



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR A

**Sobreexpresión de Genes en Tomate y Generación de
Líneas T-DNA en la Especie Silvestre *Solanum
pennellii* para identificar Determinantes de la
Tolerancia al Estrés Hídrico y la Salinidad**

D^a. Elena Moyano Solera

2013



Autorización del Director de Tesis

D^a. María del Carmen Bolarín Jiménez, Profesora de Investigación del CSIC, con destino en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS),
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad”**, realizada por D^a. Elena Moyano Solera bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para el grado de Doctora por la Universidad de Murcia

En Murcia a 29 de abril de 2013

Autorización del Director de Tesis

Dr. Alejandro Atarés Huerta, Profesor de la Universidad Politécnica de Valencia e Investigador del Laboratorio de Cultivo *in vitro* y mejora vegetal perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (U.P.V.-C.S.I.C.), AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad”**, realizada por D^a. Elena Moyano Solera bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para el grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

En Valencia a 25 de Abril de 2013

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned below the date.

Fdo.: Dr. Alejandro Atarés



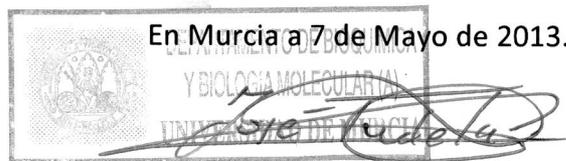
UNIVERSIDAD DE
MURCIA

José Tudela Serrano, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A,

INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la Tesis Doctoral titulada: **“Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad”**, realizada por D^a. Elena Moyano Solera bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. María del Carmen Bolarín Jiménez y D. Alejandro Atarés Huerta, este Consejo de Departamento, en sesión celebrada en fecha 7 de mayo de 2013, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

En Murcia a 7 de Mayo de 2013.



Fdo.: Dr. José Tudela Serrano.
Director del Departamento.

Doctorando: D^a. Elena Moyano Solera



Fernando Soler Pardo, Profesor Titular de la Universidad de Murcia en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *Solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad”**, ha sido realizada por D^a. Elena Moyano Solera bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. María del Carmen Bolarín Jiménez y D. Alejandro Atarés Huerta y que el Consejo de Departamento, en sesión celebrada en fecha 7 de mayo de 2013, ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión General de Doctorado.

En Murcia a 7 de mayo de 2013

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR (A)
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Dr. Fernando Soler Pardo

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I.- Problemas ocasionados por los estreses hídrico y salino	3
II.- Cómo responden las plantas frente a los estreses hídrico y salino	4
II.1.- Respuesta al estrés osmótico	5
II.2.- Respuesta al estrés iónico	7
II.3.- Otros efectos inducidos por ambos estreses	9
II.4.- Homeostasis y protección o reparación del daño provocado por los estreses hídrico y salino	10
III.- Avances en la mejora de la tolerancia a los estreses hídrico y salino	13
IV.- Herramientas para el análisis funcional de genes implicados en la tolerancia a los estreses hídrico y salino	15
IV.1.- Sobreexpresión y anulación de genes	16
IV.2.- Transcriptómica y proteómica	19
IV.3.- Identificación y análisis de mutantes	21
IV.3.1.- Mutagénesis insercional	21
IV.3.1.1.- Mutagénesis con transposones	22
IV.3.1.2.- Mutagénesis con T-DNA	23
IV.4.- Mutagénesis insercional mediante trampas génicas	25
V.- Interés del tomate y especies silvestres afines en los estudios de tolerancia a salinidad y estrés hídrico	28

OBJETIVOS	35
------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>HAL5</i> E <i>IMP1</i> RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE	39
---	----

I.1.- Material vegetal	39
I.2.- Cultivo y evaluación de las plantas en condiciones controladas	40
I.3.- Cultivo y evaluación de las plantas en el invernadero	41
I.4.- Evaluación de la tolerancia a la salinidad mediante técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	43
I.5.- Caracterización fisiológica	44
I.6.- Caracterización molecular	47
I.7.- Tratamiento estadístico	47
II.- IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN <i>Solanum pennellii</i>	48
II.1.- Material Vegetal	48
II.2.- Generación de una colección de líneas T-DNA a partir de <i>Solanum pennellii</i>	48
II.3.- Cultivo y evaluación de las plantas en condiciones controladas	51
II.4.- Cultivo y evaluación de las plantas en el invernadero	52
II.4.1.- Evaluación a medio plazo	52
II.4.2.- Evaluación a largo plazo	52
II.5.- Análisis de la expresión del gen delator en líneas T-DNA de <i>Solanum pennellii</i>	53

RESULTADOS

I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>HAL5</i> E <i>IMP1</i> RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE	59
I.1.- Análisis funcional del gen <i>HAL5</i> implicado en la tolerancia a la salinidad	59
I.1.1.- Tolerancia a la salinidad a largo plazo inducida por la sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> en plantas de tomate	59
I.1.2.- Tolerancia a la salinidad <i>in vitro</i> inducida por la sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> en plantas de tomate	66
I.1.3.- Caracterización fisiológica de la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen <i>HAL5</i>	69
I.2.- Análisis funcional del gen <i>IMP1</i> implicado en la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico	79
I.2.1.- Tolerancia a la salinidad y estrés hídrico a largo plazo inducida por la sobreexpresión del gen <i>IMP1</i> en plantas de tomate	79
I.2.2.- Caracterización fisiológica de la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico inducida por la sobreexpresión del gen <i>IMP1</i>	84

II.-IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN <i>Solanum pennellii</i>	90
II.1.- Selección de accesiones de especies silvestres para abordar un programa de identificación y aislamiento de genes mediante mutagénesis insercional	90
II.2.- Generación de una colección de líneas T-DNA a partir de <i>Solanum pennellii</i>	92
II.3.- Análisis de la expresión del gen delator en líneas T-DNA de <i>Solanum pennellii</i>	94
II.3.1.- Análisis de la expresión del gen delator en líneas cultivadas sin estrés y en condiciones de salinidad o sequía	
II.3.2.- Detección de líneas con expresión del gen delator en tricomas, raíces o estomas	100
II.4.- Identificación de mutantes en la colección de líneas T-DNA	106
II.4.1.- Mutantes afectados en el desarrollo vegetativo	107
II.4.2.- Mutantes afectados en el desarrollo reproductivo	110
II.4.3.- Mutantes afectados en la tolerancia a estrés hídrico	120
II.4.4.- Mutantes afectados en la tolerancia a estrés salino	122

DISCUSIÓN

I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>HAL5</i> E <i>IMP1</i> RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE	131
I.1.- Importancia del material vegetal y del proceso de evaluación en la identificación de genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos	131
I.2.- La sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> incrementa la tolerancia a salinidad en tomate a nivel de planta y a nivel celular	135
I.3.- La tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> en tomate está asociada a la regulación del transporte de Na^+ a la parte aérea y menor acumulación de Na^+ en hoja	137
I.4.- La sobreexpresión del gen <i>IMP1</i> incrementa la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico en tomate	141
I.5.- La tolerancia inducida por la sobreexpresión del gen <i>IMP1</i> en tomate está asociada a la tolerancia al estrés osmótico inducido por la salinidad y estrés hídrico	142
II.- IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN <i>Solanum pennellii</i>	146

II.1.- Elección de genotipos adecuados para abordar un programa de mutagénesis insercional	146
II.2.- Requisitos para abordar un programa de identificación de genes mediante mutagénesis insercional	147
II.3.- El empleo de una trampa de intensificadores para la identificación de señales de regulación mediante el análisis de la expresión del gen delator	149
II.4.- Identificación de mutantes en caracteres del desarrollo y de tolerancia a estreses abióticos	152
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Peso total y número de frutos por planta del cv p73 (WT) y de las poblaciones segregantes de diferentes líneas transgénicas de *HAL5* cultivadas con NaCl 100 mM. Valores medios de 12 plantas por línea \pm ES. 60
- Figura 2.-** Niveles de expresión relativa del gen *HAL5* en las plantas directamente transformadas (TG1) con dicho gen. 61
- Figura 3.-** Peso total de frutos por planta del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) de 3 líneas transgénicas de *HAL5* (2, 71 y 65) cultivadas sin estrés salino (A) y sus correspondientes valores porcentuales cuando se cultivan con estrés salino (B) (Peso total fruto 100 mM NaCl / Peso total fruto 0 mM NaCl). Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. 62
- Figura 4.-** Peso total de frutos por planta de la variedad sin transformar (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* a diferentes niveles de salinidad. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias (LSD_{5%}). 63
- Figura 5.-** Concentraciones de Na⁺, K⁺, azúcares y relación Na⁺/K⁺ en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* L65 y L71 desarrolladas a diferentes niveles de salinidad durante 50 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. 65
- Figura 6.-** Desarrollo de callos de la variedad sin transformar (WT) y de la línea homocigótica para el gen *HAL5* (L65) en medio de cultivo sin sal (control) y con sal (75mM de NaCl) durante 25 días. 67
- Figura 7.-** Evolución del peso fresco de callos de la variedad sin transformar (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* (L65 y L71) durante los 35 días de tratamiento (75 y 150 mM de NaCl). Valores medios de 60 callos por línea \pm ES. 68
- Figura 8.-** Concentración de Na⁺ (mmol/kg peso seco) en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas homocigóticas para el gen *HAL5* (L2 y L65) desarrolladas en sal (150 mM NaCl) durante 20 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. 70
- Figura 9.-** Concentración de Na⁺ (mmol/kg peso seco) en hoja, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (100 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias (LSD_{5%}). 71
- Figura 10.-** Caracterización fenotípica de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5*. Hojas y raíces de plantas WT (izquierda) y plantas transgénicas (derecha) a los 28 días de tratamiento salino (200 mM NaCl). 74

- Figura 11.-** Evolución de la concentración de Na⁺ (mmol/kg peso seco) en las hojas, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (200 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 76
- Figura 12.-** Tasa de acumulación de Na⁺ (mmol/kg peso seco) por día entre los 7 y 14 días de tratamiento (200 mM NaCl) en las hojas, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5*. 76
- Figura 13.-** Evolución de la concentración de K⁺ (mmol/kg peso seco) y de la relación Na⁺/K⁺ en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (200 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 78
- Figura 14.-** Peso total y número de frutos por planta del cv p73 (WT) y de líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) para el gen *IMP1* desarrolladas en condiciones control. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. *Diferencias significativas entre medias del peso total de frutos (LSD_{5%}). 80
- Figura 15.-** Peso total de frutos por planta de líneas homocigóticas para el gen *IMP1* desarrolladas en 50 mM NaCl. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 81
- Figura 16.-** Peso total de frutos por planta de la línea acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* (L10) desarrolladas en control y 50 mM NaCl en cultivo de verano (izquierda) y en control y 75 mM NaCl en cultivo de invierno (derecha). Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 82
- Figura 17.-** Peso total por planta de la parte aérea vegetativa (A) y de frutos (B) del cv p73 (WT) y de líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) para el gen *IMP1* desarrolladas en condiciones de estrés hídrico durante 50 días. El estrés se aplicó por reducción del riego (30%) del volumen aplicado a las plantas control. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 84
- Figura 18.-** Concentraciones de inositol, azúcares y ácidos orgánicos en las hojas de la línea 10 acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES. 88
- Figura 19.-** Plantas de *S. lycopersicum* (parte superior) y de *S. pennellii* '20164' (parte inferior) cultivados en invernadero sin ningún tratamiento (izquierda) y tras dos meses sometidas a un tratamiento de NaCl 200 mM (derecha). 91
- Figura 20.-** Mantenimiento de las plantas transgénicas en la cámara de cultivo (izquierda) y crecimiento en el invernadero tras su aclimatación (derecha). 94

