los metabolitos relacionados con la biosíntesis de terpenoides disminuyeron en las raíces de los mutantes *flc* cuando se aplicó ABA exógeno, aunque no se observó una recuperación total. El ABA exógeno puede estar implicado en la regulación de los niveles de diferentes tipos de terpenoides (Mansouri and Asrar 2012), explicando las modificaciones en la cantidad y tipo de terpenoides acumulados en nuestro estudio.

Tampoco se produjo una recuperación en la síntesis de hormonas, ya que algunas rutas, como la biosíntesis de SA, mostraron gran similitud entre los modelos *flc-* y *flc+*. Estudios similares han demostrado que la aplicación de ABA exógeno conduce a una recuperación significativa, pero nunca completa (Sharipova et al. 2016; Veselov et al. 2018).

4.3 Acumulación o deficiencia de iones en la raíz asociados a la deficiencia de ABA y al perfil metabolómico

El análisis de correlación establecido entre los datos ionómicos y metabolómicos señaló que la deficiencia y la acumulación de iones observada bajo la deficiencia de ABA estaban relacionadas con el perfil del metaboloma de las raíces obtenido bajo cada una de las condiciones específicas de estrés.

La acumulación de Na^+ y el aumento de la relación Na^+/K^+ observados en estos tratamientos que incluían NaCl (salinidad y salinidad + altas temperaturas) estaban relacionados con la disminución o la acumulación de algunas moléculas pequeñas específicas. Por otro lado, en estos tratamientos en los que el Na^+ y la relación Na^+/K^+ eran menores (control y altas temperaturas), algunos compuestos relacionados con los aminoácidos disminuyeron, mientras que los relacionados con el metabolismo de los terpenoides aumentaron. Vickers et al. (2009) propusieron que la protección de las plantas contra el estrés abiótico está mediada a través de reacciones directas de los terpenoides con oxidantes, ya sea intracelularmente o en la interfaz/capa límite hoja-atmósfera (Vickers et al. 2009), induciendo una estabilización de la membrana y una alteración indirecta de la señalización de ROS (Blande et al. 2014; Sewelam et al. 2016). Asimismo, la acumulación de micronutrientes esenciales como Fe y Zn se asoció principalmente con una regulación a la baja en metabolismos específicos de fenilpropanoides y terpenoides y a la regulación al alza de otros metabolitos relacionados con la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos, flavonoides o ribonucleósidos, entre otros.

En la mayoría de los casos, la deficiencia de ABA no estaba directamente relacionada con los cambios observados en las relaciones encontradas entre el metaboloma y el ionoma en raíces de tomate. Las correlaciones encontradas entre el metaboloma y el ionoma fueron específicas para cada condición de estrés y también dependieron de si el estrés se aplicó de forma individual o en combinación. Nuestros resultados muestran marcadores metabolómicos relacionados con los efectos de la deficiencia o acumulación de ciertos iones dependiendo del estrés aplicado, lo que podría abrir nuevas rutas para entender la relación entre metaboloma e ionoma en raíces de plantas.

5. Conclusiones

En conclusión, este estudio pone de manifiesto la importancia de los niveles endógenos de ABA en las raíces para la adaptación de las plantas a la combinación de los estreses salinidad y altas temperaturas, ya que las altas temperaturas tuvieron un impacto predominante cuando se aplicaban en combinación con la salinidad en plantas deficientes en ABA.

Se encontró que la deficiencia de ABA afectaba significativamente la homeostasis iónica y el perfil metabólico de las plantas, alterando la relación Na^+/K^+ y la acumulación de otros iones y compuestos esenciales. Además, la deficiencia de ABA y los estreses aplicados indujeron cambios significativos en la biosíntesis de metabolitos clave, como los fenilpropanoides, lo que sugieren una dependencia de los niveles de ABA y una especificidad basada en el estrés aplicado. Sumado a esto, el ABA parece regular el transporte de compuestos nitrogenados entre raíces y hojas, lo que tiene implicaciones para la gestión de la respuesta al estrés. También, las correlaciones encontradas entre el metaboloma y el ionoma fueron específicas para cada condición de estrés y dependieron de si el estrés se aplicó individualmente o en combinación.

Por otro lado, la aplicación de ABA en plantas deficientes en ABA resultó en una recuperación parcial y produjo cambios dependientes de las condiciones ambientales aplicadas.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de seguir investigando cómo interactúan el ABA y otros mecanismos moleculares implicados en las respuestas de las plantas bajo múltiples condiciones de estrés para mejorar la tolerancia de los cultivos a escenarios ambientales desafiantes.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV

1. Introducción

La combinación de déficit hídrico y estrés por salinidad en plantas de tomate representa uno de los principales factores que afectan su productividad, provocando significativas pérdidas económicas para los agricultores del sur de España (Soto-García et al. 2013; Pagán et al. 2022). Estos eventos también son frecuentes en muchas regiones agrícolas del mundo, y cuando ocurren simultáneamente, las pérdidas económicas para los agricultores y la industria del tomate pueden ser catastróficas. Suárez et al. (2019) demostraron que los efectos de estreses combinados (salinidad + déficit hídrico) no pueden predecirse con exactitud basándose en la cuantificación del estrés por salinidad en ausencia del estrés hídrico y del estrés hídrico en ausencia del estrés por salinidad en portainjertos de uva (Suarez et al. 2019). Asimismo, el estrés por salinidad y sequía afecta negativamente a múltiples aspectos de las plántulas de tomate, incluyendo el crecimiento, la fotosíntesis, el contenido de nutrientes y los niveles de clorofila, particularmente cuando se combinan ambos estresores (Ors et al. 2021). Por tanto, el hecho de que la respuesta de las plantas a estreses combinados sea específica y no sea simplemente la suma de las respuestas a estreses individuales ha motivado que cada vez más investigadores se enfoquen en estudiar la combinación de estreses (Rivero et al. 2022; Pardo-Hernández et al. 2024a).

En este capítulo nos centraremos en cómo una deficiencia de ABA puede interferir en el metaboloma y la calidad del fruto en plantas de tomate crecidas bajo la combinación de estreses en condiciones de campo reales, lo que ayudará a entender mejor el papel de esta fitohormona.

A nivel nutricional y agronómico, comprender los metabolitos predominantes en los productos vegetales reviste gran importancia. En consecuencia, numerosos estudios profundizan en el análisis del perfil metabólico en los frutos y sus propiedades saludables. En los frutos del tomate, los compuestos principales son fibras, azúcares, aminoácidos y minerales. Igualmente, los frutos del tomate albergan compuestos beneficiosos para la salud humana, como flavonoides, fenilpropanoides, carotenoides,

tocoferoles y vitamina C (de Vos et al. 2011). Muchos de estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, por lo que son potencialmente beneficiosos para la salud humana (Martínez-Valverde et al. 2002; García-Valverde et al. 2013). Además, los tomates contienen varios miles de otros metabolitos secundarios, muchos de los cuales permanecen sin identificar. Las condiciones ambientales influyen significativamente en el nivel de compuestos fenólicos; por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de fenoles y flavonoides aumentan en respuesta a la salinidad en plantas de tomate y de pepino (Abdel-Farid et al. 2020). Un estudio metabolómico también reveló que las altas temperaturas influía en la acumulación de lípidos, triglicéridos y compuestos volátiles en frutos de tomate (Almeida et al. 2021).

Así, el objetivo de este capítulo fue investigar el papel del ABA en las respuestas fisiológicas y metabólicas de los frutos de tomate bajo estreses simples (salinidad y déficit hídrico) o bajo la combinación de ambos (salinidad + déficit hídrico) utilizando para ello mutantes de una variedad de tomate comercial (Rheinlands Ruhm) deficientes en ABA (*flc*, Solyc07g066480). Nuestros resultados revelaron una respuesta metabólica específica de los frutos de tomate en función de la estación de crecimiento estudiada, el estrés aplicado y el nivel celular de ABA endógeno. En consecuencia, nuestro estudio identificó marcadores moleculares cruciales, tanto en frutos cultivados bajo control, como para cada condición de estrés aplicada, que podrían servir como una herramienta rápida para los científicos que trabajan en el campo del estrés abiótico y/o los mecanismos de señalización del ABA. Explorar más a fondo los resultados de este estudio podría revelar nuevas rutas y compuestos involucrados en la señalización del ABA. Esto no solo destacaría su importancia en el rendimiento y la calidad del fruto bajo estrés abiótico (ya sea individual o combinado), sino que también podría identificar compuestos con beneficios potenciales para la salud humana.

2. Material y metodología específica

En este último capítulo de la tesis los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de invernadero en las plantas *Solanum lycopersicum* cv Rheinlands Ruhm de tipo silvestres (WT) y mutantes deficientes en ABA (*flc*) bajo condiciones control (C), estrés salino (S), déficit hídrico (WD) y la combinación de salinidad + déficit hídrico

(S+WD). Además, este mismo experimento se realizó dos veces en dos épocas del año diferentes: en la estación fría (octubre 2022-febrero 2023) y la estación cálida (marzo 2023- julio 2023). La descripción de los genotipos empleados, así como la germinación de semillas, el crecimiento de las plantas y los tratamientos a los que éstas fueron sometidas han sido detallados en los apartados “1. Plantas de tomate”, “4. Germinación de semillas” y “6. Cultivos de plantas de tomate de la variedad Rheinlands Ruhm” de la sección “Materiales y métodos”.

A nivel fenotípico, se determinaron el número de racimos de frutos por planta, el número de frutos por racimo y el peso de los frutos rojos, tal y como se detalla en el subapartado “7.3 Medición de otros parámetros biométricos” de la sección “Materiales y métodos”.

Por otro lado, en los frutos maduros recolectados de estas plantas se llevó a cabo un análisis metabolómico no dirigido, el cual queda detallado en el apartado “13. Análisis metabolómico no dirigido” de la sección “Materiales y métodos”. En este capítulo IV, los DAMs fueron obtenidos a partir de dos modelos. Un modelo comparó los frutos de las plantas WT bajo estrés (salinidad, estrés hídrico y salinidad + estrés hídrico) frente a los frutos de las plantas WT bajo condiciones control, mientras que el otro modelo comparó los frutos de los mutantes *flc* bajo estrés frente a los frutos de los mutantes *flc* bajo condiciones control. Puesto que el mismo experimento se llevó a cabo en dos estaciones del año diferentes, para estos análisis se obtuvieron un total de cuatro modelos: WT verano, WT invierno, *flc* verano, *flc* invierno, cada uno de ellos comparado con sus respectivas plantas control.

3. Resultados

3.1 Los niveles de ABA y la estación de crecimiento afectaron al grado de impacto de los estreses simples o combinados en el rendimiento de frutos de tomate

Como se ha indicado anteriormente, la presente investigación se llevó a cabo en frutos maduros de plantas WT y de mutantes *flc* en un invernadero durante dos estaciones diferentes: (i) otoño-invierno, con muestreo de frutos de tomate en invierno;

y (ii) primavera-verano, con muestreo de frutos de tomate en verano. En ambos experimentos se aplicaron cuatro tratamientos: control, salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico (**Figura 43**).

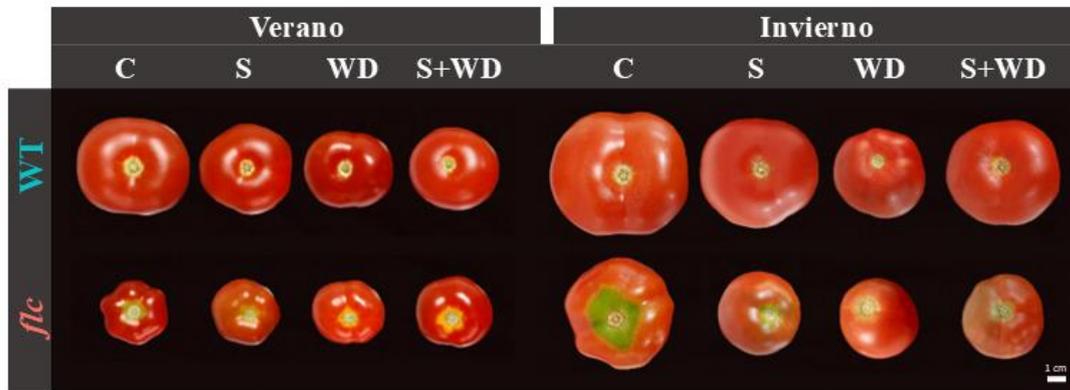


Figura 43. Fotografías en el momento del muestreo de los tomates de plantas silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo las condiciones control (C), salinidad (S), déficit hídrico (WD), y combinación de salinidad y déficit hídrico (S+WD) en las estaciones de verano e invierno.

Las estaciones se diferenciaron principalmente por la temperatura, la humedad y la intensidad luminosa, observándose niveles más bajos de estos factores en otoño-invierno en comparación con primavera-verano (**Figura S9**). Los parámetros fisiológicos medidos (número de racimos por planta, número de frutos por racimo y rendimiento del tomate) no mostraron diferencias entre las estaciones fría y cálida en plantas WT bajo condiciones control. Sin embargo, cuando las plantas se sometieron a la combinación de salinidad + déficit hídrico, se observó una disminución significativa en el peso de los frutos de invierno en comparación con los frutos de verano, lo que explica la importancia de la estación de crecimiento y cosecha para estas plantas cuando crecen en condiciones de combinación de estreses.

El fenotipo de nuestras plantas de tomate varió dependiendo del genotipo estudiado (**Figura 43**). En el experimento de verano, el número de racimos en los mutantes *flc* disminuyó significativamente en comparación con WT bajo estrés salino (**Figura 44A**). Sin embargo, en el experimento de invierno, los mutantes *flc* cultivados bajo cualquier condición (control, estrés único o combinación de estreses) mostraron un número de racimos significativamente menor en comparación con las plantas WT (**Figura 44B**). También hubo un descenso significativo en el número de frutos por racimo en los

mutantes *flc* bajo condiciones control (tanto invierno como verano) y bajo estrés salino (solo invierno) en comparación con las plantas WT bajo condiciones control y estrés salino, respectivamente (**Figuras 44C y 44D**). Finalmente, el peso del fruto fue significativamente menor en las plantas *flc* en comparación con las plantas WT bajo todas las condiciones aplicadas en verano e invierno, excepto bajo estrés único (estrés salino y déficit hídrico) en invierno (**Figuras 44E y 44F**). En resumen, nuestros resultados indicaron la existencia de una relación negativa entre la deficiencia de ABA y los parámetros medidos (número de racimos/planta, número de frutos/racimo y peso del fruto), influida además por la estación de crecimiento.

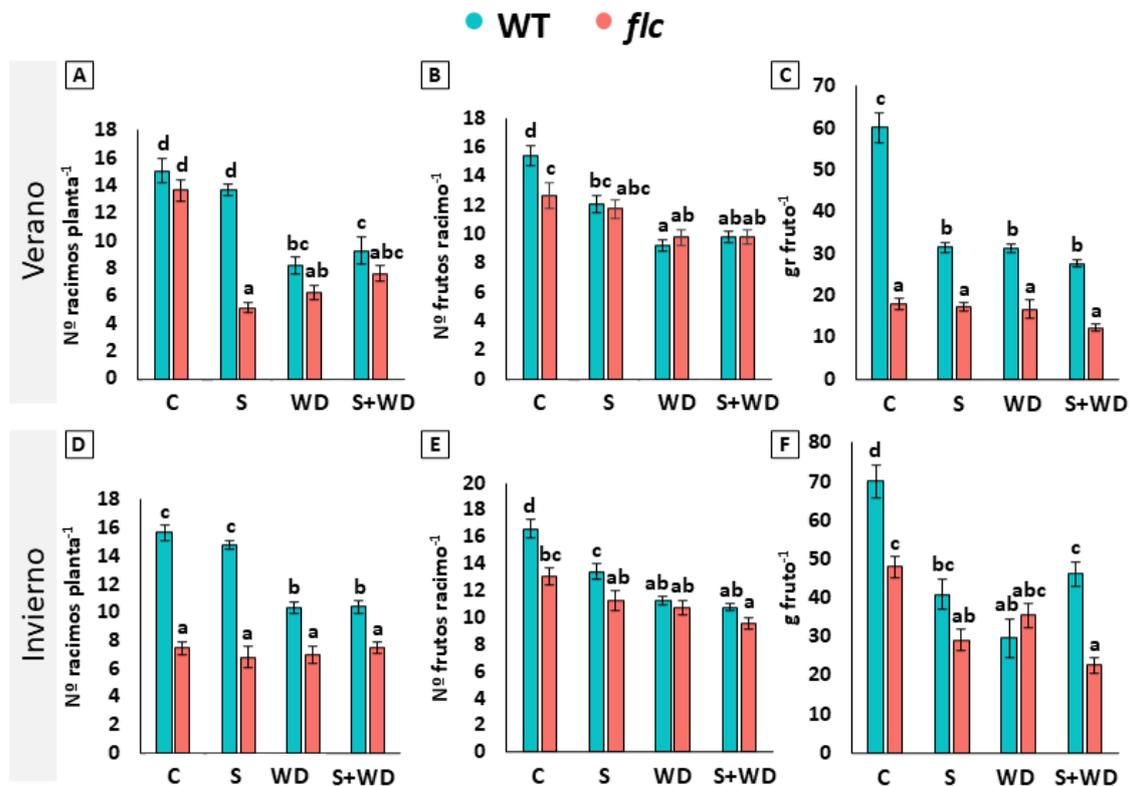


Figura 44. Caracterización fisiológica en plantas de tomate silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo control (C), salinidad (S), déficit hídrico (WD), y combinación de salinidad y déficit hídrico (S+WD) en las estaciones de verano e invierno. Nº de racimos por planta en verano (A) y en invierno (B). Nº de frutos por racimo en verano (C) y en invierno (D). Peso de los frutos de tomate en verano (E) y en invierno (F). Los valores representan las medias \pm EE (N \geq 6). Las letras dentro de cada panel son significativamente diferentes a $p < 0,05$ según la prueba de Tukey.

Por otra parte, estos parámetros estudiados también se vieron influenciados por el estrés aplicado a la planta, tanto en invierno como en verano. En este sentido, las plantas WT experimentaron una disminución significativa en el número de racimos/planta debido a la aplicación de los tratamientos déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico en comparación con las plantas WT en condiciones control (**Figuras 44A y 44B**). Además, independientemente de la estación, en las plantas WT todos los estreses produjeron una disminución significativa del número de frutos por racimo y del peso de los frutos en comparación con la condición control (**Figuras 44C, 44D, 44E y 44F**).

Sin embargo, estas diferencias observadas en plantas WT no pudieron extrapolarse a plantas deficientes en ABA (*flc*). Mientras que en las plantas WT no hubo diferencias en el número de racimos por planta ni en el número de frutos por racimo entre invierno y verano, en las plantas *flc* se observaron diferencias significativas entre las dos estaciones. Además, los estreses déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico produjeron una reducción en el número de frutos por racimo en comparación con las plantas *flc* en condiciones control (**Figuras 44A y 44C**). Sin embargo, en los mutantes *flc* el estrés no produjo diferencias en el peso del fruto recolectado en verano en comparación con las condiciones control (**Figura 44E**). Por el contrario, en las plantas muestreadas en invierno, la aplicación de cualquier estrés estudiado disminuyó significativamente el número de frutos por racimo y el peso del fruto (**Figuras 44D y 44F**). Finalmente, las plantas *flc* crecidas durante el periodo de invierno no mostraron cambios significativos en el número de racimos por planta entre tratamientos (**Figura 44B**).

En resumen, el número de racimos por planta, el número de frutos por racimo y el peso del fruto se vieron influidos por los niveles endógenos de ABA, el estrés aplicado y la estación de crecimiento de las plantas de tomate.

3.2 Efecto de los niveles de ABA, el estrés y la estación de crecimiento en el metabolismo del fruto del tomate

Para mejorar nuestra comprensión de cómo una deficiencia de ABA podría afectar al perfil metabólico de los frutos de tomate bajo estreses simples o su combinación, se llevó a cabo un análisis metabólico no dirigido en estos tejidos. Este análisis nos

permitió anotar positivamente 4964 compuestos entre frutos de plantas WT y *flc* muestreados en verano y 5805 compuestos entre frutos de plantas WT y *flc* muestreados en invierno, con 4310 compuestos comunes a verano e invierno.

El análisis HCA (**Figura S10**) reflejó claras diferencias entre genotipos (plantas WT y *flc*) tanto en invierno como en verano. Sin embargo, el HCA no mostró separaciones claras entre los diferentes tratamientos (control, salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico). Por ello, se optó por el análisis supervisado AMOPLS-DA para evaluar cuál de los tres factores (genotipo, tratamiento y genotipo x tratamiento) era el más importante para explicar las diferencias observadas (**Figura 45 y Tabla S10**). Nuestros resultados indicaron que el tratamiento fue el factor más crucial para reflejar las diferencias a nivel de metabolitos (RSS 13% en verano y 14% en invierno, **Tabla S10**). Además, el genotipo y el genotipo x tratamiento fueron estadísticamente significativos, con un RSS del 8% y del 9% en verano, respectivamente, y con un RSS del 11% y del 13% en invierno, respectivamente (**Tabla S10**). Sin embargo, casi el 71% en verano y el 62% en invierno de las diferencias metabólicas observadas no pudieron ser explicadas por estos tres factores (Residuales, **Tabla S10**). Basándonos en el AMOPLS-DA, se utilizó un enfoque VIP₂ para identificar los marcadores más relevantes en la discriminación, seleccionando aquellos con una puntuación VIP₂ superior a 4 para cada factor (**Tablas S11 y S12**). El factor genotipo tenía VIPs₂ que se concentraban principalmente en las superclases: lípidos, terpenoides y fenilpropanoides. El factor tratamiento tenía VIPs₂ mayormente asociados a los fenilpropanoides. Por último, el factor genotipo x tratamiento presentaba VIPs₂ pertenecientes principalmente a los lípidos.

Desde el principio, nuestro estudio se dividió en dos grupos: muestras de verano y muestras de invierno. Dado que el tratamiento resultó ser el factor más discriminante en el análisis AMOPLS-DA, se idearon dos modelos de estudio para facilitar la diferenciación entre los genotipos empleados donde se compararon: (i) frutos de tomate WT bajo estrés frente a frutos WT bajo condiciones control y (ii) frutos de *flc* bajo estrés frente a frutos *flc* bajo condiciones control. Por lo tanto, estudiamos cuatro modelos: WT

verano, WT invierno, *flc* verano, *flc* invierno y cada uno de ellos comparado con sus respectivas plantas control.

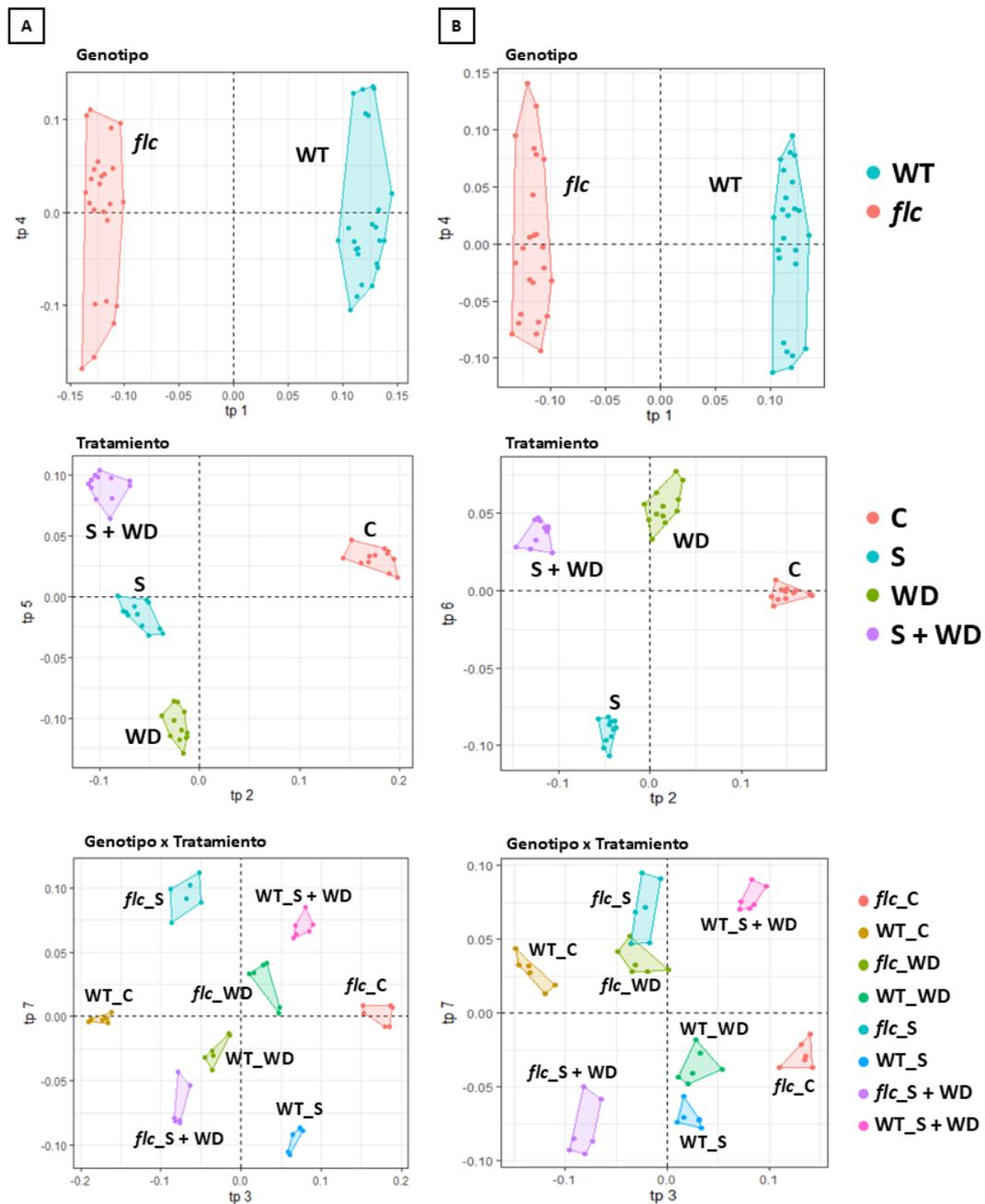


Figura 45. Gráficos del análisis metabólico AMOPLS-DA asociado a tres factores (genotipo, tratamiento y genotipo x tratamiento) en plantas de tomate silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo control (C), salinidad (S), déficit hídrico (WD) y combinación de salinidad + déficit hídrico (S+WD) en las estaciones verano (A) e invierno (B).

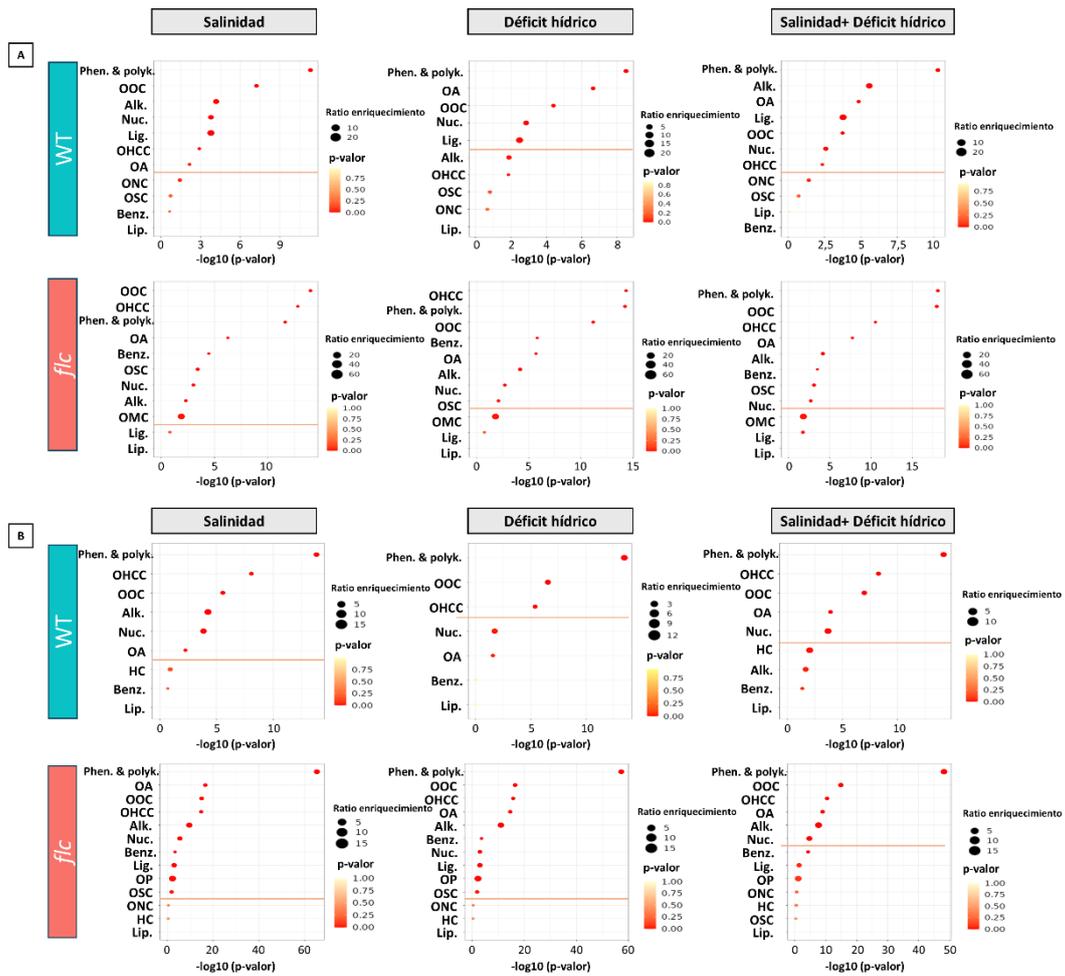


Figura 46. Gráficos de puntos tipo ORA del análisis de enriquecimiento metabólico en plantas de tomate silvestre (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo control, salinidad, déficit hídrico, y combinación de salinidad + déficit hídrico en las estaciones de verano (A) e invierno (B). Representa el estudio de cuatro modelos: WT verano, WT invierno, *flc* verano, *flc* invierno y cada uno de ellos comparado con sus respectivas plantas control. El tamaño de los círculos corresponde al ratio de enriquecimiento y el color de los círculos representa el p-valor. Las líneas naranjas representan el límite FDR. Phen & polyk: fenilpropanoides y policétidos, OOC: compuestos orgánicos oxigenados, OHC: compuestos organoheterocíclicos; Nuc.: nucleósidos, nucleótidos y análogos; OA: ácidos orgánicos y derivados, Lig.: lignanos, neolignanos y compuestos relacionados, OSC: compuestos organosulfurados, Benz.: bencenoides, Alk: alcaloides y derivados, OP: organofosfatos, ONC: compuestos orgánicos nitrogenados, HC: hidrocarburos, Lip: lípidos y moléculas relacionadas con lípidos, OMC: compuestos organometálicos.

El análisis ANOVA ($p < 0,05$) identificó 226 (WT verano), 404 (*flc* verano), 252 (WT invierno) y 791 (*flc* invierno) DAMs en plantas bajo salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico. Estos DAMs se utilizaron para realizar un estudio de enriquecimiento utilizando MetaboAnalyst (Xia et al. 2009) (**Figura 46**). Las superclases de fenilpropanoides y policétidos, compuestos orgánicos de oxígeno y compuestos organoheterocíclicos se enriquecieron significativamente en plantas estresadas, independientemente de la estación y el genotipo. Además, los nucleósidos, nucleótidos y análogos y los ácidos orgánicos y derivados se enriquecieron bajo todas las condiciones de estrés aplicadas, con la excepción de plantas WT bajo déficit hídrico de invierno, donde estos compuestos no fueron estadísticamente significativos. Curiosamente, los lignanos se enriquecieron significativamente en los frutos WT estivales sometidos a estrés, pero no en los frutos de WT de invierno sometidos a estrés. Por otro lado, las superclases de bencenoides y compuestos organosulfurados se enriquecieron en los frutos *flc* bajo los estreses simples (estrés salino y déficit hídrico) en ambas estaciones y, en las plantas *flc* sometidas a la combinación de estrés salino + déficit hídrico en la estación cálida. Por lo tanto, el enriquecimiento significativo de las superclases de bencenoides y compuestos organosulfurados parece estar relacionado con la deficiencia de ABA en frutos de tomate.

Mediante el análisis Volcano, se obtuvieron los Log_2FC de los DAMs ($p < 0,05$), lo que permitió determinar si las superclases estaban enriquecidas de manera positiva o negativa. Un mapa de calor (**Figura 47**) ilustra las superclases negativamente enriquecidas en color azul y las positivamente enriquecidas en color verde. La superclase de fenilpropanoides y policétidos aumentó en frutos WT bajo estrés salino y bajo la combinación de salinidad + déficit hídrico, independientemente de la estación de muestreo. Sin embargo, en los frutos de plantas mutantes *flc* los fenilpropanoides y policétidos aumentaron bajo todas las condiciones de estrés aplicadas en verano y disminuyeron bajo las mismas condiciones en las muestras de invierno. Además, se observaron diferencias notables en la regulación al alza de los ácidos orgánicos en los frutos WT en comparación con la regulación a la baja de los ácidos orgánicos observada en los frutos *flc* en las muestras recolectadas en el experimento de verano. Asimismo, la regulación a la baja de los ácidos orgánicos fue más pronunciada en los frutos *flc*

muestreados en invierno que en los muestreados en verano. Por lo tanto, parece existir una correlación negativa entre la acumulación de ácidos orgánicos debida a la deficiencia de ABA y la estación invernal. En cuanto a la superclase de los bencenoides, también fueron regulados al alza en verano y a la baja en los frutos de invierno de *flc* bajo estrés único. Esto sugiere una dependencia en la acumulación de bencenoides en función del de la estación del año seleccionada para el crecimiento de las plantas *flc* bajo estrés salino o déficit hídrico.

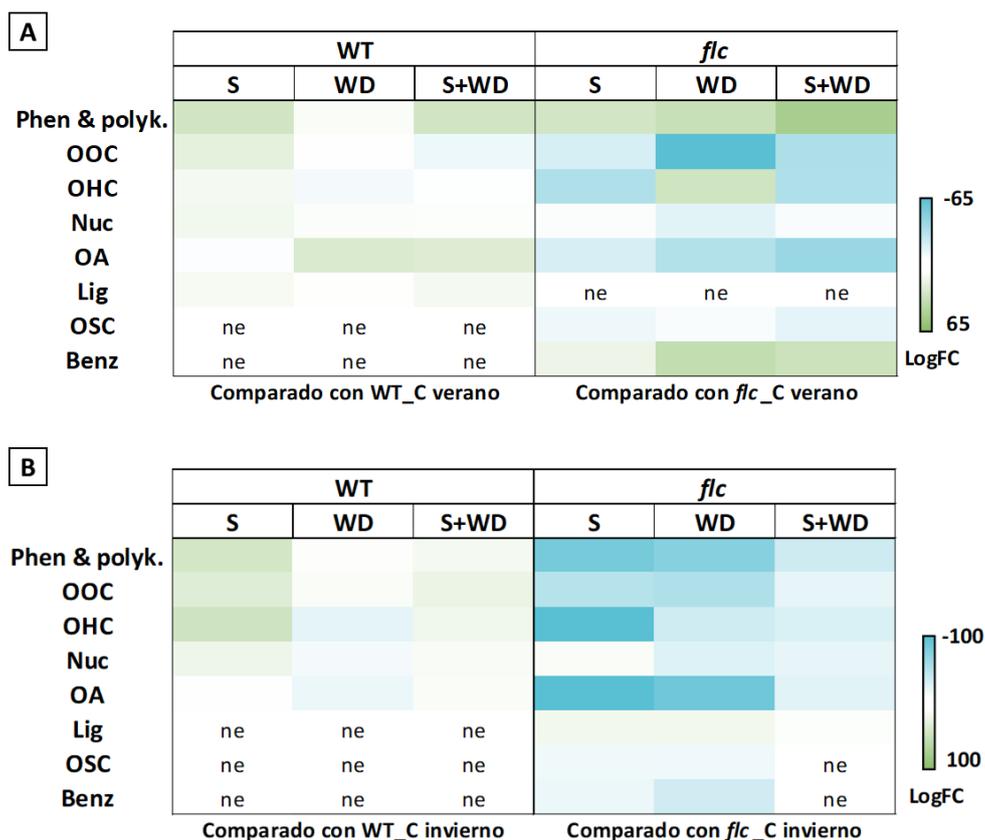


Figura 47. Mapa de calor del análisis metabolómico en plantas de tomate silvestre (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo salinidad (S), déficit hídrico (WD), y combinación de salinidad y déficit hídrico (S + WD) en las estaciones de verano (A) e invierno (B). Representa el estudio de cuatro modelos: WT verano, WT invierno, *flc* verano, *flc* invierno y cada uno de ellos comparado con sus respectivas plantas control. Los datos se presentan en Log₂FC. Las superclases negativamente enriquecidas en color azul y las positivamente enriquecidas en color verde. Phen & polyk.: fenilpropanoides y policétidos, OOC: compuestos orgánicos oxigenados, OHC: compuestos organoheterocíclicos, Nuc: nucleósidos, nucleótidos y análogos, OA: ácidos orgánicos y derivados, Lig: lignanos, neolignanos y compuestos relacionados, OSC: compuestos organosulfurados, Benz: bencenoides, ne: clase no enriquecida.