Figura 21.- Trampa de intensificadores. RB Right Border; LB Left Border; TT , terminador; 35S , promotor constitutivo; PM , promotor mínimo.	95
Figura 22.- Expresión del gen delator en diferentes órganos de la planta. a Pelos radiculares. b Granos de polen y tejido de la antera. c Semillas inmaduras. d Estigma. e-g Vasos conductores de raquis (e), tallo (g) y foliolo de hoja. La barra representa 1 mm.	95
Figura 23.- Expresión del gen delator en diferentes órganos de la línea 1066 ET SP procedentes de plantas sometidas a un tratamiento de estrés hídrico (f-j) y los correspondientes controles cultivados en condiciones normales (a-e). f Limbo y peciololo tras un día de estrés hídrico. g Limbo y peciololo tras siete días de estrés hídrico. h Limbo y peciololo tras treinta días de estrés hídrico. i Sección transversal de raquis tras treinta días de estrés hídrico. j Sección transversal de tallo tras treinta días de estrés hídrico. La barra representa 1 mm.	98
Figura 24.- Expresión del gen delator en secciones transversales de tallo (a y b) y epidermis de hoja (c y d) procedentes de plantas de la línea 492 ET SP cultivadas en condiciones normales (a y c) y con un tratamiento de estrés salino (b y d). La barra representa 1 mm.	99
Figura 25.- Expresión del gen delator en secciones transversales de tallo (a y b) y de raquis de hoja (c y d) procedentes de plantas de la línea 464 ET SP cultivadas en condiciones normales (a y c) y con un tratamiento de estrés hídrico (b y d). La barra representa 1 mm.	100
Figura 26.- Expresión en explantes de tallo del gen delator en todo el tricoma (izquierda) o únicamente en su parte terminal (derecha). La barra representa 1 mm.	101
Figura 27.- Expresión del gen delator en diferentes partes de la raíz. a Zona meristemática. b Zona cercana al meristemo. c Tejidos conductores. La barra representa 1 mm.	103
Figura 28.- Expresión del gen delator en estomas presentes en la epidermis de distintas partes de la planta (limbo de la hoja en la parte superior y tallo y peciolo en la parte inferior). La barra representa 1 mm.	105
Figura 29.- Tricomas en el tallo y sistema radicular generado tras el cultivo de segmentos de tallo con yemas axilares en medio de enraizamiento; a y c) <i>S. pennellii</i> 'PE47'; b y d) mutante 4728 ET SP. (Faltan escalas)	108
Figura 30.- Sistema radicular generado tras el cultivo de segmentos de tallo con yemas axilares en medio de enraizamiento (parte izquierda) y cultivo hidropónico (parte derecha) de <i>S. pennellii</i> 'PE47' (izquierda) y el mutante 4874 ET SP (derecha).	109

Figura 31.- Fenotipo del mutante 646 ET SP que presenta la formación de flores en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .	110
Figura 32.- a planta de <i>S. pennellii</i> '20164' en floración y detalle de inflorescencia. b planta de 475 ET SP y detalle de inflorescencia.	111
Figura 33.- Flores de <i>S. pennellii</i> 'LA0716' (parte superior) y del genotipo 7027 ET SP (parte inferior) en preantesis y antesis.	112
Figura 34.- Inflorescencias y plantas de <i>S. pennellii</i> '20164' y 450 ET SP crecidas en el invernadero.	113
Figura 35.- Expresión del gen delator en diferentes estructuras vegetativas y reproductivas del mutante 561 ET SP. a foliolo y peciololo. b raquis. c tallo. d fruto. e flor en preantesis.	114
Figura 36.- Fenotipo y expresión del gen delator en diferentes estructuras reproductivas del mutante 483 ET SP. a Frutos de <i>S. pennellii</i> '20164' (parte superior) y 483 ET SP (parte inferior). Expresión del gen delator en: b pericarpo del fruto y c granos de polen de flor en antesis. La barra representa 10 mm.	115
Figura 37.- Fenotipo y expresión del gen delator en el fruto del mutante 488 ET SP. a Frutos de <i>S. pennellii</i> '20164' (parte superior) y 488 ET SP (parte inferior). Expresión del gen delator en: b pericarpo y sépalos y c epidermis del fruto. La barra representa 10 mm.	116
Figura 38.- Fenotipo y expresión del gen delator en diferentes estructuras reproductivas del mutante ET SP 529. a flores de <i>S. pennellii</i> '20164' (izquierda) del mutante (derecha). Expresión del gen delator en: b estigma, estilo y ovario de flor en preantesis, c pericarpo y semillas de fruto. La barra representa 10 mm.	117
Figura 39.- Correlación entre el número de semillas y el peso (parte superior) o el diámetro (parte inferior) de los frutos de 529 ET SP.	118
Figura 40.- Frutos de la línea '20164' (izquierda) y de la línea 698 ET SP (derecha). La barra representa 10 mm.	119
Figura 41.- Frutos de: a y c 4777 ET SP y b <i>S. pennellii</i> 'PE47'.	120
Figura 42.- a Planta de 492 ET SP planta sin tratamiento. Planta de, b 492 ET SP y c <i>S. pennellii</i> '20164', tras 30 días de estrés hídrico. Planta de, d 492 ET SP y e <i>S. pennellii</i> '20164', tras 60 días de estrés hídrico.	121
Figura 43.- Ápices del mutante 515 ET SP de plantas sin tratamiento (a), tras 21 (b) y 35 (c) días de tratamiento estresante.	122
Figura 44.- Planta de 4794 ET SP sin tratamiento (izquierda) y planta de 4794 ET SP tras 30 días de estrés salino NaCl 200 mM. La barra representa 10 cm.	123

Figura 45.- Planta de 4542 ET SP sin tratamiento (izquierda), con tratamiento salino NaCl 200 mM durante 8 días (centro) y 15 días (derecha). La barra representa 1 cm. 124

Figura 46.- a) plantas cultivadas en cámara de condiciones controladas de 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (centro y derecha). **b)** Contenido en clorofila (media \pm ES) de estas plantas cultivadas sin presión de selección. 125

Figura 47.- a) plantas cultivadas durante 16 días con 200 mM de NaCl en cámara de condiciones controladas, 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (derecha). **b)** Contenido en clorofila (media \pm ES) de estas plantas cultivadas con un tratamiento de estrés salino. 125

Figura 48.- a) plantas cultivadas durante 35 días con 200 mM de NaCl en el invernadero, 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (derecha). **b)** Contenido en clorofila (media \pm ES) de estas plantas cultivadas con un tratamiento de estrés salino. 126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Desarrollo de los callos procedentes del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) de líneas transgénicas de <i>HAL5</i> (L65 y L71) desarrollados en medio de cultivo control durante 25 días. Valores medios de 60 callos por línea \pm ES.	66
Tabla 2.- Translocación de Na^+ a la parte aérea (mmol/kg peso fresco raíz) y flujo hacia la hoja (mmol/kg peso fresco) durante el primer (0-14 días) y segundo periodo de tratamiento (14-28 días) en plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> (L65) desarrolladas a 100 mM de NaCl.	72
Tabla 3.- Peso de raíz y parte aérea (g) de plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> (L65) desarrolladas a 200 mM de NaCl durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).	73
Tabla 4.- Translocación de Na^+ a parte aérea (mmol/kg peso fresco raíz) y flujo hacia tallo y hojas (mmol/kg peso fresco órgano) durante el segundo periodo de tratamiento (14-28 días) en plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen <i>HAL5</i> (L65) desarrolladas a 200 mM de NaCl.	77
Tabla 5.- Concentración de Na^+ y potencial osmótico de hojas de la línea acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen <i>IMP1</i> (L10) desarrolladas en control y a 50 mM de NaCl. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).	85
Tabla 6.- Potencial hídrico, osmótico y potencial de turgor (MPa) en las hojas de la línea 10 acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen <i>IMP1</i> durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).	86
Tabla 7.- Concentraciones de K^+ , azúcares y ácidos orgánicos en las hojas de la línea 10 acigótica(A) y homocigótica (H) para el gen <i>IMP1</i> durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).	87
Tabla 8.- Número de plantas obtenidas en cada transformación con las distintas accesiones de <i>S. pennellii</i> .	93
Tabla 9.- Porcentaje de líneas T-DNA de <i>Solanum pennellii</i> que presentan expresión del gen delator en diferentes estructuras de la parte aérea en plantas sin tratamiento 0 mM y con tratamiento salino (150 mM de NaCl) tras 1, 7 y 30 días de tratamiento (DT).	96

Tabla 10.- Genotipos con expresión del gen delator en tricomas.	102
Tabla 11.- Genotipos con expresión del gen delator en raíces.	104
Tabla 12.- Genotipos con expresión del gen delator en estomas.	105

RESUMEN

El problema de la salinidad y estrés hídrico continúa incrementando su importancia debido a la escasez cada vez mayor de agua para riego junto a la mala calidad de la disponible. La mejora genética de las plantas cultivadas para tolerar este tipo de estrés abiótico puede paliar en parte las consecuencias negativas de este problema. Sin embargo, la tolerancia a los estreses hídrico y salino es un carácter particularmente complejo ya que está compuesto por la interacción de muchos caracteres. Dentro de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* está incluido el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) y 12 especies afines más, conocidas como tomates silvestres, con accesiones que presentan una alta tolerancia a estos estreses. La cercanía filogenética a la especie cultivada, de gran importancia económica en todo el mundo, hace de estas especies el principal recurso genético para la mejora de tomate cultivado.

Este trabajo se enmarca en un proyecto coordinado entre tres grupos de investigación pertenecientes a la Universidad de Almería, la Universidad Politécnica de Valencia y el CEBAS de Murcia, en el que estamos utilizando dos herramientas genómicas (mutagénesis insercional y trapping) en tomate y diversas especies silvestres relacionadas para identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo vegetativo (arquitectura de la planta) y reproductivo (flor y fruto), así como en salinidad y estrés hídrico.

Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es avanzar en el conocimiento de las bases fisiológicas y genéticas de la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico en una especie de interés agronómico, el tomate.

Metodología

Se han utilizado dos herramientas biotecnológicas, el análisis funcional de dos genes candidatos y la mutagénesis insercional mediante el empleo de una trampa de intensificadores en una especie silvestre relacionada con altos niveles de tolerancia a ambos estreses. En el primer caso, se ha estudiado la respuesta de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan un gen implicado en el estrés iónico inducido por salinidad,

el gen *HAL5*, y plantas que expresan un gen implicado en la última etapa de la síntesis de myo-inositol, el gen *IMP1*. Por otra parte se ha empleado un vector que porta una trampa de intensificadores, para identificar mutantes insercionales alterados en diferentes caracteres y, especialmente, en la tolerancia a los estreses hídrico y salino.

Resultados

La sobreexpresión del gen *HAL5* incrementa la tolerancia a la salinidad de tomate cuando se mide el peso de frutos por planta, el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. Además, se ha podido comprobar que la sobreexpresión del gen *IMP1*, incrementa la tolerancia del tomate a la salinidad y al estrés hídrico a largo plazo. Por otro lado, se ha generado la primera colección de líneas T-DNA de la especie silvestre *Solanum pennellii*. Se han detectado algunas líneas con expresión específica del gen delator en órganos de la planta relacionados con el nivel de tolerancia a ambos estreses abióticos. Por último, se han identificado mutantes insercionales con alteraciones en caracteres del desarrollo vegetativo, desarrollo reproductivo y tolerancia al estrés hídrico y salino.

Conclusiones

Este trabajo ha permitido conocer la función de dos genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos y sus efectos al sobreexpresarse en plantas de tomate. También se ha generado una amplia colección de líneas T-DNA en diversas accesiones de *Solanum pennellii*, primer paso para poder llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional. Además, los diferentes mutantes de *S. pennellii* seleccionados en este trabajo constituyen un excelente material para la identificación y análisis funcional de genes implicados tanto en estreses abióticos como en procesos de desarrollo vegetativo y reproductivo.

ABSTRACT

The problem of salinity and water stress in worldwide agriculture is being intensified due to the increasing scarcity of water resources and low quality of the available water for agricultural purposes. Plant breeding of crop plants to promote tolerance to these stresses could alleviate, at least partially, the negative consequences in production and yield caused by these abiotic stresses. Nevertheless, tolerance to water and salt stresses is a particularly complex trait since it is made up by the interaction of numerous individual traits. Within the *Lycopersicon* section from *Solanum* genus it is included the cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) and 12 wild-related species, these last with accessions that present a high tolerance to these stresses. The phylogenetic closeness of the wild-related and the cultivated species, the latter of well-known worldwide economic importance, makes the former species the main genetic resource for breeding programmes in cultivated tomato.

This research work has been fulfilled within the framework of a coordinated project managed among three groups; one from the University of Almeria, the second from the Polytechnic University of Valencia and the last from CEBAS-CSIC of Murcia. Two genomic tools, insertional mutagenesis and trapping, are being applied on tomato and diverse wild-related species to identify coding sequences or regulatory elements of genes involved in vegetative (plant architecture) and reproductive (flower and fruit) development, as well as in the plant responses to salinity and water stress.

Objectives:

The essential objective of this research work is to advance in the knowledge of the physiological and genetic basis of the tolerance to salinity and water stress in a species of such agronomic importance as it is tomato.

Methodology:

For this purpose two biotechnological tools have been used; the functional analysis of two candidate genes and the insertional mutagenesis with enhancer trap applied in a wild-related species exhibiting high levels of tolerance to both stresses. In the first case, it has been studied the response of transgenic tomato plants overexpressing a gene involved in the ionic stress induced by salinity, *HAL5*, and of another set of transgenic

plants overexpressing a gene which product is involved in the last step of myo-inositol biosynthesis, *IMP1*. On the other side, a genetic construction carrying a enhancer trap, has been used for plant transformation with the aim of identifying insertional mutants altered in different phenotypic traits, but especially in those related to tolerance to salt and water stresses

Results:

The overexpression of *HAL5* augments the tolerance to salinity in the transgenic tomato assessed by fruit weight per plant, the main parameter from an agronomic point of view. Besides, it has been possible to verify that the overexpression of *IMP1* increases the tolerance to long-term salinity and drought in the resulting transgenic plants. On the other hand, the first collection of T-DNA lines of the wild-related tomato species *Solanum pennellii* has been generated. Some mutant lines with specific expression of the reporter gene in plant organs related to the level of tolerance to both abiotic stresses have been detected. Lastly, some insertional mutants with alterations in traits related to vegetative and reproductive development as well as in tolerance to salt and water stresses have been identified.

Conclusions:

This research work has allowed us to know the function of two genes involved in the tolerance to abiotic stresses and their effects when overexpressed in tomato plants. Also it has been generated a large collection of T-DNA lines in diverse accessions from *Solanum pennellii*, the first step to accomplish a programme of insertional mutagenesis. Furthermore, the different *S. pennellii* mutants selected in this research work constitute an outstanding plant material for the identification and functional analysis of genes implicated in abiotic stresses as well as in vegetative and reproductive developmental processes.

INTRODUCCIÓN

I.- PROBLEMAS OCASIONADOS POR LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO

El problema de la salinidad y estrés hídrico continúa incrementando su importancia debido a la escasez cada vez mayor de agua para riego junto a la mala calidad de la disponible y, por tanto, constituye un problema prioritario en la agricultura actual (Mittler y Blumwald, 2010). El agua tal vez sea el factor más limitante para el desarrollo en los próximos años. Datos de la UNESCO revelan que en los últimos 70 años se ha triplicado la población mundial, mientras que el uso del agua se ha multiplicado por seis, principalmente como resultado del desarrollo industrial y el mayor uso del riego en la agricultura. El agua de riego para la agricultura representa casi el 70% de toda el agua extraída cada año para el uso humano. Las tierras de cultivo y pastizales susceptibles de desertificación suponen el 30% del total, con un notable crecimiento en los últimos años. Se compite por la disponibilidad de agua, sobre todo en las regiones áridas con un elevado índice de crecimiento demográfico y expectativas de desarrollo. Finalmente, las soluciones puramente tecnológicas a la escasez de agua probablemente tendrán efectos limitados. En concreto, la desalación del agua de mar provee menos del 1% del agua que consumen los seres humanos. Puede que esta proporción aumente, pero sólo en países suficientemente ricos como para absorber los costes que supone el uso de esta tecnología.

La FAO anticipa que para el año 2030 los países en desarrollo deberían estar en condiciones de aumentar significativamente su producción de alimentos con unos incrementos de apenas un 12% de agua. La escasez de agua, cada vez mayor, significa que existe una urgente necesidad de cultivar con menos agua sin que ello suponga una disminución de la producción. Actualmente, más de la mitad de las tierras cultivables del globo están clasificadas como áridas o, al menos, sensibles a sequía. Por tanto, para las comunidades agrícolas de las zonas áridas y semiáridas, cada vez será mayor su dependencia de especies o variedades tolerantes a la sequía.

Por otra parte, la salinidad está considerada en la actualidad como uno de los principales factores limitantes de la producción vegetal. La alta concentración de sales en el suelo causa una importante disminución del rendimiento en la mayoría de los cultivos. Alrededor de 800 millones de hectáreas de suelos están afectadas por la sal, bien por salinidad (397 millones de hectáreas) o por condiciones asociadas a sodicidad (434

millones de hectáreas), ocupando aproximadamente el 6% de toda el área de la tierra (Munns, 2005). De los actuales 230 millones de hectáreas de la superficie bajo riego, 45 millones de hectáreas, la quinta parte, están afectadas por la salinidad. La superficie bajo riego es sólo el 15% de la superficie total cultivada, pero como tiene una productividad al menos dos veces mayor, produce un tercio de los alimentos que se consumen a nivel mundial. Por tanto, parece razonable pensar que la salinidad es una amenaza para el suministro de alimentos. Si tenemos en cuenta que la población mundial se estima que superará los nueve mil millones de personas en 2050, las producciones de las cosechas deben aumentar si se quiere asegurar el suministro de alimentos.

Ante esta situación, se están haciendo grandes esfuerzos para lograr variedades tolerantes a la sequía y salinidad. A pesar de ello, los avances han sido lentos, debido probablemente a la complejidad de ambos estreses abióticos, como demuestra el hecho de que aún no se conocen diferentes aspectos de las bases fisiológicas de la tolerancia (Bartels y Sunkar, 2005; Munns y Tester, 2008).

II.- CÓMO RESPONDEN LAS PLANTAS FRENTE A LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO

Aunque estos dos tipos de estrés abiótico están causados por factores ambientales distintos, (escasa disponibilidad de agua, en un caso, y altas concentraciones de sal en el otro), comparten mecanismos comunes. En situaciones de déficit hídrico, la planta necesita acumular solutos (ajuste osmótico) para mantener el volumen celular y el turgor, es decir, necesita mantener la actividad fisiológica al disminuir el potencial hídrico de la hoja (Zhu, 2002). De forma similar, el primer problema ocasionado por la salinidad es también un efecto osmótico, ya que la disminución del potencial hídrico del medio dificulta la absorción de agua y nutrientes por la raíz, lo que equivale al efecto provocado por el estrés hídrico en la planta. Esto causa reducciones en el crecimiento, además de una serie de cambios metabólicos similares a los provocados por el estrés hídrico. En una revisión sobre la fisiología de los estreses hídrico y salino, Munns (2002) indicaba que todos los procesos, excepto los efectos específicos provocados por la acumulación de iones salinos son similares en ambos estreses.

Como consecuencia de los dos efectos provocados por la salinidad, se ha propuesto que la respuesta a la salinidad tiene dos fases. La primera sería la fase osmótica y la segunda vendría determinada por el daño provocado por la acumulación de los iones salinos (Munns y Tester, 2008). El tiempo requerido para detectar diferencias entre genotipos sometidos a este estrés dependerá del grado de tolerancia a la sal del genotipo y del nivel de estrés aplicado. Así, la segunda fase empezará a manifestarse antes en las plantas que tengan baja capacidad de exclusión de iones salinos y/o cuando se apliquen altos niveles de estrés, aunque es posible que los efectos osmóticos persistan durante la segunda fase y que la toxicidad iónica tenga lugar durante la primera (De Costa et al., 2007; Muñoz-Mayor et al., 2008).

Los mecanismos para reducir al mínimo el daño provocado por estos estreses pueden variar de unas plantas a otras y, además, deben funcionar de forma coordinada. De ahí que sea necesario estudiarlos a los tres niveles de organización: a nivel de planta, a nivel de célula y a nivel molecular (Munns, 2002; Borsani et al., 2003; Tester y Davenport, 2003; Munns, 2005; Munns y Tester, 2008). Además, según Verslues y Juenger (2011), la variabilidad entre accesiones puede ser muy útil para tratar de identificar las diferentes estrategias de evitación y tolerancia a la deshidratación en respuesta de las plantas a la limitación de agua.