En general, las condiciones de estrés condujeron a una reducción de los metabolitos analizados en frutos de plantas deficientes en ABA, excepto los fenilpropanoides, los policétidos y los bencenoides durante la estación estival. Por el contrario, las condiciones de estrés no produjeron diferencias o provocaron un aumento significativo en las superfamilias de metabolitos analizados en los frutos procedentes de plantas WT.

3.3 Efecto de los niveles de ABA, el estrés y la estación de crecimiento sobre el perfil de los compuestos fenólicos en frutos de tomate

Tras realizar un estudio metabolómico general de nuestras muestras, empleamos un enfoque metabolómico no dirigido centrado en el perfil fenólico, utilizando el conjunto de datos *Phenol-Explorer*. Este análisis permitió la identificación putativa de 184 compuestos entre los frutos WT y *flc* muestreados en verano y 242 compuestos entre los frutos WT y *flc* muestreados en invierno, con 161 compuestos comunes tanto en verano como en invierno (datos publicados en el material suplementario de Pardo-Hernández et al. (2024d)). En términos de subfamilias fenólicas, fueron anotados en frutos rojos de tomate, en verano/invierno respectivamente, 99/139 flavonoides, 22/35 ácidos fenólicos, 16/17 lignanos, 43/46 otros polifenoles, y 3/5 estilbenos. Dentro de la subfamilia de los flavonoides distinguimos entre antocianinas, flavanoles, flavonoles y otros flavonoides (chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, flavonas e isoflavonoides). Los compuestos más representativos de los flavonoides fueron las antocianinas, destacando la cianidina 3-O-soforósido y la cianidina 3-O-sambubiósido 5-O-glucósido. En menor cantidad se encontraron los favonoles quercetina 3-O-rutinósido y quercetina 3-O-xilosil-rutinósido, así como la flavona gardenina B. Entre las demás subfamilias, destacaron el anhidro-secoisolariciresinol y el secoisolariciresinol (lignanos), el hidroxitirosol 4-O-glucósido (otros polifenoles), el cafeoil-glucosa (ácidos fenólicos) y la e-viniferina (estilbenos) (datos publicados en el material suplementario de Pardo-Hernández et al. (2024d)).

Posteriormente, se realizó una semicuantificación de los compuestos fenólicos utilizando patrones de referencia para cada subfamilia (ver subapartado 13.7 de la sección de Material y métodos). Como se ha explicado anteriormente, este estudio

abarca tres variables: estación experimental (verano e invierno), genotipo (WT y *flc*) y tratamiento (control, salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico). Por lo tanto, este estudio se agrupó en: (i) primero en muestras de verano e invierno, (ii), en segundo lugar, por el genotipo y (iii), por último, por el tratamiento. La **Figura 48** muestra un gráfico circular que permite interpretar la proporción de subfamilias de fenoles en función de la estación, el genotipo y el tratamiento.

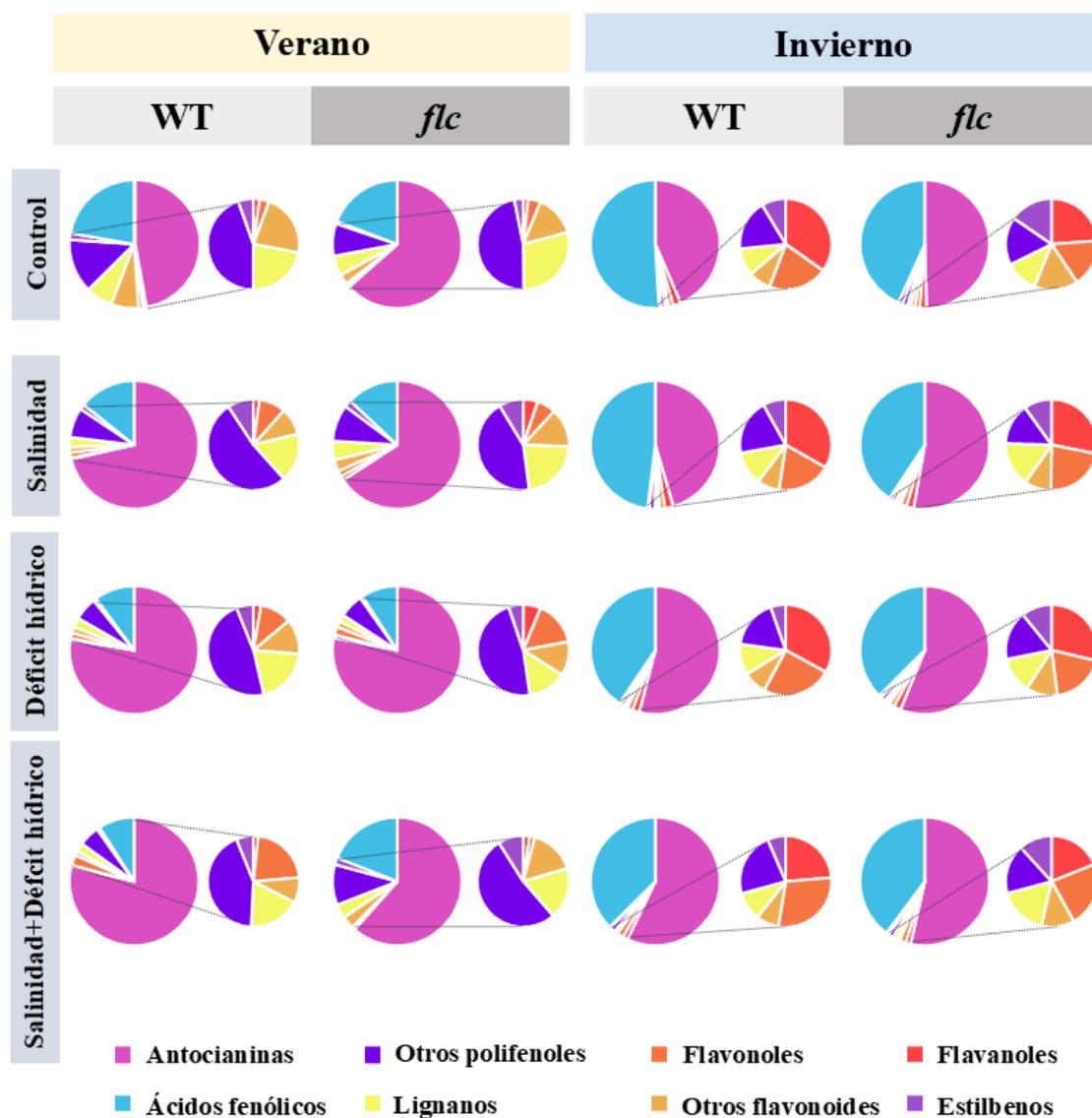


Figura 48. Gráfico circular de la proporción de subfamilias de fenoles en fruto en función de la estación (verano e invierno), el genotipo (WT y *flc*) y el tratamiento (control, salinidad, déficit hídrico, salinidad + déficit hídrico).

En primer lugar, el análisis estadístico reveló diferencias significativas para cada una de las subfamilias de compuestos fenólicos entre el invierno y el verano. La proporción de antocianinas, otros flavonoides, lignanos y otros polifenoles respecto al total de fenoles fue mayor en los frutos muestreados en verano que en los muestreados en invierno. Sin embargo, la proporción de los demás fenoles (flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos) fue mayor en los frutos muestreados en invierno que en los de verano. Por tanto, la proporción de fenoles entre los frutos de invierno y los de verano presentaba notables disparidades (**Figura 48**).

En el caso de los frutos de verano, pudimos demostrar que la deficiencia de ABA (mutante *flc*) provocaba cambios en la cantidad de flavanoles, flavonoles y ácidos fenólicos en las plantas bajo determinados tratamientos (**Figura 48** y **Tabla S13**). La cantidad de flavanoles aumentó en los frutos *flc* bajo déficit hídrico en comparación con los frutos WT bajo el mismo estrés. Además, la cantidad de flavonoles y ácidos fenólicos en los frutos *flc* disminuyó en comparación con los frutos WT, bajo condiciones salinidad + déficit hídrico y déficit hídrico, respectivamente.

Por otro lado, validamos que la deficiencia de ABA en frutos de invierno podía causar cambios en la cantidad de flavonoles, flavonoides, polifenoles, estilbenos y lignanos en plantas bajo ciertos tratamientos (**Figura 48** y **Tabla S13**). Bajo condiciones control, algunos flavonoides aumentaron bajo deficiencia de ABA en comparación con los frutos WT. Los flavonoles disminuyeron bajo condiciones de deficiencia de ABA en comparación con los frutos WT en plantas bajo estrés por déficit hídrico y la combinación de salinidad + déficit hídrico. Algunos polifenoles disminuyeron bajo condiciones de deficiencia de ABA y bajo estrés salino, así como bajo la combinación de salinidad + déficit hídrico en comparación con los frutos WT bajo los mismos estreses. Además, los niveles de lignanos aumentaron en los frutos de *flc* crecidos bajo la combinación de estreses en comparación con los frutos WT bajo las mismas condiciones. Finalmente, los niveles de estilbenos fueron mayores en los frutos *flc* sometidos a condiciones control, salinidad y salinidad + estrés hídrico en comparación con los frutos WT bajo las mismas condiciones. Por tanto, todos los niveles de fenoles, excepto las antocianinas, se vieron afectados por los niveles de ABA en al menos una de las estaciones estudiadas.

Asimismo, nuestros resultados mostraron que las condiciones de estrés provocaron cambios en los niveles de compuestos fenólicos en los frutos en comparación con las condiciones control (**Figura 48** y **Tabla S13**). Independientemente de la estación (verano e invierno), tanto las antocianinas como los flavonoles aumentaron significativamente en los frutos WT bajo la combinación de estreses en comparación con los frutos WT bajo condiciones control. También independientemente de la estación, los frutos *flc* disminuyeron su contenido en estilbenos debido al estrés salino. Finalmente, el contenido en lignanos de los frutos no se vio significativamente afectado bajo los diferentes tratamientos aplicados (control, salinidad, déficit hídrico y salinidad + déficit hídrico) dentro de cada uno de los genotipos estudiados. En resumen, a excepción de los lignanos, los niveles de los diferentes grupos de fenoles en los frutos dependieron del tipo de estrés aplicado a las plantas.

Los datos recogidos mediante este análisis de semicuantificación fueron extensos y difíciles de interpretar debido a la implicación de tres variables. Por lo tanto, y con el objetivo de simplificar y clarificar estos resultados, se emplearon dos análisis AMOPLS-DA con los datos de verano y los de invierno, respectivamente. Estos análisis pretendían determinar la influencia del genotipo, los tratamientos y la putativa interacción de ambos (genotipo x tratamiento) en la biosíntesis de compuestos fenólicos (**Figura 49** y **Tabla S14**). En ambos análisis, el tratamiento fue el factor más relevante (RSS: 15% en verano y 16% en invierno; **Tabla S14**), seguido del genotipo (RSS: 10% en verano y 15% en invierno; **Tabla S14**). Sin embargo, la interacción no se consideró significativa (RSR p-valor: 0,24 en verano y 0,23 en invierno, **Tabla S14**). Asimismo, el RSS del 66% en verano y del 56% en invierno elucidó cambios atribuibles a factores no estudiados aquí (**Tabla S14**). De este estudio se puede inferir que la combinación de estreses produjo un perfil fenólico más similar al del estrés salino que al del estrés por déficit hídrico en verano y, curiosamente, en invierno se observó la tendencia opuesta (**Figura 49**). Las distintas condiciones de luz, humedad y temperatura entre las estaciones de verano e invierno probablemente podrían explicar estas diferencias.

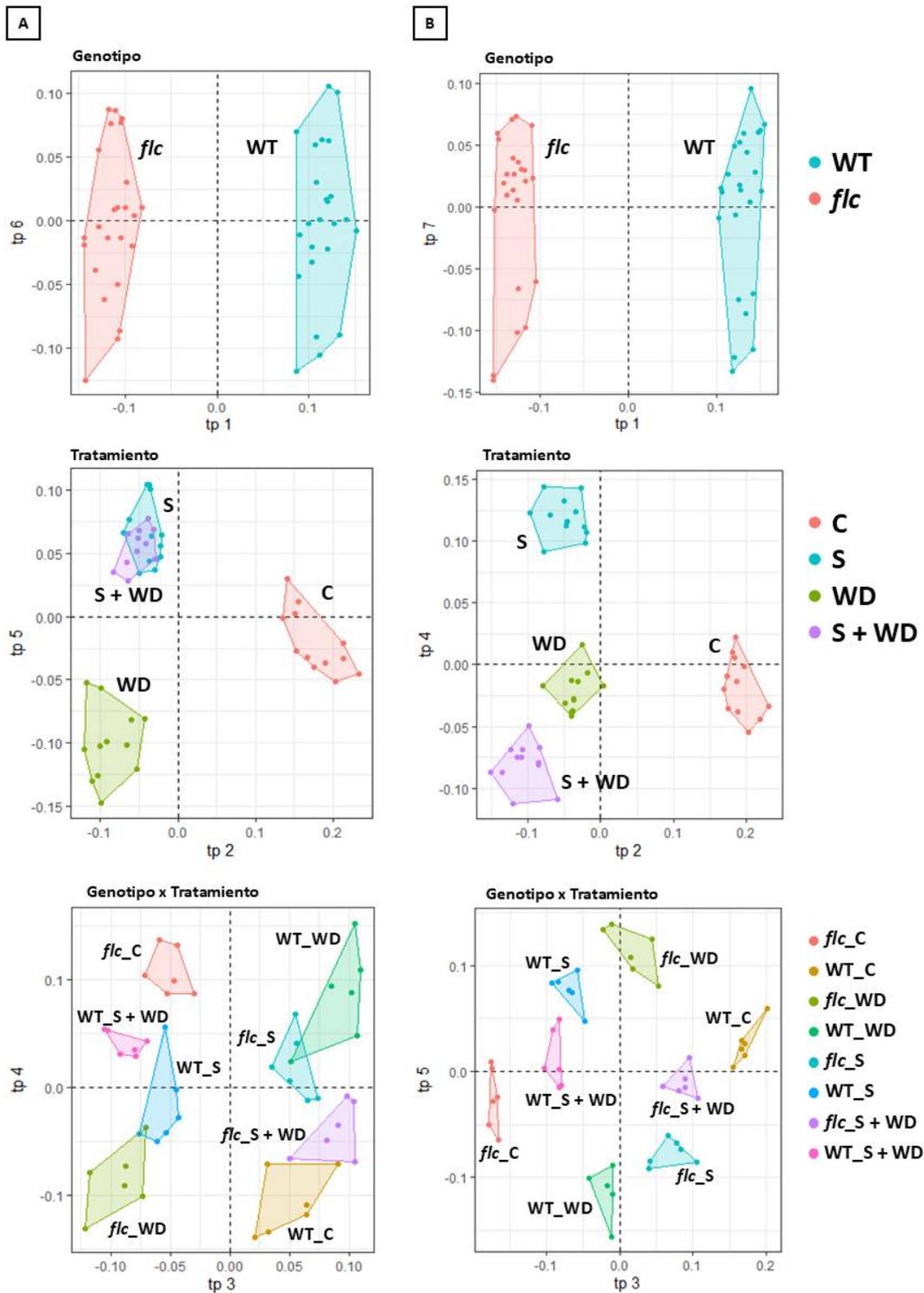


Figura 49. Gráficas del análisis AMOPLS-DA correspondientes a los componentes predictivos (tp) del análisis fenológico en relación con tres factores: genotipo, tratamiento y genotipo x tratamiento en plantas de tomate tipo silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo condiciones control (C), salinidad (S), déficit hídrico (WD) y combinación de salinidad + déficit hídrico (S + WD) en las estaciones verano (A) e invierno (B).

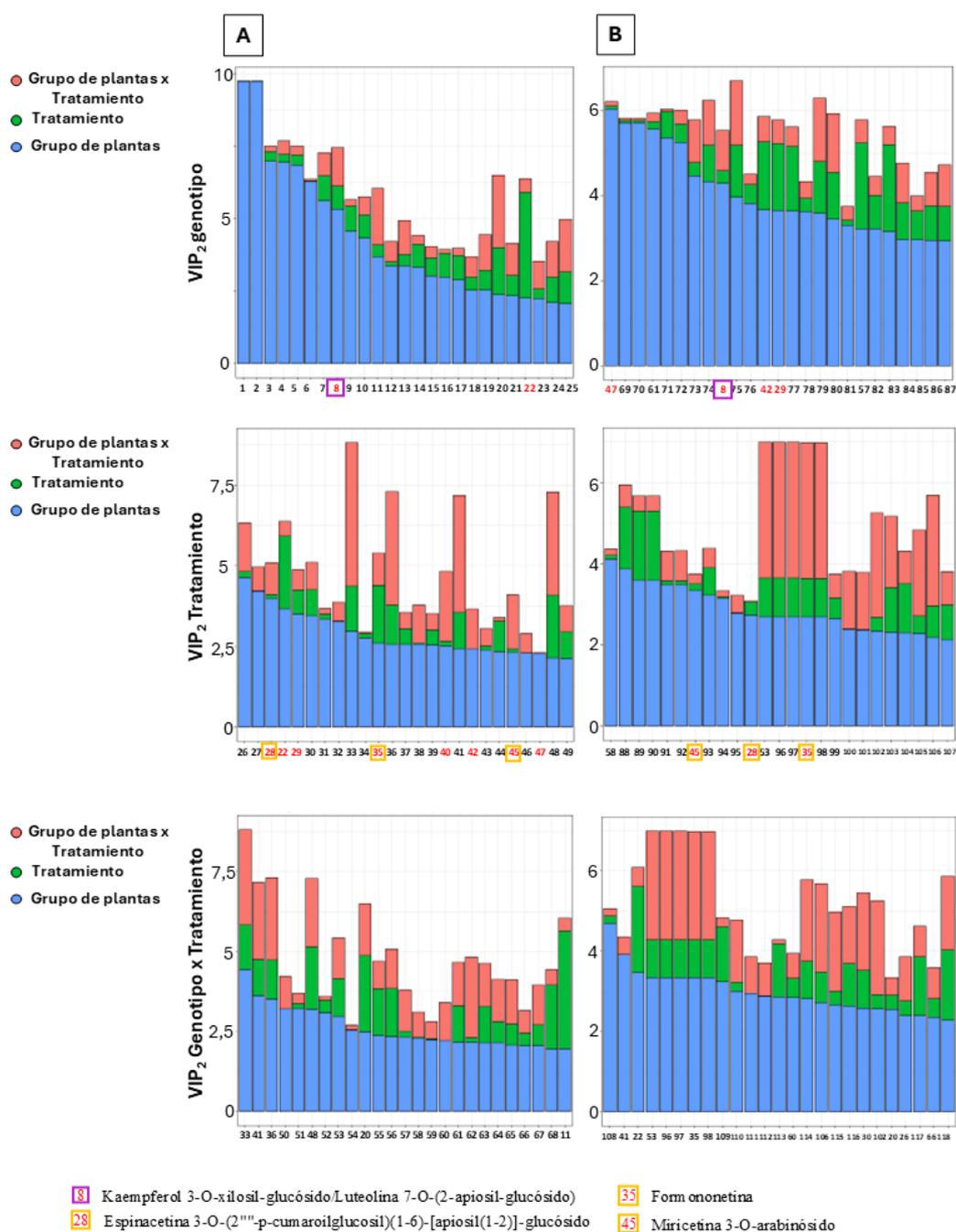


Figura 50. Los gráficos de Importancia Variable en la Proyección (VIP_2) muestran los fenoles clave atribuidos a la discriminación debida al genotipo, tratamiento y genotipo x tratamiento del análisis AMOPLS-DA en verano (A) y en invierno (B).

Además, el enfoque VIP_2 empleado para identificar los marcadores mayormente implicados en dicha discriminación (puntuación $VIP_2 > 1,9$) para cada factor mostró que los VIP_2 del factor genotipo pertenecían principalmente a otros polifenoles (verano) y

antocianinas (invierno) (8/25 y 8/25 VIPs₂, respectivamente; **Tablas S15 y S16 y Figura 50**). Adicionalmente, kaempferol 3-O-xilosil-glucósido/ Luteolina 7-O-(2-apiosil-glucósido) (flavonol) fue un VIP₂ común tanto en verano como en invierno, característico del genotipo WT, y por tanto dependiente de niveles óptimos de ABA. Por otro lado, los VIPs₂ del factor de tratamiento primario pertenecían principalmente a ácidos fenólicos (verano) y flavonoles (invierno) (7/25 y 8/215 VIPs₂, respectivamente; **Tablas S15 y S16 y Figura 50**). Formononetina (isoflavonoide) y miricetina 3-O-arabinósido (flavonol) fueron VIPs₂, comunes en verano e invierno, característicos del déficit hídrico, y, por tanto, podrían considerarse como un marcador potencial del estrés por déficit hídrico. Finalmente, espinacetina 3-O-(2-p-cumaroilglucosil)(1-6)-[apiosil(1-2)]-glucósido (flavonol) fue un VIP₂ común a verano e invierno bajo condiciones control, y por tanto, podría ser considerado como un posible marcador de frutos no sometidos a estrés.

4. Discusión

En este estudio, se utilizó un enfoque fisiológico y metabólico integrado para desentrañar la reprogramación metabólica subyacente de plantas de tomate WT y los mutantes *flc* en respuesta a condiciones de control, estrés salino, déficit hídrico, y estrés salino y déficit hídrico combinados durante dos periodos de estudio (primavera-verano, o estación cálida, y otoño-invierno, o estación fría) en condiciones de invernadero.

4.1 Efecto de la estación y el estrés en plantas de tomate silvestre cultivadas en invernadero

Las plantas están sometidas a diferentes estreses a lo largo del año, y sus respuestas a estos estreses dependen del tipo de estrés y de la estación en la que se cultivan, ya que estos factores pueden interactuar para producir diferentes respuestas. Multitud de frutas son cosechadas en una época específica del año porque su productividad es mayor (Tran et al. 2017). Las tomateras son plantas anuales que suelen germinar a principios de primavera y cuyos frutos se cosechan entre dos y cuatro meses después, dependiendo de la variedad. Sin embargo, la sobrepoblación y la gran demanda mundial de frutos de tomate, tanto frescos como procesados, están empujando a los agricultores a cultivarlos en temporadas menos productivas (Kaloizoumis et al. 2021).

El tomate es cultivado en invernaderos del sureste español y de muchas regiones del mundo, ya que su manejo agronómico se hace más sencillo. Sin embargo, estos cultivos, aunque en cierta medida estén aislados de adversidades climatológicas extremas, están sometidos igualmente a variaciones de humedad, temperatura y luz asociadas con la estación anual. En nuestros experimentos se comprobó que la productividad entre las estaciones fría y cálida no mostró diferencias bajo condiciones control. Sin embargo, cuando las plantas se sometieron a la combinación de salinidad + déficit hídrico, se produjo una reducción significativa del peso de los frutos de invierno en comparación con los de verano. Por tanto, los estreses aplicados no tienen el mismo efecto en la estación cálida que en la fría y dependen de otros factores ambientales asociados a la estacionalidad, como la temperatura, la humedad relativa y la intensidad luminosa, entre otros. Además, tanto el estrés simple como el combinado produjeron efectos negativos sobre algunos parámetros relacionados con la productividad de las plantas. Así, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de estudiar el estrés salino, el déficit hídrico y su combinación tanto en la estación fría como en la cálida, ya que la combinación de varios factores ambientales da lugar a una respuesta específica que no se corresponde con la suma de las respuestas a los factores estudiados por separado (Zandalinas et al. 2024).

En nuestro caso particular, las diferencias en la intensidad lumínica observadas entre las estaciones de invierno y verano, así como las diferencias en la temperatura y humedad ambientales, provocaron cambios significativos en los parámetros estudiados, enfatizando la importancia de estudiar los estreses abióticos como una ecuación multifactorial, donde más elementos conllevan a una respuesta metabólica más compleja (Sen and Mukherji 2009; Masetti et al. 2017).

Además, para imitar fielmente las condiciones de salinidad del agua de riego y de déficit hídrico típicas de la zona donde se realizó el estudio, los estreses se aplicaron de forma continua. Con esto, los resultados obtenidos pueden ser fácilmente transferibles al sector de la zona. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos estreses aplicados durante un periodo prolongado podrían estar generando una respuesta de estrés crónico y, en consecuencia, podrían estar enmascarando una respuesta al estrés agudo, que

podría ser diferente. Teniendo presente esta premisa, los hallazgos obtenidos en nuestros experimentos se detallan a continuación.

Las condiciones de estrés estudiadas produjeron un enriquecimiento, principalmente positivo, de fenilpropanoides y policétidos, compuestos orgánicos oxigenados y compuestos organoheterocíclicos. En general, el estrés también produjo un enriquecimiento positivo de nucleótidos y análogos y ácidos orgánicos. Además, las plantas WT cultivadas en la estación cálida mostraron un enriquecimiento de lignanos, mientras que las plantas cultivadas en invierno no mostraron un enriquecimiento significativo de estos compuestos. Como explican Chaudhary et al. (2018), nuestros frutos de tomate acumularon una gran cantidad de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, seguidos de ácidos fenólicos (Chaudhary et al. 2018).

Mediante un estudio semicuantitativo de los compuestos fenólicos, se observaron diferencias entre las estaciones y los estreses aplicados. Las cantidades de otros flavonoides, lignanos y otros polifenoles fueron mayores en los frutos de verano, mientras que las cantidades de flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos fueron mayores en los frutos de invierno. Además, las antocianinas fueron más abundantes en los frutos de invierno. Sin embargo, comparando la proporción de antocianinas con el total de fenoles, los frutos de tomate de verano tenían una mayor proporción de antocianinas. Así pues, existían claras diferencias entre los frutos de tomate cultivados en la estación cálida y en la fría. Ciaccheri et al. (2018) ya demostraron que la acumulación de ciertos compuestos, como el licopeno, son altamente dependientes de la estacionalidad (Ciaccheri et al. 2018).

Los compuestos fenólicos han sido objeto de estudio en este capítulo, ya que desempeñan un papel importante en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, y contribuyen a la tolerancia al estrés a través de varios mecanismos, como la detoxificación de ROS, el soporte estructural y las vías de señalización (Sharma et al. 2019). Independientemente de nuestras estaciones de muestreo, las antocianinas y los flavonoles aumentaron significativamente cuando las plantas estuvieron sometidas a la combinación de estreses, mientras que estos compuestos no aumentaron significativamente en condiciones de estrés simple. Por lo tanto, el aumento significativo de antocianinas y flavonoles está asociado a la combinación de salinidad + déficit hídrico

tanto en la estación fría como en la cálida, lo que sugiere que la intensidad luminosa, la humedad ambiental y la temperatura dependientes de la estación de crecimiento de las plantas cultivadas en invernadero no parecen afectar a la acumulación de estos compuestos.

Por otro lado, considerando todos los grupos de compuestos extraídos de la base de datos FoodDB (<https://foodb.ca/>), se observó que los lignanos se enriquecían en condiciones de estrés en los frutos de tomate de verano. Sin embargo, tras el estudio semicuantitativo de los lignanos, se verificó que la cantidad de lignanos no era significativamente diferente entre tratamientos. Por lo tanto, el estrés aplicado no parece afectar al aumento o la disminución de lignanos en nuestros experimentos. Hamade et al. (2021) demostraron que las perturbaciones de lignanos no afectan a la respuesta al estrés que conduce a la resistencia al estrés osmótico en plantas de lino (*Linum usitatissimum*), un modelo de planta utilizado para los estudios de biosíntesis de lignanos (Hamade et al. 2021). Sin embargo, otros estudios han mostrado una relación entre el aumento de lignanos y las respuestas a estreses abióticos y bióticos en semillas y plantas (Šamec et al. 2021). Esto demuestra que son necesarios más estudios para confirmar si la concentración de lignanos en plantas es dependientes de las condiciones ambientales.

Finalmente, mediante un estudio AMOPLS-DA, fue posible identificar tres marcadores metabólicos para ambas estaciones. La formononetina (isoflavonoide) y la miricetina 3-O-arabinósido (flavonol) fueron los marcadores metabólicos obtenidos bajo estrés hídrico, mientras que la espinacetina 3-O-(2''-p-cumaroilglucosil)(1-6)-[apiosil(1-2)]-glucósido (flavonol) fue un marcador de condiciones control, destacando la importancia de los flavonoides como marcadores de condiciones de estrés en frutos de tomate.

4.2 Efecto de la deficiencia de ABA en la respuesta de los frutos al estrés múltiple

El ABA es una fitohormona implicada en el desarrollo, el crecimiento y la tolerancia al estrés de las plantas (Dar et al. 2017; Brookbank et al. 2021). En nuestro estudio, el

uso de los mutantes *flc* nos permitió observar si una deficiencia de ABA estaba asociada a una respuesta específica al estrés simple o combinado y si esta respuesta también dependía de la estacionalidad del cultivo. Nitsch et al. (2012) observaron que la deficiencia de ABA reduce el tamaño del fruto debido a un menor tamaño celular total en plantas crecidas bajo condiciones control (Nitsch et al. 2012). En nuestros experimentos, a nivel fisiológico, se observó una disminución significativa en el número de racimos por planta bajo condiciones de salinidad, así como el número de frutos por racimo bajo condiciones control, y el peso fresco del fruto bajo todas las condiciones estudiadas (control, salinidad, estrés hídrico y salinidad + estrés hídrico) en plantas mutantes *flc* en comparación con plantas WT bajo las mismas condiciones durante la estación cálida. Además, en la estación fría, se observó una disminución significativa en el número de racimos por planta bajo los tratamientos control, estrés hídrico y salinidad + estrés hídrico y el número de frutos bajo salinidad, en comparación con las plantas WT bajo las mismas condiciones. Sin embargo, en la estación fría, solo se produjeron cambios significativos en el peso del fruto de las plantas crecidas bajo condiciones control y salinidad + déficit hídrico. Por lo tanto, las variaciones en la humedad, la intensidad luminosa y la temperatura entre estaciones parecen interactuar con las condiciones control, los estreses simples y los estreses combinados, produciendo una respuesta específica a esta interacción multifactorial. Por último, se demostró que el ABA puede o no estar implicado en la regulación del número de racimos por planta, el número de frutos por racimo y el peso fresco del fruto en función de las condiciones ambientales.

Por otra parte, el perfil metabólico en los mutantes *flc* mostró diferencias significativas en comparación con el de las plantas WT. Mediante un estudio de enriquecimiento, se observó una disminución generalizada de las superclases de compuestos en las plantas *flc*, especialmente durante la estación invernal, en comparación con las plantas de tipo silvestre. Por lo tanto, parece existir una relación entre la disminución de la actividad metabólica y la deficiencia de ABA, posiblemente debido a la implicación del ABA en numerosos procesos biológicos (Brookbank et al. 2021).

Por el contrario, los mutantes *flc* bajo ciertas condiciones (estrés combinado en la estación fría y estrés simple en ambas estaciones) mostraron un enriquecimiento de las superclases de bencenoides y compuestos organosulfurados, lo que no se observó en las plantas WT. Es conocido que ABA está interconectado con la regulación y asimilación de S (Hasanuzzaman et al. 2018), lo que explicaría el enriquecimiento de compuestos organosulfurados en plantas deficientes en ABA. Sin embargo, no existen datos previos que relacionen el enriquecimiento de bencenoides con ABA. Asimismo, cabe destacar que fue identificado el bencenoide 2-Metoxi-9-fenil-1H-fenaleno-1 como un marcador característico de los mutantes *flc* en condiciones de estrés y, además, éste estaba regulado a la baja en verano y al alza en invierno en comparación con sus condiciones control. Duque et al. (2013) ya demostraron que la luz podía afectar a su concentración (Duque et al. 2013), lo que explicaría nuestra observación de una menor concentración de estos compuestos durante la estación con más luz (estación cálida).

Debido a la implicación de los fenoles en la respuesta de la planta al estrés, se realizó un análisis semicuantitativo de los compuestos fenólicos en el fruto. Nuestro estudio mostró que la síntesis de compuestos fenólicos en los frutos de *flc* era significativamente diferente en comparación con las plantas WT. En los frutos de plantas *flc* cultivadas en la estación cálida, se observó que la deficiencia de ABA produjo cambios significativos en la cantidad de flavanoles, flavonoles y ácidos fenólicos en al menos uno de los tratamientos estudiados. Sin embargo, en frutos de plantas *flc* cultivadas en la estación fría, la deficiencia de ABA produjo cambios en las cantidades de flavonoles, otros flavonoides, otros polifenoles, estilbenos y lignanos en al menos uno de los tratamientos estudiados. Por lo tanto, a excepción de las antocianinas, todos los niveles de fenoles se vieron significativamente afectados por los niveles de ABA en al menos una de las condiciones ambientales estudiadas. Es cierto que el aumento de antocianinas se ha relacionado con el ABA en hojas de tomate sometidos a bajas temperaturas (Xu et al. 2023b) y que la aplicación de ABA también promueve la acumulación de antocianinas en frutos principalmente no climatéricos y, en menor medida, en frutos climatéricos de plantas como manzana y *Lycium* (Kadomura-Ishikawa et al. 2015; Oh et al. 2018; Li et al. 2019b; Wang et al. 2019a; Bennett et al. 2023). No obstante, no hay muchos estudios que utilicen mutantes deficientes en ABA, y, tras una revisión de la literatura disponible,

tampoco se han encontrado estudios que relacionen el ABA con el aumento de antocianinas en frutos de tomate. Asimismo, existe una gran diversidad fisiológica de antocianinas que afectan al proceso de maduración y provoca variaciones en la pigmentación del fruto. Además, no todas las plantas de tomate acumulan la misma cantidad de antocianinas, por ejemplo, Ailsa Craig se considera una variedad no acumuladora de antocianinas, y Sun Black es una variedad acumuladora de antocianinas (Borghesi et al. 2016). Por lo tanto, un estudio interesante sería la cuantificación específica de antocianinas en general y de cada antocianina en particular para comprender mejor la relación entre antocianinas y ABA en tomate.

Por último, mediante el estudio VIP₂ fue identificado el flavonol kaempferol 3-O-xilosil-glucósido / Luteolina 7-O-(2-apiosil-glucósido) como un marcador metabólico específico para las plantas WT, pero no para las plantas *flc*, lo que indica que la acumulación de este metabolito depende de la presencia de niveles mínimos de ABA en los frutos.

5. Conclusiones

En síntesis, los compuestos metabólicos de los frutos de tomate varían enormemente en función de los niveles endógenos de ABA y de los factores ambientales (estación del año y estreses). Las plantas presentaron un perfil metabólico muy diferente en función de la época de cultivo (variaciones de radiación, humedad y temperatura) y del tratamiento aplicado a las plantas (control, salinidad, estrés hídrico, salinidad + estrés hídrico). Asimismo, nuestros resultados mostraron una clara implicación del metabolismo de fenilpropanoides en la respuesta del tomate a estreses simples o combinados, produciéndose los principales cambios en mutantes deficientes en ABA bajo la combinación de estreses, lo que enfatiza la importancia de nuestros estudios.

Además, se observó una interacción entre los efectos de la radiación, la humedad y la temperatura, el tratamiento de estrés al que se sometieron las plantas y los niveles de ABA endógeno, que en última instancia afectan a los mecanismos de señalización en respuesta a las restricciones ambientales, dando lugar a una respuesta metabólica muy específica.

Dado que nuestros estudios se centraron en la última etapa de maduración de los frutos de tomate, sería interesante relacionar estos resultados con el perfil metabólico encontrado en etapas de desarrollo anteriores y comprobar si los marcadores metabólicos relacionados con el estrés identificados permanecen inalterados. Futuros estudios de silenciamiento génico o de sobreexpresión génica son necesarios para confirmar el papel de estos metabolitos específicos en la resiliencia a múltiples estreses.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En conjunto, esta tesis doctoral, estructurada en cuatro capítulos, aporta nuevos conocimientos sobre la adaptación de las plantas a entornos adversos mediante vías de señalización tanto dependientes como independientes de ABA. La identificación de ciertos genes, metabolitos e iones podría ser clave para el desarrollo de estrategias biotecnológicas dirigidas a mejorar la tolerancia de los cultivos a condiciones extremas de estrés ambiental, especialmente en el contexto de cambio climático y seguridad alimentaria global. En este sentido, las principales conclusiones derivadas de nuestra investigación fueron las siguientes:

1. Las hojas y las raíces de plantas de tomate bajo la combinación de los estreses salinidad y altas temperaturas produjeron una respuesta específica y compleja que no fue deducible del estudio de la respuesta a los estreses aplicados por separado.
2. La deficiencia de ABA produjo una respuesta fisiológica y transcriptómica específica en las plantas de tomate que conlleva al enriquecimiento de rutas relacionadas con la transcripción y de proteínas quinasas específicas. Los factores de transcripción SIMYB50 y SIMYB86, relacionados con la biosíntesis de flavonoides, fueron identificados como marcadores específicos de la respuesta a la combinación de salinidad y altas temperaturas e independientes de la regulación por ABA.
3. La integración de datos multiómicos de hojas reveló que, aunque los análisis transcriptómicos y metabolómicos indicaban una mayor similitud entre la respuesta a la combinación de estreses y el tratamiento de altas temperaturas, la evaluación conjunta con la ionómica y la fenómica mostró que la respuesta global de la planta se asemejaba más a la respuesta que la planta generaba bajo el tratamiento de salinidad.
4. El estudio multiómico nos permitió comprender los mecanismos de respuesta al estrés en conjunto y, por tanto, entender las interacciones entre las ómicas y encontrar marcadores fisiológicos y moleculares clave.