II.1.- Respuesta al estrés osmótico

En condiciones de sequía y salinidad, se reduce el movimiento de agua hacia el medio intracelular y, por consiguiente, su potencial osmótico disminuye debido a un simple efecto de concentración de solutos. Sin embargo, si durante el curso de la pérdida de agua celular los solutos son activamente acumulados, la reducción de potencial osmótico será mayor que la debida al mero efecto de concentración (Blum, 1988). Esta acumulación activa de solutos durante el transcurso del déficit hídrico se denomina ajuste osmótico.

Los solutos que contribuyen al ajuste osmótico en plantas sometidas a estrés hídrico son mayoritariamente los solutos orgánicos. Estos solutos no dañan ni a los enzimas ni a otras estructuras celulares aunque se acumulen hasta alcanzar elevadas concentraciones, razón

por la que se denominan osmolitos o solutos compatibles. Los principales solutos orgánicos que contribuyen al ajuste osmótico en la mayoría de las plantas glicofitas son los ácidos orgánicos y los azúcares, principalmente fructosa y glucosa. Por ejemplo, el malato es un ácido orgánico que se ha relacionado con la osmorregulación y con el cierre estomático. El oxalato, otro ácido orgánico, es el principal osmolito orgánico de diversas especies del género *Atriplex* y de la familia *Chenopodiaceae* (Osmond, 1976). Por otra parte, ciertos azúcares, tales como la sacarosa, actúan como osmolitos orgánicos en algunas plantas sometidas a estrés salino. También se ha comprobado que otras sustancias pueden realizar esta función: polioles lineales (glicerol, manitol o sorbitol), polioles cíclicos (inositol o pinitol y otros derivados mono- y dimetilados del inositol), aminoácidos (glutamato y prolina), compuestos de amonio cuaternario (glicinbetaína o alaninbetaína) y otros compuestos (trealosa, rafinosa, fructanos,...).

Las funciones más importantes asignadas a los osmolitos son la protección de estructuras celulares y el mantenimiento del balance osmótico, ya sea permitiendo la entrada de agua en la célula o reduciendo su salida. Pero, además de esto, conviene resaltar que los solutos orgánicos protegen a la célula contra el efecto tóxico de ciertos iones y las condiciones de desecación, además de eliminar los radicales de oxígeno reactivo que se producen bajo condiciones de estrés osmótico e iónico. No está claro que la tolerancia inducida por la acumulación de algunos osmolitos se deba, como en principio cabría esperar, a un mejor ajuste osmótico, sino quizás a una acción de tipo osmoprotector o a otros efectos (Yokoi et al., 2002). Los recientes avances en genética molecular y transformación genética abren nuevas vías en el conocimiento de las implicaciones metabólicas que conlleva la acumulación de osmolitos en plantas (Lugan et al., 2010).

Por otro lado, cuando las plantas están sometidas a estrés salino, además de los osmolitos, también pueden contribuir al ajuste osmótico los iones salinos procedentes del sustrato. El coste energético requerido para la acumulación de iones salinos (exclusión de la sal, compartimentación intracelular y/o excreción por medio de glándulas salinas) es relativamente pequeño en relación al que se necesita para sintetizar solutos orgánicos (Yeo, 1983; Ravens, 1985). Según Munns (2002), el número de moles de ATP necesarios para usar un mol de NaCl como osmolito es aproximadamente cuatro en las células de la raíz y siete en las de las hojas, mientras que el número de moles requerido para sintetizar

un compuesto orgánico es significativamente mayor. En otro trabajo, Ravens (1985) establecía un coste energético de 3,5 moles de ATP para Na^+ , 34 para manitol, 41 para prolina, 50 para glicinbetaína y alrededor de 52 para sacarosa.

La maquinaria citosólica y organular de las glicofitas y halofitas es igual de sensible a los iones salinos (Yokoi et al., 2002). Por consiguiente, los iones salinos, cuya acumulación puede ser más eficaz para el ajuste osmótico desde un punto de vista energético, deben ser transportados a la vacuola para minimizar la citotoxicidad (Blumwald et al., 2000). En este caso, el movimiento de iones hasta la vacuola debe ocurrir directamente desde el apoplasto a la vacuola a través de la vesiculación de la membrana o mediante un proceso citológico que yuxtapone la membrana del plasma al tonoplasto (Hasegawa et al., 2000). Por tanto, la compartimentalización podría alcanzarse con una mínima o incluso inexistente exposición del citosol a los iones tóxicos. El movimiento desde el apoplasto a la vacuola tiene lugar a través de sistemas de transporte iónico localizados en la membrana plasmática y el tonoplasto. Presumiblemente, se requiere una regulación muy coordinada de estos sistemas de transporte para controlar el influjo a través de la membrana plasmática y la compartimentalización vacuolar, pues en caso contrario se acumularían los iones en el citoplasma provocando un efecto tóxico (Tester y Davenport, 2003).

II.2.- Respuesta al estrés iónico

La acumulación de los iones salinos, especialmente Na^+ y Cl^- , provoca un estrés iónico en la planta, alterando la homeostasis no sólo de Na^+ y Cl^- , sino también de K^+ y Ca^{2+} (Hasegawa et al., 2000; Rodríguez-Navarro, 2000). La supervivencia de la planta y su desarrollo dependerá de la capacidad para restablecer la homeostasis iónica después de la imposición del estrés y adaptar su metabolismo para mantener las condiciones homeostáticas que le permitan reanudar el crecimiento y completar el ciclo vegetativo en el nuevo medio (Verslues et al., 2006). Las raíces deben excluir la mayoría del Na^+ y Cl^- disueltos en la solución del suelo, puesto que si no es así la sal se irá acumulando gradualmente en la parte aérea hasta alcanzar niveles tóxicos, ya que las plantas transpiran unas 50 veces más agua que la que retienen en sus hojas. Si una planta

absorbe sólo 1/50 de la sal en la solución del suelo (i.e. excluye el 98%), la concentración de sal en la parte aérea nunca se incrementará más que la del suelo, y la planta podrá sobrevivir indefinidamente en medio salino (Munns, 2005).

El control de la absorción de los iones salinos y su distribución dentro de la planta incluye diferentes procesos, tales como la absorción por la raíz, la carga en el xilema, la recuperación desde el xilema antes de que alcance la parte aérea, la recirculación en el floema, la localización en algunas partes concretas de la parte aérea, como hojas adultas, la secreción por la hoja, etc. (Tester y Davenport, 2003). De hecho, lo que parece diferenciar las especies sensibles de las tolerantes es la capacidad de compartimentación de iones tóxicos en la vacuola para minimizar la citotoxicidad, ya que se ha visto que la maquinaria citosólica y organular es igual de sensible a la presencia de iones salinos (Yokoi et al., 2002). Si la capacidad de compartimentación de iones no es suficiente y la hoja continúa transpirando, los iones salinos se acumularán en el citoplasma, con la subsiguiente inactivación de enzimas (Amtmann y Sanders, 1999), o en las paredes celulares con la subsiguiente deshidratación (Flowers et al., 1991). Según Munns y colaboradores (2003), el Na^+ empieza a inhibir la mayoría de los enzimas a una concentración superior a 100 mM. El Na^+ puede inhibir la función de los enzimas tanto por enlazarse directamente a los sitios de inhibición, como de una manera indirecta por desplazar al K^+ de los lugares de activación (Serrano, 1996). En ambos casos, la competitividad entre Na^+ y K^+ es muy importante y, por consiguiente, la relación Na^+/K^+ en el citosol es probablemente un factor más crítico para determinar la toxicidad de Na^+ que su concentración en el citosol (Cuin et al., 2003).

Inmediatamente después del estrés salino se produce una alteración del gradiente electroquímico de protones. El transporte de protones por la bomba de protones de la membrana plasmática (H^+ -ATPasa) y del tonoplasto (H^+ -ATPasa y H^+ -pirofosfatasa) genera gradientes de pH y diferencias de potencial eléctrico a través de las membranas celular y vacuolar. Los iones Na^+ entran a la célula y pueden ser translocados fuera de la célula o a la vacuola por la acción del antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática (SOS1) o vacuolar (AtNHX1), los cuales parecen transportar Na^+ en una u otra dirección dependiendo de las condiciones (Shi et al., 2002, 2003). El antiportador vacuolar AtNHX1 parece contribuir también a secuestrar K^+ en la vacuola (Pardo et al., 2006). Los

transportadores HKT son probablemente muy importantes en la regulación del transporte de K^+ y Na^+ desde la raíz a la parte aérea (Pardo, 2010). Así, un mutante en el que no funcionaba AtHKT1 incrementaba claramente la sensibilidad a la sal (Rus et al., 2004), lo que demuestra la importancia de la función de HKT1 en el control del transporte de K^+ y Na^+ . Otra clase de transportadores de K^+ es la familia KUP/HAK/KT (Martínez-Cordero et al., 2004).

La exportación desde las hojas al floema también podría ayudar a mantener bajas concentraciones en las hojas. Medidas de iones en la savia del floema han indicado que las especies más tolerantes excluyen Na^+ y Cl^- por el floema en mayor medida que las menos tolerantes (Pérez-Alfocea et al., 2000; Munns, 2005). Por tanto, aunque pueda ser relativamente baja la retranslocación de sal desde las hojas, en relación al transportado en la cadena de transpiración, la salida de Na^+ de las hojas vía floema puede ser importante en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Tester y Davenport, 2003).

II.3.- Otros efectos inducidos por ambos estreses

Otro de los efectos producidos por la salinidad es la generación de especies de oxígeno activas (EOA), como el superóxido, peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilo. El cierre estomático, que tiene lugar como una de las respuestas primarias a la salinidad del medio, inhibe la fijación de CO_2 e incrementa la formación de EOA a través de la fuga de electrones hacia el oxígeno. La generación de EOA provoca daño celular y puede ocasionar la muerte de la planta, debido principalmente al daño producido en los centros de reacción del fotosistema II o en los lípidos de membrana. Además, esta peroxidación lipídica, junto con otras alteraciones, dañan la integridad de las membranas celulares (Hernández et al., 2001).

Para protegerse de los posibles efectos citotóxicos, las plantas deben desarrollar diferentes mecanismos para destruir estas especies de oxígeno reactivas, por ejemplo, incrementando la actividad y/o la expresión de los sistemas antioxidantes (Hernández et al., 2000; Mittova et al., 2002). Los sistemas que previenen contra la oxidación en las plantas consisten en enzimas que pueden eliminar los radicales de oxígeno, tales como superóxido dismutasa (SODs), peroxidasas, catalasas y glutatión reductasa. Las SODs son

componentes esenciales de los sistemas de protección oxidativa en la mayor parte de las plantas y catalizan la dismutación de dos radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Cuando los SODs eliminan los radicales superóxido, el peróxido que se genera es eliminado por las peroxidasas y catalasas (Hong et al., 2007). Basándose en estudios comparativos entre especies silvestres y cultivadas, se ha correlacionado la capacidad antioxidante con la mayor tolerancia a la salinidad en tomate (Shalata et al., 2001; Mittova et al., 2002; Zushi y Matsuzoe, 2009).

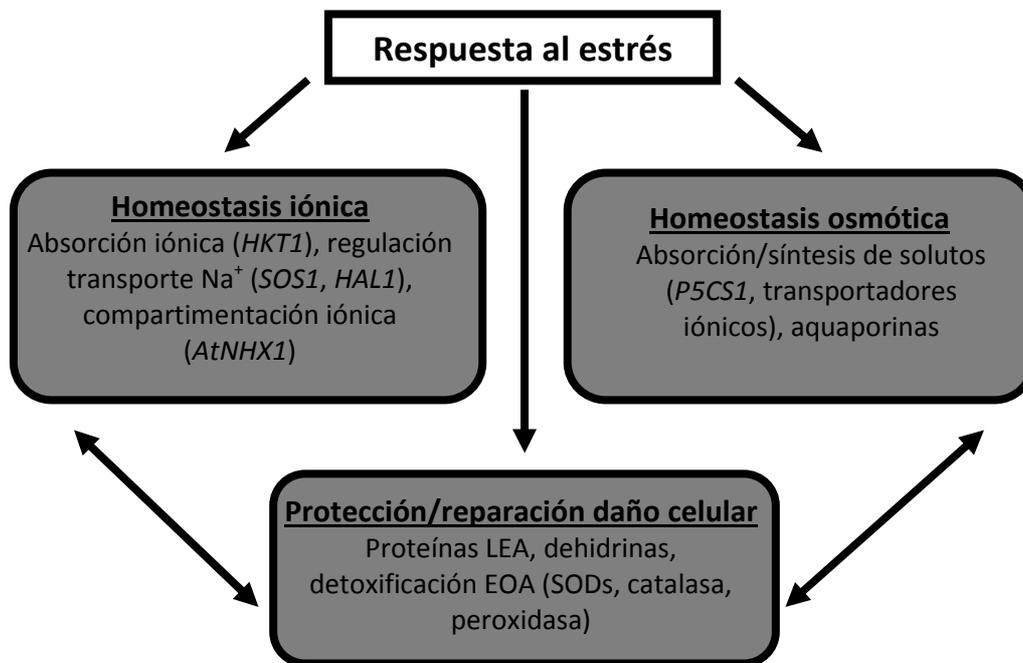
Algunos autores han sugerido que una de las funciones de azúcares, polioles, glicinbetaína y prolina podría ser la protección celular contra radicales hidroxilo (Molinari et al., 2007). Los mejores resultados se han obtenido con polioles lineales tales como el manitol, polioles metilados y la glicinbetaína (Sickler et al., 2007). Aunque estos metabolitos son efectivos contra radicales de oxígeno, lo que se desconoce todavía es cuál puede ser su modo de acción.

Estudios recientes proponen que la generación de EOA desempeña un papel clave como moléculas de transducción de señal implicadas en las respuestas de adaptación de las plantas a estreses de tipo abiótico (Boursiac et al., 2008; Miller et al., 2009). En este sentido, se ha postulado que el H_2O_2 podría modular la actividad de muchos componentes que contribuyen a la señalización celular, incluyendo los canales de Ca^{2+} y K^+ (Weinl y Kudla, 2009).

II.4.- Homeostasis y protección o reparación del daño provocado por los estreses hídrico y salino

La respuesta a los estreses hídrico y salino es frecuentemente discutida en términos de homeostasis o reparación del daño (Zhu, 2001). Estos mecanismos homeostáticos incluyen homeostasis osmótica en ambos estreses, similar a los mecanismos para evitar la deshidratación celular y homeostasis iónica, que es el factor dominante en la tolerancia a salinidad. Los mecanismos de homeostasis iónica y osmótica intentan restaurar el contenido iónico celular o el contenido de agua a niveles similares a aquellos que presenta la célula sin estrés. Los mecanismos de protección y reparación del daño intentan prevenir o reparar el daño celular causado por los contenidos iónicos o hídricos

alterados por el estrés. En el siguiente esquema se resumen los mecanismos de respuesta al estrés, mostrando con flechas la interacción entre ellos, y se muestran (entre paréntesis) algunos ejemplos de genes involucrados en cada mecanismo de respuesta al estrés.



Aunque son numerosos los estudios y revisiones sobre el tema, aún hay grandes lagunas sobre el papel de los transportadores (Pardo, 2010; Plett y Moller, 2010; Cui et al., 2011). El papel del transportador de Na^+ de membrana plasmática *SOS1*, cuya función parece ser diferente en función del nivel de estrés, puede ser un ejemplo de la complejidad de estos mecanismos. A niveles moderados de estrés, *SOS1* parece funcionar en la carga de Na^+ del xilema para transportar Na^+ a la parte aérea y almacenarlo en las células del mesófilo, las cuales tienen suficiente capacidad de compartimentación, lo que facilitaría el ajuste osmótico y el desarrollo de la planta (Shi et al., 2002). A altos niveles de estrés, este transportador parece funcionar restringiendo la absorción en la raíz y recuperando Na^+ desde el xilema en la raíz adulta, ayudando ambos procesos a limitar la rápida acumulación de Na^+ en la parte aérea, ya que las plantas que sobreexpresaban *SOS1* acumulaban menos Na^+ en el xilema y en la parte aérea (Shi et al., 2003).

Otro ejemplo entre los genes que regulan el transporte de Na^+ es el gen de levadura *HAL1*. En tomate se observó que la sobreexpresión de este gen induce una mayor

tolerancia cuando se evalúa el peso de los frutos cosechados (Rus et al., 2001), el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. La mayor tolerancia estaba asociada a la capacidad de las plantas que expresan *HAL1* para mantener la homeostasis iónica a lo largo del ciclo vegetativo, reduciendo significativamente la acumulación de Na^+ en las hojas (Muñoz-Mayor et al., 2008). Sin embargo, y haciendo hincapié en la complejidad del estrés salino, también se observó que la mayor capacidad de exclusión de Na^+ de una línea homocigótica con alto nivel de expresión de *HAL1* causaba otro tipo de problema que se reflejaba negativamente en su nivel de tolerancia. Así, la alta exclusión de Na^+ en las hojas inducía una mayor síntesis y acumulación de solutos orgánicos (azúcares y ácidos orgánicos) para mantener el balance osmótico, lo cual es energéticamente mucho más costoso (Muñoz-Mayor et al., 2008). Estos resultados demuestran la importancia de considerar la componente osmótica del estrés salino para el diseño de estrategias de mejora de la tolerancia a la salinidad. En este sentido, se ha encontrado generalmente correlación entre la exclusión de sales y la tolerancia a la sal en la mayoría de las especies (Tester y Davenport, 2003), incluido el tomate (Cuartero et al., 2006). Por esto, se ha utilizado el carácter “exclusión de Na^+ ” para la mejora genética de diferentes especies de interés agronómico (Munns et al., 2003; Flowers, 2004), aunque no siempre este carácter conduzca a un mayor rendimiento en medio salino, como se ha indicado anteriormente.

En resumen, el efecto osmótico de la sal fuera de las raíces puede tener un mayor efecto sobre el desarrollo y el rendimiento que el efecto específico de la toxicidad iónica. Por tanto, no debería ser tenido en cuenta únicamente el carácter de exclusión de Na^+ para mejorar el rendimiento de los cultivos sino que habría que evaluar la conveniencia de modificar mecanismos como la capacidad de absorción y transporte de sales a la parte aérea. En este sentido, Tester y Davenport (2003) indicaban que las halofitas son mucho más eficaces para controlar la absorción y transporte de Na^+ , ya que a bajas concentraciones de sal la acumulación de NaCl es generalmente mayor que en glicofitas mientras que a altos niveles de salinidad se reduce, es decir, la absorción de iones salinos no es proporcional al nivel salino del medio. De hecho, ésta parece ser la estrategia utilizada por las especies silvestres de tomate tolerantes a la salinidad (Santa-Cruz et al., 1999). Por último, una herramienta muy útil para evaluar estos mecanismos es la

utilización de portainjertos con diferente capacidad de absorción y transporte (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008).

III.- AVANCES EN LA MEJORA DE LA TOLERANCIA A LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO

La tolerancia a los estreses hídrico y salino es un carácter particularmente complejo ya que está compuesto por la interacción de muchos caracteres, que pueden ser de naturaleza poligénica y muy influidos por el ambiente. Esto se traduce en una baja heredabilidad, que cambia su importancia según el estado de desarrollo de la planta y que muestran distinta expresión según los niveles de estrés en los que se cultiven las plantas (Cuartero et al., 2010). Todo esto ayuda a entender la falta de éxito en la obtención de genotipos tolerantes al aplicar programas de selección tradicionales.

Utilizar una selección indirecta basada en marcadores moleculares ligados fuertemente a genes o QTLs relacionados con la tolerancia a la salinidad podría ser una alternativa válida ya que se podrían manejar varios caracteres poligénicos a la vez y esos marcadores no son influidos por el ambiente (Roy et al., 2011). Los estudios dirigidos a la identificación de QTLs para la tolerancia a sal están basados generalmente en los contenidos de Na^+ y K^+ en los tejidos y no directamente en la tolerancia a la sal (Pardo, 2010). Probablemente los únicos que están basados en la tolerancia del tomate a la salinidad sean los del grupo de la Dra. Asins, que utilizó dos colecciones de líneas RILs procedentes de los cruces entre *S. lycopersicum* x *S. chesmaniae* y *S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* (Villalta et al., 2007). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la demostrada interacción QTL x ambiente es especialmente importante en la selección para tolerancia a la salinidad y que esa interacción llevaría a que cada QTL se comportaría como un carácter distinto en distintos ambientes dificultando la selección (Richards et al., 2010). Otras dificultades adicionales en el empleo de esta estrategia serían la interacción QTL x QTL, que puede llegar a ser mayor que muchos QTL individuales (Juenger et al., 2005), y de los efectos pleiotrópicos de los genes y QTL (Villalta et al., 2007).

Una vez identificados los principales QTLs y genes relacionados con la tolerancia a los estreses hídrico y salino quedaría la tarea de pasarlos a los genotipos de interés, y que esos genotipos mejorados diesen la cosecha y la calidad de cosecha que los agricultores necesitan. Aún ayudados de excelentes marcadores moleculares codominantes para esa

ingente masa de genes y QTLs, se tendrían que diseñar programas que llevasen lentamente hacia la homocigosis para que el mejorador tuviese la posibilidad de seleccionar. Los cultivares actuales son el resultado de muchos años de selección y de incorporación de las características que tanto los agricultores como el consumidor han demandado. Es altamente probable que el delicado equilibrio de productividad, calidad, resistencias a enfermedades y otras características agronómicas de los cultivares actuales se viese notablemente alterado al introducir un número sustancial de genes como el que presumiblemente se requiere para conseguir tolerancia a estreses abióticos. Una solución parcial al problema sería mejorar la tolerancia a los estreses hídrico y salino en la raíz e injertar sobre ella la parte aérea de los cultivares actuales (Estañ et al., 2005; Sánchez-Bel et al., 2011). Esta solución podría ser válida tanto en frutales como en muchas especies hortícolas.