5. Una deficiencia de ABA en raíces produjo cambios en la homeostasis iónica de los iones Na^+ , K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cu , Mn , Zn , Mo , B , P , Ca^{2+} , S y Fe . Sin embargo, los niveles de Mg^{2+} no dependieron de los niveles de ABA en raíces.
6. La deficiencia de ABA y el estrés produce cambios en los niveles de metabolitos clave implicados en la respuesta oxidativa, como los fenilpropanoides.
7. La aplicación exógena de ABA en plantas deficientes en esta hormona no condujo a la recuperación de la planta, ni a nivel fenotípico ni a nivel metabólico total, pero desencadenó una reprogramación celular con cambios en marcadores específicos debidos a este ABA exógeno.
8. Los frutos maduros de plantas de tomate bajo la combinación de los estreses salinidad y déficit hídrico indujeron una respuesta fisiológica y metabólica específica y compleja que no es deducible del estudio de la respuesta obtenida cuando estos estreses eran aplicados por separado.
9. La concentración de flavonoides, lignanos y otros polifenoles fueron mayores en los frutos de verano, mientras que las cantidades de antocianinas, flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos fueron mayores en los frutos de invierno.
10. Las antocianinas y los flavonoles aumentaron significativamente cuando las plantas estuvieron sometidas a la combinación de estreses salinidad y déficit hídrico, mientras que estos compuestos no aumentaron significativamente bajo condiciones de estrés simple.
11. La deficiencia de ABA bajo ciertas condiciones de estrés (la combinación de los estreses salinidad y déficit hídrico, en la estación fría, y los estreses simples, en ambas estaciones) produjo un enriquecimiento de las superclases de bencenoides y compuestos organosulfurados, que no se observó en las plantas silvestres.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Overall, this PhD thesis, structured in four chapters, provides new insights into plant adaptation to adverse environments through both ABA-dependent and ABA-independent signalling pathways. The identification of certain genes, metabolites and ions could be key for the development of biotechnological strategies aimed at improving crop tolerance to extreme environmental stress conditions, especially in the context of climate change and global food security. In this regard, the main conclusions derived from our experiments were the following:

1. The leaves and the roots of tomato plants under the combination of the stresses salinity and heat produced a specific and complex response that was not deducible from the study of the response to the stresses applied separately.
2. ABA deficiency produced a specific physiological and transcriptomic response in tomato plants leading to the enrichment of transcription-related pathways and specific protein kinases. The transcription factors SIMYB50 and SIMYB86, related to flavonoid biosynthesis, were identified as unequivocal specific markers of the response to the combination of salinity and heat and independent of ABA regulation.
3. Integration of leaf multi-omics data revealed that, although transcriptomic and metabolomic analyses indicated a greater similarity between the response to the combination of stresses and the heat treatment, joint assessment with ionomics and phenomics showed that the overall plant response more closely resembled the response the plant generated under the salinity treatment.
4. The multi-omics study also allowed us to understand the mechanisms of the stress response as a whole and thus to understand the interactions between the omics and to find key physiological and molecular markers.
5. A deficiency of ABA in roots led to changes in ionic homeostasis of the ions Na^+ , K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cu, Mn, Zn, Mo, B, P, Ca^{2+} , S y Fe. However, Mg^{2+} levels did not depend on ABA levels in roots.
6. ABA deficiency and stress leads to changes in the levels of key metabolites involved in the oxidative response, such as phenylpropanoids.

7. Exogenous application of ABA to plants deficient in this hormone did not lead to plant recovery, neither at phenotypic nor at total metabolic level, but triggered cellular reprogramming with changes in specific markers due to this exogenous ABA.
8. Mature fruits of tomato plants under the combination of salinity and water deficit stresses induced a specific and complex physiological and metabolic response that is not deducible from the study of the response obtained when these stresses were applied separately.
9. The concentration of flavonoids, lignans and other polyphenols were higher in summer fruits, while the amounts of anthocyanins, flavanols, flavonols, phenolic acids and stilbenes were higher in winter fruits.
10. Anthocyanins and flavonols increased significantly when plants were subjected to the combination of salinity and water deficit stresses, whereas these compounds did not increase significantly under simple stress conditions.
11. ABA deficiency under certain stress conditions (the combination of salinity and water deficit stresses in the cold season and single stresses in both seasons) resulted in an enrichment of superclasses of benzenoids and organosulphur compounds, which was not observed in wild plants.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Farid IB, Marghany MR, Rowezek MM, Sheded MG (2020) Effect of Salinity Stress on Growth and Metabolomic Profiling of *Cucumis sativus* and *Solanum lycopersicum*. *Plants (Basel)* 9: 1626
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 15: 63–78
- Abrams SR, Reaney MJT, Abrams GD, Mazurek T, Shaw AC, Gusta LV (1989) Ratio of (S)- to (R)-abscisic acid from plant cell cultures supplied with racemic aba. *Phytochemistry* 28: 2885–2889
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF (1968) Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin). *Science* 159: 1493–1493
- Agarwal PK, Jha B (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum* 54: 201–212
- Akhiyarova GR, Ivanov RS, Ivanov II, Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Nuzhnaya T, Ovchinnikova TV, Veselov DS, Kudoyarova GR (2021) Effects of Salinity and Abscisic Acid on Lipid Transfer Protein Accumulation, Suberin Deposition and Hydraulic Conductance in Pea Roots. *Membranes (Basel)* 11: 762
- Albaladejo I, Meco V, Plasencia F, Flores FB, Bolarin MC, 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
- Aleman F, Yazaki J, Lee M, Takahashi Y, Kim AY, Li Z, Kinoshita T, Ecker JR, Schroeder JI (2016) An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 Transcription Factor: A putative link of ABA and JA signaling. *Sci Rep* 6: 28941
- Ali F, Qanmber G, Li F, Wang Z (2022) Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *J Adv Res* 35: 199–214
- Allbed A, Kumar L (2013) Soil Salinity Mapping and Monitoring in Arid and Semi-Arid Regions Using Remote Sensing Technology: A Review. *Advances in Remote Sensing* 2: 373–385
- Almeida J, Perez-Fons L, Fraser PD (2021) A transcriptomic, metabolomic and cellular approach to the physiological adaptation of tomato fruit to high temperature. *Plant, Cell & Environment* 44: 2211–2229
- Álvarez S, Sánchez-Blanco MJ (2015) Comparison of individual and combined effects of salinity and deficit irrigation on physiological, nutritional and ornamental aspects of tolerance in *Callistemon laevis* plants. *J Plant Physiol* 185: 65–74
- Amin I, Rasool S, Mir MA, Wani W, Masoodi KZ, Ahmad P (2021) Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: a molecular approach. *Physiologia Plantarum* 171: 578–594

- Anfang M, Shani E (2021) Transport mechanisms of plant hormones. *Curr Opin Plant Biol* 63: 102055
- Angon PB, Tahjib-Ul-Arif M, Samin SI, Habiba U, Hossain MA, Brestic M (2022) How Do Plants Respond to Combined Drought and Salinity Stress?—A Systematic Review. *Plants* 11: 2884
- Anwar K, Joshi R, Dhankher OP, Singla-Pareek SL, Pareek A (2021) Elucidating the Response of Crop Plants towards Individual, Combined and Sequentially Occurring Abiotic Stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 6119
- Anwar M, Yu W, Yao H, Zhou P, Allan AC, Zeng L (2019a) NtMYB3, an R2R3-MYB from *Narcissus*, Regulates Flavonoid Biosynthesis. *Int J Mol Sci* 20: 5456
- Anwar R, Fatima T, Mattoo AK (2019b) Tomatoes: A Model Crop of Solanaceous Plants. Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science
- Archer D (2016) *The Long Thaw: How Humans Are Changing the Next 100,000 Years of Earth's Climate*. Princeton University Press
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2009) Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *J Pineal Res* 46: 58–63
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2018) Melatonin and its relationship to plant hormones. *Ann Bot* 121: 195–207
- Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51: 163–190
- Astle MC, Rubery PH (1980) A study of abscisic acid uptake by apical and proximal root segments of *Phaseolus coccineus* L. *Planta* 150: 312–320
- Bandurska H, Stroi ski A (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol Plant* 27: 379–386
- Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C (2014) jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15: 293
- Bäurle I (2016) Plant Heat Adaptation: priming in response to heat stress. *F1000Res* 5: F1000 Faculty Rev-694
- Benitez-Alfonso Y, Soanes BK, Zimba S, Sinanaj B, German L, Sharma V, Bohra A, Kolesnikova A, Dunn JA, Martin AC, Rahman MK u, Saati-Santamaría Z, García-Fraile P, Ferreira EA, Frazão LA, Cowling WA, Siddique KHM, Pandey MK, Farooq M, Varshney RK, Chapman MA, Boesch C, Daszkowska-Golec A, Foyer CH (2023) Enhancing climate change resilience in agricultural crops. *Current Biology* 33: R1246–R1261
- Bennett J, Meiyalaghan S, Nguyen HM, Bolding H, Cooney J, Elborough C, Araujo LD, Barrell P, Lin-Wang K, Plunkett BJ, Martin D, Espley RV (2023) Exogenous abscisic acid and sugar induce a cascade of ripening events associated with anthocyanin accumulation in cultured Pinot Noir grape berries. *Front Plant Sci* 14: 1324675

- Bhaduri AM, Fulekar MH (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Rev Environ Sci Biotechnol* 11: 55–69
- Bieto JA, Cubillo MT, Mangas IB, Ormaechea AG (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España
- Bizouerne E, Ly Vu J, Ly Vu B, Diouf I, Bitton F, Causse M, Verdier J, Buitink J, Leprince O (2023) Genetic Variability in Seed Longevity and Germination Traits in a Tomato MAGIC Population in Contrasting Environments. *Plants* 12: 3632
- Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F (2012) Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLOS ONE* 7: e48198
- Blande JD, Holopainen JK, Niinemets Ü (2014) Plant volatiles in polluted atmospheres: stress responses and signal degradation. *Plant, Cell & Environment* 37: 1892–1904
- Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 431–434
- Boccard J, Tonoli D, Strajhar P, Jeanneret F, Odermatt A, Rudaz S (2019) Removal of batch effects using stratified subsampling of metabolomic data for *in vitro* endocrine disruptors screening. *Talanta* 195: 77–86
- Borghesi E, Ferrante A, Gordillo B, Rodríguez-Pulido FJ, Cocetta G, Trivellini A, Mensuali-Sodi A, Malorgio F, Heredia FJ (2016) Comparative physiology during ripening in tomato rich-anthocyanins fruits. *Plant Growth Regul* 80: 207–214
- Boursiac Y, Lérant S, Corratgé-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B (2013) ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science* 18: 325–333
- Brabham DE, Biggs RH (1981) Cis-Trans Photoisomerization of Abscisic Acid. *Photochemistry and Photobiology* 34: 33–37
- Brookbank BP, Patel J, Gazzarrini S, Nambara E (2021) Role of Basal ABA in Plant Growth and Development. *Genes (Basel)* 12: 1936
- Bruzzone S, Ameri P, Briatore L, Mannino E, Basile G, Andraghetti G, Grozio A, Magnone M, Guida L, Scarfi S, Salis A, Damonte G, Sturla L, Nencioni A, Fenoglio D, Fiory F, Miele C, Beguinot F, Ruvolo V, Bormioli M, Colombo G, Maggi D, Murialdo G, Cordera R, De Flora A, Zocchi E (2012) The plant hormone abscisic acid increases in human plasma after hyperglycemia and stimulates glucose consumption by adipocytes and myoblasts. *FASEB J* 26: 1251–1260
- Cai Z, Liu J, Wang H, Yang C, Chen Y, Li Y, Pan S, Dong R, Tang G, Barajas-Lopez J de D, Fujii H, Wang X (2014) GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 9651–9656
- Caine RS, Harrison EL, Sloan J, Flis PM, Fischer S, Khan MS, Nguyen PT, Nguyen LT, Gray JE, Croft H (2023) The influences of stomatal size and density on rice abiotic stress resilience. *New Phytologist* 237: 2180–2195

- Camejo D, Rodríguez P, Angeles Morales M, Miguel Dell'Amico J, Torrecillas A, Alarcón JJ (2005) High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 162: 281–289
- Cao M-J, Wang Z, Zhao Q, Mao J-L, Speiser A, Wirtz M, Hell R, Zhu J-K, Xiang C-B (2014) Sulfate availability affects ABA levels and germination response to ABA and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 77: 604–615
- Capovilla G, Schmid M, Posé D (2015) Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany* 66: 59–69
- Castañeda C, Herrero J, Latorre B (2020) Chapter Six - The vanishing legacy of soil salinity data from irrigated districts: A case study from Spain and a call for action. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 325–355
- Chai Q, Gan Y, Zhao C, Xu H-L, Waskom RM, Niu Y, Siddique KHM (2015) Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agron Sustain Dev* 36: 3
- Chamarro J (1995) Anatomía y fisiología de la planta. *El Cultivo del tomate* . 43–91
- Chang X, Donnelly L, Sun D, Rao J, Reid MS, Jiang C-Z (2014) A *Petunia* Homeodomain-Leucine Zipper Protein, PhHD-Zip, Plays an Important Role in Flower Senescence. *PLOS ONE* 9: e88320
- Chaudhary P, Sharma A, Singh B, Nagpal AK (2018) Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *J Food Sci Technol* 55: 2833–2849
- Chen C-W, Yang Y-W, Lur H-S, Tsai Y-G, Chang M-C (2006) A Novel Function of Abscisic Acid in the Regulation of Rice (*Oryza sativa* L.) Root Growth and Development. *Plant and Cell Physiology* 47: 1–13
- Chen H, Liu L, Wang L, Wang S, Cheng X (2016) VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 129: 263–273
- Chen H-H, Shen Z-Y, Li PH (1982) Adaptability of Crop Plants to High Temperatures Stress1. *Crop Science* 22: crops1982.0011183X002200040006x
- Chen K, Li G-J, Bressan RA, Song C-P, Zhu J-K, Zhao Y (2020) Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 62: 25–54
- Chen P, Yang R, Bartels D, Dong T, Duan H (2022) Roles of Abscisic Acid and Gibberellins in Stem/Root Tuber Development. *Int J Mol Sci* 23: 4955
- Chen R, Jiang H, Li L, Zhai Q, Qi L, Zhou W, Liu X, Li H, Zheng W, Sun J, Li C (2012) The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *Plant Cell* 24: 2898–2916
- Chen X, Smith SM, Shabala S, Yu M (2023) Phytohormones in plant responses to boron deficiency and toxicity. *J Exp Bot* 74: 743–754

- Cheng P, Gao J, Feng Y, Zhang Z, Liu Y, Fang W, Chen S, Chen F, Jiang J (2018) The chrysanthemum leaf and root transcript profiling in response to salinity stress. *Gene* 674: 161–169
- Ciaccheri L, Tuccio L, Mencaglia AA, Sikorska-Zimny K, Hallmann E, Kowalski A, G. Mignani A, Kaniszewski S, Agati G (2018) Prediction Models for Assessing Lycopene in Open-Field Cultivated Tomatoes by Means of a Portable Reflectance Sensor: Cultivar and Growing-Season Effects. *J Agric Food Chem* 66: 4748–4757
- Colmenero-Flores JM, Franco-Navarro JD, Cubero-Font P, Peinado-Torrubia P, Rosales MA (2019) Chloride as a Beneficial Macronutrient in Higher Plants: New Roles and Regulation. *Int J Mol Sci* 20: 4686
- Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M (2013) Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology* 30: 355–361
- Conway JR, Lex A, Gehlenborg N (2017) UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33: 2938–2940
- Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G (1965) Synthesis of (\pm)-Abscisin II. *Nature* 206: 715–715
- Corot A, Roman H, Douillet O, Autret H, Perez-Garcia M-D, Citerne S, Bertheloot J, Sakr S, Leduc N, Demotes-Mainard S (2017) Cytokinins and Abscisic Acid Act Antagonistically in the Regulation of the Bud Outgrowth Pattern by Light Intensity. *Front Plant Sci* 8:
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11: 163
- Croll J (2023) *Climate and Time in Their Geological Relations: A Theory of Secular Changes of the Earth's Climate*. Good Press
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* 61: 651–679
- Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, Chong K (2007) Overexpression of an R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology* 143: 1739–1751
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* 32: 40–52
- Dar NA, Amin I, Wani W, Wani SA, Shikari AB, Wani SH, Masoodi KZ (2017) Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants. *Plant Gene* 11: 106–111
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2013) Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions. *Front Plant Sci* 4:
- David-Rogeat N, Broadley MR, Stavridou E (2024) Heat and salinity stress on the African eggplant F1 Djamba, a Kumba cultivar. *Front Plant Sci* 15: 1323665
- De Torres Zabala M, Bennett MH, Truman WH, Grant MR (2009) Antagonism between salicylic acid and abscisic acid reflects early host–pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal* 59: 375–386

- Debnath M, Pandey M, Bisen PS (2011) An Omics Approach to Understand the Plant Abiotic Stress. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 15: 739–762
- Demidchik V, Tester M (2002) Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots. *Plant Physiol* 128: 379–387
- Derbyshire MC, Batley J, Edwards D (2022) Use of multiple ‘omics techniques to accelerate the breeding of abiotic stress tolerant crops. *Current Plant Biology* 32: 100262
- Dias AS, Lidon FC (2009) II. Heat stress in Triticum: kinetics of Cu and Zn accumulation. *Braz J Plant Physiol* 21: 135–142
- Ding Y, Yang S (2022) Surviving and thriving: How plants perceive and respond to temperature stress. *Developmental Cell* 57: 947–958
- Dittrich M, Mueller HM, Bauer H, Peirats-Llobet M, Rodriguez PL, Geilfus C-M, Carpentier SC, Al Rasheid KAS, Kollist H, Merilo E, Herrmann J, Müller T, Ache P, Hetherington AM, Hedrich R (2019) The role of Arabidopsis ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nat Plants* 5: 1002–1011
- Dixon LE, Karsai I, Kiss T, Adamski NM, Liu Z, Ding Y, Allard V, Boden SA, Griffiths S (2019) VERNALIZATION1 controls developmental responses of winter wheat under high ambient temperatures. *Development* 146: dev172684
- Djanaguiraman M, Boyle DL, Welti R, Jagadish SVK, Prasad PVV (2018) Decreased photosynthetic rate under high temperature in wheat is due to lipid desaturation, oxidation, acylation, and damage of organelles. *BMC Plant Biology* 18: 55
- Djanaguiraman M, Prasad PVV (2010) Ethylene production under high temperature stress causes premature leaf senescence in soybean. *Functional Plant Biol* 37: 1071–1084
- Dong Z, Yu Y, Li S, Wang J, Tang S, Huang R (2016) Abscisic Acid Antagonizes Ethylene Production through the ABI4-Mediated Transcriptional Repression of ACS4 and ACS8 in Arabidopsis. *Molecular Plant* 9: 126–135
- Dourado PRM, de Souza ER, Santos MA dos, Lins CMT, Monteiro DR, Paulino MKSS, Schaffer B (2022) Stomatal Regulation and Osmotic Adjustment in Sorghum in Response to Salinity. *Agriculture* 12: 658
- Du H, Huang F, Wu N, Li X, Hu H, Xiong L (2018) Integrative Regulation of Drought Escape through ABA-Dependent and -Independent Pathways in Rice. *Molecular Plant* 11: 584–597
- Du M, Lu D, Liu X (2023) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 regulate plant response to salt stress in an ABA-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 685: 149156
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 15: 573–581
- Duque L, Zapata C, Rojano B, Schneider B, Otálvaro F (2013) Radical Scavenging Capacity of 2,4-Dihydroxy-9-phenyl-1H-phenalen-1-one: A Functional Group Exclusion Approach. *Org Lett* 15: 3542–3545

- E T, F F, S C, P R, Gk M (2011) Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *Journal of experimental botany* 62:
- Earl HJ, Tollenaar M (1998) Relationship between thylakoid electron transport and photosynthetic CO₂ uptake in leaves of three maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Photosynthesis Research* 58: 245–257
- El-Yazied AA, Ibrahim MFM, Ibrahim MAR, Nasef IN, Al-Qahtani SM, Al-Harbi NA, Alzuaibr FM, Alaklabi A, Dessoky ES, Alabdallah NM, Omar MMA, Ibrahim MTS, Metwally AA, Hassan KM, Shehata SA (2022) Melatonin Mitigates Drought Induced Oxidative Stress in Potato Plants through Modulation of Osmolytes, Sugar Metabolism, ABA Homeostasis and Antioxidant Enzymes. *Plants* 11: 1151
- Emenecker RJ, Strader LC (2020) Auxin-Abscisic Acid Interactions in Plant Growth and Development. *Biomolecules* 10: 281
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E (2008) Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells. *Plant Physiol* 147: 1984–1993
- Fang Zhu X, Sheng Zhao X, Wu Q, Fang Shen R (2018) Abscisic acid is involved in root cell wall phosphorus remobilization independent of nitric oxide and ethylene in rice (*Oryza sativa*). *Ann Bot* 121: 1361–1368
- Farooq M, Hussain M, Wahid A, Siddique KHM (2012) Drought Stress in Plants: An Overview. In: Aroca R (ed) *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–33
- Ferrandino A, Lovisolo C (2014) Abiotic stress effects on grapevine (*Vitis vinifera* L.): Focus on abscisic acid-mediated consequences on secondary metabolism and berry quality. *Environmental and Experimental Botany* 103: 138–147
- Ferreira JA, Zwinderman AH (2006) On the Benjamini–Hochberg method. *The Annals of Statistics* 34: 1827–1849
- Fidler J, Graska J, Gietler M, Nykiel M, Prabucka B, Rybarczyk-Płońska A, Muszyńska E, Morkunas I, Labudda M (2022) PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Abscisic-Acid-Dependent Responses of Plants to External or Internal Stimuli. *Cells* 11: 1352
- Finkelstein R (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book* 11: e0166
- Fortin M-C, Poff KL (1991) Characterization of thermotropism in primary roots of maize: Dependence on temperature and temperature gradient, and interaction with gravitropism. *Planta* 184: 410–414
- Fu J, Wu Y, Miao Y, Xu Y, Zhao E, Wang J, Sun H, Liu Q, Xue Y, Xu Y, Hu T (2017) Improved cold tolerance in *Elymus nutans* by exogenous application of melatonin may involve ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Sci Rep* 7: 39865
- Fu L, Shen Q, Kuang L, Yu J, Wu D, Zhang G (2018) Metabolite profiling and gene expression of Na/K transporter analyses reveal mechanisms of the difference in salt tolerance between barley and rice. *Plant Physiology and Biochemistry* 130: 248–257

- Fujii H, Verslues PE, Zhu J-K (2007) Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19: 485–494
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 1988–1993
- Galmés J, Aranjuelo I, Medrano H, Flexas J (2013) Variation in Rubisco content and activity under variable climatic factors. *Photosynth Res* 117: 73–90
- Gantait S, Sarkar S, Verma SK (2019) Marker-assisted Selection for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Molecular Plant Abiotic Stress*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 335–368
- García-Caparrós P, Hasanuzzaman M, Lao MT (2019) Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under Salinity. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 291–309
- García-Martí M, Piñero MC, García-Sánchez F, Mestre TC, López-Delacalle M, Martínez V, Rivero RM (2019) Amelioration of the Oxidative Stress Generated by Simple or Combined Abiotic Stress through the K⁺ and Ca²⁺ Supplementation in Tomato Plants. *Antioxidants (Basel)* 8: 81
- García-Valverde V, Navarro-González I, García-Alonso J, Periago MJ (2013) Antioxidant Bioactive Compounds in Selected Industrial Processing and Fresh Consumption Tomato Cultivars. *Food Bioprocess Technol* 6: 391–402
- Ge SX, Jung D, Yao R (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 36: 2628–2629
- Ge SX, Son EW, Yao R (2018) iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 19: 534
- Ge X-M, Cai H-L, Lei X, Zhou X, Yue M, He J-M (2015) Heterotrimeric G protein mediates ethylene-induced stomatal closure via hydrogen peroxide synthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 82: 138–150
- Gitz DC, Baker JT (2009) Methods for Creating Stomatal Impressions Directly onto Archivable Slides. *Agronomy Journal* 101: 232–236
- Gong Z, Xiong L, Shi H, Yang S, Herrera-Estrella LR, Xu G, Chao D-Y, Li J, Wang P-Y, Qin F, Li J, Ding Y, Shi Y, Wang Y, Yang Y, Guo Y, Zhu J-K (2020) Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Sci China Life Sci* 63: 635–674
- Gonzalez LE, Keller K, Chan KX, Gessel MM, Thines BC (2017) Transcriptome analysis uncovers Arabidopsis F-BOX STRESS INDUCED 1 as a regulator of jasmonic acid and abscisic acid stress gene expression. *BMC Genomics* 18: 533
- González-Hernández AI, Scalschi L, García-Agustín P, Camañes G (2020) Tomato root development and N assimilation depend on C and ABA content under different N sources. *Plant Physiol Biochem* 148: 368–378

- Goodger JQ, Schachtman DP (2010) Re-examining the role of ABA as the primary long-distance signal produced by water-stressed roots. *Plant Signal Behav* 5: 1298–1301
- Goussi R, Manfredi M, Marengo E, Derbali W, Cantamessa S, Barbato R, Manaa A (2021) Thylakoid proteome variation of *Eutrema salsugineum* in response to drought and salinity combined stress. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1862: 148482
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *The Plant Cell* 7: 1879–1891
- Guo R, Zhao L, Zhang K, Lu H, Bhanbhro N, Yang C (2021) Comparative Genomics and Transcriptomics of the Extreme Halophyte *Puccinellia tenuiflora* Provides Insights Into Salinity Tolerance Differentiation Between Halophytes and Glycophytes. *Front Plant Sci* 12: 649001
- Gupta A, Bhardwaj M, Tran L-SP (2021) JASMONATE ZIM-DOMAIN Family Proteins: Important Nodes in Jasmonic Acid-Abscisic Acid Crosstalk for Regulating Plant Response to Drought. *Curr Protein Pept Sci* 22: 759–766
- Gupta A, Upadhyay RK, Prabhakar R, Tiwari N, Garg R, Sane VA, Sane AP (2022a) *SIDREB3*, a negative regulator of ABA responses, controls seed germination, fruit size and the onset of ripening in tomato. *Plant Science* 319: 111249
- Gupta K, Wani SH, Razzaq A, Skalicky M, Samantara K, Gupta S, Pandita D, Goel S, Grewal S, Hejnak V, Shiv A, El-Sabroun AM, Elansary HO, Alaklabi A, Brestic M (2022b) Abscisic Acid: Role in Fruit Development and Ripening. *Front Plant Sci* 13:
- Hamade K, Fliniaux O, Fontaine J-X, Molinié R, Otogo Nnang E, Bassard S, Guénin S, Gutierrez L, Lainé E, Hano C, Pilard S, Hijazi A, El Kak A, Mesnard F (2021) NMR and LC-MS-Based Metabolomics to Study Osmotic Stress in Lignan-Deficient Flax. *Molecules* 26: 767
- Hamaguchi A, Yamshino T, Koizumi N, Kiba T, Kojima M, Sakakibara H, Mizuno T (2008) A Small Subfamily of Arabidopsis RADIALIS-LIKE SANT/MYB Genes: A Link to HOOKLESS1-Mediated Signal Transduction during Early Morphogenesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 2687–2696
- Harborne JB (1975) Flavonoid sulphates: A new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochemistry* 14: 1147–1155
- Harris JM (2015) Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants (Basel)* 4: 548–572
- Harris JM, Ondzighi-Assoume CA (2017) Environmental nitrate signals through abscisic acid in the root tip. *Plant Signal Behav* 12: e1273303
- Hartung W (2010) The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Functional Plant Biol* 37: 806–812
- Hasan MdM, Liu X-D, Waseem M, Guang-Qian Y, Alabdallah NM, Jahan MS, Fang X-W (2022) ABA activated SnRK2 kinases: an emerging role in plant growth and physiology. *Plant Signaling & Behavior* 17: 2071024

- Hasan MM, Liu X-D, Yao G-Q, Liu J, Fang X-W (2024) Ethylene-mediated stomatal responses to dehydration and rehydration in seed plants. *J Exp Bot* erae060
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Mahmud JA, Nahar K, Mohsin SM, Parvin K, Fujita M (2018) Interaction of sulfur with phytohormones and signaling molecules in conferring abiotic stress tolerance to plants. *Plant Signaling & Behavior* 13: e1477905
- Hasanuzzaman Md, Davies NW, Shabala L, Zhou M, Brodribb TJ, Shabala S (2017) Residual transpiration as a component of salinity stress tolerance mechanism: a case study for barley. *BMC Plant Biology* 17: 107
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr Biol* 21: R346-355
- He Y, Liu Y, Li M, Lamin-Samu AT, Yang D, Yu X, Izhar M, Jan I, Ali M, Lu G (2021) The Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA32 Protein Regulates ABA-Mediated Responses to Drought Stress. *Front Plant Sci* 12:
- Hluska T, Hlusková L, Emery RJN (2021) The Hulks and the Deadpools of the Cytokinin Universe: A Dual Strategy for Cytokinin Production, Translocation, and Signal Transduction. *Biomolecules* 11: 209
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular California Agricultural Experiment Station* 347:
- Hong G, Su X, Xu K, Liu B, Wang G, Li J, Wang R, Zhu M, Li G (2022) Salt stress downregulates 2-hydroxybutyrylation in Arabidopsis siliques. *Journal of Proteomics* 250: 104383
- Hosmani PS, Flores-Gonzalez M, Geest H van de, Maumus F, Bakker LV, Schijlen E, Haarst J van, Cordewener J, Sanchez-Perez G, Peters S, Fei Z, Giovannoni JJ, Mueller LA, Saha S (2019) An improved de novo assembly and annotation of the tomato reference genome using single-molecule sequencing, Hi-C proximity ligation and optical maps. 767764
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Véry A-A, Simonneau T, Thibaud J-B, Sentenac H (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5549–5554
- Hou Y, Wang Y, Tang L, Tong X, Wang L, Liu L, Huang S, Zhang J (2019) SAPK10-Mediated Phosphorylation on WRKY72 Releases Its Suppression on Jasmonic Acid Biosynthesis and Bacterial Blight Resistance. *iScience* 16: 499–510
- Hsu P-K, Dubeaux G, Takahashi Y, Schroeder JI (2021) Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *The Plant Journal* 105: 307–321
- Hu Y, Yu D (2014) BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 4394–4408
- Huang X, Hou L, Meng J, You H, Li Z, Gong Z, Yang S, Shi Y (2018) The Antagonistic Action of Abscisic Acid and Cytokinin Signaling Mediates Drought Stress Response in Arabidopsis. *Mol Plant* 11: 970–982

- Huang X, Zhang X, Gong Z, Yang S, Shi Y (2017) ABI4 represses the expression of type-A ARR1s to inhibit seed germination in Arabidopsis. *Plant J* 89: 354–365
- Huang Y, Zhou J, Li Y, Quan R, Wang J, Huang R, Qin H (2021) Salt Stress Promotes Abscisic Acid Accumulation to Affect Cell Proliferation and Expansion of Primary Roots in Rice. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 10892
- Huo K, Shui L, Mai Y, Zhou N, Liu Y, Zhang C, Niu J (2020) Effects of exogenous abscisic acid on oil content, fatty acid composition, biodiesel properties and lipid components in developing Siberian apricot (*Prunus sibirica*) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 154: 260–267
- Hussain Q, Asim M, Zhang R, Khan R, Farooq S, Wu J (2021) Transcription Factors Interact with ABA through Gene Expression and Signaling Pathways to Mitigate Drought and Salinity Stress. *Biomolecules* 11: 1159
- Hussain T, Asrar H, Zhang W, Liu X (2023) The combination of salt and drought benefits selective ion absorption and nutrient use efficiency of halophyte *Panicum antidotale*. *Front Plant Sci* 14: 1091292
- Hussain T, Koyro H-W, Zhang W, Liu X, Gul B, Liu X (2020) Low Salinity Improves Photosynthetic Performance in *Panicum antidotale* Under Drought Stress. *Front Plant Sci* 11:
- Ibañez C, Poeschl Y, Peterson T, Bellstädt J, Denk K, Gogol-Döring A, Quint M, Delker C (2017) Ambient temperature and genotype differentially affect developmental and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 17: 114
- Ilyas N, Gull R, Mazhar R, Saeed M, Kanwal S, Shabir S, Bibi F (2017) Influence of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on Wheat Under Drought Stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48: 2715–2723
- Imber D, Tal M (1970) Phenotypic Reversion of Flacca, a Wilty Mutant of Tomato, by Abscisic Acid. *Science* 169: 592–593
- Innes SN, Solhaug KA, Torre S, Dodd IC (2021) Different abscisic acid-deficient mutants show unique morphological and hydraulic responses to high air humidity. *Physiologia Plantarum* 172: 1795–1807
- Israelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schroeder JI (2006) Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Curr Opin Plant Biol* 9: 654–663
- Itai C, Benzioni A, Munz S (1978) Heat stress: Effects of abscisic acid and kinetin on response and recovery of tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* 19: 453–459
- Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui H, Petricka JJ, Busch W, Tsukagoshi H, Benfey PN (2011) Cell identity regulators link development and stress responses in the Arabidopsis root. *Dev Cell* 21: 770–782
- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A (2017) The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* 15: 405–414

- Jan R, Asaf S, Numan M, Lubna, Kim K-M (2021) Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* 11: 968
- Janicka-Russak M, Kabała K (2012) Abscisic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma membrane H⁺-ATPase from *Cucumis sativus* L. roots under heat shock. *Journal of Plant Physiology* 169: 1607–1614
- Jenkins JA (1948) The origin of the cultivated tomato. *Econ Bot* 2: 379–392
- Jia C, Guo B, Wang B, Li X, Yang T, Li N, Wang J, Yu Q (2022) Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals the role of phenylpropanoid biosynthesis pathway in tomato roots during salt stress. *Front Plant Sci* 13: 1023696
- Jia W, Davies WJ (2007) Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant Physiol* 143: 68–77
- Jiang C-J, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Yazawa K, Yoshida R, Inoue H, Hayashi N, Sakakibara H, Takatsuji H (2010) Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-Magnaporthe grisea interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 791–798
- Jiang F, Hartung W (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* 59: 37–43
- Jiang W, Tong T, Chen X, Deng F, Zeng F, Pan R, Zhang W, Chen G, Chen Z-H (2022) Molecular response and evolution of plant anion transport systems to abiotic stress. *Plant Mol Biol* 110: 397–412
- Jin H, Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41: 577–585
- Jumrani K, Bhatia VS (2018) Impact of combined stress of high temperature and water deficit on growth and seed yield of soybean. *Physiol Mol Biol Plants* 24: 37–50
- Kadomura-Ishikawa Y, Miyawaki K, Takahashi A, Masuda T, Noji S (2015) Light and abscisic acid independently regulated FaMYB10 in *Fragaria × ananassa* fruit. *Planta* 241: 953–965
- Kalinina EB, Keith BK, Kern AJ, Dyer WE (2012) Salt- and osmotic stress-induced choline monooxygenase expression in *Kochia scoparia* is ABA-independent. *Biol Plant* 56: 699–704
- Kalozoumis P, Savvas D, Aliferis K, Ntatsi G, Marakis G, Simou E, Tampakaki A, Karapanos I (2021) Impact of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation and Grafting on Tolerance of Tomato to Combined Water and Nutrient Stress Assessed via Metabolomics Analysis. *Front Plant Sci* 12: 670236
- Karami S, Shiran B, Ravash R, Fallahi H (2023) A comprehensive analysis of transcriptomic data for comparison of plants with different photosynthetic pathways in response to drought stress. *PLOS ONE* 18: e0287761
- Karlova R, Boer D, Hayes S, Testerink C (2021) Root plasticity under abiotic stress. *Plant Physiol* 187: 1057–1070