En los últimos años se han generado grandes expectativas en la mejora de la tolerancia a estreses abióticos con el desarrollo de las herramientas biotecnológicas, especialmente con la transformación genética. Sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos publicados en los últimos 10 años, no se puede concluir que se hayan obtenido cultivares verdaderamente halotolerantes (i.e., con un nivel de tolerancia suficiente desde un punto de vista agronómico). Un aspecto clave es el que se refiere a la evaluación de la tolerancia en las plantas transgénicas. Los resultados de tipo descriptivo o los que se sustentan en meras evidencias fotográficas son muy cuestionables (Flowers, 2004). Lo mismo puede decirse cuando la evaluación se realiza con un número limitado de plantas, con ensayos a muy corto plazo, usando tratamientos de choque, en etapas del crecimiento muy específicas (Yamaguchi y Blumwald, 2005; Cuartero et al., 2006) o empleando los típicos ensayos de germinación de semillas que suelen dar resultados diferentes a los que se obtienen en estadios más avanzados del desarrollo (Foolad, 2007). Para llegar a conclusiones fiables la evaluación se debería realizar de forma rigurosa y con ensayos a largo plazo (Roy et al., 2011).

Otro aspecto importante a la hora de estimar la tolerancia es el material vegetal empleado. El uso de transformantes primarios (TG1) puede conducir a conclusiones erróneas debido a los cambios epigenéticos que usualmente exhiben las plantas regeneradas mediante algunas técnicas de cultivo *in vitro*. La evaluación en plantas de la

TG2 solventa el problema anterior, pero hay que tener en cuenta que se trata de una progenie segregante. En general, lo mejor es llevar a cabo la evaluación con líneas homocigóticas y acigóticas (obtenidas en TG3). De esa forma, las líneas homocigóticas y hemicigóticas pueden ser comparadas con dos controles: el cultivar original y la correspondiente línea acigótica sin el transgén.

En los trabajos de transformación dirigidos al aumento de la tolerancia a estreses abióticos, la mayor parte de los genes que se han clonado y transferido provienen de especies modelo o de especies muy alejadas a las que se pretende mejorar. La experiencia de muchos años en el campo de la mejora indica, no obstante, que lo mejor sería clonar los genes a partir de la misma especie o de especies silvestres relacionadas con la especie cultivada. En las especies y formas silvestres existe una amplia diversidad genética que todavía está por explotar (Bohnert et al., 2006; Cuartero et al., 2006; Nevo y Chen 2010). En el caso del tomate, por ejemplo, se sabe desde hace tiempo que en algunas de las especies silvestres relacionadas (*Solanum pennellii* Correll, *S. cheesmaniae* (L. Riley) Fosberg, *S. pimpinellifolium* L.) hay entradas que exhiben un alto grado de tolerancia (Bolarín et al., 1991). Sin embargo, en la actualidad, seguimos sin conocer qué genes determinan la tolerancia a la salinidad en estas entradas silvestres. Sorprendentemente, no se ha hecho casi nada en esta dirección.

IV.- HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS FUNCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA A LOS ESTRESSES HÍDRICO Y SALINO

En el análisis genético tradicional el punto de partida es el carácter y el destino el gen, es decir, se asocian rasgos o características visibles (fenotipado) con el gen o los genes que los producen (genotipo). Conocida una determinada función se trata de establecer el control genético de la misma y, en el caso más simple, se intenta llegar de manera abstracta al gen que la codifica. Esta aproximación metodológica se conoce como “Genética directa”. Los impresionantes avances que se han producido en biotecnología han invertido el problema. Hoy en día se dispone de muchas secuencias de polinucleótidos a las que hay que asignarles una función, es decir, se trata de ir del gen al fenotipo. Este ámbito de la genética se conoce como “Genética inversa”. Una

combinación de las diferentes herramientas genómicas disponibles en la actualidad puede ser la mejor estrategia para lograr mayores avances (Varshney et al., 2011).

En este contexto, la transformación genética se ha convertido en una herramienta imprescindible para la mayor parte de los métodos de análisis funcional de genes. A continuación se resumen los mayores avances en la utilización de la sobreexpresión y anulación de genes como herramienta para el análisis funcional de genes.

IV.1. Sobreexpresión y anulación de genes

Las primeras estrategias que se diseñaron para aumentar la tolerancia a estreses abióticos mediante un abordaje biotecnológico se basaron en la transferencia de genes implicados en la síntesis de osmolitos. En uno de los primeros estudios, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que acumulaban manitol gracias a la sobreexpresión del gen bacteriano *mtID* que codifica el enzima manitol 1-fosfato deshidrogenasa (Tarczynski et al., 1993). Poco más tarde, Thomas y colaboradores (1995) sobreexpresaron el mismo gen en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, observando que las semillas de las descendencias eran capaces de germinar en medios con altas concentraciones de sal. Por otro lado, Abebe y colaboradores (2003) demostraron que la biosíntesis y acumulación de manitol en plantas transgénicas de arroz estaba relacionada con la tolerancia a la sal. Siguiendo un enfoque similar, Kavi Kishor y colaboradores (1995) obtuvieron plantas transgénicas de tabaco con el gen *p5CS* de *Vigna aconitifolia* que codifica la A-pirrolina-5-carboxilato sintetasa y comprobaron que las plantas no sólo acumulaban de 10 a 18 veces más prolina sino que, además, exhibían un cierto grado de tolerancia tanto al estrés hídrico como a la salinidad.

La biosíntesis de trealosa y glicinbetaína ha sido la estrategia más utilizada en los últimos años para inducir tolerancia (Penna, 2003; Iordachescu e Imai, 2008; Chen y Murata, 2008; Khan et al., 2009), probablemente debido a la acumulación de trealosa en algunas plantas tolerantes a la desecación (Penna, 2003) y de glicinbetaína en numerosas halofitas (Rhodes y Hanson, 1993; Flowers y Colmer 2008). Uno de los genes utilizados es *TPS1* de *S. cerevisiae*, que codifica el enzima trealosa-fosfato sintetasa implicado en la síntesis de trealosa. Romero y colaboradores (1997) observaron un alto nivel de tolerancia al estrés hídrico en las plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando este

gen, pero había efectos pleiotrópicos negativos ya que las plantas exhibían fenotipos anómalos. Posteriormente, Cortina y Culiañez-Macia (2005) expresaban el gen *TPS1* en tomate bajo el control del promotor p35S y también encontraban importantes alteraciones en el desarrollo de las plantas. Por otra parte, Pilon-Smits y colaboradores (1998) observaron que la acumulación de trealosa en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli*, que codifican para la síntesis trealosa-6-fosfato sintetasa y trealosa-6-fosfato fosfatasa respectivamente, conducía a un incremento de la tolerancia al estrés hídrico, aunque la acumulación de trealosa también alteraba el fenotipo de las plantas de tabaco. Posteriormente, Garg y colaboradores (2002) utilizaron promotores dependientes de estrés y específicos de tejido para expresar los genes *otsA* y *otsB* en plantas transgénicas de arroz y observaron que las plantas transgénicas exhibían mayor tolerancia a salinidad, estrés hídrico y bajas temperaturas. Además, y en contraste con lo que se había observado en trabajos anteriores, la utilización de promotores específicos permitió minimizar los efectos negativos de la trealosa en el crecimiento de las plantas.

Aunque son bastantes las referencias relacionadas con la acción de genes implicados en el efecto osmótico inducido por la salinidad, el único trabajo en el que parece que la mayor tolerancia de las plantas transgénicas podría deberse a un mejor ajuste osmótico es el de Hayashi y colaboradores (1997). Los autores introdujeron el gen *codA* de *Arthrobacter globiformis* en plantas transgénicas de *A. thaliana*, dirigiendo la expresión en cloroplastos. En este caso, las plantas exhibían mayor tolerancia a la salinidad (y al frío), pero lo más destacable es que la acumulación de glicinbetaína en los cloroplastos podría ser suficiente como para facilitar un mejor ajuste osmótico.

En los estudios de tolerancia a salinidad, los mayores esfuerzos se han dirigido hacia la identificación de los transportadores iónicos y tan sólo algunos trabajos reportan avances importantes en los procesos relacionados con el transporte de Na^+ (Olias et al., 2009; Leidi et al., 2010; Pardo, 2010). En *A. thaliana* se identificó el gen *SOS1* (*Salt Overly Sensitive 1*) que se expresa en condiciones de estrés salino y que es esencial para la homeostasis de Na^+ y K^+ (Shi et al., 2000). Según los autores, *SOS1* codifica una proteína transmembrana que presenta una alta homología con antiportadores Na^+/H^+ de la membrana plasmática de bacterias y hongos (Shi et al., 2002, 2003), tal como se indicó

anteriormente. Por tanto, SOS1 juega un papel crucial en la salida de Na^+ desde las células de la raíz y en el transporte a larga distancia desde la raíz a la parte aérea. Además, la salida de Na^+ a través de SOS1 está regulada por el complejo kinasa SOS2-SOS3 (ver Pineda, 2005; Chinnusamy et al., 2005). El calcio actúa en condiciones salinas como señalizador, siendo percibida esta señal por SOS3, el cual activa la proteína serina/treonina kinasa SOS2 (Halfter et al., 2000), y SOS2 activada fosforila al antiportador SOS1. Por tanto, SOS2 incrementa la transcripción de *SOS1* y la actividad de la proteína SOS1 a través de una interacción directa proteína-proteína (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). SOS2 también activa el antiporter Na^+/H^+ de tonoplasto que secuestra Na^+ en la vacuola. La entrada de Na^+ en el citosol a través del transportador HKT1 también puede ser restringida por SOS2 (Rus et al., 2001).

Entre los genes candidatos encargados de regular el transporte de K^+ y Na^+ se encuentran los genes de levadura *HAL*, aislados en el laboratorio del Doctor Serrano (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC). Hasta el momento, el más estudiado ha sido *HAL1* habiéndose comprobado que la expresión de este gen de levadura en plantas transgénicas de melón (Bordas et al., 1997), sandía (Ellul et al., 2003) y tomate (Gisbert et al., 2000) conduce a un aumento de la tolerancia a la salinidad, tanto en callos como en plantas cultivadas a distintos niveles salinos. Además, se ha observado que el mecanismo de acción del gen en las plantas (Gisbert et al., 2000) es bastante similar al que previamente se había observado en la levadura (Serrano, 1996).