- Karonen M (2022) Insights into Polyphenol-Lipid Interactions: Chemical Methods, Molecular Aspects and Their Effects on Membrane Structures. *Plants (Basel)* 11: 1809
- Khan AL, Waqas M, Khan AR, Hussain J, Kang S-M, Gilani SA, Hamayun M, Shin J-H, Kamran M, Al-Harrasi A, Yun B-W, Adnan M, Lee I-J (2013) Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 improves growth of ABA-deficient tomato under salinity. *World J Microbiol Biotechnol* 29: 2133–2144
- Khan Z, Shahwar D (2020) Role of Heat Shock Proteins (HSPs) and Heat Stress Tolerance in Crop Plants. In: Roychowdhury R, Choudhury S, Hasanuzzaman M, Srivastava S (eds) *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change*. Springer International Publishing, Cham, pp. 211–234
- Khurshid A, Inayat R, Tamkeen A, Ul Haq I, Li C, Boamah S, Zhou J-J, Liu C (2021) Antioxidant Enzymes and Heat-Shock Protein Genes of Green Peach Aphid (*Myzus persicae*) Under Short-Time Heat Stress. *Front Physiol* 12:
- Kilgore MB, Holland CK, Jez JM, Kutchan TM (2016) Identification of a Noroxomaritidine Reductase with Amaryllidaceae Alkaloid Biosynthesis Related Activities. *J Biol Chem* 291: 16740–16752
- Kim H, Seomun S, Yoon Y, Jang G (2021) Jasmonic Acid in Plant Abiotic Stress Tolerance and Interaction with Abscisic Acid. *Agronomy* 11: 1886
- Kirik V, Bäumlein H (1996) A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. *Gene* 183: 109–113
- Kirkham MB, Gardner WR, Gerloff GC (1969) Leaf Water Potential of Differentially Salinized Plants 1. *Plant Physiol* 44: 1378–1382
- Kishor PBK, Guddimalli R, Kulkarni J, Singam P, Somanaboina AK, Nandimandalam T, Patil S, Polavarapu R, Suravajhala P, Sreenivasulu N, Penna S (2023) Impact of Climate Change on Altered Fruit Quality with Organoleptic, Health Benefit, and Nutritional Attributes. *J Agric Food Chem* 71: 17510–17527
- Klee HJ, Resende MFR (2020) Plant Domestication: Reconstructing the Route to Modern Tomatoes. *Current Biology* 30: R359–R361
- Knapp S, Peralta IE (2016) The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In: Causse M, Giovannoni J, Bouzayen M, Zouine M (eds) *The Tomato Genome*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 7–21
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J* 12: 1067–1078
- Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsuhashi W, Toyomasu T, Koshiba T (2004) Tissue-Specific Localization of an Abscisic Acid Biosynthetic Enzyme, AAO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 1697–1707
- Koo YM, Heo AY, Choi HW (2020) Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *Plant Pathol J* 36: 1–10

- Kozaki A, Aoyanagi T (2022) Molecular Aspects of Seed Development Controlled by Gibberellins and Abscisic Acids. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1876
- Kraft M, Kuglitsch R, Kwiatkowski J, Frank M, Grossmann K (2007) Indole-3-acetic acid and auxin herbicides up-regulate 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene expression and abscisic acid accumulation in cleavers (*Galium aparine*): interaction with ethylene. *J Exp Bot* 58: 1497–1503
- Krasavina MS, Burmistrova NA, Raldugina GN (2014) Chapter 11 - The Role of Carbohydrates in Plant Resistance to Abiotic Stresses. In: Ahmad P, Rasool S (eds) *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Academic Press, San Diego, pp. 229–270
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ (1998) (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase. *Plant Physiol* 118: 849–860
- Kul R, Ekinci M, Turan M, Ors S, Yildirim E, Kul R, Ekinci M, Turan M, Ors S, Yildirim E (2020) How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots. *Plant Roots*. IntechOpen
- Kumar S, Kaushal N, Nayyar H, Gaur P (2012) Abscisic acid induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings by facilitated accumulation of osmoprotectants. *Acta Physiol Plant* 34: 1651–1658
- Kundu S, Gantait S (2017) Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response. *Plant Gene* 11: 61–69
- Kusajima M, Okumura Y, Fujita M, Nakashita H (2017) Abscisic acid modulates salicylic acid biosynthesis for systemic acquired resistance in tomato. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1850–1853
- Laoué J, Fernandez C, Ormeño E (2022) Plant Flavonoids in Mediterranean Species: A Focus on Flavonols as Protective Metabolites under Climate Stress. *Plants* 11: 172
- Le Roy J, Huss B, Creach A, Hawkins S, Neutelings G (2016) Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7:
- Lee D-K, Yoon S, Kim YS, Kim J-K (2017) Rice OsERF71-mediated root modification affects shoot drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 12: e1268311
- Lee SG, Kim SK, Lee HJ, Lee HS, Lee JH (2018) Impact of moderate and extreme climate change scenarios on growth, morphological features, photosynthesis, and fruit production of hot pepper. *Ecology and Evolution* 8: 197–206
- Lee TG, Jang CS, Kim JY, Kim DS, Park JH, Kim DY, Seo YW (2007) A Myb transcription factor (TaMyb1) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses. *Physiologia Plantarum* 129: 375–385
- Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng SJ (2014) Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 37: 852–863

- Li C, Tan D-X, Liang D, Chang C, Jia D, Ma F (2015) Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 66: 669–680
- Li C, Zhang W, Yuan M, Jiang L, Sun B, Zhang D, Shao Y, Liu A, Liu X, Ma J (2019a) Transcriptome analysis of osmotic-responsive genes in ABA-dependent and -independent pathways in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *PeerJ* 7: e6519
- Li G, Zhao J, Qin B, Yin Y, An W, Mu Z, Cao Y (2019b) ABA mediates development-dependent anthocyanin biosynthesis and fruit coloration in *Lycium* plants. *BMC Plant Biol* 19: 317
- Li H, Li Y, Ke Q, Kwak S-S, Zhang S, Deng X (2020a) Physiological and Differential Proteomic Analyses of Imitation Drought Stress Response in *Sorghum bicolor* Root at the Seedling Stage. *Int J Mol Sci* 21: 9174
- Li H, Mo Y, Cui Q, Yang X, Guo Y, Wei C, Yang J, Zhang Y, Ma J, Zhang X (2019c) Transcriptomic and physiological analyses reveal drought adaptation strategies in drought-tolerant and -susceptible watermelon genotypes. *Plant Science* 278: 32–43
- Li J, Han G, Sun C, Sui N (2019d) Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. *Plant Signaling & Behavior* 14: 1613131
- Li N, Wang Z, Wang B, Wang J, Xu R, Yang T, Huang S, Wang H, Yu Q (2022) Identification and Characterization of Long Non-coding RNA in Tomato Roots Under Salt Stress. *Frontiers in Plant Science* 13:
- Li P, Zhu Y, Song X, Song F (2020b) Negative effects of long-term moderate salinity and short-term drought stress on the photosynthetic performance of Hybrid *Pennisetum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 155: 93–104
- Li Q, Li P, Sun L, Wang Y, Ji K, Sun Y, Dai S, Chen P, Duan C, Leng P (2012) Expression analysis of β -glucosidase genes that regulate abscisic acid homeostasis during watermelon (*Citrullus lanatus*) development and under stress conditions. *Journal of Plant Physiology* 169: 78–85
- Li S (2014) Redox Modulation Matters: Emerging Functions for Glutaredoxins in Plant Development and Stress Responses. *Plants (Basel)* 3: 559–582
- Li S, Liu F (2021) Exogenous Abscisic Acid Priming Modulates Water Relation Responses of Two Tomato Genotypes With Contrasting Endogenous Abscisic Acid Levels to Progressive Soil Drying Under Elevated CO₂. *Front Plant Sci* 12: 733658
- Li W, Zhang C, Lu Q, Wen X, Lu C (2011) The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Physiology* 168: 1743–1752
- Li X, Tan D-X, Jiang D, Liu F (2016) Melatonin enhances cold tolerance in drought-primed wild-type and abscisic acid-deficient mutant barley. *J Pineal Res* 61: 328–339
- Li Y, Jiang F, Niu L, Wang G, Yin J, Song X, Ottosen C-O, Rosenqvist E, Mittler R, Wu Z, Zhou R (2023) Synergistic regulation at physiological, transcriptional and metabolic levels in tomato plants subjected to a combination of salt and heat stress. *The Plant Journal* n/a:

- Li Z, Tang J, Srivastava R, Bassham DC, Howell SH (2020c) The Transcription Factor bZIP60 Links the Unfolded Protein Response to the Heat Stress Response in Maize. *The Plant Cell* 32: 3559–3575
- Liang K, Chen Y, Hou J, Yan F, Liu F (2024) ABA-mediated stomatal response modulates the effects of drought, salinity and combined stress on tomato plants grown under elevated CO₂. *Environmental and Experimental Botany* 223: 105797
- Liao Q, Ding R, Du T, Kang S, Tong L, Gu S, Gao S, Gao J (2024) Stomatal conductance modulates maize yield through water use and yield components under salinity stress. *Agricultural Water Management* 294: 108717
- Liao Y, Zou H-F, Wang H-W, Zhang W-K, Ma B, Zhang J-S, Chen S-Y (2008) Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Cell Res* 18: 1047–1060
- Lin Z, Li Y, Wang Y, Liu X, Ma L, Zhang Z, Mu C, Zhang Y, Peng L, Xie S, Song C-P, Shi H, Zhu J-K, Wang P (2021) Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling. *Nat Commun* 12: 2456
- Liu B, Song L, Deng X, Lu Y, Lieberman-Lazarovich M, Shabala S, Ouyang B (2023a) Tomato heat tolerance: Progress and prospects. *Scientia Horticulturae* 322: 112435
- Liu H, Liu Y, Xu N, Sun Y, Li Q, Yue L, Zhou Y, He M (2022a) Chrysanthemum × grandiflora leaf and root transcript profiling in response to salinity stress. *BMC Plant Biol* 22: 240
- Liu H, Song S, Zhang H, Li Y, Niu L, Zhang J, Wang W (2022b) Signaling Transduction of ABA, ROS, and Ca²⁺ in Plant Stomatal Closure in Response to Drought. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 14824
- Liu H, Tang X, Zhang N, Li S, Si H (2023b) Role of bZIP Transcription Factors in Plant Salt Stress. *Int J Mol Sci* 24: 7893
- Liu S, Lv Z, Liu Y, Li L, Zhang L (2018) Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in Arabidopsis thaliana. *Genetics and Molecular Biology* 41:
- Liu S, Sun B, Cao B, Lv Y, Chen Z, Xu K (2023c) Effects of soil waterlogging and high-temperature stress on photosynthesis and photosystem II of ginger (*Zingiber officinale*). *Protoplasma* 260: 405–418
- Liu X, Hu Q, Yan J, Sun K, Liang Y, Jia M, Meng X, Fang S, Wang Y, Jing Y, Liu G, Wu D, Chu C, Smith SM, Chu J, Wang Y, Li J, Wang B (2020) ζ-Carotene Isomerase Suppresses Tillering in Rice through the Coordinated Biosynthesis of Strigolactone and Abscisic Acid. *Mol Plant* 13: 1784–1801
- Liu X, Ma D, Zhang Z, Wang S, Du S, Deng X, Yin L (2019) Plant lipid remodeling in response to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* 165: 174–184
- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang H-Q, Luan S, Li J, He Z-H (2013) Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15485–15490

- Liu Y, Pan Y, Li J, Chen J, Yang S, Zhao M, Xue Y (2023d) Transcriptome Sequencing Analysis of Root in Soybean Responding to Mn Poisoning. *Int J Mol Sci* 24: 12727
- Liu Z, Yan J-P, Li D-K, Luo Q, Yan Q, Liu Z-B, Ye L-M, Wang J-M, Li X-F, Yang Y (2015) UDP-Glucosyltransferase71C5, a Major Glucosyltransferase, Mediates Abscisic Acid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167: 1659–1670
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408
- Lopez-Delacalle M, Camejo D, Garcia-Marti M, Lopez-Ramal MJ, Nortes PA, Martinez V, Rivero RM (2021a) Deciphering fruit sugar transport and metabolism from tolerant and sensitive tomato plants subjected to simulated field conditions. *Physiologia Plantarum* 173: 1715–1728
- Lopez-Delacalle M, Camejo DM, García-Martí M, Nortes PA, Nieves-Cordonos M, Martínez V, Rubio F, Mittler R, Rivero RM (2020) Using Tomato Recombinant Lines to Improve Plant Tolerance to Stress Combination Through a More Efficient Nitrogen Metabolism. *Frontiers in Plant Science* 10:
- Lopez-Delacalle M, Silva CJ, Mestre TC, Martinez V, Blanco-Ulate B, Rivero RM (2021b) Synchronization of proline, ascorbate and oxidative stress pathways under the combination of salinity and heat in tomato plants. *Environmental and Experimental Botany* 183: 104351
- Lozano-Juste J, Infantes L, Garcia-Maquilon I, Ruiz-Partida R, Merilo E, Benavente JL, Velazquez-Campoy A, Coego A, Bono M, Forment J, Pampín B, Destito P, Monteiro A, Rodríguez R, Cruces J, Rodriguez PL, Albert A (2023) Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought. *Science Advances* 9: eade9948
- Macková H, Hronková M, Dobrá J, Turečková V, Novák O, Lubovská Z, Motyka V, Haisel D, Hájek T, Prášil IT, Gaudinová A, Štorchová H, Ge E, Werner T, Schmülling T, Vanková R (2013) Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *J Exp Bot* 64: 2805–2815
- MacRobbie EAC, Brownlee C, Sanders D (1997) Calcium and ABA-induced stomatal closure. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 338: 5–18
- Magaraggia F, Solinas G, Valle G, Giovinazzo G, Coraggio I (1997) Maturation and translation mechanisms involved in the expression of a myb gene of rice. *Plant Mol Biol* 35: 1003–1008
- Magome H, Kamiya Y (2018) Inactivation Processes. *Annual Plant Reviews online*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 73–93
- Malini MK, Karwa S, Priyadarsini P, Kumar P, Nagar S, Kumar M, Kumar S, Chinnusamy V, Pandey R, Pal M (2023) Abscisic-Acid-Modulated Stomatal Conductance Governs High-Temperature Stress Tolerance in Rice Accessions. *Agriculture* 13: 545
- Manishankar P, Wang N, Köster P, Alatar AA, Kudla J (2018) Calcium signaling during salt stress and in the regulation of ion homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 69: 4215–4226

- Mansouri H, Asrar Z (2012) Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage. *Biol Plant* 56: 153–156
- Mariani L, Ferrante A (2017) Agronomic Management for Enhancing Plant Tolerance to Abiotic Stresses—Drought, Salinity, Hypoxia, and Lodging. *Horticulturae* 3: 52
- Martinez V, Mestre TC, Rubio F, Girones-Vilaplana A, Moreno DA, Mittler R, Rivero RM (2016) Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* 7:
- Martinez V, Nieves-Cordones M, Lopez-Delacalle M, Rodenas R, Mestre TC, Garcia-Sanchez F, Rubio F, Nortes PA, Mittler R, Rivero RM (2018) Tolerance to Stress Combination in Tomato Plants: New Insights in the Protective Role of Melatonin. *Molecules* 23: 535
- Martínez-Ballesta MC, Aparicio F, Pallás V, Martínez V, Carvajal M (2003) Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 160: 689–697
- Martínez-Ballesta MC, López-Pérez L, Muries B, Muñoz-Azcarate O, Carvajal M (2009) Climate Change and Plant Water Balance: The Role of Aquaporins – A Review. In: Lichtfouse E (ed) *Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms: Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 71–89
- Martínez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A (2002) Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 323–330
- Mascia T, Santovito E, Gallitelli D, Cillo F (2010) Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology* 11: 805–816
- Masetti O, Ciampa A, Nisini L, Sequi P, Dell'Abate MT (2017) A multifactorial approach in characterizing geographical origin of Sicilian cherry tomatoes using ¹H-NMR profiling. *Food Research International* 100: 623–630
- Mathan J, Singh A, Ranjan A (2021) Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of OsSWEET13 and OsSWEET15 in rice. *Physiologia Plantarum* 171: 620–637
- Mazur R, Maszkowska J, Anielska-Mazur A, Garstka M, Polkowska-Kowalczyk L, Czajkowska A, Zmienko A, Dobrowolska G, Kulik A (2021) The SnRK2.10 kinase mitigates the adverse effects of salinity by protecting photosynthetic machinery. *Plant Physiol* 187: 2785–2802
- McAdam SAM, Susmilch FC (2021) The evolving role of abscisic acid in cell function and plant development over geological time. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 109: 39–45
- Mei W, Chen W, Wang Y, Liu Z, Dong Y, Zhang G, Deng H, Liu X, Lu X, Wang F, Chen G, Tang W, Xiao Y (2023) Exogenous Kinetin Modulates ROS Homeostasis to Affect Heat Tolerance in Rice Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 6252
- Mendel RR, Bittner F (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* 1763: 621–635

- Meyre D, Leonardi A, Brisson G, Vartanian N (2001) Drought-adaptive mechanisms involved in the escape/tolerance strategies of *Arabidopsis Landsberg erecta* and Columbia ecotypes and their F1 reciprocal progeny. *Journal of Plant Physiology* 158: 1145–1152
- Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, Thomas PD (2019) Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc* 14: 703–721
- Mikołajczak K, Kuczyńska A, Krajewski P, Kempa M, Nuc M (2022) Transcriptome profiling disclosed the effect of single and combined drought and heat stress on reprogramming of genes expression in barley flag leaf. *Front Plant Sci* 13: 1096685
- Min X, Okada K, Brockmann B, Koshiba T, Kamiya Y (2000) Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1493: 337–341
- Miransari M, Rangbar B, Khajeh K, Tehranchi MM, Azad RR, Nagafi F, Rahnamaie R (2013) Salt Stress and MAPK Signaling in Plants. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV (eds) *Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations*. Springer, New York, NY, pp. 157–173
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15–19
- Mittler R, Blumwald E (2015) The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell* 27: 64–70
- Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Van Breusegem F (2022) Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 663–679
- Motti R (2021) The Solanaceae Family: Botanical Features and Diversity. In: Carputo D, Aversano R, Ercolano MR (eds) *The Wild Solanums Genomes*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–9
- Muhammad Aslam M, Waseem M, Jakada BH, Okal EJ, Lei Z, Saqib HSA, Yuan W, Xu W, Zhang Q (2022) Mechanisms of Abscisic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1084
- Mulet JM, Porcel R, Yenush L (2023) Modulation of potassium transport to increase abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany* 74: 5989–6005
- Müller AH, Hansson M (2009) The Barley Magnesium Chelatase 150-kD Subunit Is Not an Abscisic Acid Receptor. *Plant Physiology* 150: 157–166
- Müller M (2021) Foes or Friends: ABA and Ethylene Interaction under Abiotic Stress. *Plants (Basel)* 10: 448
- Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7: 37

- Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder JI (2015) Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology* 28: 154–162
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681
- Muñoz-Espinoza VA, López-Climent MF, Casaretto JA, Gómez-Cadenas A (2015) Water Stress Responses of Tomato Mutants Impaired in Hormone Biosynthesis Reveal Abscisic Acid, Jasmonic Acid and Salicylic Acid Interactions. *Front Plant Sci* 6: 997
- Muñoz-Mayor A, Pineda B, Garcia-Abellán JO, Antón T, Garcia-Sogo B, Sanchez-Bel P, Flores FB, Atarés A, Angosto T, Pintor-Toro JA, Moreno V, Bolarin MC (2012) Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *J Plant Physiol* 169: 459–468
- Nahar K, Kyndt T, Nzogela YB, Gheysen G (2012) Abscisic acid interacts antagonistically with classical defense pathways in rice–migratory nematode interaction. *New Phytologist* 196: 901–913
- Nahar L, Aycan M, Hanamata S, Baslam M, Mitsui T (2022) Impact of Single and Combined Salinity and High-Temperature Stresses on Agro-Physiological, Biochemical, and Transcriptional Responses in Rice and Stress-Release. *Plants (Basel)* 11: 501
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) ABSCISIC ACID BIOSYNTHESIS AND CATABOLISM. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165–185
- Naumann R, Dörffling K (1982) Variation of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and dihydrophaseic acid levels in ripening barley grains. *Plant Science Letters* 27: 111–117
- Neumann J (1985) Climatic change as a topic in the classical Greek and Roman literature. *Climatic Change* 7: 441–454
- Nguyen KH, Ha CV, Nishiyama R, Watanabe Y, Leyva-González MA, Fujita Y, Tran UT, Li W, Tanaka M, Seki M, Schaller GE, Herrera-Estrella L, Tran LS (2016) Arabidopsis type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 3090–3095
- Nieves-Cordones M, Al Shiblawi FR, Sentenac H (2016) Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. *Met Ions Life Sci* 16: 291–324
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park S-Y, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal* 61: 290–299
- Nitsch L, Kohlen W, Oplaat C, Charnikhova T, Cristescu S, Michieli P, Wolters-Arts M, Bouwmeester H, Mariani C, Vriezen WH, Rieu I (2012) ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of Plant Physiology* 169: 878–883
- Niu J, Chen Z, Guo Z, Xu N, Sui X, Roy M, Kareem HA, Hassan MU, Cui J, Wang Q (2022) Exogenous melatonin promotes the growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under NaCl stress through multiple pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 242: 113938

- Noman A, Hussain A, Adnan M, Khan MI, Ashraf MF, Zainab M, Khan KA, Ghramh HA, He S (2019) A novel MYB transcription factor CaPHL8 provide clues about evolution of pepper immunity against soil borne pathogen. *Microbial Pathogenesis* 137: 103758
- Obadi A, Alharbi A, Alomran A, Alghamdi AG, Louki I, Alkhasha A, Alqardaei T (2024) Enhancement in Tomato Yield and Quality Using Biochar Amendments in Greenhouse under Salinity and Drought Stress. *Plants (Basel)* 13: 1634
- Oh HD, Yu DJ, Chung SW, Chea S, Lee HJ (2018) Abscisic acid stimulates anthocyanin accumulation in 'Jersey' highbush blueberry fruits during ripening. *Food Chemistry* 244: 403–407
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142: 1592–1593
- de Ollas C, Hernando B, Arbona V, Gómez-Cadenas A (2013) Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum* 147: 296–306
- del Olmo I, Poza-Viejo L, Piñeiro M, Jarillo JA, 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: 343–356
- Olubanjo O, Alade A (2018) Growth and Yield Response of Tomato Plants Grown Under Different Substrates Culture
- Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD (1991) A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell* 67: 483–493
- Ors S, Ekinci M, Yildirim E, Sahin U, Turan M, Dursun A (2021) Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. *South African Journal of Botany* 137: 335–339
- Osman H, Mahmoud M, Shehata S, Salama Y, Abdelkader A (2016) Induction of Thermotolerant Tomato Plants Using Salicylic Acid and Kinetin Foliar Applications. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants* 8: 89–97
- Osthoff A, Donà dalle Rose P, Baldauf JA, Piepho H-P, Hochholdinger F (2019) Transcriptomic reprogramming of barley seminal roots by combined water deficit and salt stress. *BMC Genomics* 20: 325
- Ozturk M, Turkyilmaz Unal B, García-Caparrós P, Khursheed A, Gul A, Hasanuzzaman M (2021) Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum* 172: 1321–1335
- Pacak A, Barciszewska-Pacak M, Swida-Barteczka A, Kruska K, Segal P, Milanowska K, Jakobsen I, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z (2016) Heat Stress Affects Pi-related Genes Expression and Inorganic Phosphate Deposition/Accumulation in Barley. *Frontiers in Plant Science* 7:
- Pagán E, Robles JM, Temnani A, Berríos P, Botía P, Pérez-Pastor A (2022) Effects of water deficit and salinity stress on late mandarin trees. *Science of The Total Environment* 803: 150109

- Pál M, Janda T, Szalai G (2011) Abscisic Acid May Alter the Salicylic Acid-Related Abiotic Stress Response in Maize. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 368–377
- Palmer CE (1981) Influence of Abscisic Acid on Nitrate Accumulation and Nitrate Reductase Activity in Potato Tuber Slices. *Plant and Cell Physiology* 22: 1541–1551
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* 136: 136–148
- Pardo JM, Rubio F (2011) Na⁺ and K⁺ Transporters in Plant Signaling. In: Geisler M, Venema K (eds) *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 65–98
- Pardo-Hernández M, Arbona V, Simón I, Rivero RM (2024a) Specific ABA-independent tomato transcriptome reprogramming under abiotic stress combination. *Plant J* doi.org/10.1111/tpj.16642
- Pardo-Hernández M, García-Pérez P, Lucini L, Rivero RM (2024b) Multi-Omics Exploration of ABA Involvement in Identifying Unique Molecular Markers for Single and Combined Stresses in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* erae372
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T-FF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu J-K, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071
- Parwez R, Aftab T, Gill SS, Naeem M (2022) Abscisic acid signaling and crosstalk with phytohormones in regulation of environmental stress responses. *Environmental and Experimental Botany* 199: 104885
- Pascual LS, Segarra-Medina C, Gómez-Cadenas A, López-Climent MF, Vives-Peris V, Zandalinas SI (2022) Climate change-associated multifactorial stress combination: A present challenge for our ecosystems. *J Plant Physiol* 276: 153764
- Peláez-Vico MÁ, Zandalinas SI, Devireddy AR, Sinha R, Mittler R (2024) Systemic stomatal responses in plants: Coordinating development, stress, and pathogen defense under a changing climate. *Plant Cell Environ* doi.org/10.1111/pce.14797
- Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A (2015) Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci* 6: 255
- Peng Z-Y, Weyers JDB (1994) Stomatal sensitivity to abscisic acid following water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* 45: 835–845
- Pérez-Alonso M-M, Ortiz-García P, Moya-Cuevas J, Lehmann T, Sánchez-Parra B, Björk RG, Karim S, Amirjani MR, Aronsson H, Wilkinson MD, Pollmann S (2021) Endogenous indole-3-acetamide levels contribute to the crosstalk between auxin and abscisic acid, and trigger plant stress responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 72: 459–475
- Pesaresi P, Mizzotti C, Colombo M, Masiero S (2014) Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Front Plant Sci* 5:

- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L (2008) The Gibberellic Acid Signaling Repressor RGL2 Inhibits Arabidopsis Seed Germination by Stimulating Abscisic Acid Synthesis and ABI5 Activity. *The Plant Cell* 20: 2729–2745
- Pizzio GA (2022) Abscisic Acid Machinery Is under Circadian Clock Regulation at Multiple Levels. *Stresses* 2: 65–78
- Planchet E, Limami AM (2015) Amino acid synthesis under abiotic stress. *Amino acids in higher plants* 262–276
- Postiglione AE, Muday GK (2020) The Role of ROS Homeostasis in ABA-Induced Guard Cell Signaling. *Front Plant Sci* 11:
- Pottosin I, Dobrovinskaya O (2014) Non-selective cation channels in plasma and vacuolar membranes and their contribution to K⁺ transport. *Journal of Plant Physiology* 171: 732–742
- Rakitin VYu, Prudnikova ON, Rakitina TYa, Karyagin VV, Vlasov PV, Novikova GV, Moshkov IE (2009) Interaction between ethylene and ABA in the regulation of polyamine level in *Arabidopsis thaliana* during UV-B stress. *Russ J Plant Physiol* 56: 147–153
- Ramachandran M, Arulbalachandran D, Ramya S (2022) Exogenous foliar application of abscisic acid on polyethylene glycol induced drought by improving the morphological and biochemical characters of four rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Plant Science Today* 9: 272–280
- Ramasamy S, Ganesh Thiruvengadam Nandagopal J, Balasubramanian M, Girija S (2022) Effect of Abscisic acid and Selenium foliar sprays on drought mitigation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Materials Today: Proceedings* 48: 191–195
- Ranc N, Muñoz S, Santoni S, Causse M (2008) A clarified position for *solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology* 8: 130
- Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J (2019) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47: W191–W198
- Raza A, Charagh S, Abbas S, Hassan MU, Saeed F, Haider S, Sharif R, Anand A, Corpas FJ, Jin W, Varshney RK (2023) Assessment of proline function in higher plants under extreme temperatures. *Plant Biol (Stuttg)* 25: 379–395
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439: 290–294
- Razifard H, Ramos A, Della Valle AL, Bodary C, Goetz E, Manser EJ, Li X, Zhang L, Visa S, Tieman D, van der Knaap E, Caicedo AL (2020) Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution* 37: 1118–1132
- Raziq A, Wang Y, Mohi Ud Din A, Sun J, Shu S, Guo S (2022) A Comprehensive Evaluation of Salt Tolerance in Tomato (Var. Ailsa Craig): Responses of Physiological and Transcriptional

- Changes in RBOH's and ABA Biosynthesis and Signalling Genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1603
- Rehman A, Azhar MT, Hinze L, Qayyum A, Li H, Peng Z, Qin G, Jia Y, Pan Z, He S, Du X (2021) Insight into abscisic acid perception and signaling to increase plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Plant Interactions* 16: 222–237
- Resh HM (2022) *Hydroponic Food Production: A Definitive Guidebook for the Advanced Home Gardener and the Commercial Hydroponic Grower*, 8th Ed. CRC Press, Boca Raton
- Risk JM, Macknight RC, Day CL (2008) FCA does not bind abscisic acid. *Nature* 456: E5-6
- Rivero RM, Mestre TC, Mittler R, Rubio F, Garcia-Sanchez F, Martinez V (2014) The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant Cell Environ* 37: 1059–1073
- Rivero RM, Mittler R, Blumwald E, Zandalinas SI (2022) Developing climate-resilient crops: improving plant tolerance to stress combination. *The Plant Journal* 109: 373–389
- Rivero RM, Ruiz JM, Romero LM (2004) Importance of N Source on Heat Stress Tolerance Due to the Accumulation of Proline and Quaternary Ammonium Compounds in Tomato Plants. *Plant Biology* 6: 702–707
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143–1151
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683–1696
- Rock CD, Zeevaart JA (1991) The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 7496–7499
- Ródenas R, Ragel P, Nieves-Cordones M, Martínez-Martínez A, Amo J, Lara A, Martínez V, Quintero FJ, Pardo JM, Rubio F (2021) Insights into the mechanisms of transport and regulation of the arabidopsis high-affinity K⁺ transporter HAK51. *Plant Physiology* 185: 1860–1874
- Rodrigues F, Sousa B, Soares C, Moreira D, Pereira C, Moutinho-Pereira J, Cunha A, Fidalgo F (2024) Are tomato plants co-exposed to heat and salinity able to ensure a proper carbon metabolism? – An insight into the photosynthetic hub. *Plant Physiology and Biochemistry* 206: 108270
- Rohart F, Gautier B, Singh A, Cao K-AL (2017) mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology* 13: e1005752
- Romero P, Rodrigo MJ, Alférez F, Ballester A-R, González-Candelas L, Zacarías L, Lafuente MT (2012) Unravelling molecular responses to moderate dehydration in harvested fruit of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) using a fruit-specific ABA-deficient mutant. *Journal of Experimental Botany* 63: 2753–2767

- Rosales MA, Franco-Navarro JD, Peinado-Torrubia P, Díaz-Rueda P, Álvarez R, Colmenero-Flores JM (2020) Chloride Improves Nitrate Utilization and NUE in Plants. *Front Plant Sci* 11: 442
- Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'hiri N, García-Lobato P, Manach C, Knox C, Eisner R, Wishart DS, Scalbert A (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database (Oxford)* 2013: bat070
- Rowe JH, Topping JF, Liu J, Lindsey K (2016) Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist* 211: 225–239
- Roychowdhury R, Das SP, Gupta A, Parihar P, Chandrasekhar K, Sarker U, Kumar A, Ramrao DP, Sudhakar C (2023) Multi-Omics Pipeline and Omics-Integration Approach to Decipher Plant's Abiotic Stress Tolerance Responses. *Genes (Basel)* 14: 1281
- Sagi M, Fluhr R, Lips SH (1999) Aldehyde Oxidase and Xanthine Dehydrogenase in a flacca Tomato Mutant with Deficient Abscisic Acid and Wilty Phenotype. *Plant Physiol* 120: 571–578
- Sagi M, Scazzocchio C, Fluhr R (2002) The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J* 31: 305–317
- Sah SK, Reddy KR, Li J (2016) Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Plant Sci* 7:
- Saini N, Nikalje GC, Zargar SM, Suprasanna P (2022) Molecular insights into sensing, regulation and improving of heat tolerance in plants. *Plant Cell Rep* 41: 799–813
- Salek RM, Neumann S, Schober D, Hummel J, Billiau K, Kopka J, Correa E, Reijmers T, Rosato A, Tenori L, Turano P, Marin S, Deborde C, Jacob D, Rolin D, Dartigues B, Conesa P, Haug K, Rocca-Serra P, O'Hagan S, Hao J, van Vliet M, Sysi-Aho M, Ludwig C, Bouwman J, Cascante M, Ebbels T, Griffin JL, Moing A, Nikolski M, Oresic M, Sansone S-A, Viant MR, Goodacre R, Günther UL, Hankemeier T, Luchinat C, Walther D, Steinbeck C (2015) COordination of Standards in MetabOLOmicS (COSMOS): facilitating integrated metabolomics data access. *Metabolomics* 11: 1587–1597
- Samanta S, Seth CS, Roychoudhury A (2024) The molecular paradigm of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) with different phytohormone signaling pathways during drought stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 206: 108259
- Šamec D, Karalija E, Šola I, Vujčić Bok V, Salopek-Sondi B (2021) The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants* 10: 118
- Samineni S, Mahendrakar MD, Shankar N, Hotti A, Chand U, Rathore A, Gaur PM (2022) Impact of heat and drought stresses on grain nutrient content in chickpea: Genome-wide marker-trait associations for protein, Fe and Zn. *Environmental and Experimental Botany* 194: 104688
- Sarowar S, Kim YJ, Kim EN, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JS (2005) Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep* 24: 216–224

- Sauter A, Dietz K-J, Hartung W (2002) A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell Environ* 25: 223–228
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2003) Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591–1601
- Scott JW, Harbaugh BK (1989) *Micro-Tom: a Miniature Dwarf Tomato*. Agricultural Experiment Station, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL
- Segarra-Medina C, Alseekh S, Fernie AR, Rambla JL, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cádenas A, Zandalinas SI (2023) Abscisic acid promotes plant acclimation to the combination of salinity and high light stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 203: 108008
- Sen S, Mukherji S (2009) Season-controlled changes in biochemical constituents and oxidase enzyme activities in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Environ Biol* 30: 479–483
- Sewelam N, Kazan K, Schenk PM (2016) *Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road*. *Front Plant Sci* 7:
- Shakirova FM, Bezrukova MV, Allagulova ChR, Maslennikova DR, Lubyanova AR (2017) Wheat Germ Agglutinin and Dehydrins as ABA-Regulated Components of SA-Induced Cadmium Resistance in Wheat Plants. In: Nazar R, Iqbal N, Khan NA (eds) *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone*. Springer, Singapore, pp. 77–96
- Shan T, Rong W, Xu H, Du L, Liu X, Zhang Z (2016) The wheat R2R3-MYB transcription factor TaRIM1 participates in resistance response against the pathogen *Rhizoctonia cerealis* infection through regulating defense genes. *Sci Rep* 6: 28777
- Shang Y, Yan L, Liu Z-Q, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu F-Q, Wang X-F, Du S-Y, Jiang T, Zhang X-F, Zhao R, Sun H-L, Liu R, Yu Y-T, Zhang D-P (2010) The Mg-Chelatase H Subunit of Arabidopsis Antagonizes a Group of WRKY Transcription Repressors to Relieve ABA-Responsive Genes of Inhibition. *The Plant Cell* 22: 1909–1935
- Sharipova G, Veselov D, Kudoyarova G, Fricke W, Dodd IC, Katsuhara M, Furuichi T, Ivanov I, Veselov S (2016) Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA-deficient barley mutant Az34. *Ann Bot* 118: 777–785
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B (2019) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* 24: 2452
- Sharp RE (2002) Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell & Environment* 25: 211–222
- Shelke D, Nikalje G, Nikam T, Maheshwari P, Punita D, Rao K, Kavi Kishor P, Suprasanna P (2019) Chloride (Cl⁻) Uptake, Transport, and Regulation in Plant Salt Tolerance. *Molecular Plant Abiotic Stress*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 241–268

- Shi C, Qi C, Ren H, Huang A, Hei S, She X (2015) Ethylene mediates brassinosteroid-induced stomatal closure via $G\alpha$ protein-activated hydrogen peroxide and nitric oxide production in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 82: 280–301
- Shi H, Zhu J-K (2002) Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 50: 543–550
- Shimomura H, Etoh H, Mizutani M, Hirai N, Todoroki Y (2007) Effect of the minor ABA metabolite 7'-hydroxy-ABA on *Arabidopsis* ABA 8'-hydroxylase CYP707A3. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 4977–4981
- Shiva S, Samarakoon T, Lowe KA, Roach C, Vu HS, Colter M, Porras H, Hwang C, Roth MR, Tamura P, Li M, Schrick K, Shah J, Wang X, Wang H, Welti R (2020) Leaf Lipid Alterations in Response to Heat Stress of *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)* 9: 845
- Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang P, Li Y, Wang S, Tang S, Liu C, Yang W, Cao X, Serino G, Xie Q (2016) *ABI4* mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels. *Plant J* 85: 348–361
- Shu K, Zhou W, Chen F, Luo X, Yang W (2018) Abscisic Acid and Gibberellins Antagonistically Mediate Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Front Plant Sci* 9:
- Silva EN, Silveira JAG, Ribeiro RV, Oliveira JÊ, Cardoso RA (2018) Photosynthetic and Antioxidant Responses of *Jatropha curcas* Plants to Heat Stress: On the Relative Sensitivity of Shoots and Roots. *J Plant Growth Regul* 37: 255–265
- Singh A, Roychoudhury A (2023) Abscisic acid in plants under abiotic stress: crosstalk with major phytohormones. *Plant Cell Rep* 42: 961–974
- Singh AK, Singh MK, Singh V, Singh R, Raghuvanshi T, Singh C (2017) Debilitation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as result of heat stress. *J Pharmacogn Phytochem* 6: 1917–1922
- Singiri JR, Swetha B, Sikron-Persi N, Grafi G (2021) Differential Response to Single and Combined Salt and Heat Stresses: Impact on Accumulation of Proteins and Metabolites in Dead Pericarps of *Brassica juncea*. *Int J Mol Sci* 22: 7076
- Sinha R, Shostak B, Induri SP, Sen S, Zandalinas SI, Joshi T, Fritschi FB, Mittler R (2023) Differential transpiration between pods and leaves during stress combination in soybean. *Plant Physiol* kiad114
- Sinha R, Zandalinas SI, Fichman Y, Sen S, Zeng S, Gómez-Cadenas A, Joshi T, Fritschi FB, Mittler R (2022) Differential regulation of flower transpiration during abiotic stress in annual plants. *New Phytologist* 235: 611–629
- Skalak J, Nicolas KL, Vankova R, Hejatko J (2021) Signal Integration in Plant Abiotic Stress Responses via Multistep Phosphorelay Signaling. *Front Plant Sci* 12:
- Skubacz A, Daszkowska-Golec A, Szarejko I (2016) The Role and Regulation of *ABI5* (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk. *Front Plant Sci* 7:

- Sokolova DV, Shvachko NA, Mikhailova AS, Popov VS (2022) Betalain Content and Morphological Characteristics of Table Beet Accessions: Their Interplay with Abiotic Factors. *Agronomy* 12: 1033
- Song C, Yan Y, Rosado A, Zhang Z, Castellarin SD (2019) ABA Alleviates Uptake and Accumulation of Zinc in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) by Inducing Expression of ZIP and Detoxification-Related Genes. *Front Plant Sci* 10: 872
- Song Z, Zhao L, Ma W, Peng Z, Shi J, Pan F, Gao Y, Sui X, Rengel Z, Chen Q, Wang B (2023) Ethylene inhibits ABA-induced stomatal closure via regulating NtMYB184-mediated flavonol biosynthesis in tobacco. *J Exp Bot* 74: 6735–6748
- Soto-García M, Martínez-Alvarez V, García-Bastida PA, Alcon F, Martín-Gorriñ B (2013) Effect of water scarcity and modernisation on the performance of irrigation districts in south-eastern Spain. *Agricultural Water Management* 124: 11–19
- Sousa B, Rodrigues F, Soares C, Martins M, Azenha M, Lino-Neto T, Santos C, Cunha A, Fidalgo F (2022) Impact of Combined Heat and Salt Stresses on Tomato Plants-Insights into Nutrient Uptake and Redox Homeostasis. *Antioxidants (Basel)* 11: 478
- Stavridou E, Webster RJ, Robson PRH (2019) Novel *Miscanthus* genotypes selected for different drought tolerance phenotypes show enhanced tolerance across combinations of salinity and drought treatments. *Ann Bot* 124: 653–674
- Steudle E (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 51: 1531–1542
- Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrstens F, Niehaus K, Weisshaar B (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal* 50: 660–677
- Su H, Wang T, Ju C, Deng J, Zhang T, Li M, Tian H, Wang C (2021) Abscisic acid signaling negatively regulates nitrate uptake via phosphorylation of NRT1.1 by SnRK2s in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 63: 597–610
- Su Y, Luo W, Lin W, Ma L, Kabir MH (2015) Model of Cation Transportation Mediated by High-Affinity Potassium Transporters (HKTs) in Higher Plants. *Biol Proced Online* 17: 1
- Suarez DL, Celis N, Anderson RG, Sandhu D (2019) Grape Rootstock Response to Salinity, Water and Combined Salinity and Water Stresses. *Agronomy* 9: 321
- Subramanian I, Verma S, Kumar S, Jere A, Anamika K (2020) Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinform Biol Insights* 14: 1177932219899051
- Sun A-Z, Chen L-S, Tang M, Chen J-H, Li H, Jin X-Q, Yi Y, Guo F-Q (2022) Lipidomic Remodeling in *Begonia grandis* Under Heat Stress. *Front Plant Sci* 13: 843942
- Sun K, Xue X, Liu N, Zhu Z, Li H (2020) A point-to-point protein–protein interaction assay reveals the signaling interplays among plant hormones and environmental cues. *Plant Direct* 4: e00228

- Sun M, Shen Y (2024) Integrating the multiple functions of CHLH into chloroplast-derived signaling fundamental to plant development and adaptation as well as fruit ripening. *Plant Science* 338: 111892
- Suzuki N, Bassil E, Hamilton JS, Inupakutika MA, Zandalinas SI, Tripathy D, Luo Y, Dion E, Fukui G, Kumazaki A, Nakano R, Rivero RM, Verbeck GF, Azad RK, Blumwald E, Mittler R (2016) ABA Is Required for Plant Acclimation to a Combination of Salt and Heat Stress. *PLoS One* 11: e0147625
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43: D447-452
- Tal M (1966) Abnormal Stomatal Behavior in Wilty Mutants of Tomato. *Plant Physiol* 41: 1387–1391
- Tal M, Imber D (1971) Abnormal Stomatal Behavior and Hormonal Imbalance in Flacca, a Wilty Mutant of Tomato: III. Hormonal Effects on the Water Status in the Plant. *Plant Physiol* 47: 849–850
- Tal M, Imber D, Itai C (1970) Abnormal Stomatal Behavior and Hormonal Imbalance in flacca, a Wilty Mutant of Tomato: I. Root Effect and Kinetin-like Activity. *Plant physiology* 46: 367–72
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S (2005) Ethylene Inhibits Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis. *Plant Physiology* 138: 2337–2343
- Tarahovsky YS, Muzafarov EN, Kim YA (2008) Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity. *Mol Cell Biochem* 314: 65–71
- Teles YCF, Souza MSR, de Souza M de FV (2018) Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities. *Molecules* 23: 480
- Thalmann M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* 214: 943–951
- Thiel G, Lynch J, Läuchli A (1988) Short-term Effects of Salinity Stress on the Turgor and Elongation of Growing Barley Leaves. *Journal of Plant Physiology* 132: 38–44
- Tissera P, Ayres PG (1986) Endogenous Ethylene Affects the Behaviour of Stomata in Epidermis Isolated from Rust Infected Faba Bean (*vicia Faba L.*). *New Phytologist* 104: 53–61
- Tiwari M, Kumar R, Min D, Jagadish SVK (2022) Genetic and molecular mechanisms underlying root architecture and function under heat stress—A hidden story. *Plant, Cell & Environment* 45: 771–788
- Tolnai Z, Sharma H, Soós V (2024) D27-like carotenoid isomerases: at the crossroads of strigolactone and abscisic acid biosynthesis. *J Exp Bot* 75: 1148–1158
- Tovar JC, Berry JC, Quillatupa C, Castillo SE, Acosta-Gamboa L, Fahlgren N, Gehan MA (2022) Heat stress changes mineral nutrient concentrations in *Chenopodium quinoa* seed. *Plant Direct* 6: e384

- Tran DT, Hertog MLATM, Tran TLH, Quyen NT, Van de Poel B, Mata CI, Nicolai BM (2017) Population Modeling Approach to Optimize Crop Harvest Strategy. The Case of Field Tomato. *Front Plant Sci* 8: 608
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20623–20628
- Tsioli S, Koutalianou M, Gkafas GA, Exadactylos A, Papathanasiou V, Katsaros CI, Orfanidis S, Küpper FC (2022) Responses of the Mediterranean seagrass *Cymodocea nodosa* to combined temperature and salinity stress at the ionic, transcriptomic, ultrastructural and photosynthetic levels. *Marine Environmental Research* 175: 105512
- Tuan PA, Kumar R, Rehal PK, Toora PK, Ayele BT (2018) Molecular Mechanisms Underlying Abscisic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. *Front Plant Sci* 9:
- Turkan I (2018) ROS and RNS: key signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 69: 3313–3315
- Tuteja N (2007) Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior* 2: 135–138
- Tzortzakis NG (2010) Potassium and calcium enrichment alleviate salinity-induced stress in hydroponically grown endives. *Horticultural Science* 37: 155–162
- Ulferts S, Delventhal R, Splivallo R, Karlovsky P, Schaffrath U (2015) Abscisic acid negatively interferes with basal defence of barley against *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biol* 15: 7
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell* 5: 1529–1539
- Urban J, Ingwers M, McGuire MA, Teskey RO (2017) Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signaling & Behavior* 12: e1356534
- Varshney V, Majee M (2021) JA Shakes Hands with ABA to Delay Seed Germination. *Trends in Plant Science* 26: 764–766
- Verma L (2016) Effect of Iron Stress on Oxidative Metabolism in Wheat Plants (*Triticum Aestivum* (L.)) Iron Stress in Wheat
- Veselov DS, Sharipova GV, Veselov SY, Dodd IC, Ivanov I, Kudoyarova GR (2018) Rapid changes in root HvPIP2;2 aquaporins abundance and ABA concentration are required to enhance root hydraulic conductivity and maintain leaf water potential in response to increased evaporative demand. *Funct Plant Biol* 45: 143–149
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 5: 283–291
- de Vos RCH, Hall RD, Moing A (2011) Metabolomics of a Model Fruit: Tomato. *Annual Plant Reviews Volume 43*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 109–155

- Waadt R, Seller CA, Hsu P-K, Takahashi Y, Munemasa S, Schroeder JI (2022) Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 680–694
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199–223
- Wang D, Chen Q, Chen W, Guo Q, Xia Y, Wang S, Jing D, Liang G (2021a) Physiological and transcription analyses reveal the regulatory mechanism of melatonin in inducing drought resistance in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 181: 104291
- Wang F, Sha J, Chen Q, Xu X, Zhu Z, Ge S, Jiang Y (2019a) Exogenous Abscisic Acid Regulates Distribution of ¹³C and ¹⁵N and Anthocyanin Synthesis in ‘Red Fuji’ Apple Fruit Under High Nitrogen Supply. *Front Plant Sci* 10: 1738
- Wang H-Q, Sun L-P, Wang L-X, Fang X-W, Li Z-Q, Zhang F-F, Hu X, Qi C, He J-M (2020a) Ethylene mediates salicylic-acid-induced stomatal closure by controlling reactive oxygen species and nitric oxide production in Arabidopsis. *Plant Science* 294: 110464
- Wang J, Sun Z, Wang X, Tang Y, Li X, Ren C, Ren J, Wang X, Jiang C, Zhong C, Zhao S, Zhang H, Liu X, Kang S, Zhao X, Yu H (2023) Transcriptome-based analysis of key pathways relating to yield formation stage of foxtail millet under different drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 13:
- Wang Q, Yu F, Xie Q (2020b) Balancing growth and adaptation to stress: Crosstalk between brassinosteroid and abscisic acid signaling. *Plant, Cell & Environment* 43: 2325–2335
- Wang W, Wang X, Huang M, Cai J, Zhou Q, Dai T, Cao W, Jiang D (2018a) Hydrogen Peroxide and Abscisic Acid Mediate Salicylic Acid-Induced Freezing Tolerance in Wheat. *Front Plant Sci* 9:
- Wang W-L, Wang Y-X, Li H, Liu Z-W, Cui X, Zhuang J (2018b) Two MYB transcription factors (CsMYB2 and CsMYB26) are involved in flavonoid biosynthesis in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *BMC Plant Biol* 18: 288
- Wang X-C, Wu J, Guan M-L, Zhao C-H, Geng P, Zhao Q (2020c) Arabidopsis MYB4 plays dual roles in flavonoid biosynthesis. *Plant J* 101: 637–652
- Wang Y, Chen Z-H, Zhang B, Hills A, Blatt MR (2013) PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors regulate K⁺ and Cl⁻ channels through reactive oxygen species-mediated activation of Ca²⁺ channels at the plasma membrane of intact Arabidopsis guard cells. *Plant Physiol* 163: 566–577
- Wang Y, Mostafa S, Zeng W, Jin B (2021b) Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses. *Int J Mol Sci* 22: 8568
- Wang Y-T, Chen Z-Y, Jiang Y, Duan B-B, Xi Z-M (2019b) Involvement of ABA and antioxidant system in brassinosteroid-induced water stress tolerance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 256: 108596
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frey NF dit, Leung J (2008) An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More *Molecular Plant* 1: 198–217

- Watanabe S, Sato M, Sawada Y, Tanaka M, Matsui A, Kanno Y, Hirai MY, Seki M, Sakamoto A, Seo M (2018) *Arabidopsis molybdenum cofactor sulfurase ABA3* contributes to anthocyanin accumulation and oxidative stress tolerance in ABA-dependent and independent ways. *Sci Rep* 8: 16592
- Watkins JM, Chapman JM, Muday GK (2017) Abscisic Acid-Induced Reactive Oxygen Species Are Modulated by Flavonols to Control Stomata Aperture1[OPEN]. *Plant Physiol* 175: 1807–1825
- Wei X-R, Ling W, Ma Y-W, Du J-L, Cao F-X, Chen H-X, Chen J-R, Li Y-F (2022) Genome-Wide Analysis of the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene Family in Rose (*Rosa chinensis*) and Differential Expression under Heat Stress. *Horticulturae* 8: 429
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmölling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol (Stuttg)* 8: 371–381
- Wiebe HH, Poovaiah BW (1973) Influence of Moisture, Heat, and Light Stress on Hydrogen Fluoride Fumigation Injury to Soybeans 1. *Plant Physiology* 52: 542–545
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25: 195–210
- Williams TCR, Poolman MG, Howden AJM, Schwarzlander M, Fell DA, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ (2010) A Genome-Scale Metabolic Model Accurately Predicts Fluxes in Central Carbon Metabolism under Stress Conditions. *Plant Physiology* 154: 311–323
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 218–223
- Wolf A, Akshalov K, Saliendra N, Johnson DA, Laca EA (2006) Inverse estimation of V_{cmax} , leaf area index, and the Ball-Berry parameter from carbon and energy fluxes. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 111:
- Wu J, Kim SG, Kang KY, Kim J-G, Park S-R, Gupta R, Kim YH, Wang Y, Kim ST (2016) Overexpression of a Pathogenesis-Related Protein 10 Enhances Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Plant Pathol J* 32: 552–562
- Wu M, Xu X, Hu X, Liu Y, Cao H, Chan H, Gong Z, Yuan Y, Luo Y, Feng B, Li Z, Deng W (2020) SIMYB72 Regulates the Metabolism of Chlorophylls, Carotenoids, and Flavonoids in Tomato Fruit. *Plant Physiol* 183: 854–868
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Res* 37: W652–W660
- Xia X, Cheng X, Li R, Yao J, Li Z, Cheng Y (2021) Advances in application of genome editing in tomato and recent development of genome editing technology. *Theor Appl Genet* 134: 2727–2747
- Xu H, Li J, Wang L, Li X, Liu Y, Wang X, Gao T, Ma Y (2023a) Integrated transcriptomic and metabolomics analysis reveals abscisic acid signal transduction and sugar metabolism pathways as defense responses to cold stress in *Argyranthemum frutescens*. *Environmental and Experimental Botany* 205: 105115

- Xu J, Lu X, Liu Y, Lan W, Wei Z, Yu W, Li C (2024) Interaction between ABA and NO in plants under abiotic stresses and its regulatory mechanisms. *Front Plant Sci* 15: 1330948
- Xu P, Chen H, Cai W (2020) Transcription factor CDF4 promotes leaf senescence and floral organ abscission by regulating abscisic acid and reactive oxygen species pathways in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* 21: e48967
- Xu Z, Wang J, Ma Y, Wang F, Wang J, Zhang Y, Hu X (2023b) The bZIP transcription factor SIAREB1 regulates anthocyanin biosynthesis in response to low temperature in tomato. *Plant J* 115: 205–219
- Yamaguchi N (2022) Heat memory in plants: histone modifications, nucleosome positioning and miRNA accumulation alter heat memory gene expression. *Genes Genet Syst* 96: 229–235
- Yang A, Dai X, Zhang W-H (2012a) A R2R3-type MYB gene, OsMYB2, is involved in salt, cold, and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany* 63: 2541–2556
- Yang L, Yang Y, Huang L, Cui X, Liu Y (2023) From single- to multi-omics: future research trends in medicinal plants. *Brief Bioinform* 24: bbac485
- Yang Q, Deng X, Liu T, Qian J, Zhang P, Zhu E, Wang J, Zhu X, Kudoyarova G, Zhao J, Zhang K (2024) Abscisic acid root-to-shoot translocation by transporter AtABCG25 mediates stomatal movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 195: 671–684
- Yang W, Liu X-D, Chi X-J, Wu C-A, Li Y-Z, Song L-L, Liu X-M, Wang Y-F, Wang F-W, Zhang C, Liu Y, Zong J-M, Li H-Y (2011) Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta* 233: 219–229
- Yang X, Zhu X, Wei J, Li W, Wang H, Xu Y, Yang Z, Xu C, Li P (2022) Primary root response to combined drought and heat stress is regulated via salicylic acid metabolism in maize. *BMC Plant Biol* 22: 417
- Yang Z-B, Eticha D, Albacete A, Rao IM, Roitsch T, Horst WJ (2012b) Physiological and molecular analysis of the interaction between aluminium toxicity and drought stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 63: 3109–3125
- Ye J, Hu T, Yang C, Li H, Yang M, Ijaz R, Ye Z, Zhang Y (2015) Transcriptome Profiling of Tomato Fruit Development Reveals Transcription Factors Associated with Ascorbic Acid, Carotenoid and Flavonoid Biosynthesis. *PLoS ONE* 10: e0130885
- Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M (2005) The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The Plant Journal* 42: 862–876
- Yeshi K, Crayn D, Ritmejeriytè E, Wangchuk P (2022) Plant Secondary Metabolites Produced in Response to Abiotic Stresses Has Potential Application in Pharmaceutical Product Development. *Molecules* 27: 313
- Yoon Y, Seo DH, Shin H, Kim HJ, Kim CM, Jang G (2020) The Role of Stress-Responsive Transcription Factors in Modulating Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Agronomy* 10: 788

- Yoshida T, Christmann A, Yamaguchi-Shinozaki K, Grill E, Fernie AR (2019) Revisiting the Basal Role of ABA – Roles Outside of Stress. *Trends in Plant Science* 24: 625–635
- Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 21: 133–139
- Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K (2015) Omics Approaches Toward Defining the Comprehensive Abscisic Acid Signaling Network in Plants. *Plant and Cell Physiology* 56: 1043–1052
- Yu B, Ming F, Liang Y, Wang Y, Gan Y, Qiu Z, Yan S, Cao B (2022) Heat Stress Resistance Mechanisms of Two Cucumber Varieties from Different Regions. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1817
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, Rodermeil S, Yin Y (2011) A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65: 634–646
- Yuan G-F, Jia C-G, Li Z, Sun B, Zhang L-P, Liu N, Wang Q-M (2010) Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Scientia Horticulturae* 126: 103–108
- Yuan T-T, Xu H-H, Zhang K-X, Guo T-T, Lu Y-T (2014) Glucose inhibits root meristem growth via 5, which represses PIN1 accumulation and auxin activity in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 37: 1338–1350
- Yun YB, Park JI, Choi HS, Jung H, Jang SJ, Back K, Kuk YI (2013) Protoporphyrinogen Oxidase–Overexpressing Transgenic Rice is Resistant to Drought Stress. *Crop Science* 53: 1076–1085
- Zaharah SS, Singh Z, Symons GM, Reid JB (2013) Mode of action of abscisic acid in triggering ethylene biosynthesis and softening during ripening in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 75: 37–44
- Zahedi SM, Hosseini MS, Abadía J, Marjani M (2020) Melatonin foliar sprays elicit salinity stress tolerance and enhance fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Plant Physiology and Biochemistry* 149: 313–323
- Zahra N, Hafeez MB, Ghaffar A, Kausar A, Zeidi MA, Siddique KHM, Farooq M (2023) Plant photosynthesis under heat stress: Effects and management. *Environmental and Experimental Botany* 206: 105178
- Zandalinas SI, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A, Inupakutika MA, Mittler R (2016a) ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress. *Journal of Experimental Botany* 67: 5381–5390
- Zandalinas SI, Mittler R (2022) Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist* 234: 1161–1167
- Zandalinas SI, Peláez-Vico MÁ, Sinha R, Pascual LS, Mittler R (2024) The impact of multifactorial stress combination on plants, crops, and ecosystems: how should we prepare for what comes next? *Plant J* 117: 1800–1814

- Zandalinas SI, Rivero RM, Martínez V, Gómez-Cadenas A, Arbona V (2016b) Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biol* 16: 105
- Zandalinas SI, Sengupta S, Fritschi FB, Azad RK, Nechushtai R, Mittler R (2021) The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. *New Phytologist* 230: 1034–1048
- Zdunek-Zastocka E, Lips HS (2003) Plant molybdoenzymes and their response to stress. *Acta Physiol Plant* 25: 437–452
- Zhang J, Shi Y, Zhang X, Du H, Xu B, Huang B (2017) Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environmental and Experimental Botany* 138: 36–45
- Zhang J, Tuskan GA, Tschaplinski TJ, Muchero W, Chen J-G (2020a) Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Lignin Biosynthesis Pathway Genes in *Populus*. *Frontiers in Plant Science* 11:
- Zhang J-H, Liu Y-P, Pan Q-H, Zhan J-C, Wang X-Q, Huang W-D (2006) Changes in membrane-associated H⁺-ATPase activities and amounts in young grape plants during the cross adaptation to temperature stresses. *Plant Science* 170: 768–777
- Zhang XL, Jiang L, Xin Q, Liu Y, Tan JX, Chen ZZ (2015) Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front Plant Sci* 6:
- Zhang Y, Berman A, Shani E (2023) Plant Hormone Transport and Localization: Signaling Molecules on the Move. *Annu Rev Plant Biol* 74: 453–479
- Zhang Y, Li T-T, Wang L-F, Guo J-X, Lu K-K, Song R-F, Zuo J-X, Chen H-H, Liu W-C (2022) Abscisic acid facilitates phosphate acquisition through the transcription factor ABA INSENSITIVE5 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 111: 269–281
- Zhang Y, Li Y, Hassan MJ, Li Z, Peng Y (2020b) Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. *BMC Plant Biology* 20: 150
- Zhao J, Missihoun TD, Bartels D (2017) The role of *Arabidopsis* aldehyde dehydrogenase genes in response to high temperature and stress combinations. *J Exp Bot* 68: 4295–4308
- Zhao M, Jin J, Wang J, Gao T, Luo Y, Jing T, Hu Y, Pan Y, Lu M, Schwab W, Song C (2022) Eugenol functions as a signal mediating cold and drought tolerance via UGT71A59-mediated glucosylation in tea plants. *The Plant Journal* 109: 1489–1506
- Zhao P, Li Q, Li J, Wang L, Ren Z (2014) Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics* 289: 1183–1207
- Zheng H, Wang W, Xu K, Xu Y, Ji D, Chen C, Xie C (2020) Ca²⁺ influences heat shock signal transduction in *Pyropia haitanensis*. *Aquaculture* 516: 734618
- Zheng Z, Guo Y, Novák O, Chen W, Ljung K, Noel JP, Chory J (2016) Local auxin metabolism regulates environment-induced hypocotyl elongation. *Nature Plants* 2: 1–9

- Zhou H, Shi H, Yang Y, Feng X, Chen X, Xiao F, Lin H, Guo Y (2024) Insights into plant salt stress signaling and tolerance. *Journal of Genetics and Genomics* 51: 16–34
- 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: 4371–4383
- Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross ARS, Taylor DC, Abrams SR (2004) A New Abscisic Acid Catabolic Pathway. *Plant Physiol* 134: 361–369
- Zhu H, Guo J, Ma T, Liu S, Zhou Y, Yang X, Li Q, Yu K, Wang T, He S, Zhao C, Wang J, Sui J (2023) The Sweet Potato K⁺ Transporter IbHAK11 Regulates K⁺ Deficiency and High Salinity Stress Tolerance by Maintaining Positive Ion Homeostasis. *Plants (Basel)* 12: 2422
- Zhu L, Guan Y, Zhang Z, Song A, Chen S, Jiang J, Chen F (2020) CmMYB8 encodes an R2R3 MYB transcription factor which represses lignin and flavonoid synthesis in chrysanthemum. *Plant Physiol Biochem* 149: 217–224
- Zhu T, Fonseca De Lima CF, De Smet I (2021) The heat is on: how crop growth, development, and yield respond to high temperature. *Journal of Experimental Botany* 72: 7359–7373
- Zlatev Z, Lidon F (2005) Effects of water deficit on plant growth, water relations and photosynthesis. *Biologia Vegetal e Agro-Industrial* 2: 235–252
- Zocchi E, Basile G, Cerrano C, Bavestrello G, Giovine M, Bruzzone S, Guida L, Carpaneto A, Magrassi R, Usai C (2003) ABA- and cADPR-mediated effects on respiration and filtration downstream of the temperature-signaling cascade in sponges. *J Cell Sci* 116: 629–636
- Zulfiqar F, Akram NA, Ashraf M (2019) Osmoprotection in plants under abiotic stresses: new insights into a classical phenomenon. *Planta* 251: 3

ANEXOS

ANEXOS

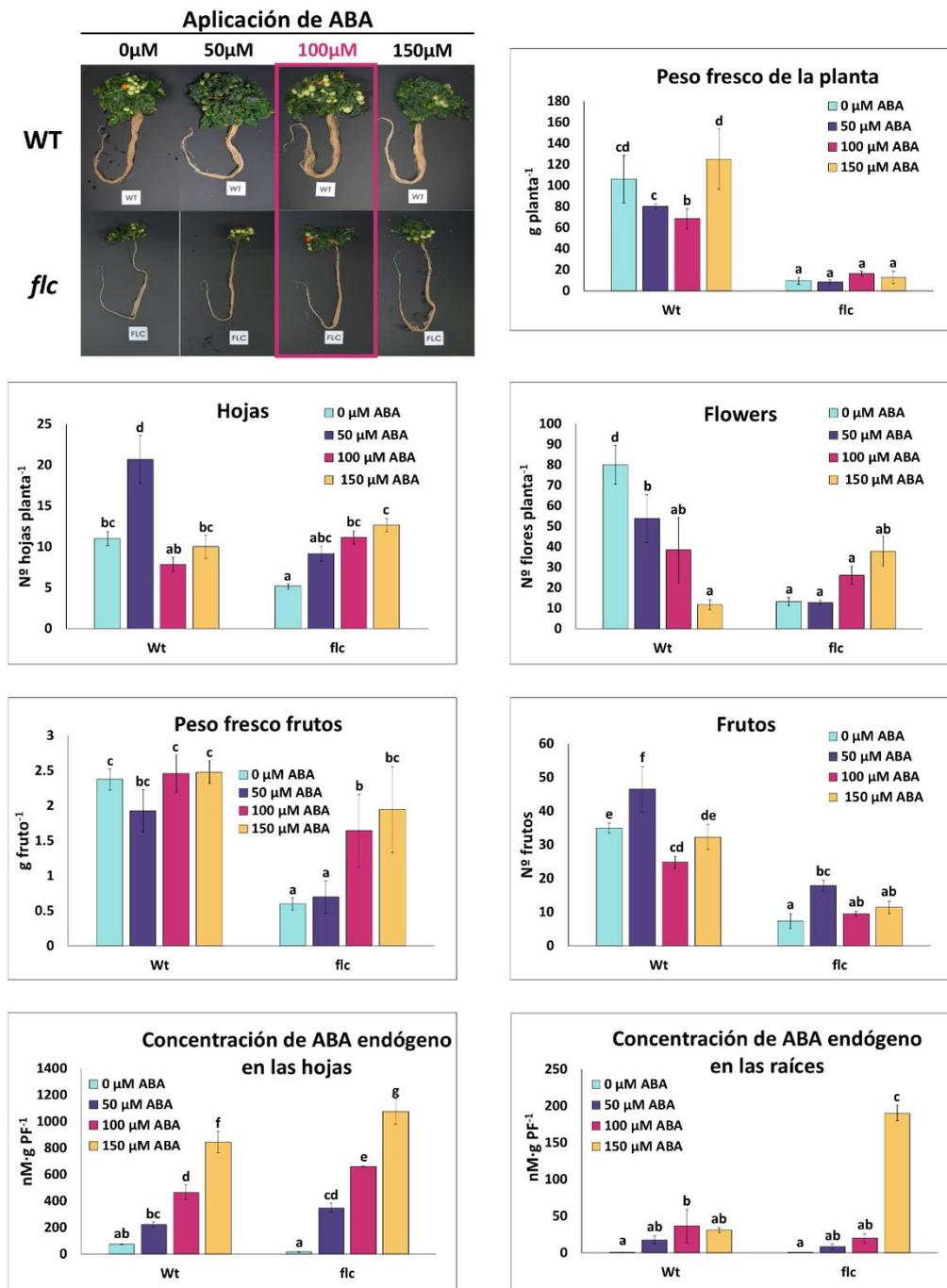


Figura S1. Experimento preliminar en el mutante *flc* para el establecimiento de la concentración de ABA exógeno idónea.

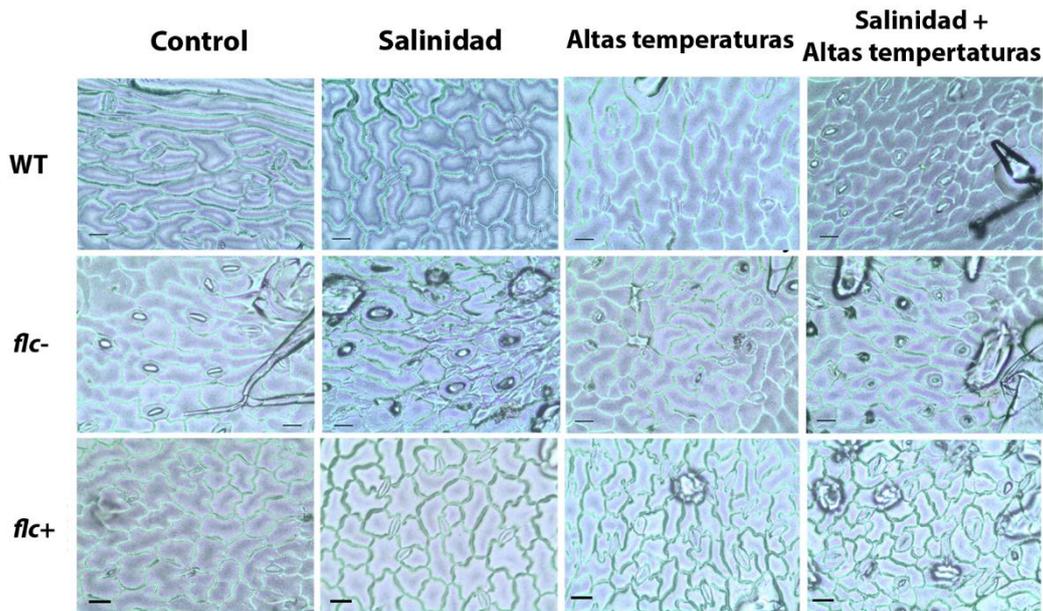


Figura S2. Micrografía de microscopía óptica de la superficie foliar adaxial de tomate WT y mutantes *flc* cultivados bajo condiciones control, salinidad, estrés térmico, o su combinación. Barras de escala: 100 μ m.

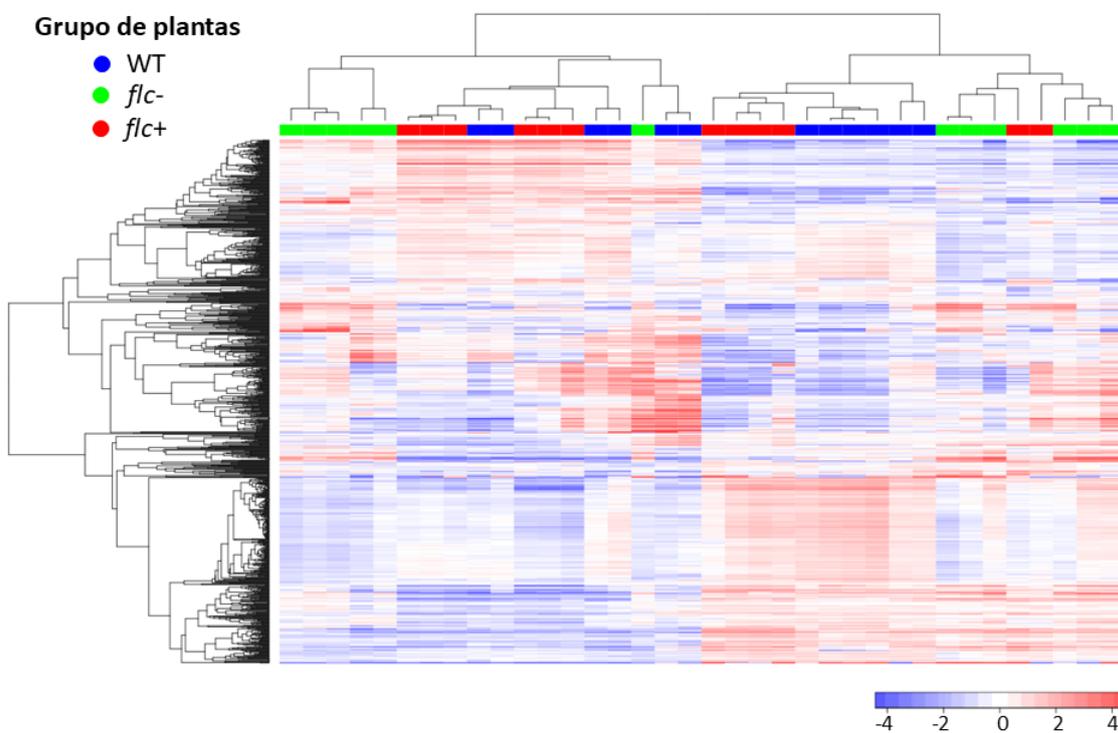


Figura S3. Análisis de agrupación jerárquica (HCA) del análisis transcriptómico en hojas de plantas de tomate.

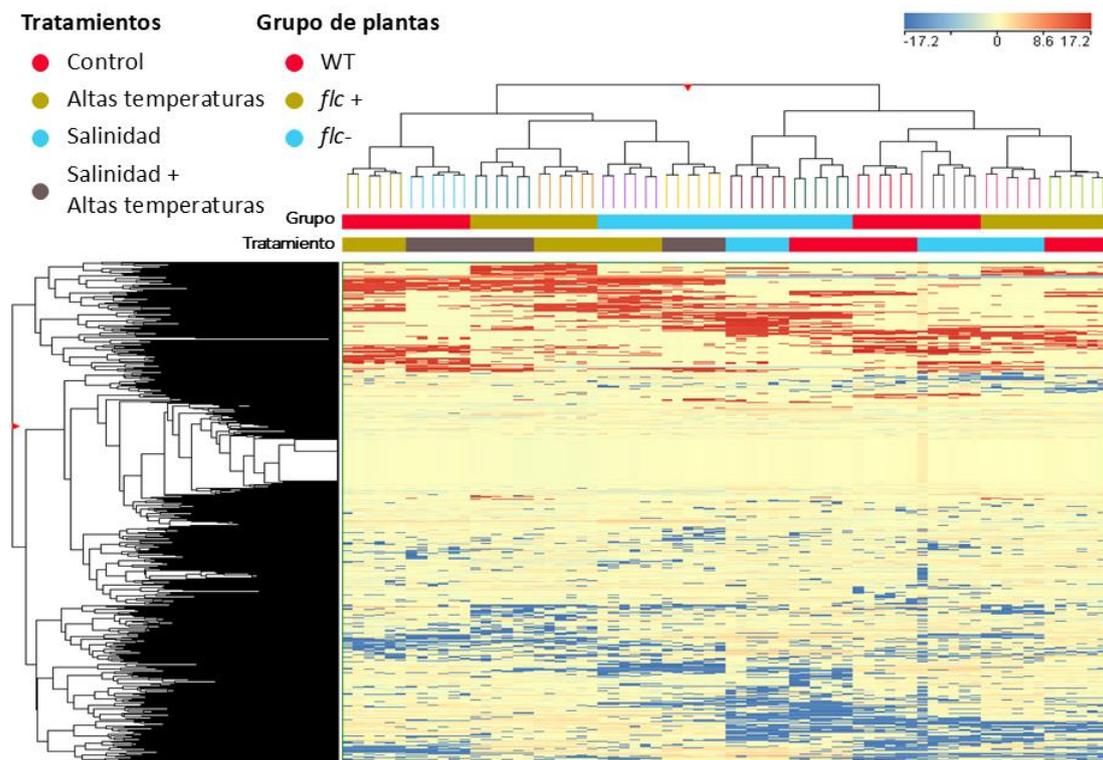


Figura S4. Análisis de agrupación jerárquica (HCA) del análisis metabolómico en hojas de plantas de tomate.

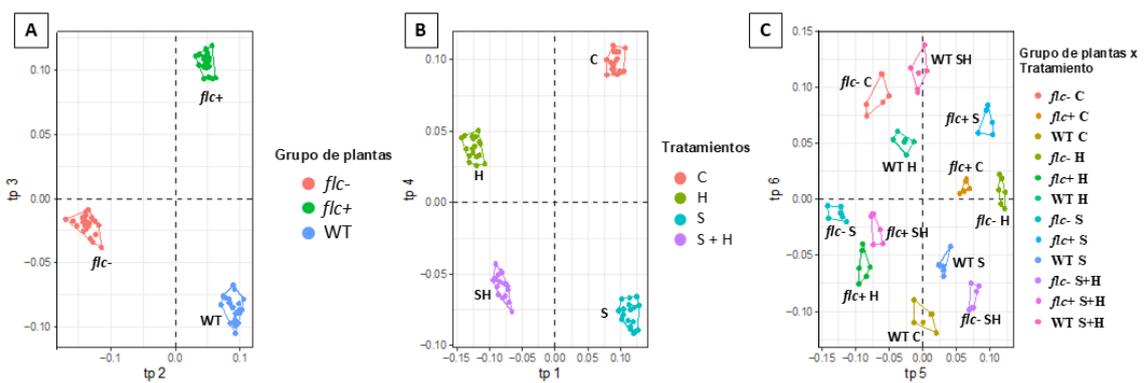


Figura S5. Los gráficos de puntuaciones AMOPLS-DA correspondientes a los componentes predictivos (tp) del análisis metabolómico de hojas de tomate asociado a tres factores: (A) grupo de plantas (B) tratamiento y (C) grupo de plantas x tratamiento.

● Control ● Salinidad ● Alta temperatura ● Salinidad + Alta temperatura

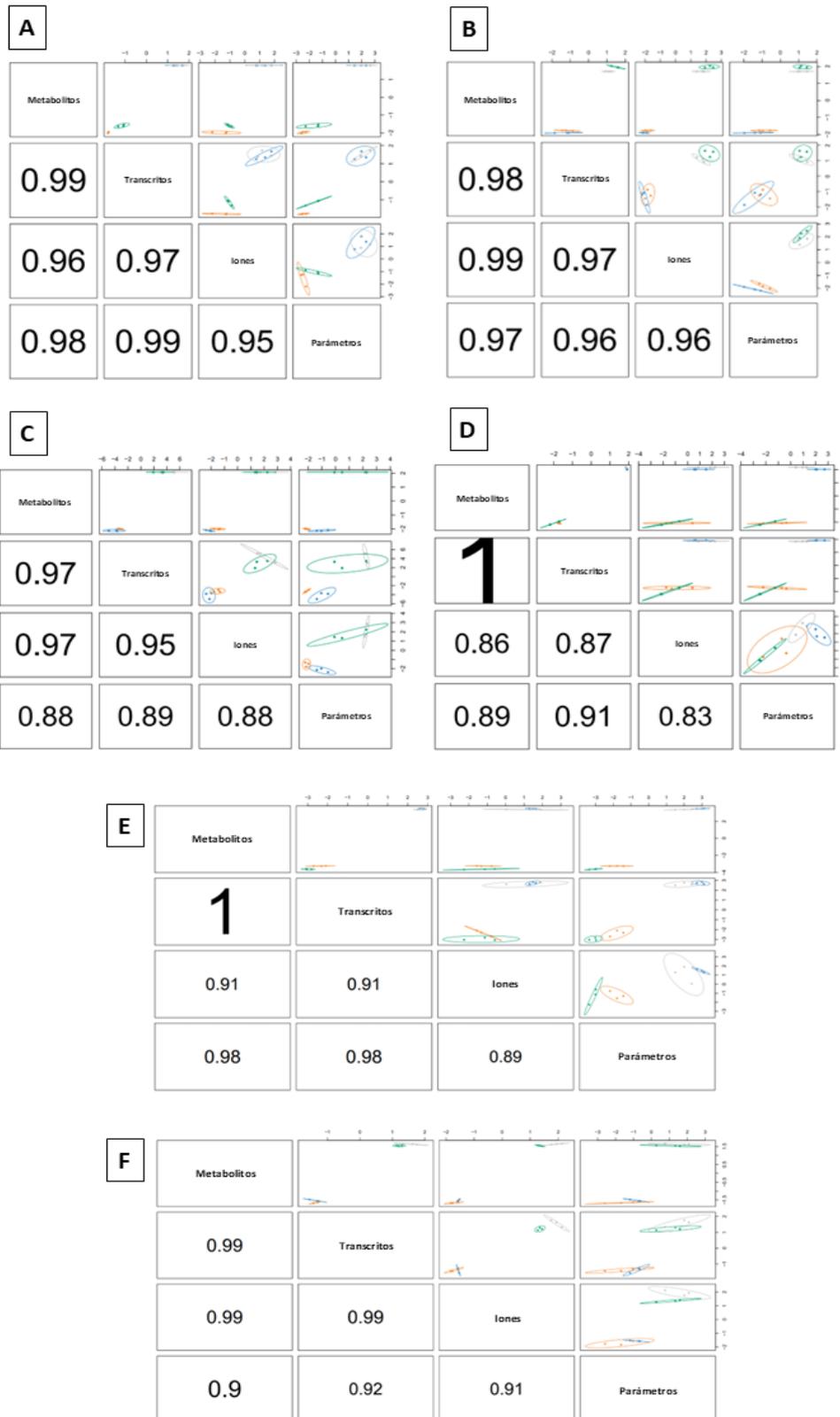


Figura S6. Diagnóstico sPLS de los análisis multiómicos. (A) Componente 1 en el modelo *flc-*. (B) Componente 2 en el modelo *flc-*. (C) Componente 1 en el modelo *flc+*. (D) Componente 2 en el modelo *flc+*. (E) Componente 1 en el modelo WT. (F) Componente 2 en el modelo WT.

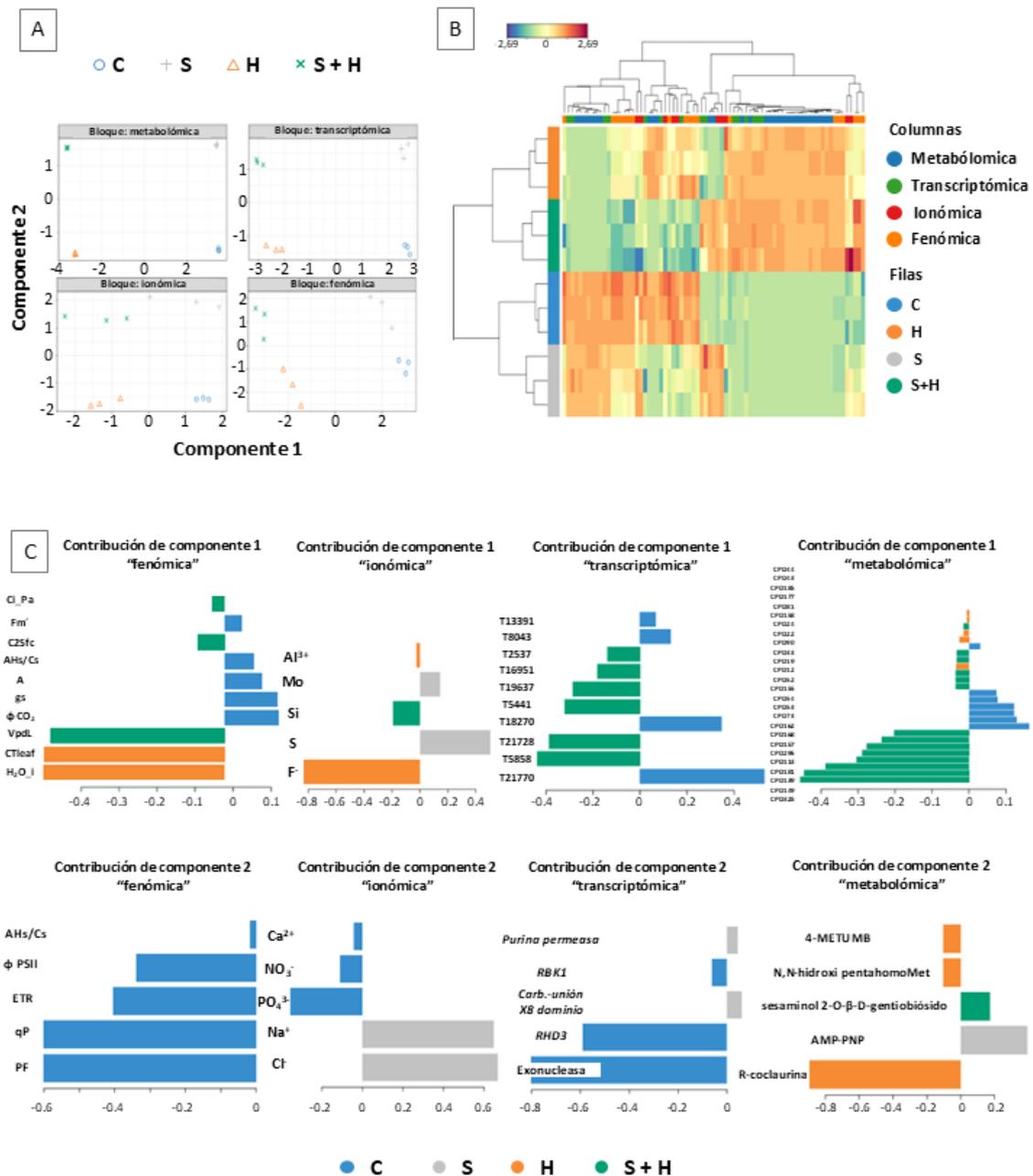


Figura S7. Análisis multiómico en plantas WT utilizando el software mixOmics. (A) Análisis sPLS-DA en cada ómica. (B) Gráfico de correlación Heatmap de las características más discriminantes seleccionadas de los conjuntos de datos fenómicos, ionómicos, transcriptómicos y metabolómicos. Las ómicas se representan en columnas y los tratamientos en filas. (C) Gráfico de carga de cada característica seleccionada con la máxima capacidad de discriminación en la primera y segunda componente en cada conjunto de datos ómicos. El color indica el tratamiento de estrés aplicado. Los compuestos de la componente 1 de la metabolómica están nombrados en la **Tabla S5**.

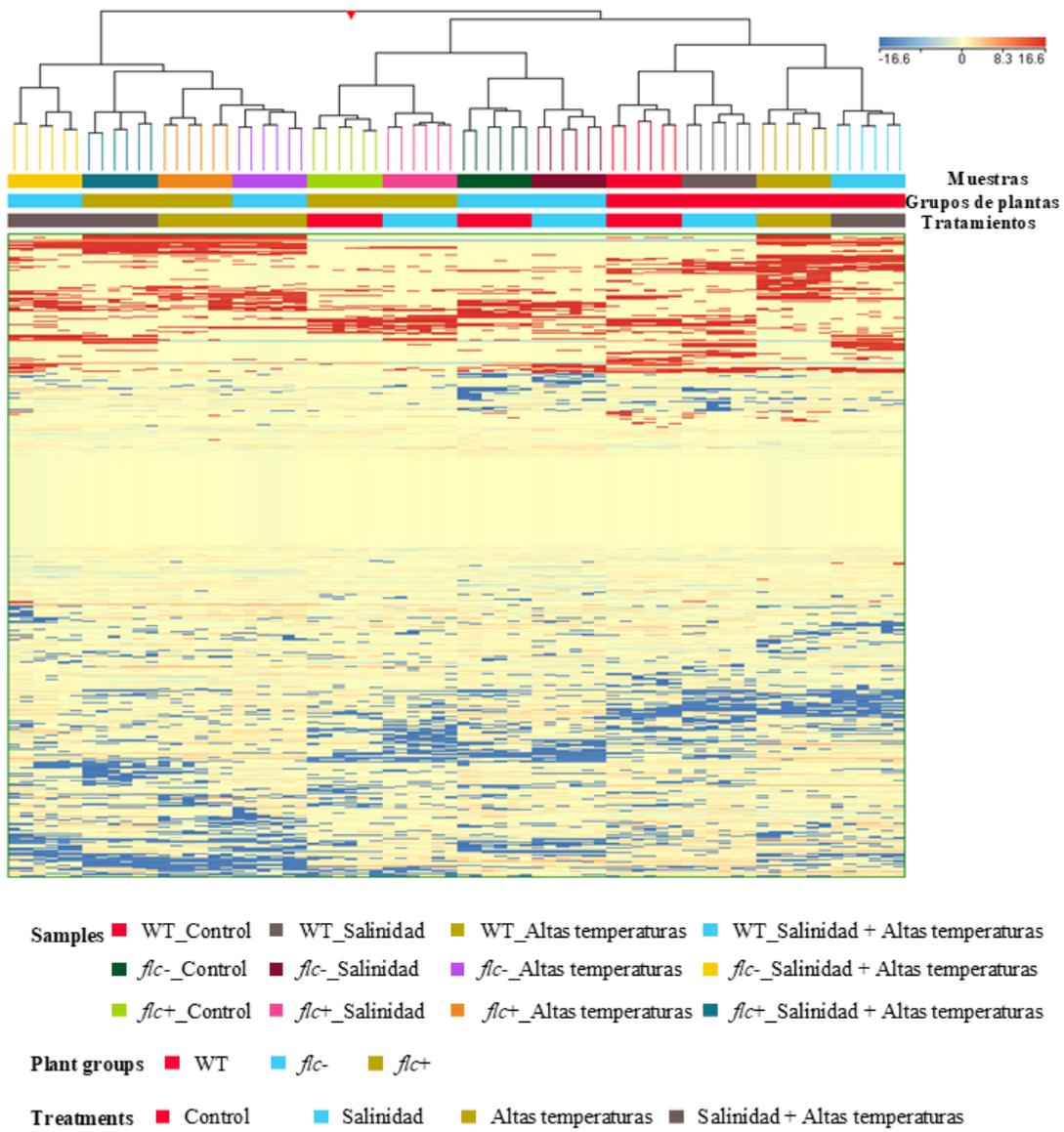


Figura S8. Análisis de agrupación jerárquica (HCA) para el análisis metabolómico en raíces de planta de tomate.

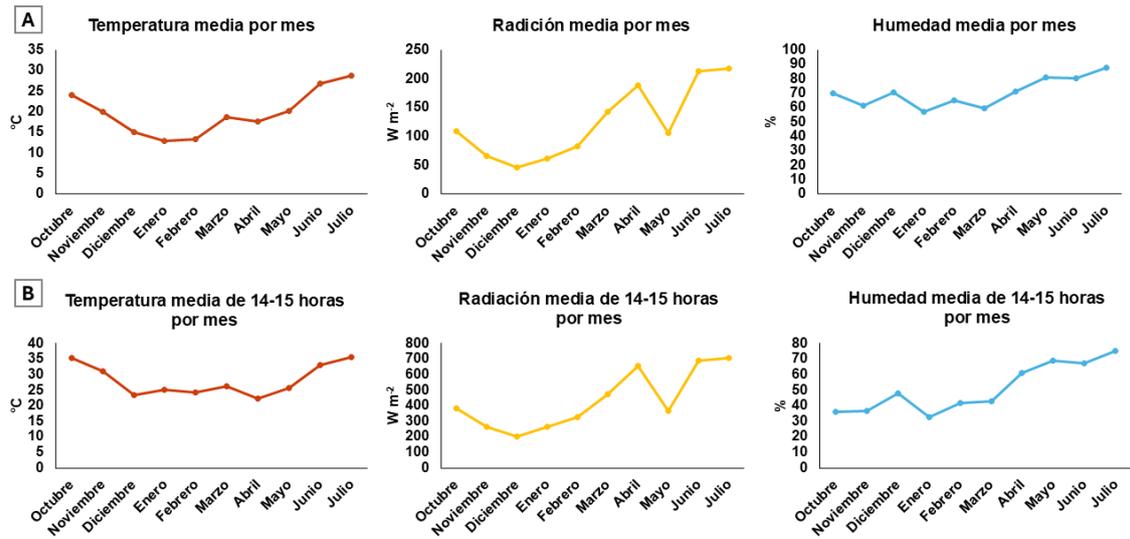


Figura S9. Gráficos de los datos de temperatura, radiación y humedad del interior del invernadero. (A) Datos medios del mes. (B) Datos medios del mes medidos de 14:00 a 15:00 horas.

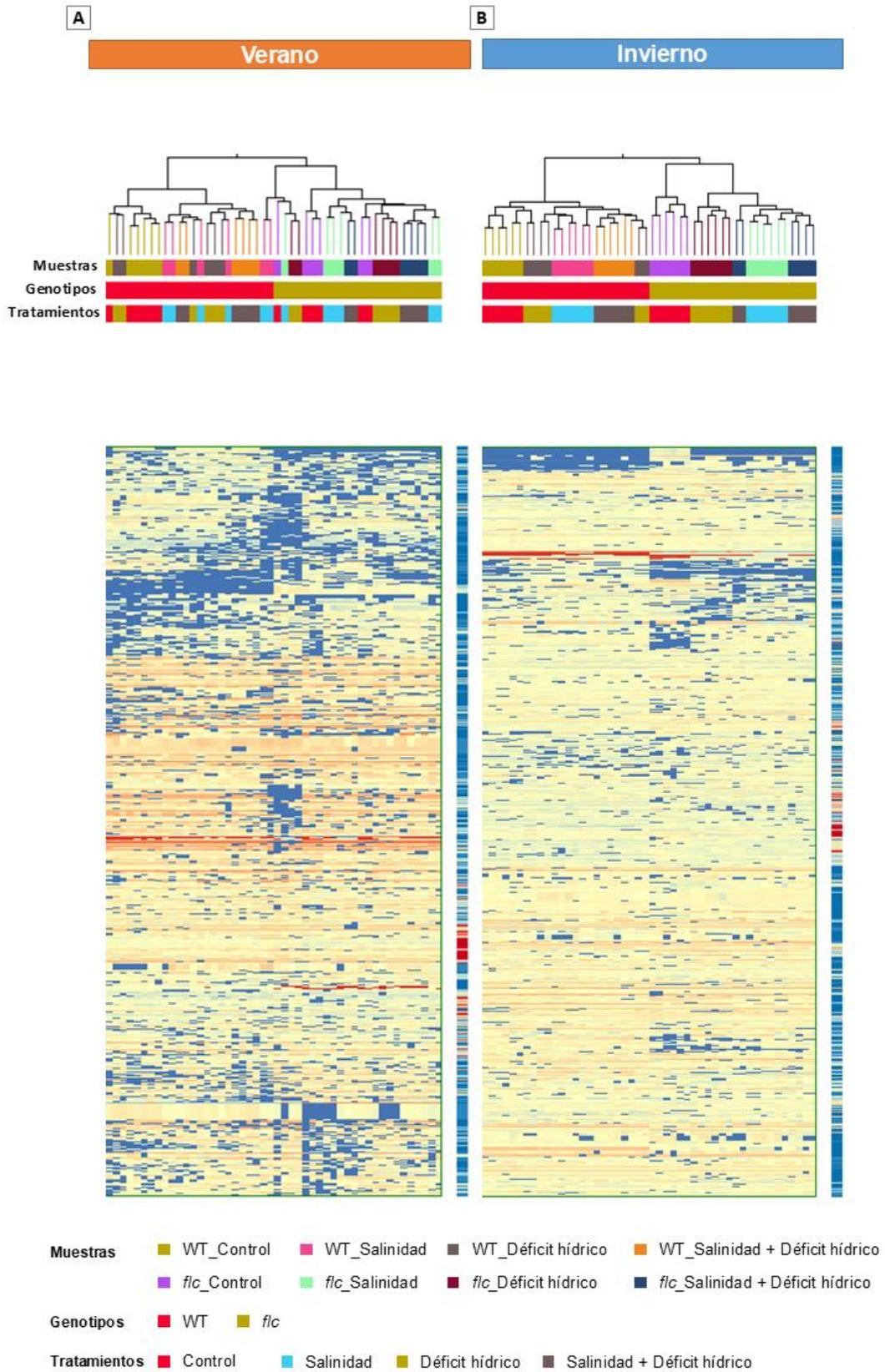


Figura S10. Análisis de agrupación jerárquica (HCA) del análisis metabolómico en frutos de plantas de tomate.

Gen	Wt_H-		Wt_S-		Wt_SH-		flc_H-		flc_S-		flc_SH-	
	Wt_C_	p-valor	Wt_C_	p-valor	Wt_C_	p-valor	flc_C_	p-valor	flc_C_	p-valor	flc_C_	p-valor
	$-\log_2FC$		$-\log_2FC$		$-\log_2FC$		$-\log_2FC$		$-\log_2FC$		$-\log_2FC$	
<i>bHLH</i>	-2.57	0.000	-1.80	0.002	-1.89	0.000	-1.84	0.000	-1.22	0.996	0.02	0.017
<i>sf3a60</i>	-0.01	0.985	0.10	0.928	0.28	0.434	0.32	0.424	0.23	0.793	0.35	0.358
<i>P_ATPasa</i>	0.37	0.219	0.25	0.698	0.12	0.758	-0.05	0.934	0.14	0.894	-0.02	0.973
<i>P_ATPasa_2</i>	1.66	0.001	0.53	0.665	0.80	0.160	0.70	0.280	0.81	0.345	-1.66	0.002
<i>DF4R</i>	-1.92	0.001	-0.37	0.823	-2.81	0.000	-1.46	0.019	-2.45	0.761	1.49	0.000
<i>F3'H</i>	-2.58	0.000	-0.59	0.687	-3.01	0.000	-1.21	0.087	-1.91	0.688	1.60	0.003
<i>CHS</i>	-2.67	0.087	-2.88	0.218	-3.78	0.010	-4.05	0.008	-3.93	0.777	1.18	0.010
<i>bHLH150</i>	-1.24	0.000	-0.59	0.353	-1.71	0.000	-0.02	0.989	-0.18	0.126	1.80	0.774
<i>F3H</i>	0.33	0.633	-0.26	0.870	0.20	0.785	-0.40	0.584	0.22	0.006	1.56	0.790



Tabla S1. Expresión génica de los genes codificadores de las proteínas contenidas en la red de interacción proteica de SIMYB50 y SIMYB86.

Grupo de plantas	Tratamientos	<i>Ci</i>	<i>Fo'</i>	<i>Fm'</i>	<i>Fs</i>	<i>Vpdl</i>	<i>CTleaf</i>	<i>H₂O_i</i>	<i>gs total</i>
		$\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$				kPa	$^{\circ}\text{C}$	mmol mol^{-1}	
WT	Control	268.4 ± 4.539 a	295.8 ± 1.145 b	726.0 ± 8.470 def	395.5 ± 1.161	1.710 ± 0.041 abc	26.21 ± 0.231 a	33.75 ± 0.460 a	0.317 ± 0.018 a
	Salinidad	282.3 ± 8.747 a	278.3 ± 16.36 ab	573.0 ± 25.10 abcdef	388.5 ± 29.28	2.013 ± 0.055 bcd	25.83 ± 0.191 a	33.02 ± 0.374 a	0.172 ± 0.020 a
	Altas temperaturas	290.9 ± 2.287 a	260.6 ± 13.38 ab	533.5 ± 24.92 abcdef	335.0 ± 26.71	3.302 ± 0.103 ef	35.98 ± 0.225 c	58.90 ± 0.732 cd	0.139 ± 0.017 a
	Salinidad + Altas temperaturas	349.1 ± 8.597 b	247.4 ± 18.89 ab	474.9 ± 35.42 ab	358.7 ± 30.20	3.613 ± 0.037 f	36.01 ± 0.155 c	58.97 ± 0.504 d	0.068 ± 0.007 a
<i>flc-</i>	Control	336.7 ± 1.739 b	280.2 ± 0.798 ab	761.0 ± 16.17 f	370.2 ± 0.496	1.037 ± 0.047 a	25.40 ± 0.350 a	32.18 ± 0.670 a	1.100 ± 0.054 b
	Salinidad	357.0 ± 8.216 b	296.3 ± 13.77 b	678.8 ± 56.31 cdef	402.2 ± 24.91	1.255 ± 0.099 ab	24.47 ± 0.586 a	30.47 ± 1.055 a	0.936 ± 0.071 b
	Altas temperaturas	350.0 ± 6.260 b	264.3 ± 17.20 ab	667.7 ± 51.51 bcdef	362.6 ± 23.89	1.553 ± 0.371 ab	33.02 ± 1.056 bc	50.11 ± 3.042 bc	1.363 ± 0.321 b
	Salinidad + Altas temperaturas	349.4 ± 4.798 b	221.2 ± 15.54 a	581.2 ± 60.22 abcdef	333.6 ± 35.21	1.661 ± 0.276 abc	31.68 ± 0.961 b	46.42 ± 2.582 b	1.068 ± 0.156 b
<i>flc+</i>	Control	263.4 ± 6.524 a	292.4 ± 5.242 ab	734.2 ± 29.11 ef	353.5 ± 2.243	2.514 ± 0.136 cde	33.25 ± 0.574 bc	50.65 ± 1.619 bcd	0.266 ± 0.031 a
	Salinidad	274.8 ± 5.689 a	263.1 ± 23.63 ab	542.9 ± 51.51 abcde	363.7 ± 28.69	2.056 ± 0.088 bcd	26.86 ± 0.188 a	35.08 ± 0.390 a	0.183 ± 0.033 a
	Altas temperaturas	351.2 ± 6.455 b	255.0 ± 17.45 ab	493.0 ± 33.54 abc	329.2 ± 24.13	3.268 ± 0.103 ef	35.83 ± 0.204 c	58.40 ± 0.636 cde	0.157 ± 0.028 a
	Salinidad + Altas temperaturas	343.2 ± 22.38 b	254.0 ± 10.08 ab	464.8 ± 31.30 a	342.3 ± 29.07	2.801 ± 0.279 def	30.72 ± 1.541 b	44.13 ± 3.772 b	0.100 ± 0.023 a

Grupo de plantas	Tratamientos	<i>gs CO₂</i>	<i>Ci_Pa</i>	<i>RHsfsc</i>	<i>C2Sfc</i>	<i>AHs/Cs</i>	<i>ETR</i>	<i>qP</i>	<i>qN</i>
		$\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Pa	% Humedad superficial	CO_2 superficial (Émol/mol)	Parámetro Berry	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$		
WT	Control	0.199 ± 0.011 a	27.17 ± 0.459 a	50.39 ± 0.927 bc	384.1 ± 0.461 abc	0.028 ± 0.001 cd	193.4 ± 3.270	0.767 ± 0.009 cde	2.454 ± 0.021 cd
	Salinidad	0.107 ± 0.013 a	28.57 ± 0.885 a	39.51 ± 1.128 ab	392.3 ± 1.451 efg	0.011 ± 0.002 ab	137.5 ± 10.21	0.627 ± 0.034 abc	2.063 ± 0.052 ab
	Altas temperaturas	0.087 ± 0.011 a	29.45 ± 0.231 a	43.06 ± 1.213 ab	393.7 ± 0.688 efg	0.008 ± 0.001 ab	159.0 ± 10.34	0.730 ± 0.038 bcde	2.049 ± 0.042 ab
	Salinidad + Altas temperaturas	0.043 ± 0.004 a	35.35 ± 0.870 b	37.37 ± 0.150 a	398.1 ± 0.204 g	0.001 ± 0.000 a	104.6 ± 3.728	0.513 ± 0.023 a	1.920 ± 0.029 a
<i>flc-</i>	Control	0.699 ± 0.035 b	34.09 ± 0.176 b	71.13 ± 1.364 d	378.2 ± 0.563 a	0.052 ± 0.002 e	218.0 ± 4.061	0.812 ± 0.004 de	2.715 ± 0.062 d
	Salinidad	0.593 ± 0.046 b	36.13 ± 0.831 b	62.56 ± 2.053 cd	387.6 ± 2.296 cde	0.023 ± 0.005 bcd	171.3 ± 14.22	0.719 ± 0.022 bcde	2.290 ± 0.154 bc
	Altas temperaturas	0.872 ± 0.208 b	35.44 ± 0.634 b	72.88 ± 5.934 d	380.9 ± 2.219 ab	0.038 ± 0.007 de	193.8 ± 3.754	0.755 ± 0.008 cde	2.521 ± 0.034 cd
	Salinidad + Altas temperaturas	0.679 ± 0.100 b	35.39 ± 0.486 b	67.73 ± 4.146 d	382.8 ± 0.779 abc	0.030 ± 0.003 cd	180.2 ± 11.48	0.688 ± 0.039 bcd	2.614 ± 0.098 cd
<i>flc+</i>	Control	0.167 ± 0.019 a	26.67 ± 0.660 a	50.54 ± 1.356 bc	385.4 ± 1.470 bcd	0.024 ± 0.003 bcd	219.8 ± 7.618	0.860 ± 0.012 e	2.510 ± 0.090 cd
	Salinidad	0.114 ± 0.020 a	27.82 ± 0.576 a	41.81 ± 2.091 ab	391.0 ± 0.953 def	0.013 ± 0.002 abc	139.3 ± 5.637	0.636 ± 0.021 abc	2.061 ± 0.014 ab
	Altas temperaturas	0.098 ± 0.018 a	35.56 ± 0.654 b	43.30 ± 1.415 ab	396.3 ± 0.296 fg	0.002 ± 0.000 a	141.0 ± 11.24	0.687 ± 0.054 bcd	1.933 ± 0.000 a
	Salinidad + Altas temperaturas	0.062 ± 0.014 a	34.76 ± 2.266 b	36.19 ± 1.542 a	397.5 ± 0.500 g	0.001 ± 0.000 a	112.3 ± 6.795	0.589 ± 0.048 ab	1.825 ± 0.052 a

Grupo de plantas	Tratamientos	<i>Cl</i>	<i>Na</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>S</i>	<i>Zn</i>	<i>F</i>	<i>NO₃⁻</i>
		mmol g DW^{-1}								
WT	Control	2.380 ± 0.176 a	17.19 ± 0.512 a	1693. ± 48.37 d	799.0 ± 41.97 c	256.2 ± 9.047 cd	128.1 ± 4.189 b	0.303 ± 0.012 abc	0.427 ± 0.016 ab	29.98 ± 0.475 e
	Salinidad	44.11 ± 1.842 bc	839.1 ± 152.9 bc	979.3 ± 89.23 abc	572.8 ± 17.75 ab	190.4 ± 1.527 abc	114.2 ± 11.29 ab	0.267 ± 0.032 ab	0.404 ± 0.045 ab	6.275 ± 1.041 abc
	Altas temperaturas	1.573 ± 0.163 a	23.67 ± 3.054 a	1374. ± 31.55 bcd	671.1 ± 28.51 bc	221.5 ± 20.61 abcd	98.12 ± 2.680 ab	0.440 ± 0.162 abcd	0.778 ± 0.075 cd	11.92 ± 0.706 bcd
	Salinidad + Altas temperaturas	23.31 ± 2.574 b	837.2 ± 123.1 bc	927.5 ± 43.69 ab	457.5 ± 31.37 a	158.0 ± 11.49 ab	84.18 ± 7.997 a	0.226 ± 0.024 a	0.644 ± 0.040 bcd	4.846 ± 1.174 a
<i>flc-</i>	Control	2.421 ± 0.159 a	25.67 ± 3.905 a	1615. ± 34.56 d	741.4 ± 15.59 bc	283.8 ± 5.641 d	129.0 ± 3.058 b	0.408 ± 0.028 abc	0.306 ± 0.030 a	15.99 ± 1.087 d
	Salinidad	32.58 ± 2.029 c	657.5 ± 109.3 bc	939.9 ± 178.7 ab	623.0 ± 32.09 ab	229.1 ± 39.86 abcd	98.58 ± 19.29 ab	0.327 ± 0.062 abc	0.325 ± 0.039 ab	5.937 ± 0.137 ab
	Altas temperaturas	2.242 ± 0.155 a	25.81 ± 3.170 a	1585. ± 146.3 d	704.2 ± 52.31 bc	223.0 ± 13.40 abcd	110.0 ± 5.797 ab	0.481 ± 0.072 abcd	0.481 ± 0.032 abc	12.29 ± 2.135 cd
	Salinidad + Altas temperaturas	27.13 ± 0.640 b	531.3 ± 54.48 bc	1457. ± 135.7 cd	574.4 ± 27.15 ab	204.1 ± 6.104 abcd	101.8 ± 7.860 ab	0.492 ± 0.007 abcd	0.456 ± 0.012 ab	4.131 ± 0.397 a
<i>flc+</i>	Control	1.772 ± 0.111 a	24.19 ± 6.522 a	1496. ± 133.3 d	823.1 ± 34.01 c	229.8 ± 8.320 bcd	127.5 ± 7.938 b	0.326 ± 0.035 abc	0.468 ± 0.042 abc	15.07 ± 1.260 d
	Salinidad	55.12 ± 13.45 bc	952.8 ± 112.2 c	636.6 ± 96.74 a	590.7 ± 40.14 ab	173.0 ± 26.36 abc	113.2 ± 2.833 ab	0.750 ± 0.203 cd	0.322 ± 0.072 a	5.748 ± 1.348 ab
	Altas temperaturas	1.363 ± 0.178 a	27.03 ± 4.089 a	937.1 ± 47.45 ab	607.0 ± 40.52 ab	156.6 ± 15.50 ab	101.6 ± 4.733 ab	0.693 ± 0.024 bcd	0.806 ± 0.149 d	11.32 ± 2.387 bcd
	Salinidad + Altas temperaturas	32.73 ± 11.11 bc	946.2 ± 46.14 c	855.5 ± 16.84 a	481.0 ± 9.199 a	142.2 ± 2.198 a	82.24 ± 5.772 a	0.897 ± 0.125 d	0.463 ± 0.065 abc	4.977 ± 0.346 a

Grupo de plantas	Tratamientos	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	B	Cu	Fe	P	Al	Cr	Mo
		mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹	mmol g DW ⁻¹
WT	Control	7.644 ± 0.125 ab	1.014 ± 0.064 abc	3.240 ± 0.155	0.317 ± 0.009 ab	2.059 ± 0.142	323.8 ± 12.47	4.035 ± 0.028 ab	0.087 ± 0.002	0.050 ± 0.010
	Salinidad	5.591 ± 0.231 a	0.871 ± 0.039 abc	4.190 ± 0.251	0.339 ± 0.038 ab	2.263 ± 0.049	285.9 ± 16.85	4.242 ± 0.091 ab	0.096 ± 0.003	0.051 ± 0.008
	Altas temperaturas	9.249 ± 0.132 bc	0.415 ± 0.018 a	4.120 ± 0.386	0.296 ± 0.020 ab	3.632 ± 1.870	271.8 ± 4.470	4.517 ± 0.201 ab	0.101 ± 0.006	0.033 ± 0.003
	Salinidad + Altas temperaturas	6.026 ± 1.231 a	1.077 ± 0.139 abc	3.436 ± 0.159	0.264 ± 0.032 a	1.657 ± 0.050	254.9 ± 23.92	4.662 ± 0.345 b	0.108 ± 0.011	0.028 ± 0.007
flc-	Control	11.74 ± 0.458 cd	1.362 ± 0.119 bc	3.390 ± 0.081	0.478 ± 0.017 b	2.400 ± 0.096	313.9 ± 2.704	3.999 ± 0.129 ab	0.085 ± 0.003	0.025 ± 0.001
	Salinidad	7.688 ± 0.207 ab	1.256 ± 0.125 bc	3.788 ± 0.912	0.385 ± 0.113 ab	2.000 ± 0.441	260.1 ± 48.72	3.900 ± 0.145 ab	0.096 ± 0.014	0.132 ± 0.110
	Altas temperaturas	13.74 ± 0.430 d	0.808 ± 0.037 ab	4.589 ± 0.450	0.351 ± 0.017 ab	1.992 ± 0.092	295.0 ± 11.89	3.922 ± 0.046 ab	0.086 ± 0.002	0.048 ± 0.008
	Salinidad + Altas temperaturas	7.149 ± 0.047 ab	0.949 ± 0.004 abc	3.787 ± 0.016	0.330 ± 0.019 ab	2.139 ± 0.117	275.4 ± 2.261	3.945 ± 0.047 ab	0.092 ± 0.001	0.036 ± 0.003
flc+	Control	14.15 ± 0.302 d	2.235 ± 0.139 de	2.856 ± 0.057	0.323 ± 0.019 ab	2.023 ± 0.092	298.1 ± 22.15	4.049 ± 0.056 ab	0.086 ± 0.003	0.046 ± 0.006
	Salinidad	8.183 ± 0.839 ab	1.352 ± 0.257 bc	3.682 ± 0.329	0.450 ± 0.046 ab	2.168 ± 0.123	303.8 ± 15.67	3.626 ± 0.366 a	0.088 ± 0.007	0.064 ± 0.010
	Altas temperaturas	11.97 ± 0.420 cd	1.559 ± 0.236 cd	4.407 ± 0.063	0.314 ± 0.022 ab	1.630 ± 0.194	274.4 ± 3.106	3.673 ± 0.253 a	0.095 ± 0.001	0.067 ± 0.004
	Salinidad + Altas temperaturas	8.474 ± 0.931 ab	2.416 ± 0.179 e	3.473 ± 0.191	0.258 ± 0.018 a	1.544 ± 0.077	293.9 ± 2.912	4.066 ± 0.090 ab	0.095 ± 0.001	0.036 ± 0.003

Tabla S2. Datos brutos de los análisis de fenómica e ionómica en hojas de plantas de tomate.

Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución						
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	To1
Grupo de plantas	16%	1.892	0.01	0.1%	100%	99.5%	0.2%	0.2%	0.5%	19.5%
Tratamiento	21%	2.188	0.01	100%	0.1%	0.1%	99.1%	0.2%	0.4%	16.9%
Grupo de plantas x Tratamiento	15%	1.379	0.01	0.1%	0.2%	0.2%	0.3%	99.2%	98.2%	26.7%
Residuos	48%	1	NA	0.1%	0.2%	0.2%	0.4%	0.4%	0.9%	36.9%

Tabla S3. Variabilidad relativa y contribuciones de bloque del análisis AMOPLS-DA de datos metabolómicos adquiridos de hoja de planta de tomate silvestre (WT) y de mutantes *flacca* sin (*flc-*) y con aplicación de ABA (*flc+*) bajo condiciones control, salinidad, altas temperaturas, y combinación de salinidad + altas temperaturas. RSS: Suma Relativa de Cuadrados, RSR: Relación de Estructura Residual, Tp: componentes predictivos, To: componente ortogonal.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Grupo	Tratamiento	Grupo x Tratamiento
CPD1125	5-hydroxy-CTP	N-cnt	nucleótidos	6.2617	0.0030	0.0081
CPD1510	lauroyl-CoA	lípidos	ácidos grasos	5.9880	0.0166	0.0226
CPD1362	cyanidin 3-O-glucoside-7-O-(6-O-(p-hydroxybenzoyl)-glucoside)	fenilpropanoides	antocianidinas	5.9209	0.0231	0.0443
CPD1120	patulitrin	fenilpropanoides	flavonoles	5.9080	0.0255	0.0509
CPD513	capsaicin	N-cnt	alcaloides	5.8777	0.0275	0.0746
CPD391	10',6'-diapocarotene-10',6'-dial	terpenoides	carotenoides	5.8704	0.0422	0.0738
CPD273	lacinilene C	terpenoides	sesquiterpenoides	5.8662	0.0113	0.0306
CPD230	metyrapone	otros	otros	5.6635	0.0728	0.1002
CPD72	(3-E)-4,8-dimethylnona-1,3,7-triene	terpenoides	monoterpenoides	5.5217	0.0202	0.0550
CPD1373	isovitexin-7-O-glucosyl-2''O-rhamnoside	fenilpropanoides	flavonas	5.3669	0.0390	0.1245
CPD625	(9Z)-12,13,17-trihydroxyoctadeca-9-enoate	lípidos	ácidos grasos	5.1826	0.0782	0.2413
CPD1142	24-epicathasterone-22-O-sulfate	lípidos	esteroides	5.1106	0.4030	0.2048
CPD792	dihydrochelirubine	N-cnt	alcaloides	5.1009	0.2371	0.4177
CPD902	8-(methylsulfanyl)octyl-desulfoglucosinolate	N-cnt	alcaloides	4.9872	0.6436	0.3379
CPD764	2,3-dioctanoylglyceramide	lípidos	ácidos grasos	4.9302	0.1777	0.2727
CPD578	thiamine phosphate	vitaminas	vitaminas B	4.8635	0.6612	0.2345
CPD133	3-methylphosphoenolpyruvate	otros	otros	4.8388	0.1280	0.3339
CPD1271	glutathione disulfide	otros	otros	4.8240	0.7285	0.2267
CPD1293	α-hydroxyheme	otros	otros	4.7735	0.7310	0.2454
CPD963	neolinustatin	N-cnt	glucósidos cianogénicos	4.7162	0.9200	0.1917

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Grupo	Tratamiento	Grupo x Tratamiento
CPD1083	N10-formyl-2,4-diaminodideazafolate	vitaminas	folatos	0.0033	4.7870	0.0035
CPD922	5'-(p-nitrophenyl)thioadenosine	N-cnt	nucleótidos	0.0029	4.7868	0.0031
CPD1255	4-sinapoyloxybutylglucosinolate	N-cnt	glucosinolato	0.0034	4.7794	0.0073
CPD1146	formononetin-7-O-glucoside-6''-malonate	fenilpropanoides	isoflavonas	0.0031	4.7694	0.0148
CPD281	γ-L-glutamyl-L-cysteine	otros	péptidos	0.0100	4.7657	0.0106
CPD1086	(indol-3-yl)acetyl-myo-inositol L-arabinoside	otros	inositoles	0.0158	4.6458	0.0135
CPD150	iridotrial	terpenoides	monoterpenoides	0.0042	4.5369	0.0321
CPD97	isoeugenol	fenilpropanoides	metoxifenoles	0.0042	4.5369	0.0321
CPD51	(3Z)-hex-3-en-1-yl acetate	otros	otros	0.0047	4.5355	0.0345
CPD282	N-benzoyl-L-glutamate	N-cnt	carboxiamidas	0.0229	4.5310	0.0349
CPD889	gibberellin A₄₃	hormonas	giberelinas	0.0051	4.5172	0.0248
CPD1119	eupatolin	fenilpropanoides	flavonoles	0.0155	4.5045	0.0430
CPD1181	dTDP-4-dehydro-6-deoxy-α-D-glucopyranose	otros	otros	0.0173	4.5039	0.0298
CPD129	L-cysteinylglycine	otros	péptidos	0.0363	4.2536	0.0604
CPD170	3-hydroxy-5-methoxybiphenyl	otros	bifenilos	0.0503	4.2230	0.3972
CPD1136	protohypericin	otros	perilenoquinonas	0.0306	4.1243	0.2020
CPD270	9-mercaptodethiobiotin	otros	imidazoles	0.0179	4.1232	0.1399
CPD777	2-amino-4,6-dinitrotoluene glucoside	N-cnt	otros	0.1938	4.1106	0.3321
CPD801	isopentenyladenine-7-N-glucoside	Hormonas	citoquininas	0.3906	4.0574	0.3140
CPD1137	maltotriose	azúcar	polisacáridos	0.2902	3.9388	0.8436

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Grupo	Tratamiento	Grupo x Tratamiento
CPD867	dopaxanthin quinone	N-cnt	alcaloides	1.3713	0.5310	4.3763
CPD871	betanidin	N-cnt	alcaloides	1.3713	0.5310	4.3763
CPD1098	7-(methylsulfanyl)heptyl-glucosinolate	N-cnt	glucosinolatos	1.4973	0.5324	4.2217
CPD603	2-(2,8-dihydroxytridecyl)-6-oxopyran-4-olate	others	otros	0.6032	0.7565	3.8537
CPD367	maritinamine	others	otros	0.2818	1.3665	3.8150
CPD741	xanthohumol	phenylpropanoids	chalconas	0.5279	0.1983	3.7748
CPD427	hemigossypolone-6-methyl ether	terpenoid	otros	1.1418	1.3007	3.5403
CPD482	1-monopalmitoylethylene glycol	others	otros	1.1410	1.2939	3.5254
CPD1149	(-)-medicarpin-3-O-glucoside-6''-malonate	others	otros	1.1415	1.2987	3.5205
CPD452	5,8,11,14-icosatetraenoate	others	otros	1.5551	0.5583	3.5065
CPD15	phenylacetone nitrile	N-cnt	nitrilo	1.1409	1.2979	3.5051
CPD358	dicranin	lipids	ácidos grasos	0.5905	1.0172	3.3687
CPD267	5-azacytidine	N-cnt	nucleósido	1.5576	0.2495	3.3531
CPD269	(indol-3-yl)acetyl-L-alanine	others	otros	1.5236	0.3457	3.3501
CPD471	N-acetyl-α-D-glucosamine 1-phosphate	sugar	monosacáridos	1.9770	0.0348	3.2397
CPD587	p-coumaroylserotonin	N-cnt	amidas	2.0188	0.2172	3.1701
CPD258	5-(methylsulfanyl)-2,3-dioxopentyl 1-phosphate	others	otros	0.1417	0.2071	3.0836
CPD1012	7,8-dihydrofolate monoglutamate	vitamins	folatos	0.8544	0.7591	3.0622
CPD445	4-coumaroyl-3-hydroxygamatine	N-cnt	amidas	1.4244	1.4053	3.0097
CPD232	petiveriin	N-cnt	aminoácidos modificado	0.9369	1.0678	2.9040

Tabla S4. Marcadores metabólicos en hojas de plantas de tomate determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros: el grupo de plantas, el tratamiento y la interacción grupo de plantas x tratamiento.

Modelo <i>flc</i> + Componente 1		
Transcritos		
T5390	SOLYC06G075100.3	<i>glycosyltransferase family protein 2 (AHRD V3.3 *** AT5G60700.2)</i>
T7819	SOLYC06G036440.2	<i>S-type anion channel SLAH3 (AHRD V3.3 *** AOA2G3CWS5_CAPCH)</i>
T974	SOLYC08G065710.2	<i>Vacuolar-processing enzyme (AHRD V3.3 *** AOA2G2ZDR1_CAPAN)</i>
T6917	SOLYC09G098220.3	<i>DNA polymerase zeta processivity subunit (AHRD V3.3 *** AOA2G3CRB0_CAPCH)</i>
T1809	SOLYC06G075650.3	<i>tonoplast intrinsic protein 1.2</i>
T7307	SOLYC01G099580.3	<i>Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein (AHRD V3.3 *- * Q9ZUW8_ARATH)</i>
T1185	SOLYC01G080010.2	<i>xyloglucan endoglucanase inhibitor</i>
T2754	SOLYC09G008650.3	<i>Peptidylprolyl isomerase (AHRD V3.3 *** AOA1U8E6I5_CAPAN)</i>
T1122	SOLYC05G041540.4	<i>Carboxypeptidase (AHRD V3.3 *** AOA2G3BBI5_CAPCH)</i>
T991	SOLYC02G062390.3	<i>abscisic acid and environmental stress-inducible protein TAS14 (AHRD V3.3 *- * AOA1U8FJ72_CAPAN)</i>
T1035	SOLYC09G091520.2	<i>60S acidic ribosomal protein P0 (AHRD V3.3 *** AOA2G3CRU5_CAPCH)</i>
T161	SOLYC07G063020.3	<i>Early nodulin-like protein 2 (AHRD V3.3 *** AOA2G2WEZ9_CAPBA)</i>
T1139	SOLYC03G097820.2	<i>bHLH transcription factor 022</i>
T1891	SOLYC12G099000.3	<i>S-adenosylmethionine synthase (AHRD V3.3 *** AOA2G2VJM2_CAPBA)</i>
T1755	SOLYC10G076250.2	<i>Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 (AHRD V3.3 *** B6U6Q5_MAIZE)</i>
T612	SOLYC11G072470.3	<i>LOB domain-containing protein (AHRD V3.3 *** AOA2K3PP50_TRIPR)</i>
T1899	SOLYC03G113690.1	<i>ABC transporter G family member 23 (AHRD V3.3 *** AOA2G2WRI2_CAPBA)</i>
T1016	SOLYC10G024490.2	<i>Protein NRT1/ PTR FAMILY 7.3 (AHRD V3.3 *** AOA2G2YL05_CAPAN)</i>
T1232	SOLYC06G062430.3	<i>Inositol oxygenase (AHRD V3.3 *** AOA2U1PDJ1_ARTAN)</i>
T1405	SOLYC08G061270.1	<i>DUF1677 family protein (DUF1677) (AHRD V3.3 *** Q9SK23_ARATH)</i>
T1264	SOLYC09G082340.2	<i>vicilin</i>
T6959	SOLYC06G005310.3	<i>Transcription factor MYB48 (AHRD V3.3 *** AOA2G2Z7N5_CAPAN)</i>
T1319	SOLYC01G104110.4	<i>11-S seed storage protein (AHRD V3.3 *** AOA2U1KM33_ARTAN)</i>
T2239	SOLYC03G119180.1	<i>Unknown protein</i>
T1057	SOLYC04G045280.2	<i>Unknown protein</i>

Modelo WT Componente 1		
metabolitos		
CPD44		9-(methylsulfanyl)-2-oxononanoate
CPD43		noraucuparin
CPD185		(E)-glutaconyl-CoA
CPD177		kaempferide triglycoside
CPD81		dihydroxyphaseic acid
CPD158		p-nitrophenyl-chitobiose
CPD24		geranate
CPD22		(6E)-8-oxogeranial
CPD90		(13S)-HPODE
CPD33		iridotrial
CPD19		isoeugenol
CPD12		(3Z)-hex-3-en-1-yl acetate
CPD52		(-)-curcuquinone
CPD155		(+)-sesaminol 2-O- β -D-glucoside
CPD54		germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oate
CPD53		L-hexahomomethionine
CPD73		dihydroartemisinic acid hydroperoxide
CPD162		kaempferol 3-O- β -D-glucosylgalactoside
CPD168		curcumin diglucoside
CPD157		all-trans-phytoene
CPD295		gibberellin A ₂₀
CPD113		gibberellin A ₄₃
CPD181		UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)- α -D-glucosamine
CPD139		eupatolin
CPD149		formononetin-7-O-glucoside-6''-malonate
CPD325		Mg-protoporphyrin
transcritos		
T13391	SOLYC07G016210.1	Specific tissue protein (AHRD V3.3 *** AOA2K3NKN8_TRIPR)
T8043	SOLYC04G011790.1	Glutaredoxin (AHRD V3.3 *** AOA1L7MRR3_SOLPI)
T2537	SOLYC01G108775.1	Methylketone synthase 1b (AHRD V3.3 *** EOYCS5_SOLLC)
T16951	SOLYC09G030370.3	GDSL esterase/lipase (AHRD V3.3 *** AOA1U8E6M9_CAPAN)
T19637	SOLYC11G006740.3	F-box domain, Phloem protein 2-like protein (AHRD V3.3 *** AOA2U1NHQ2_ARTAN)
T5441	SOLYC03G006910.3	bHLH transcription factor 019
T18270	SOLYC10G008680.3	HXXXD-type acyl-transferase family protein (AHRD V3.3 *** AOA2U1NMZ6_ARTAN)
T21728	SOLYC12G038450.1	Ethylene-responsive transcription factor (AHRD V3.3 *- AOA2G2WLG1_CAPBA)
T5858	SOLYC03G043850.3	cytochrome c oxidase subunit 6a, mitochondrial-like (AHRD V3.3 *** AOA2I4HW31_9ROSI)
T21770	SOLYC12G040790.2	Phosphoethanolamine N-methyltransferase (AHRD V3.3 *** AOA2G3A318_CAPAN)

Tabla S5. IDs de transcritos y metabolitos y su correspondiente nomenclatura de identificación para los marcadores clave obtenidos en las multiómicas de los modelos *flc+* y WT. El color hace referencia al tratamiento. Azul: control, gris: salinidad, naranja: altas temperaturas y verde: la combinación de salinidad + altas temperaturas.

Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución						
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp8	To1
Grupo de plantas	16%	2.061	0.01	0.001	100%	0.4%	97.6%	0.2%	0.6%	18.5%
Tratamiento	19%	2.11	0.01	100%	0.001	0.4%	0.5%	99.2%	0.5%	18.1%
Grupo de plantas x Tratamiento	18%	1.522	0.01	0.001	0.001	98.5%	0.7%	0.3%	97.8%	25.1%
Residuos	47%	1	NA	0.001	0.002	0.8%	1.1%	0.4%	1.1%	38.2%

Tabla S6. Variabilidad relativa y contribuciones de bloque del análisis AMOPLS-DA de datos metabolómicos adquiridos de raíces de plantas de tomate silvestres (WT) y mutantes *flacca* sin (*flc-*) y con aplicación de ABA (*flc+*) bajo condiciones control, salinidad, altas temperaturas, y combinación de salinidad y altas temperaturas. RSS: Suma Relativa de Cuadrados, RSR: Relación de Estructura Residual, Tp: componentes predictivos, To: componente ortogonal.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Grupo	Grupo x	
					Tratamiento	Tratamiento
CPD1508	<i>kaempferide triglycoside</i>	fenilpropanoides	flavonoles	6.1561	0.0019	0.0040
CPD642	<i>phyto sphingosine (C18)</i>	N-cnt	aminoalcohol	5.9835	0.0638	0.0253
CPD99	<i>decan-2-ol</i>	otros	otros	5.5206	0.0269	0.1183
CPD1085	<i>3,22-dimethyl-1,2,23,24-tetrahydro-2,3,22,23-tetrahydro-squalene</i>	terpenoides	triterpenoides	5.4320	0.1003	0.1811
CPD813	<i>22-oxo-docosanoate</i>	lípidos	ácidos grasos	5.3920	0.0644	0.1067
CPD201	<i>N-prenylagmatine</i>	otros	otros	5.2908	0.0960	0.3171
CPD555	<i>(indol-3-yl)acetyl-L-glutamate</i>	otros	otros	5.1174	0.0869	0.0903
CPD455	<i>xanthosine</i>	N-cnt	nucleósido	5.1174	0.0860	0.0886
CPD774	<i>adenosine 5'-phosphoramidate</i>	N-cnt	nucleótido	4.7325	0.3411	0.4054
CPD1263	<i>all-trans-lycopene</i>	terpenoides	carotenoides	4.6984	0.1637	0.3339
CPD372	<i>pyrithiamine</i>	otros	otros	4.5644	0.4758	0.3175
CPD946	<i>1,2-dioctanoyl-1,2,6-hexanetriol</i>	otros	otros	4.5643	0.1103	0.2667
CPD260	<i>(2E,6E)-farnesol</i>	terpenoides	sesquiterpenoides	4.5425	0.2830	0.6344
CPD213	<i>(E)-&beta;-farnesene</i>	terpenoides	sesquiterpenoides	4.5416	0.2827	0.6355
CPD389	<i>(2S,5R)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-5,9-dimethyl-1-oxaspiro[5.5]undec-8-ene-7,10-dione</i>	terpenoides	sesquiterpenoides	4.5337	0.3229	0.3822
CPD396	<i>heliespirone B</i>	terpenoides	sesquiterpenoides	4.4383	0.0835	0.2692
CPD1386	<i>quercetin 3,5-O-diglycoside</i>	fenilpropanoides	flavonoles	4.4365	0.1358	0.6359
CPD1187	<i>(E)-1-(glutathion-5-yl)-N-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethan-1-imine</i>	otros	glutación y derivados	4.4122	0.0089	0.3467
CPD1295	<i>protoporphyrin IX</i>	otros	porfirina	4.3842	0.0919	0.4813
CPD690	<i>3-dehydro-sphinganine (C20)</i>	N-cnt	otros	4.3682	0.4283	0.4616
				Puntuación VIP ₂		
CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Grupo	Tratamiento	Grupo x Tratamiento
CPD91	<i>&alpha;-ethynylagmatine</i>	otros	otros	0.0015	5.1936	0.0017
CPD775	<i>gibberellin A₃</i>	hormonas	giberelinas	0.0018	5.1917	0.0083
CPD1168	<i>N10-formyl-2,4-diaminodiazofolate</i>	otros	otros	0.0060	5.1826	0.0113
CPD1573	<i>(+)-sesaminol 2-O-&beta;-D-gentiotrioside</i>	fenilpropanoides	liganos	0.0057	5.1802	0.0095
CPD1083	<i>2'-methoxythiamine pyrophosphate</i>	otros	otros	0.0035	5.1749	0.0104
CPD1354	<i>magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester</i>	otros	porfirina	0.0011	4.9985	0.1603
CPD460	<i>all-trans-retinal</i>	terpenoides	diterpenoides	0.0562	4.9586	0.0501
CPD1040	<i>adenosine 3',5'-bisphosphate</i>	N-cnt	nucleótido	0.0445	4.7167	0.1142
CPD986	<i>dTDP group</i>	N-cnt	nucleósido	0.0445	4.7167	0.1142
CPD1088	<i>GDP</i>	N-cnt	nucleósido	0.0445	4.7167	0.1142
CPD1092	<i>GDP group</i>	N-cnt	nucleósido	0.0445	4.7167	0.1142
CPD990	<i>3-O-acetyl-4'-O-demethylpapaveroxine</i>	N-cnt	alcaloides	0.0754	4.6934	0.1325
CPD311	<i>biotin</i>	vitaminas	vitaminas B	0.0303	4.6584	0.1088
CPD363	<i>5-methyl-5-thio-&alpha;-D-ribose 1-phosphate</i>	N-cnt	nucleósido	0.1007	4.5558	0.2307
CPD296	<i>D-erythro-imidazole-glycerol-phosphate</i>	otros	otros	0.1005	4.5558	0.2309
CPD242	<i>imidazole acetol-phosphate</i>	otros	otros	0.1009	4.5539	0.2318
CPD520	<i>(R)-4'-phosphopantothenate</i>	otros	otros	0.0848	4.3246	0.6813
CPD368	<i>5-phospho-D-arabinonohydroxamate</i>	otros	otros	0.2928	4.2968	0.1588
CPD1450	<i>trihydroxyferuloyl spermidine</i>	otros	ácidos hidoxicinámicos	0.0305	4.2907	0.3419
CPD1569	<i>taxol</i>	terpenoides	diterpenoides	0.1712	4.2762	0.4060
				Puntuación VIP ₂		
CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Grupo	Tratamiento	Grupo x Tratamiento
CPD761	<i>3',4',5'-O-trimethyltricetin</i>	fenilpropanoides	flavonoide	0.1261	0.4643	3.8465
CPD692	<i>gibberellin A₅</i>	hormonas	giberelinas	0.4199	0.0810	3.6131
CPD1253	<i>cyandinin 3-O-(6''-O-malonyl)-&beta;-glucoside</i>	fenilpropanoides	antocianinas	0.9114	0.6201	3.4822
CPD83	<i>phenylthiourea</i>	otros	otros	0.0108	0.4472	3.4820
CPD1102	<i>biochanin A-7-O-glucoside</i>	fenilpropanoides	isoflavonas	0.0509	0.8251	3.4649
CPD84	<i>azaguanine</i>	N-cnt	ácido nucleico	0.0506	0.3299	3.3318
CPD30	<i>(R)-pantolactone</i>	otros	gamma butirolactonas	0.0507	0.3296	3.3317
CPD954	<i>secologanin</i>	terpenoides	monoterpenoides	0.3266	0.8074	3.2790
CPD1117	<i>syn-copalyl diphosphate</i>	terpenoides	diterpenoides	0.5142	1.2728	3.2501
CPD198	<i>2-tridecanone</i>	otros	cetonas	0.5387	0.8934	3.2397
CPD1281	<i>delphinidin 3-O-(6''-O-malonyl)-&beta;-glucoside</i>	fenilpropanoides	antocianinas	0.2395	0.8318	3.2124
CPD762	<i>DIBOA-&beta;-D-glucoside</i>	otros	glucósidos	0.7326	0.1410	3.1019
CPD440	<i>similar to cycloheximide</i>	otros	piperidinedionas	1.1133	1.4095	3.0739
CPD346	<i>daidzein</i>	fenilpropanoides	isoflavonas	1.1124	1.4113	3.0737
CPD406	<i>naringenin chalcone</i>	fenilpropanoides	chalcona	1.1124	1.4113	3.0737
CPD1458	<i>1D-myo-inositol 5-diphosphate 1,2,3,4,6-pentakisphosphate</i>	otros	inositoles	1.1122	1.4110	3.0730
CPD1601	<i>N-methylanthraniloyl-CoA</i>	aminoácidos	n-acil-alfa-aminoácidos y derivados	1.1210	1.4140	3.0580
CPD1436	<i>pteroyl-&gamma;-glutamyl-&gamma;-glutamylglutamate</i>	otros	otros	1.1053	1.4022	3.0540
CPD905	<i>(-)-thujaplicatin</i>	fenilpropanoides	liganos	1.1210	1.4091	3.0527
CPD149	<i>L-cysteinylglycine</i>	peptido	dipeptido	1.1210	1.4091	3.0526

Tabla S7. Marcadores metabólicos en raíces de plantas de tomate determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros: el grupo de plantas, el tratamiento y la interacción grupo de plantas x tratamiento.

	Cl	K	Na	Na/K	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Cu	Mn	Zn	Mo	B	P	Ca	Mg	S	Fe
<i>flc</i> - C vs Wt C	0.9	-0.2	-0.51	-0.44	0.29	0.39	0.18	1.54	0.93	0.69	1.65	0.08	0.33	-0.87	0.28	-1.2	1.58
<i>flc</i> - S vs Wt C	4.04	-0.19	3.85	4.05	-1.48	0.02	-0.42	0.28	-0.13	0.88	1.86	0.06	0.24	-1.21	-1.56	-2.04	1.45
<i>flc</i> - H vs WT C	0.4	0.08	-0.31	-0.44	0	0.48	0.58	3.05	1.04	2.73	2.18	0.28	0.7	-0.69	-1.39	-1.68	2.51
<i>flc</i> - SH vs Wt C	3.91	-0.39	3.74	4.13	-1.12	0.35	0.45	2.26	0.24	2.87	2.36	0.12	0.83	-0.75	-1.51	-1.37	3.06

Tabla S8. Log₂FC de la concentración de iones encontrada en las raíces de los mutantes *flc* respecto a las plantas WT cultivadas en condiciones control.

CPD	Compuesto	Grupo	LogFC			
			<i>flc</i> _C	<i>flc</i> _S	<i>flc</i> _H	<i>flc</i> _S+H
M3	4-guanidinobutyraldehyde	pequeña molécula con varias funciones	-16.69		-16.97	
M8	S-allyl-L-cysteine	metabolismo de aminoácidos	-14.88		-15.17	
M10	N-hydroxyhomomethionine	metabolismo de aminoácidos	-14.88		-15.17	
M18	(-)-methyl jasmonate	metabolismo hormonal	16.45		15.82	
M20	germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ooate	metabolismo de terpenoides	16.72	15.63		
M23	thymidine	metabolismo de los aminoácidos	-16.07		-16.35	
M24	3-methoxy-4',5-dihydroxy-trans-stilbene	metabolismo de compuestos aromáticos	-16.07		-16.35	
M26	3,3'-Diindolylmethane	compuestos indólicos	15.34	14.83		
M27	lacinilene C	metabolismo de terpenoides	16.10		15.59	
M41	16-oxo-palmitate	metabolismo de los ácidos grasos	18.72	17.71		
M43	16-hydroxypalmitate	metabolismo de los ácidos grasos	2.38	2.02		
M45	stearate	metabolismo de los ácidos grasos	18.09	17.72		
M73	Taxa-4(20),11(12)-dien-5alpha-yl acetate	pequeña molécula con varias funciones	-19.60		-3.67	
M83	9-[6(RS)-C-carboxamido-5,6,7-trideoxy-beta-D-ribo-octofuranosyl]-9H-purin-6-amine	molécula pequeña con varias funciones	-16.15	-16.21		1.56
M91	(indol-3-yl)acetyl-L-tryptophan	metabolismo de aminoácidos	-3.16	-3.08		
M111	3,22-dimethyl-1,2,23,24-tetrahydro-2,3,22,23-tetrahydrosqualene	metabolismo de terpenoides	17.91	16.06	16.37	16.12
M118	IAA-glutamate-N-beta-D-glucose	metabolismo de los aminoácidos	-6.50		-6.04	
M132	zeta-Carotene	metabolismo de terpenoides	17.55	18.23	15.37	16.60
M166	N-carbamoylputrescine	pequeña molécula con varias funciones		-14.74		-15.02
M185	amobarbital	pequeña molécula con varias funciones		-15.83		-16.11
M203	7-methylinosine	pequeña molécula con varias funciones		-2.95		-3.00
M204	galanthamine	molécula pequeña con varias funciones		15.18		16.18
M216	6,7-dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine	pequeña molécula con varias funciones		-17.25		-17.54
M218	(R)-reticuline	molécula pequeña con varias funciones		-1.71		-1.58
M220	columbamine	metabolismo de alcaloides		2.35		2.18
M237	2'-methoxythiamine pyrophosphate (MeO-TPP)	pequeña molécula con varias funciones		15.28		16.59
M276	3-methylphosphoenolpyruvate	molécula pequeña con varias funciones			-1.03	-1.57
M288	5-hydroxy-L-tryptophan	metabolismo de aminoácidos			15.26	16.04
M293	biotin	vitamina			15.26	16.04
M294	cytidine	ribonucleósido			15.26	16.02
M309	all-trans-retinal	metabolismo de terpenoides			-2.10	-2.22
M312	(6-hydroxy-indol-3-yl)acetyl-L-valine	metabolismo de aminoácidos			-1.80	-1.87
M334	N-beta-D-glucopyranosol IAA	metabolismo hormonal			-1.24	-1.37
M348	(+)-sesamin	metabolismo de los fenilpropanoides			-1.24	-1.37
M375	N10-formyl-2,4-diaminodiazafolate	molécula pequeña con varias funciones			16.12	17.14
M391	quercetin 3-O-gentiobioside-7-O-rhamnoside	metabolismo de los flavonoides			15.93	16.68

Tabla S9. Metabolitos más relevantes obtenidos del análisis de correlación entre iones y metabolitos y sus Log₂FC (comparado con WT bajo condiciones control).

Verano											
Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución							
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	To1
Genotipo	8%	1.17	0.01	98%	1%	1%	1%	4%	3%	3%	24%
Tratamiento	13%	1.212	0.01	1%	98%	1%	1%	87%	90%	3%	23%
Genotipo x Tratamiento	9%	1.119	0.01	1%	1%	96%	98%	4%	3%	89%	25%
Residuos	71%	1	NA	1%	1%	1%	1%	5%	4%	4%	28%

Invierno											
Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución							
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	To1
Genotipo	11%	1.428	0.01	99%	0%	0%	4%	1%	2%	2%	22%
Tratamiento	14%	1.296	0.01	0%	99%	0%	4%	96%	91%	3%	24%
Genotipo x Tratamiento	13%	1.27	0.01	0%	1%	99%	86%	1%	3%	92%	24%
Residuos	62%	1	NA	0%	1%	1%	6%	2%	4%	3%	31%

Tabla S10. Variabilidad relativa y contribuciones de bloque del análisis AMOPLS-DA de datos metabolómicos adquiridos del fruto de plantas de tomate silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo condiciones control, salinidad, déficit hídrico, y combinación de salinidad + déficit hídrico en la estación de verano y de invierno. RSS: Suma Relativa de Cuadrados, RSR: Relación de Estructura Residual, Tp: componentes predictivos, To: componente ortogonal.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD133	<i>Furaneol acetate</i>	Otros	Furanonas	13.2936	0.0038	0.0053
CPD82	<i>Methyl salicylate</i>	Otros	Bencenoídes	13.2933	0.0039	0.0055
CPD84	<i>(2E)-4-hydroxy-5-methyl-2-propylidene-3(2H)-furanone</i>	Otros	Otros	13.2925	0.0041	0.0057
CPD1821	<i>Chenodeoxycholic acid disulfate</i>	Lípidos	Esteroides	13.2799	0.0051	0.0071
CDP2934	<i>Theasaponin A2</i>	Terpenoides	Esteroides	13.2183	0.0051	0.0071
CDP1822	<i>Arctignan B</i>	Fenilpropanoides	Lignanós	12.2223	0.0726	0.1002
CDP2523	<i>Medicagenic acid 3-O-[α-D-glucosyl-(1-4)-β-D-glucoside]</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	12.2119	0.0318	0.0441
CPD2955	<i>Theasaponin B1</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	12.1908	0.0547	0.0756
CDP2732	<i>Dimalonylwobanin</i>	Fenilpropanoides	Glicósidos flavonoides	11.5865	0.1455	0.1800
CDP2955	<i>(Cyanidin 3-O-beta-glucoside)(kaempferol 3-O-(2-O-beta-glucosyl-beta-glucoside)-7-O-beta-glucosiduronic acid) malonate</i>	Fenilpropanoides	Glicósidos flavonoides	11.3625	0.1057	0.0970
CDP1078	<i>Finasteride</i>	Lípidos	Esteroides	11.2377	0.1389	0.1600
CPD2356	<i>Kaempferol 3-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)glucoside]-7-glucoside</i>	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	11.2150	0.1827	0.2519
CPD2935	<i>28-O-[β-D-xylosyl-(1-4)-α-L-rhamnosyl-(1-2)-α-L-arabinosyl] ester</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	10.3971	0.2611	0.2108
CDP885	<i>3-Hydroxymugineic acid</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	10.3420	0.1495	0.2136
CPD352	<i>2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol</i>	Fenilpropanoides	Otros	10.3372	0.1530	0.0587
CPD421	<i>Geranyl hexanoate</i>	Lípidos	Ácidos grasos	10.3372	0.1530	0.0587
CPD2653	<i>Lyciumin B</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	10.3358	0.1799	0.2500
CDP765	<i>2-O-Acetylbarbutin</i>	Fenoles	Glucósidos fenólicos	10.3249	0.1663	0.2340
CDP2782	<i>Diadenosine hexaphosphate</i>	NCC	Nucleótidos y derivados	9.9233	0.0228	0.1568
CPD2893	<i>Hexacosanoyl-CoA</i>	Lípidos	Ácidos grasos	9.6927	0.1971	0.3535
CPD93	<i>Butadiene-styrene rubber</i>	Otros	Estirenos	9.6628	0.0325	0.9996
CPD2746	<i>Achyranthoside C</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	9.6205	0.1391	0.6402
CDP2750	<i>Kudusaponin SA4</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	9.6184	0.1492	0.3189
CPD1423	<i>Glycinin</i>	Otros	Otros	9.5363	0.4031	0.2152
CDP2745	<i>jasmanoyl-CoA</i>	Lípidos	Ácidos grasos	9.5028	0.1418	0.6866

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD797	<i>Cepharadione B</i>	NCCs	Alcaloides	0.0041	7.4403	0.0954
CDP797	<i>Homoglutathione</i>	Otros	Glutaciones	0.0527	6.7076	0.1550
CPD1294	<i>Pelargonidin 3-rhamnoside</i>	Fenilpropanoides	Antocianinas	0.0172	6.7036	0.4016
CDP1614	<i>6'-O-Galloylsucrose</i>	Otros	Bencenoídes	0.1161	6.5989	0.4051
CDP2239	<i>4,4''-bis(N-feruloyl)serotonin</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	0.0491	6.5055	0.1381
CPD2027	<i>Glucosinalbin 4-(4-acetyl-rhamnoside)</i>	Otros	Carbohidratos y derivados	0.0083	6.3913	0.0184
CDP1950	<i>4'-Hydroxyanigorootin</i>	Fenilpropanoides	Flavonoides	0.3632	6.3750	0.2106
CDP806	<i>Nb-cis-p-Coumaroylserotonin</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	0.3035	6.3120	0.7634
CPD2354	<i>5',5'''-diadenosine triphosphate</i>	NCC	Nucleótidos y derivados	0.0459	6.1005	0.4876
CPD670	<i>4-Oxoretinal</i>	Lípidos	Retinoides	0.1259	6.0495	0.3089
CPD119	<i>2-Butyl-4-methylphenol</i>	Fenoles	Cresoles	0.0267	6.0490	0.4168
CDP333	<i>6-Methoxy-3-(2-thiazolyl)-1H-indole</i>	Otros	Tiazoles	0.2018	5.9295	0.6072
CDP17	<i>7-Azaindolizine</i>	Otros	Pirrolpirazinas	0.3959	5.8979	0.6689
CPD2772	<i>TG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))[iso6]</i>	Lípidos	Ácidos grasos	0.3769	5.8086	0.0714
CPD1233	<i>Glycerol tribenzoate</i>	Otros	Bencenoídes	0.3880	5.6573	0.5708
CPD956	<i>Dihomo-gamma-Linolenoyl ethanolamide</i>	NCC	Aminas	0.0081	5.5790	0.0205
CPD2286	<i>Kaempferol 3-O-alpha-L-(2,3-di-trans-p-coumaroyl-rhamnosyl)-D-galactose</i>	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	0.7373	5.5201	0.8592
CPD990	<i>3-O-beta-D-Galactopyranuronosyl-D-galactose</i>	Otros	Hidratos de carbono y derivados	0.1874	5.5129	1.3599
CPD326	<i>Propyl propane thiosulfonate</i>	Otros	Otros	0.2369	5.4376	0.1688
CDP1288	<i>Pulmatin</i>	Otros	Bencenoídes	0.2816	5.3746	1.6159
CPD2639	<i>Galabiosylceramide (d18:1/9Z-18:1)</i>	Lípidos	Glicoesfingolípidos	1.2168	5.2543	1.8893
CPD790	<i>4'-Methylgallocatechin</i>	Fenilpropanoides	Flavonoides	0.0050	5.2474	0.5569
CDP2072	<i>Prebetanin</i>	NCC	Alcaloides (Betalaínas)	0.7714	5.1656	0.6211
CPD1949	<i>Proanthocyanidin A2</i>	Fenilpropanoides	Antocianinas	1.0362	5.1343	0.9272
CPD1245	<i>Erysothiopine</i>	NCCs	Alcaloides	0.0886	5.1177	0.9932

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CDP2255	<i>PE(14:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))</i>	Lípidos	Fosfolípidos	0.0072	0.6499	6.0789
CDP2583	<i>precocin-2</i>	Otros	Tetrapirroles	0.0268	0.5254	5.5832
CDP1149	<i>3-Hydroxy-cis-5-tetradecenoylcarnitine</i>	Lípidos	Ácidos grasos	0.0600	0.1989	5.0540
CDP307	<i>Isoflavones</i>	Fenilpropanoides	Flavonoides	2.0334	0.8678	4.9914
CDP2007	<i>Somniferine</i>	NCC	Alcaloides	0.3923	1.9791	4.9839
CPD2934	<i>22R-Acetoxy-1alpha,3beta-dihydroxyergosta-5,24E-dien-26-oic acid 3-O-b-D-glucoside 26-O-[b-D-glucosyl-(1-4)-6-acetyl-b-D-glucosyl-(1-2)-6-acetyl-b-D-glucosyl] ester</i>	Lípidos	Glucósidos esteroideos	1.9008	3.4683	4.7818
CDP1002	<i>N1-(5-Phospho-alpha-D-ribose)-5,6-dimethylbenzimidazole</i>	Otros	Otros	1.9002	3.4671	4.7801
CPD1848	<i>Neoacrimarine K</i>	Otros	Quinolinas y derivados	1.9001	3.4671	4.7801
CPD1842	<i>Physalin Q</i>	Lípidos	Esteroides	1.9001	3.4670	4.7801
CPD1778	<i>Dukunolide C</i>	Otros	Naftopiranos	1.8999	3.4667	4.7796
CDP1396	<i>Ginkgolide C</i>	Terpenoides	Diterpenos	1.8994	3.4657	4.7781
CDP278	<i>3-[4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2-propenal</i>	Otros	Otros	1.8985	3.4640	4.7758
CPD1068	<i>1,24-Tetracosanedial</i>	Lípidos	Ácidos grasos	1.3834	2.6298	4.7758
CDP218	<i>Pyrimethanil</i>	NCCs	Anilinas	1.8971	3.4615	4.7723
CDP666	<i>Benzoyl glucuronide</i>	Otros	Glucurónidos	1.8970	3.4612	4.7721
CDP776	<i>Protocatechuic acid 4-glucoside</i>	Fenoles	Glucósidos fenólicos	1.8970	3.4612	4.7721
CDP674	<i>D-4'-Phosphopantothenate</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	1.8968	3.4610	4.7717
CDP673	<i>Salicylic acid 2-beta-D-glucoside</i>	Fenoles	Glucósidos fenólicos	1.8968	3.4609	4.7716
CPD2758	<i>Goyasaponin III</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	0.8545	1.0843	4.7716
CPD2897	<i>Quinqueoside R1</i>	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	0.0744	1.3300	4.7206
CPD1883	<i>Deoxycholic acid 3-glucuronide</i>	Lípidos	Glucósidos esteroideos	0.2162	0.7845	4.6368
CPD23	<i>Isopropylpyrazine</i>	NCC	Pirazinas	2.4551	3.2008	4.6294
CPD2600	<i>25-Acetyl-6,7-didehydrofevicordin F 3-[glucosyl-(1-6)-glucoside]</i>	Lípidos	Glucósidos esteroideos	0.2080	0.7913	4.5959
CDP66	<i>4-Acetamidobutanoic acid</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	2.4757	3.2147	4.5939
CPD516	<i>Heptanoylcarnitine</i>	Lípidos	Ácidos grasos	0.0020	0.4794	4.5395