En relación con la acumulación en la vacuola, se identificó un antiportador vacuolar Na^+/H^+ de *Saccharomyces cerevisiae* (Nass et al., 1997). Usando su secuencia, Apse y colaboradores (1999) aislaron su homólogo en plantas, al que denominaron *AtNHX1*. Su expresión en *Arabidopsis* indicó que este homólogo codificaba un antiportador Na^+/H^+ . Pero además, la sobreexpresión de este antiportador en plantas transgénicas conducía a una mayor tolerancia a la salinidad. En tomate, Zhang y Blumwald (2001) describían diferencias espectaculares entre plantas transgénicas de tomate que sobreexpresaban el antiportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis* y plantas control cuando el cultivo se realizaba bajo un estrés salino de 200 mM de NaCl, aunque estos resultados han sido cuestionados por algunos investigadores (Flowers, 2004; Munns, 2005).

Otra herramienta diferente de la anterior es la anulación de función de un gen candidato. El sistema RNAi es un mecanismo que actúa como sistema de defensa frente a RNAs extraños de doble cadena. El proceso central que involucra al RNAi es el corte de RNAs y RNAsi (short interfering RNA) de entre 21 y 26 nucleótidos (Hamilton y Baulcombe, 1999; Voinnet, 2002). El descubrimiento del RNAs ha proporcionado un esquema de silenciamiento de genes específicos más eficiente que la supresión antisentido o la cosupresión por sobreexpresión de genes diana (Fire et al., 1998; Kennerdell y Carthew 1998; Waterhouse et al., 1998; Sánchez-Alvarado y Newmark, 1999). Otra de las ventajas del RNAi es que los fenotipos silenciados se transmiten sexualmente (Kerschen et al., 2004). Además, la interferencia del RNAs permite generar toda una gama de transformantes en lo que se refiere al grado de expresión del gen silenciado lo que proporciona una herramienta muy efectiva para el estudio de genes esenciales para la viabilidad del individuo (Levin et al., 2000; Yu et al., 2002)

IV.2.- Transcriptómica y proteómica

Los análisis transcriptómicos y proteómicos relacionados con la tolerancia a estreses en plantas dan información sobre la regulación de muchos genes simultáneamente basándose en cambios en los niveles de transcripción y traducción de proteína respectivamente. En la actualidad, los análisis transcriptómicos permiten comparar los perfiles de expresión de cientos o miles de genes que se ven alterados en condiciones de estrés salino, lo que ha supuesto un paso muy importante para mejorar nuestra comprensión de la dinámica de los genes y sus productos (Birnbaum y Benfey, 2004; Chen y Zhu, 2004; Eulgem, 2005; Provar y McCourt, 2004; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Estos sistemas son muy importantes para el estudio de plantas como *Arabidopsis* y arroz en las que sus genomas completos ya han sido secuenciados y están disponibles.

El análisis de microarrays está permitiendo llegar a identificar genes relacionados con importantes características fisiológicas y agronómicas, incluyendo las respuestas a los estreses hídrico y salino (Deyholos, 2010). En tomate, Wei y colaboradores (2000) observaron cambios diferenciales en la acumulación de RNA utilizando raíces de plantas cultivadas en condiciones salinas y en ausencia de estrés. Los resultados indicaron que la mayoría de los cambios inducidos por el tratamiento salino ocurrían a través de una ruta

independiente de ácido abscísico. Más recientemente, Zhou y colaboradores (2007) identificaron mediante microarrays 1.757 genes con alteraciones en su nivel de expresión utilizando como material de estudio cotiledones y meristemos apicales de plántulas de tomate (cv Moneymaker) sometidas a estrés salino. Los autores observaron que 563 de esos genes disminuían el nivel de expresión mientras que 1194 exhibían mayor nivel de expresión. Utilizando un enfoque similar, Ouyang y colaboradores (2007) identificaron un total de 201 genes no redundantes que se expresaban diferencialmente a los 30 minutos de aplicar el estrés salino en dos genotipos de tomate con diferente nivel de tolerancia a la sal. En resumen, los análisis de transcriptómica han proporcionado hasta ahora una idea general de los genes que alteran su nivel de expresión en situaciones de estrés abiótico, así como el número de genes que pertenecen a diferentes categorías funcionales cuya expresión se ha visto modificada significativamente. Aunque se trata de una información valiosa, no proporciona las bases para el diseño de programas de mejora (por ejemplo, vía transgénesis) ya que es muy difícil abordar el análisis funcional de los cientos (o miles) de genes cuya expresión cambia en condiciones de estrés abiótico.

Se ha comprobado que los estudios de microarrays no proporcionan información sobre la presencia de las proteínas correspondientes (Khan et al., 2007). De hecho, sólo se ha reportado una escasa o moderada correlación entre los cambios en los niveles de mensajero y sus correspondientes proteínas en estudios llevados a cabo en *Saccharomyces cerevisiae* (Gygi et al., 1999) o *Arabidopsis* (Mooney et al., 2006; Jiang et al., 2007). Con todo, a pesar de que la proteómica en plantas superiores se encuentra todavía en su infancia en comparación con los estudios llevados a cabo en procariontas, levadura y humanos (Khan et al., 2007), es previsible que pueda servir para arrojar luz sobre algunos de los mecanismos relacionados con la tolerancia a estreses abióticos, tal como se ha demostrado recientemente en dos especies hortícolas sometidas a bajas temperaturas durante el almacenaje (Sánchez-Bel et al., 2012). Por lo tanto, para el futuro cercano, el reto más importante en los estudios de proteómica es aclarar los principales procesos fisiológicos que determinan la tolerancia a los diferentes estreses abióticos.

IV.3.- Identificación y análisis de mutantes

Una de las herramientas utilizada con más éxito para identificar la función de los genes implicados en diferentes procesos biológicos en plantas es el análisis genético y molecular de mutantes. La mutagénesis se ha empleado con éxito en la identificación de genes esenciales en la tolerancia a NaCl de levaduras (Mendoza et al., 1994). En *Arabidopsis*, a través de la identificación de los mutantes *sos* (salt overly sensitive), y la posterior clonación y caracterización de los genes *SOS*, se descubrió una importante y novedosa vía de señalización relacionada con la homeostasis iónica (Shi et al., 2002). Sin embargo, el número de mutantes afectados en el nivel de tolerancia a la sal en otras especies ha sido más bien escaso. Mutantes espontáneos ocasionales o, alternativamente, los generados por métodos químicos (por ejemplo, EMS) o físicos (por ejemplo, rayos X, rayos γ o neutrones rápidos) podrían proporcionar las bases para avanzar en el conocimiento de los procesos fisiológicos relacionados con la tolerancia a la sal (Ostergaard y Yanofsky, 2004; Tuberosa y Salvi, 2006; Vij y Tyagi, 2007). El mayor problema que plantea este tipo de mutantes en especies de cosecha es que, en ausencia de genes candidatos, el aislamiento de los genes alterados en el mutante a través de una estrategia de clonaje posicional requiere un enorme esfuerzo. Por fortuna, en la actualidad estos problemas pueden ser solventados mediante el uso de métodos alternativos como la mutagénesis insercional.

IV.3.1.- Mutagénesis insercional

La generación de mutantes usando la mutagénesis insercional con T-DNA representa en la actualidad una de las alternativas más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan tanto el desarrollo como la tolerancia o sensibilidad a diferentes estreses abióticos (salinidad, sequía, estrés oxidativo, etc.) en las plantas (Fu et al., 2009; Prabhakar et al., 2009). Esta herramienta biotecnológica asocia el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular para identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado. Con esta estrategia, basada en la utilización de un inserto transgénico (transposón o T-DNA) como 'agente mutagénico' podemos obtener líneas con pérdida o alteración de función de un gen endógeno. En efecto, la integración de dicho inserto en las regiones reguladoras de un

gen endógeno o la disrupción del mismo pueden ocasionar la alteración o anulación de su expresión.

IV.3.1.1.- Mutagénesis con transposones

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden moverse de un sitio a otro a través del genoma. La ventaja de esta técnica es que se pueden generar otras líneas a partir de las existentes por movilización del elemento insertado a un lugar diferente con respecto a la localización que ocupaba el inserto original. Este cambio puede originar la alteración o anulación de función de un gen determinado o también podría ocurrir lo contrario, que se recuperase la función de un gen al cual le está generando una disrupción.

Mediante el uso de los elementos móviles *Ac/Ds* se han podido aislar genes en petunia, tabaco, *Arabidopsis*, tomate y lino (Sundaresan, 1996). En uno de los primeros ensayos se puso de manifiesto la actividad del sistema *Ac* dotado de una transposasa para generar mutaciones insercionales en arroz (Enoki et al., 1999). Otro elemento transponible interesante para su explotación es *Mu*, procedente de maíz, por su frecuencia de inducción de mutaciones germinales y la diversa naturaleza de los mutantes aislados. Los efectos de los elementos *Mu-1* son muy interesantes porque se insertan preferentemente en regiones ricas en citosina no metilada, que coinciden con la presencia de secuencias únicas de bajo número de copias y codificantes (Bennetzen et al., 1993). Por esta razón este sistema es uno de los preferidos para la obtención de mutantes insercionales de maíz (Cresse et al., 1995).

En tomate, los experimentos de mutagénesis insercional con transposones se han llevado a cabo principalmente con el sistema *Ac/Ds*, después de demostrarse que estos transposones eran perfectamente activos en esta especie (Yoder et al., 1988; Yoder, 1990; Osborne et al., 1991; Rommens et al., 1992; Carroll et al., 1995). El primer gen clonado mediante esta estrategia fue *Cf-9* (Jones et al., 1994) relacionado con la resistencia a diferentes razas de *Cladosporium fulvum*. Posteriormente, se han clonado los genes *DWARF*, que codifica para un citocromo P₄₅₀ (Bishop et al., 1996); *DCL* (Defective Chloroplasts and Leaves), que controla el desarrollo de cloroplastos (Keddie et al., 1996); *FEEBLY*, relacionado con metabolismo y desarrollo (Van der Biezen et al., 1996); *DEM*

(Defective Embryo and Meristems), requerido para la organización del tejido apical durante el desarrollo de los embriones así como para el correcto patrón de divisiones celulares y mantenimiento del meristemo en la raíz (Keddie et al., 1998) y *Cf-4*, relacionado con la resistencia a *Cladosporium fulvum* (Takken et al., 1998).

Con el sistema *Ac/Ds*, Meissner y colaboradores (2000) obtuvieron y analizaron una colección de 2.932 plantas de tomate (Microtom) e identificaron 10 mutantes con un patrón de segregación 3:1 aunque señalaron que sólo en uno de los mutantes se producía cosegregación entre el elemento *Ds* y el fenotipo mutante. Los autores discuten que el bajo número de mutantes insercionales identificados (1 a partir de 2.932 familias) podría deberse a la elevada actividad del elemento *Ds*, con frecuencias de escisión del 60%. Gidoni y colaboradores (2003) generaron una colección de 405 líneas transgénicas de tomate con la construcción multifuncional pJasm13, que contiene un T-DNA y el elemento transponible *Ds* modificado. A partir de esta colección se ha clonado el gen *Tm-2²*, que confiere resistencia al virus del mosaico del tomate (Lanfermeijer et al., 2003).