Tabla S11. Marcadores metabólicos de tomates cosechados en verano, determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros genotipo, tratamiento y la interacción genotipo x tratamiento.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CDP384	3-Mercaptohexyl hexanoate	Lípidos	Ácidos grasos	8.9801	0.0009	0.0010
CPD448	1-(5-Methyl-3-pyridinyl)-1-decanone	Otros	Cetona	8.9760	0.0017	0.0018
CDP2679	Oleragenoside	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	8.9646	0.0071	0.0076
CDP2722	26-[2-Glucosyl-6-acetylglucosyl]-1,3,11,22-tetrahydroxyergosta-5,24-dien-26-oate	Lípidos	Glucósidos esteroideos	8.9645	0.0071	0.0076
CDP1754	Orcein	Otros	Benzofuranos	8.9627	0.0044	0.0047
CDP2755	Betanidin 5-[E-feruloyl-(5)-apiosyl-(1-2)-glucoside]	Otros	Derivados de giberelinas	8.9470	0.0102	0.0109
CDP1073	22-hydroxydocosanoate	Lípidos	Ácidos grasos	8.9168	0.0199	0.0213
CPD2729	Similar to neuromedin B (4-10)	Otros	Otros	8.7738	0.0445	0.0459
CDP465	Abscisic alcohol	Terpenoides	Sesquiterpenoides	8.2926	0.0078	0.0781
CDP2683	Medicagenic acid 3-O-[α-D-glucosyl-(1-4)-β-D-glucoside]	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	8.2537	0.0522	0.0559
CDP2030	phosphoribulosylformimino-AICAR-P	NCCs	Nucleótidos y derivados	8.2534	0.0440	0.0446
CPD1939	UDP-L-rhamnose	NCCs	Nucleótidos y derivados	8.2534	0.0440	0.0446
CDP141	2,5-Dimethyl-3-furanthiol acetate	Otros	Otros	8.2278	0.0702	0.0726
CDP80	5-Methyl benzenecarbothioate	Otros	Bencenoides	8.2274	0.0703	0.0727
CPD79	Oxypurinol	Otros	Otros	8.2273	0.0722	0.0748
CPD1076	1,8-Dihydroxy-3,5-dimethoxy-2-prenylxanthone	Otros	Xantonas	8.1877	0.0928	0.0951
CDP2114	Delphinidin 3-sambubioside	Fenilpropanoides	Antocianinas	7.7422	0.0749	0.0451
CPD2107	Quercetin 3-arabinoside 7-glucoside	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	7.7422	0.0749	0.0451
CDP1762	3-Oxo-α-ionol 9-[apiosyl-(1-6)-glucoside]	Lípidos	Ácidos grasos	7.6611	0.0863	0.4351
CPD2937	TG(20:1(11Z)/20:1(11Z)/20:1(11Z))	Lípidos	Ácidos grasos	7.5876	0.1601	0.1722
CPD1392	10-Hydroxymelleolide	Terpenoides	Sesquiterpenoides	7.5715	0.1631	0.1751
CPD2391	Similar to lacto-N-neotetraose	Otros	Otros	7.5504	0.2313	0.2385
CPD1485	Delphinidin 3-xyloside	Fenilpropanoides	Antocianinas	7.5450	0.2137	0.1983
CPD1464	[E]-Ribosylzeatin 5''-phosphate	Otros	Otros	7.4247	0.2041	0.1169
CPD383	Furanogermentone	Terpenoides	Sesquiterpenoides	7.3099	0.0682	0.0721

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CDP564	1/2-D-glucuronate 1-phosphate	Otros	Hidratos de carbono y derivados	0.0056	7.1816	0.0065
CDP1129	Indicalactone	Otros	Otros	0.0691	6.1802	0.1474
CDP2400	N-(2R-Hydroxyhexacosanoyl)-2S-amino-1,3S,4R-octadecanetriol	Lípidos	Otros	0.0023	5.7017	0.6051
CDP449	Vanillic acid 4-sulfate	Otros	Bencenoides	0.0244	5.6006	0.0214
CDP197	(Z+E)-L-Mercapto-p-menthan-3-one	Terpenoides	Monoterpenoides	0.0107	5.3294	0.0580
CPD2557	TG(16:1(9Z)/14:0/16:1(9Z))[iso3]	Lípidos	Ácidos grasos	0.0000	5.1747	0.4394
CPD2174	N-Acetylneuraminic acid	Otros	Otros	0.1202	5.1739	0.1432
CPD1182	Furaneal 4-(6-malonylglucoside)	Otros	Hidratos de carbono y derivados	0.1911	5.0622	0.7713
CPD1087	Dihydrocaffeic acid 3-O-glucuronide	Fenoles	Glucósidos fenólicos	0.1986	5.0573	0.7930
CPD136	2-Hexylthiophene	Otros	Otros	0.0017	4.9907	0.1653
CPD215	5-Methoxytryptophol	Otros	Indoles	0.0017	4.9907	0.1653
CDP2106	Acrimarine J	Otros	Quinolinas y derivados	0.1542	4.9852	0.1259
CPD2100	Zizyboside II	Azúcares	Oligosacáridos	0.1277	4.8568	0.0634
CPD2169	trans-delta-Viniferin 3''-glucoside	Fenilpropanoides	Flavonoides	0.0844	4.8377	0.0543
CDP2116	Leucopelargonidin 3-O-α-L-rhamno-β-D-glucopyranoside	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	0.0972	4.8354	0.0751
CPD2116	C.I. Pigment Red 149	Otros	Pigmentos	0.0992	4.8339	0.0760
CDP2346	Nuzhenide	Otros	Carbohidratos y derivados	0.3294	4.8317	0.9897
CDP3069	Ginsenoside Rs1	Terpenoides	Saponinas triterpénicas	0.2453	4.8223	0.8479
CPD2055	Naringin	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	0.1292	4.7371	0.1498
CPD515	Camelinin	Otros	Otros	0.1412	4.7262	0.1272
CDP1973	Ustiloxin C	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	0.0998	4.7251	0.1252
CPD1988	Artonin R	Otros	Xantonas	0.9862	4.7105	0.0497
CPD273	Methylsacitric acid	Otros	Ácidos carboxílicos	0.0905	4.5874	0.3405
CDP2546	Leonoside A	Azúcares	Oligosacáridos	0.2941	4.5766	0.3800
CPD2749	PE(24:1(15Z)/20:1(11Z))	Lípidos	Fosfolípidos	0.0296	4.5729	0.0449

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CDP138	<i>(+/-)-N,N-Dimethyl menthyl succinamide</i>	Otros	Hidrocarburos	0.1380	0.1344	4.9559
CDP200	<i>2-Butyl-1-octanol</i>	Lípidos	Ácidos grasos	0.1380	0.1344	4.9559
CPD286	<i>2-Cyclotetradecen-1-one</i>	Otros	Cetonas	0.1380	0.1344	4.9559
CPD2544	<i>Isovitexin 7-(6'''-(E)-p-feruloylglucoside)</i>	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	0.5362	1.6762	4.9075
CDP749	<i>Tinctormine</i>	Aminoácidos y derivados	Aminoácidos y derivados	0.0018	1.4555	4.8370
CPD748	<i>3,5-Dihydroxy-6,7-methylenedioxyflavanone</i>	Fenilpropanoides	Flavonoides	0.0018	1.4555	4.8370
CPD1405	<i>Palmitoyl glucuronide</i>	Lípidos	Glucósidos de ácidos grasos	0.1968	0.3250	4.8264
CDP982	<i>Dodecyl gallate</i>	Otros	Bencenoides	1.0419	0.2574	4.7804
CPD2103	<i>DG(20:1(11Z)/14:0/0:0)</i>	Lípidos	Diglicéridos	0.0153	0.9993	4.5954
CDP976	<i>Danazol</i>	Lípidos	Esteroides	1.2770	0.3827	4.5759
CDP3130	<i>Cyanidin 3-O-[[4-Hydroxy-3,5-dimethoxycinnamoyl-(2)-b-D-glucopyranosyl-(1-2)]-[4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl-(6)]-b-D-glucopyranoside] 5-O-(6-O-malonyl-b-D-glucopyranoside)</i>	Fenilpropanoides	Antocianinas	1.2399	0.8075	4.5448
CPD724	<i>Tanacetol B</i>	Terpenoides	Sesquiterpenoides	1.3195	0.4082	4.5220
CDP1532	<i>(3beta,5alpha,6beta,22E)-23-Methylergosta-7,22-diene-3,5,6-triol</i>	Lípidos	Esteroides	0.1911	1.0389	4.5090
CDP1212	<i>Sphinganine 1-phosphate</i>	Lípidos	Esfingolípidos	0.6348	0.4131	4.3157
CPD2524	<i>PE(22:1(13Z)/15:0)</i>	Lípidos	Fosfolípidos	0.0003	2.4944	4.2875
CPD1301	<i>desacetoxylvindoline</i>	NCC	Alcaloides	2.8386	0.0015	4.2701
CDP2866	<i>trans-D-Decenoyl-CoA</i>	Lípidos	Ácidos grasos	0.0347	2.1059	4.2590
CPD2865	<i>Cyanidin 3-O-(2'''-xylosyl-6'''-(6'''-feruloyl-glucosyl)-galactoside)</i>	Fenilpropanoides	Antocianinas	0.0347	2.1059	4.2590
CPD2884	<i>Polyamines</i>	NCCs	Poliaminas	0.0329	2.1280	4.2580
CPD877	<i>Homodihydrocapsaicin</i>	Otros	Bencenoides	0.2764	0.7211	4.2451
CPD2862	<i>Quercetin 3-(6-[4-glucosyl-p-coumaryl]glucosyl)(1-2)-rhamnoside</i>	Fenilpropanoides	Glucósidos flavonoides	0.0509	2.1241	4.2296
CPD2481	<i>PG(16:1(9Z)/18:3(6Z,9Z,12Z))</i>	Lípidos	Glicerolfosfolípidos	0.6261	0.9946	4.2230
CPD2573	<i>PC(14:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))</i>	Lípidos	Fosfolípidos	0.0058	2.5077	4.1942
CDP1215	<i>Potassium gibberellate</i>	Hormonas	Derivados de giberelinas	0.1056	1.3435	4.1842
CDP2579	<i>Glucosylceramide (d18:1/22:0)</i>	Lípidos	Esfingolípidos	0.4241	0.7384	4.1484

Tabla S12. Marcadores metabólicos de tomates cosechados en invierno, determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros genotipo, tratamiento y la interacción genotipo x tratamiento.

Estación	Genotipos	Tratamientos	Antocianinas	Flavonoles	Flavonoles	Otros flavonoides	Lignanos	Otros polifenoles	Ácidos fenólicos	Estilbenos
Verano	WT	Control	2.9184 ± 1.4019 a	0.0402 ± 0.0199 a	0.0650 ± 0.0563 a	0.4229 ± 0.1152 n.d.	0.4165 ± 0.1941 n.d.	0.8407 ± 0.2533 a	1.3764 ± 0.3096 a	0.1014 ± 0.0682 ab
Verano	WT	Salinidad	11.5267 ± 7.4337 ab	0.0496 ± 0.0290 a	0.2169 ± 0.1355 ab	0.2223 ± 0.0796 n.d.	0.3998 ± 0.1331 n.d.	1.2106 ± 0.2697 ab	2.2988 ± 0.7699 b	0.2123 ± 0.0619 c
Verano	WT	Déficit hídrico	15.4146 ± 10.1993 ab	0.0655 ± 0.0418 a	0.2718 ± 0.3454 ab	0.3030 ± 0.1376 n.d.	0.4868 ± 0.2892 n.d.	1.1560 ± 0.3024 ab	2.0009 ± 0.4157 ab	0.1456 ± 0.0552 abc
Verano	WT	Salinidad + Déficit hídrico	16.9069 ± 10.1540 b	0.0445 ± 0.0291 a	0.5676 ± 0.4063 b	0.2337 ± 0.1106 n.d.	0.4719 ± 0.2292 n.d.	1.1175 ± 0.1806 ab	1.9344 ± 0.5263 ab	0.1566 ± 0.0562 abc
Verano	ffc	Control	7.2527 ± 4.0687 ab	0.0357 ± 0.0134 a	0.0867 ± 0.1096 a	0.2920 ± 0.1320 n.d.	0.5771 ± 0.0395 n.d.	0.9353 ± 0.2328 ab	2.2000 ± 0.4397 ab	0.0624 ± 0.0471 a
Verano	ffc	Salinidad	6.8468 ± 5.9558 ab	0.1144 ± 0.0959 ab	0.1475 ± 0.2248 ab	0.3069 ± 0.1061 n.d.	0.4938 ± 0.1429 n.d.	0.9641 ± 0.4051 ab	1.3493 ± 0.5643 a	0.1903 ± 0.0504 bc
Verano	ffc	Déficit hídrico	18.6652 ± 6.8428 b	0.1903 ± 0.0914 b	0.4848 ± 0.3276 ab	0.3718 ± 0.0523 n.d.	0.4167 ± 0.2243 n.d.	1.4467 ± 0.2411 b	2.1693 ± 0.4035 ab	0.1577 ± 0.0528 abc
Verano	ffc	Salinidad + Déficit hídrico	6.3687 ± 2.1605 ab	0.0451 ± 0.0103 a	0.0382 ± 0.0035 a	0.3288 ± 0.1216 n.d.	0.3699 ± 0.1303 n.d.	1.0585 ± 0.2789 ab	1.9675 ± 0.3255 ab	0.1798 ± 0.0789 bc
Invierno	Wt	Control	16.1624 ± 2.5973 a	0.7091 ± 0.3855 n.d.	0.4259 ± 0.0687 a	0.1612 ± 0.0199 a	0.1984 ± 0.0925 a	0.3671 ± 0.0260 ab	18.8892 ± 3.1903 n.d.	0.1740 ± 0.0265 ab
Invierno	Wt	Salinidad	18.4994 ± 5.8520 a	0.8712 ± 0.4040 n.d.	0.4978 ± 0.0832 a	0.2044 ± 0.0285 ab	0.3132 ± 0.0563 abc	0.5186 ± 0.0664 cd	19.5465 ± 4.1327 n.d.	0.2097 ± 0.0821 abc
Invierno	Wt	Déficit hídrico	28.0803 ± 7.5832 bc	0.9217 ± 0.6663 n.d.	0.6919 ± 0.1371 bc	0.2329 ± 0.0343 bc	0.3072 ± 0.1465 abc	0.4883 ± 0.0442 bc	21.1099 ± 4.7952 n.d.	0.1482 ± 0.0331 a
Invierno	Wt	Salinidad + Déficit hídrico	29.6919 ± 4.2147 c	0.6595 ± 0.3884 n.d.	0.8070 ± 0.1325 c	0.2226 ± 0.0208 bc	0.2813 ± 0.0540 ab	0.6370 ± 0.0955 d	19.5310 ± 2.1108 n.d.	0.1794 ± 0.0522 ab
Invierno	ffc	Control	18.1463 ± 3.0937 a	0.6218 ± 0.0742 n.d.	0.4402 ± 0.0515 a	0.4045 ± 0.0442 e	0.3002 ± 0.0461 abc	0.4429 ± 0.0707 abc	15.8430 ± 3.7386 n.d.	0.4017 ± 0.0877 d
Invierno	ffc	Salinidad	18.9327 ± 2.8653 ab	0.6532 ± 0.2173 n.d.	0.5122 ± 0.0216 ab	0.2202 ± 0.0229 bc	0.3658 ± 0.0667 bc	0.3414 ± 0.0545 a	14.6161 ± 6.4475 n.d.	0.2277 ± 0.0560 abc
Invierno	ffc	Déficit hídrico	21.5413 ± 7.1487 abc	0.6928 ± 0.2445 n.d.	0.4657 ± 0.1811 a	0.2677 ± 0.0378 cd	0.3074 ± 0.0623 abc	0.4206 ± 0.1043 abc	14.4114 ± 4.8649 n.d.	0.2597 ± 0.0353 bc
Invierno	ffc	Salinidad + Déficit hídrico	20.5759 ± 3.7340 abc	0.4803 ± 0.1031 n.d.	0.5863 ± 0.0483 ab	0.2966 ± 0.0213 d	0.4359 ± 0.0212 c	0.4447 ± 0.0485 abc	15.3149 ± 3.2718 n.d.	0.2973 ± 0.0667 cd

Tabla S13. Análisis de Tukey de la semicuantificación de fenoles en el fruto de tomate maduro

Verano												
Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución								
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	To1	
Genotipo	10%	1.292	0.01	99%	1%	2%	5%	5%	9%	8%	23%	
Tratamiento	15%	1.337	0.01	0%	96%	2%	5%	82%	69%	8%	22%	
Genotipo x Tratamiento	9%	1.157	0.24	0%	1%	95%	85%	6%	10%	73%	26%	
Residuos	66%	1	NA	1%	2%	2%	6%	7%	12%	11%	30%	

Invierno												
Factor	RSS	RSR	RSR p-valor	Bloque de contribución								
				Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6	Tp7	To1	
Genotipo	15%	1.748	0.01	99%	1%	1%	2%	2%	3%	5%	19%	
Tratamiento	16%	1.455	0.01	0%	97%	1%	90%	3%	3%	80%	23%	
Genotipo x Tratamiento	13%	1.287	0.23	0%	1%	98%	3%	91%	90%	7%	26%	
Residuos	56%	1	NA	0%	1%	1%	4%	4%	4%	9%	33%	

Tabla S14. Variabilidad relativa y contribuciones de bloque del análisis AMOPLS-DA de datos fenólicos adquiridos del fruto de plantas de tomate silvestres (WT) y mutantes *flacca* (*flc*) bajo condiciones control, salinidad, déficit hídrico, y combinación de salinidad y déficit hídrico en la estación de verano y de invierno. RSS: Suma Relativa de Cuadrados, RSR: Relación de Estructura Residual, Tp: componentes predictivos, To: componente ortogonal.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD15	3,4-Dihydroxyphenylglycol	Otros polifenoles	Otros polifenoles	9.7453	0.0032	0.0051
CPD9	Vanillin	Otros polifenoles	Hidroxibenzaldehídos	9.7451	0.0033	0.0053
CPD131	Glycitin	Flavonoides	Isoflavonoides	6.9909	0.3243	0.1991
CPD167	Pelargonidin 3-O-(6"-succinyl-glucoside)	Flavonoides	Antocianinas	6.9439	0.2789	0.4619
CPD91	p-HPEA-EA	Otros polifenoles	Tirosoles	6.8606	0.3516	0.2963
CPD211	Delphinidin 3-O-feruloyl-glucoside	Flavonoides	Antocianinas	6.2881	0.0201	0.0489
CPD98	5,6-Dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone	Flavonoides	Flavonas	5.6158	0.8689	0.7918
CPD186	Kaempferol 3-O-xylosyl-glucoside	Flavonoides	Flavonoles	5.3370	0.8035	1.3224
CPD189	Cyanidin 3-O-(6"-dioxalyl-glucoside)	Flavonoides	Antocianinas	4.5694	0.8757	0.2170
CPD59	Sinapine	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	4.3330	0.8072	0.6265
CPD100	7-Hydroxysecoisolaricresinol	Lignanos	Lignanos	3.6918	0.4147	1.9488
CPD224	1-Sinapoyl-2-feruloylgentiobiose	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	3.3727	0.1476	0.7079
CPD74	Demethoxycurcumin	Otros polifenoles	Curcuminoides	3.3722	0.3908	1.1832
CPD155	Malvidin 3-O-glucoside	Flavonoides	Antocianinas	3.3182	0.8023	0.3072
CPD83	Sesamin	Lignanos	Lignanos	3.0285	0.6271	0.3844
CPD237	Prodelphinidin trimer GC-GC-C	Flavonoides	Flavonoles	2.9926	0.8105	0.1375
CPD112	5-Heneicosylresorcinol	Otros polifenoles	Alquilfenoles	2.8845	0.8394	0.2603
CPD172	Oleuropein	Otros polifenoles	Tirosoles	2.5460	0.4381	0.7125
CPD190	Kaempferol 3-O-rutinoside	Flavonoides	Flavonoles	2.5341	0.6960	1.2197
CPD31	Pinocembrin	Flavonoides	Flavanonas	2.3889	1.6110	2.4963
CPD152	6"-O-Acetylglucitin	Flavonoides	Isoflavonoides	2.3482	0.6918	1.1269
CPD208	Quercetin 3-O-sophoroside	Flavonoides	Flavonoles	2.2630	3.6584	0.4639
CPD101	5-Nonadecenylresorcinol	Otros polifenoles	Alquilfenoles	2.2554	0.3336	0.9509
CPD222	Quercetin 3-O-(6"-malonyl-glucoside) 7-O-glucoside	Flavonoides	Flavonoles	2.1103	0.8773	1.2231
CPD6	Estragole	Otros polifenoles	Hidroxifenilpropenos	2.0805	1.0894	1.8076

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD114	<i>Daidzin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	0.2064	4.6284	1.4932
CPD181	<i>Pelargonidin 3-O-sambubioside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.0317	4.2011	0.7375
CPD240	<i>Spinacetin 3-O-(2''-p-coumaroylglucosyl)(1-6)-[apiosyl(1-2)]-glucoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.1333	3.9742	0.9878
CPD208	<i>Quercetin 3-O-sopharoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	2.2630	3.6584	0.4639
CPD214	<i>Quercetin 3-O-(6''-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.7273	3.5090	0.6349
CPD219	<i>1,2-Diferuloylgentiobiose</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.8212	3.4446	0.8480
CPD26	<i>Sinapic acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.1457	3.3486	0.1846
CPD183	<i>Procyanidin dimer B1</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.0014	3.2802	0.5970
CPD62	<i>Protocatechuic acid 4-O-glucoside</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	1.3906	2.9764	4.4435
CPD129	<i>Phloridzin</i>	Flavonoides	Dihidrochalconas	0.1427	2.7607	0.0046
CPD34	<i>Formononetin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	1.7915	2.5983	0.9942
CPD236	<i>Pradelphinidin trimer C-GC-C</i>	Flavonoides	Flavonoles	1.2223	2.5675	3.5145
CPD162	<i>5,3',4'-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone 4'-O-glucuronide</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.4756	2.5625	0.5220
CPD111	<i>Oleoside 11-methylester</i>	Otros polifenoles	Tirosoles	0.0375	2.5596	1.1875
CPD223	<i>Theaflavin 3-O-gallate</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.4705	2.5413	0.4993
CPD107	<i>Resveratrol 3-O-glucoside</i>	Estilbenos	Estilbenos	0.1428	2.5155	2.1652
CPD47	<i>Avenanthramide 2p</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	1.1325	2.4239	3.6186
CPD213	<i>Apigenin 7-O-(6''-malonyl-apiosyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Flavonas	0.0106	2.4160	1.2419
CPD138	<i>(+)-Catechin 3-O-glucose</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.1270	2.3836	0.5576
CPD23	<i>Pinosylvin</i>	Estilbenos	Estilbenos	0.9632	2.3296	0.0979
CPD136	<i>Myricetin 3-O-arabinoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.1004	2.3259	1.6683
CPD69	<i>Avenanthramide 2f</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.0002	2.3019	0.5979
CPD86	<i>Conidendrin</i>	Lignanós	Lignanós	0.0001	2.2851	0.0288
CPD173	<i>3,5-Diferuloylquinic acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	1.9414	2.1440	3.1981
CPD82	<i>3-Caffeoylquinic acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.8212	2.1327	0.8126

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD62	<i>Protocatechuic acid 4-O-glucoside</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	1.3906	2.9764	4.4435
CPD47	<i>Avenanthramide 2p</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	1.1325	2.4239	3.6186
CPD236	<i>Pradelphinidin trimer C-GC-C</i>	Flavonoides	Flavonoles	1.2223	2.5675	3.5145
CPD185	<i>Pelargonidin 3-O-rutinoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.0094	1.0021	3.2089
CPD49	<i>4-Hydroxybenzoic acid 4-O-glucoside</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	0.1579	0.3240	3.2088
CPD173	<i>3,5-Diferuloylquinic acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	1.9414	2.1440	3.1981
CPD239	<i>1,2'-Disinapoyl-2-feruloylgentiobiose</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.3943	0.1337	3.0826
CPD48	<i>Hispidulin</i>	Flavonoides	Flavonas	1.1937	1.2833	2.9581
CPD109	<i>Nobiletin</i>	Flavonoides	Flavonas	0.0006	0.1444	2.5498
CPD31	<i>Pinocembrin</i>	Flavonoides	Flavanonas	2.3889	1.6110	2.4963
CPD174	<i>Chrysoeriol 7-O-(6''-malonyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Flavonas	1.4558	0.8694	2.3732
CPD5	<i>Cinnamic acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	1.4976	1.2383	2.3483
CPD207	<i>Petunidin 3-O-(6''-p-coumaroyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.1837	1.2971	2.3251
CPD187	<i>Naringin</i>	Flavonoides	Flavanonas	0.0376	0.7743	2.2895
CPD202	<i>Quercetin 3-O-rutinoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.0329	0.5298	2.2436
CPD212	<i>Petunidin 3,5-O-diglucoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.0010	1.1808	2.2233
CPD128	<i>Delphinidin 3-O-xyloside</i>	Flavonoides	Antocianinas	1.1340	1.3554	2.1776
CPD107	<i>Resveratrol 3-O-glucoside</i>	Estilbenos	Estilbenos	0.1428	2.5155	2.1652
CPD126	<i>Quercetin 3-O-xyloside</i>	Flavonoides	Flavonoles	1.1344	1.3442	2.1592
CPD145	<i>Quercetin 3-O-glucoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.6503	1.3261	2.1540
CPD199	<i>Peonidin 3-O-rutinoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.6505	1.3922	2.0785
CPD46	<i>Kaempferide</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.3836	0.7130	2.0645
CPD134	<i>Kaempferol 3-O-glucoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.6504	1.2496	2.0604
CPD217	<i>Naringin 6'-malonate</i>	Flavonoides	Flavanonas	2.0116	0.4698	1.9561
CPD100	<i>7-Hydroxysecoisolariciresinol</i>	Lignanós	Lignanós	3.6918	0.4147	1.9488

Tabla S15. Marcadores fenólicos de tomates cosechados en verano, determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros genotipo, tratamiento y la interacción genotipo x tratamiento.

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD93	<i>Conidendrin</i>	Lignanos	Lignanos	6.0372	0.0768	0.0963
CPD207	<i>Quercetin 3-O-glucosyl-xyloside</i>	Flavonoides	Flavonoles	5.7087	0.0643	0.0460
CPD209	<i>Delphinidin 3-O-sambubioside</i>	Flavonoides	Antocianinas	5.7087	0.0643	0.0460
CPD138	<i>Delphinidin 3-O-xyloside</i>	Flavonoides	Antocianinas	5.5633	0.1792	0.1999
CPD179	<i>6"-O-Malonylglycitin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	5.3552	0.6243	0.0582
CPD171	<i>Delphinidin 3-O-(6"-acetyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Antocianinas	5.2558	0.4345	0.3189
CPD190	<i>Secoisolariciresinol-sesquilignan</i>	Lignanos	Lignanos	4.4642	0.3160	1.0004
CPD10	<i>4-Ethylguaiaicol</i>	Otros polifenoles	Alquilmetoxifenoles	4.3345	0.8500	1.0552
CPD199	<i>Kaempferol 3-O-xylosyl-glucoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	4.2868	0.3049	0.9515
	<i>Kaempferol 3-O-(6"-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Flavonoles			
CPD224				3.9652	1.2225	1.5141
CPD104	<i>Arctigenin</i>	Lignanos	Lignanos	3.8177	0.4481	0.2472
CPD228	<i>Apigenin 7-O-(6"-malonyl-apiosyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Flavonas	3.6620	1.6092	0.5949
CPD229	<i>Quercetin 3-O-(6"-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	3.6483	1.5792	0.5550
CPD241	<i>Cyanidin 3-O-xylosyl-rutinoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	3.6441	1.5208	0.4590
CPD118	<i>Pelargonidin 3-O-arabioside</i>	Flavonoides	Antocianinas	3.6248	0.3162	0.3971
CPD232	<i>Luteolin 7-O-(2-apiosyl-6-malonyl)-glucoside</i>	Flavonoides	Flavonas	3.5848	1.2180	1.4887
CPD187	<i>Cyanidin 3-O-(6"-succinyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Antocianinas	3.4544	1.0927	1.3903
CPD177	<i>Ligstroside</i>	Otros polifenoles	Tirosoles	3.3025	0.1213	0.3253
CPD221	<i>Petunidin 3-O-(6"-p-coumaroyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Antocianinas	3.2216	2.0195	0.5400
CPD255	<i>1-Sinapoyl-2,2'-diferuloylgentiobiose</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxycinámicos	3.2202	0.7806	0.4515
CPD158	<i>Dihydromyricetin 3-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Dihidroflavonoles	3.1533	2.0464	0.4347
CPD191	<i>Vitisin A</i>	Flavonoides	Antocianinas	2.9563	0.8778	0.9259
CPD149	<i>e-Viniferin</i>	Estilbenos	Estilbenos	2.9559	0.6784	0.3530
CPD150	<i>(+)-Gallocatechin 3-O-gallate</i>	Flavonoides	Flavonoles	2.9549	0.8017	0.7930
CPD61	<i>p-HPEA-EDA</i>	Otros polifenoles	Tirosoles	2.9363	0.8134	0.9750

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD200	<i>Naringin</i>	Flavonoides	Flavanones	0.0953	4.1162	0.1527
CPD134	<i>Pelargonidin 3-O-glucoside</i>	Flavonoides	Anthocyanins	1.5210	3.8663	0.5567
CPD40	<i>Naringenin</i>	Flavonoides	Flavanones	1.7055	3.5837	0.3790
CPD49	<i>(+)-Catechin</i>	Flavonoides	Flavanols	1.7055	3.5837	0.3790
CPD130	<i>Kaempferol 3-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.0940	3.4839	0.7355
CPD131	<i>Genistin</i>	Flavonoides	Isoflavonoids	0.0963	3.4831	0.7411
CPD146	<i>Myricetin 3-O-arabioside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.1796	3.3333	0.2328
CPD23	<i>Hydroxycaffeic acid</i>	Ácidos fenólicos	Hydroxycinnamic acids	0.6695	3.2248	0.4892
CPD231	<i>Malvidin 3,5-O-diglucoside</i>	Flavonoides	Anthocyanins	0.0468	3.1366	0.1592
CPD56	<i>[6]-Gingerol</i>	Otros polifenoles	Hydroxyphenylpropenes	0.0107	2.7785	0.4403
	<i>Spinacetin 3-O-(2'''-p-coumaroylglucosyl)(1-6)-[apiosyl(1-2)]-glucoside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.3230	2.7327	0.0300
CPD54	<i>Hispidulin</i>	Flavonoides	Flavones	0.9462	2.6955	3.3465
CPD57	<i>Peonidin</i>	Flavonoides	Anthocyanins	0.9462	2.6955	3.3465
CPD69	<i>Rhamnetin</i>	Flavonoides	Flavanols	0.9461	2.6951	3.3461
CPD39	<i>Formononetin</i>	Flavonoides	Isoflavonoids	0.9455	2.6933	3.3438
CPD46	<i>Sakuranetin</i>	Flavonoides	Flavanones	0.9455	2.6933	3.3438
CPD233	<i>Spinacetin 3-O-glucosyl-(1-6)-glucoside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.5046	2.6507	0.5897
CPD244	<i>Quercetin 3-O-xylosyl-rutinoside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.0053	2.3854	1.4225
CPD246	<i>Cyanidin 3-O-sambubioside 5-O-glucoside</i>	Flavonoides	Anthocyanins	0.0138	2.3732	1.3947
CPD91	<i>Xanthohumol</i>	Flavonoides	Chalcones	0.3448	2.3375	2.5719
CPD162	<i>Isorhamnetin 3-O-glucoside</i>	Flavonoides	Flavanols	1.0986	2.3102	1.7550
CPD172	<i>3,4-Dicaffeoylquinic acid</i>	Ácidos fenólicos	Hydroxycinnamic acids	1.2139	2.2972	0.7957
	<i>Kaempferol 3-O-(2"-rhamnosyl-6"-acetyl-galactoside) 7-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Flavanols	0.4302	2.2859	2.1157
CPD251				0.4302	2.2859	2.1157
CPD66	<i>Caffeoyl tartaric acid</i>	Ácidos fenólicos	Hydroxycinnamic acids	0.7692	2.1913	2.7205
CPD236	<i>Cyanidin 3-O-(6"-malonyl-3"-glucosyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Anthocyanins	0.8696	2.1226	0.8083

CPD	Nombre del compuesto	Clase	Subclase	Puntuación VIP ₂		
				Genotipo	Tratamiento	Genotipo x Tratamiento
CPD152	<i>5-Pentacosenylresorcinol</i>	Otros polifenoles	Alquilfenoles	0.1758	0.1819	4.6985
CPD53	<i>Avenanthramide 2p</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.0071	0.4269	3.9205
CPD222	<i>Quercetin 3-O-sophoroside</i>	Flavonoides	Flavonoles	2.1410	0.4711	3.4739
CPD54	<i>Hispidulin</i>	Flavonoides	Flavonas	0.9462	2.6955	3.3465
CPD57	<i>Peonidin</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.9462	2.6955	3.3465
CPD69	<i>Rhamnetin</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.9461	2.6951	3.3461
CPD39	<i>Formononetin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	0.9455	2.6933	3.3438
CPD46	<i>Sakuranetin</i>	Flavonoides	Flavanonas	0.9455	2.6933	3.3438
CPD132	<i>3-Methoxynobiletin</i>	Flavonoides	Flavonoles	1.3759	0.2225	3.2406
CPD78	<i>Galloyl glucose</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzoicos	0.2236	1.5541	3.0040
CPD143	<i>Petunidin 3-O-rhamnoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.0006	0.9146	2.9549
CPD250	<i>Kaempferol 3,7,4'-O-triglucoside</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.0153	0.8216	2.8752
CPD153	<i>5-Pentacosylresorcinol</i>	Otros polifenoles	Alquilfenoles	1.3195	0.0957	2.8675
CPD227	<i>Petunidin 3,5-O-diglucoside</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.4749	0.6224	2.8520
CPD173	<i>6''-O-Malonylgenistin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	0.9327	2.0233	2.8215
CPD66	<i>Caffeoyl tartaric acid</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.7692	2.1913	2.7205
CPD174	<i>Pelargonidin 3-O-(6''-malonyl-glucoside)</i>	Flavonoides	Antocianinas	0.3306	1.9755	2.6707
CPD210	<i>Diosmin</i>	Flavonoides	Flavonas	1.0609	1.4259	2.6354
CPD235	<i>1,2-Diferuloylgentiobiose</i>	Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos	0.9389	1.9321	2.5898
CPD91	<i>Xanthohumol</i>	Flavonoides	Chalconas	0.3448	2.3375	2.5719
CPD36	<i>Pinocembrin</i>	Flavonoides	Flavanonas	0.3521	0.4369	2.5503
CPD123	<i>Daidzin</i>	Flavonoides	Isoflavonoides	0.3653	1.0995	2.4042
CPD19	<i>p-HPEA-AC</i>	Otros polifenoles	Tirosoles	1.4574	0.7677	2.4012
CPD52	<i>Kaempferide</i>	Flavonoides	Flavonoles	0.4635	0.7713	2.3559
CPD213	<i>Quercetin 3-O-xylosyl-glucuronide</i>	Flavonoides	Flavonoles	1.7370	1.8332	2.2945

Tabla S16. Marcadores fenólicos de tomates cosechados en invierno, determinados a partir del análisis VIP₂ (Importancia Variable en la Proyección versión 2) para los parámetros genotipo, tratamiento y la interacción genotipo x tratamiento.