IV.3.1.2.- Mutagénesis con T-DNA

La primera vez que se aplicó este método fue en *Drosophila melanogaster* (Ballinger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990), posteriormente ha sido aplicado en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis* (Feldmann, 1991; Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997; Krysan et al., 1999; Bouché y Bouchez, 2001; Alonso et al., 2003), arroz (Jeon et al., 2000; Yin y Wang, 2000; Jeong et al., 2002; Wu et al., 2003; Chen et al., 2003; Sallaud et al., 2003), *Lotus japonicus* (Webb et al., 2000), *Medicago truncatula* (Scholte et al., 2002), *Salvia miltiorrhiza* (Lee et al., 2008), *Brachipodium distachyon* (Vain et al., 2008), *Brassica rapa* (Lee et al., 2004), álamo (Harrison et al., 2007), tomate (Mathews et al., 2003), cebada (Zhao et al., 2006) y fresa (Oosumi et al., 2006).

En este tipo de mutagénesis, las inserciones del T-DNA son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony et al., 2005). La inserción de este T-DNA en el genoma es aleatoria, ya que no hay puntos calientes para su integración (Franzmann et al., 1995). Según An y colaboradores (2005), en la integración del T-DNA en arroz no hay evidencias de que esté ligado a ninguna clase de genes. Sin embargo, hay transposones (e.g.: *Tos 17*) que sí tienen preferencia por ciertos genes (e.g.: proteínas

kinasas). En un principio, el T-DNA suele integrarse preferentemente en regiones transcripcionalmente activas (André et al., 1986; Koncz et al., 1989; Herman et al., 1990). Los análisis realizados de las secuencias flanqueantes del T-DNA en *Arabidopsis* nos demuestran que las inserciones ocurren en zonas ricas en AT (Qin et al., 2003). En arroz la inserción se da con más probabilidad cerca del codón de inicio ATG (An et al., 2003; Chen et al., 2003; Sallaud et al., 2004). En ambas especies se ha observado que hay una amplia distribución de los insertos a lo largo del genoma, bajas frecuencias de integración en regiones repetidas e integración preferente en zonas ricas en genes.

Uno de los primeros trabajos en el que se abordó un programa de mutagénesis insercional por T-DNA fue descrita en *Arabidopsis* y permitió el aislamiento del gen *DWARF* (Feldmann et al., 1989). Por lo que respecta a tomate, que nosotros sabemos los únicos genes clonados mediante etiquetado por T-DNA han sido *ANT1*, que codifica para un factor de transcripción tipo MYB que actúa en la ruta biosintética de antocianinas (Mathews et al., 2003), y *ARLEQUÍN/TAGL1*, un gen MADS-box ortólogo de los genes *SHATTERPROF* de *Arabidopsis thaliana* que coordina distintos procesos del desarrollo reproductivo (Giménez et al., 2010).

Conviene indicar que la mutagénesis insercional, al igual que ocurre con otras aproximaciones que provocan disrupción génica, tiene algunas limitaciones. En este sentido, es difícil detectar un fenotipo mutante si se produce la disrupción de un gen redundante, ya que puede haber dos o más loci que desempeñen la misma función o tengan funciones compartidas. Asimismo, es difícil identificar la función de genes que son requeridos durante las primeras etapas del desarrollo gametofítico o embriogénico, es decir, genes cuya disrupción ocasiona letalidad. Por otro lado, puede ocurrir que un gen se exprese en un pequeño conjunto de células o durante un periodo de tiempo corto y el efecto que produce la pérdida de función no sea distinguible a nivel fenotípico. Adicionalmente, en los casos en los que un gen cumple más de una función, a no ser que se tenga un conocimiento suficiente de las características del material vegetal y que el fenotipado se realice de forma exhaustiva, puede ser muy difícil llegar a inferir todas y cada una de las funciones del gen. En este caso, lo más normal es que sólo se llegue a identificar la función más importante, la más temprana durante el desarrollo ontogénico

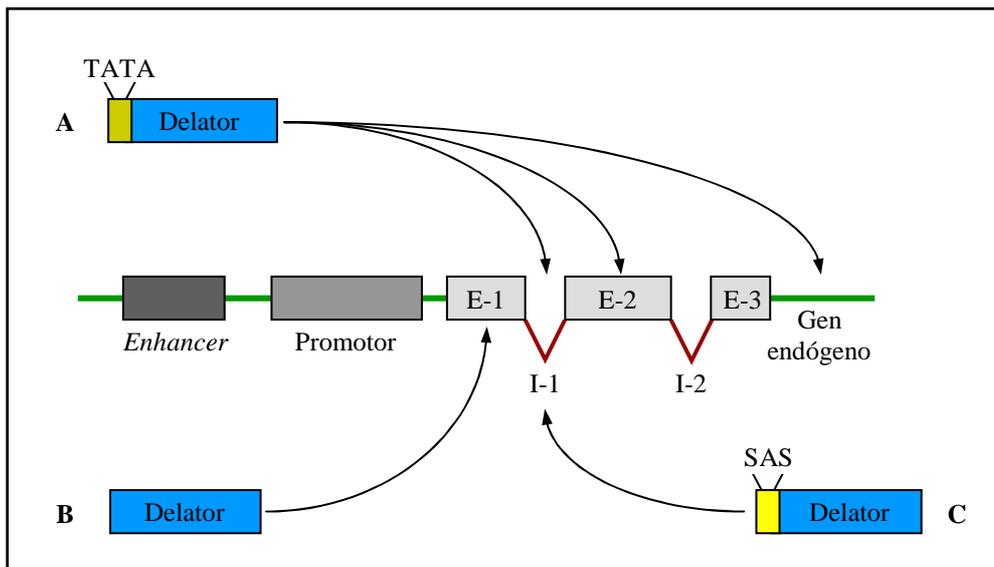
o, simplemente, la más espectacular o fácil de identificar a nivel fenotípico. Este tipo de problemas se puede resolver, al menos parcialmente, mediante el uso trampas génicas.

IV.4.- Mutagénesis insercional mediante trampas génicas

Por medio de esta estrategia se intenta obtener información sobre la función génica a partir de datos relacionados con la expresión de un gen delator presente en la construcción. La técnica consiste en introducir en dicha construcción, a parte del gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. Por tanto, además del efecto insercional que pueda tener la integración del T-DNA en un punto concreto del genoma, se trata de analizar las secuencias genómicas junto a las que se inserta la construcción por las propiedades de expresión que confieren éstas al gen delator, es decir, permite analizar el patrón de expresión de un gen analizando la expresión del delator.

El gen delator más comúnmente utilizado es el gen bacteriano *uidA* que codifica para la proteína GUS. Otra alternativa es el uso de la proteína fluorescente verde – GFP – (Haseloff et al., 1997) o del gen *LC* de maíz (Goldsbrough et al., 1996). Sin embargo, por comparación, la observación microscópica de la tinción GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g. *GFP* o *LUC*) ya que permite su detección en unas pocas células (Topping et al., 1994; Sundaresan et al., 1995; Campisi et al., 1999; He et al., 2001). Según Jefferson y colaboradores (1987), esta detección por medio de GUS es tan sensible que podemos detectarla en una única célula por técnicas histoquímicas.

Hay tres tipos de trampas génicas que usualmente se denominan como trampas de intensificadores, promotores y genes (Springer, 2000).



La trampa de intensificadores (A) consiste en un T-DNA sencillo que, además del gen marcador, contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* justo al lado del borde derecho. El promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de actuación de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del delator. **La trampa de promotores (B)** es idéntica a la de intensificadores, pero eliminando el promotor mínimo. Para que funcione, el T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones (E1, E2 o E3) de un gen. **La trampa de genes (C)** tiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator, de forma que sólo funciona cuando el T-DNA se integra dentro de un intrón (I-1 o I-2) (Hueros y Jouve, 2002).

Cada una de las trampas tiene sus ventajas e inconvenientes. La ventaja de la trampa de intensificadores es que, como para que funcione basta que se inserte en el área de actuación de un intensificador, el número de genes que se detecta es mayor. Por ejemplo, los estudios realizados por Kertbundit y colaboradores (1991) y Topping y Lindsey (1995) revelaron que la proporción de insertos que desencadenan expresión del gen delator estaba en torno al 25% usando una trampa de promotores y 50% con una trampa de intensificadores. El inconveniente, estriba en que, como puede funcionar a una distancia considerable, a la hora de clonar el gen, el esfuerzo requerido puede ser mayor. En este sentido, puede resultar difícil determinar que secuencia genómica es responsable de tal

patrón de expresión. Respecto a las trampas de promotores y genes, el inconveniente es que, como para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente, el número de genes que van a detectarse es menor. La ventaja es que el gen queda estrictamente etiquetado y que si se produce una fusión traduccional no solo puede hacerse un análisis funcional del gen, sino que además pueden obtenerse datos de la localización intracelular del producto del gen endógeno. No obstante, otro aspecto que merece tenerse en cuenta es la versatilidad de la trampa de intensificadores, ya que puede actuar como una trampa de promotores, cuando se inserta dentro de uno de los exones del gen, o como una trampa de genes, cuando se inserta dentro de un intrón.

Con independencia del tipo de trampa elegido, el empleo de esta estrategia tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional en sentido estricto al permitir la identificación de genes: a) funcionalmente redundantes; b) que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos que generan confusión al llevar a cabo el fenotipado; c) cuya disrupción provoca letalidad temprana; y d) cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en el fenotipado de las plantas. La identificación del gen es, además, independiente del nivel de expresión del mismo, evitando el peligro de descartar genes de baja expresión pero con efectos muy relevantes (e.g. *OVATE*; Liu et al., 2002), tal y como a veces ocurre cuando se emplean otras aproximaciones, como por ejemplo las de tipo transcriptómico. Por todo esto consideramos que éste es el método ideal para detectar genes que se activan o inactivan en respuesta a un estímulo externo o situaciones de estrés abiótico.

Se puede señalar que la probabilidad de que las trampas reflejen la expresión de un gen endógeno próximo es muy alta (Bellen, 1999). Hasta la fecha los genes endógenos detectados con este sistema y que posteriormente se han llegado a clonar mimetizan el patrón de expresión que había sido observado previamente con la trampa (Grossniklaus et al., 1989; Springer et al., 1995; Gu et al., 1998; Campisi et al., 1999; Swaminathan et al., 2000)

Análisis preliminares de colecciones de plantas con sistemas de trampas génicas han conducido a la identificación de genes y secuencias reguladoras específicas, por ejemplo, raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997), embriones en desarrollo (Topping y Lindsey, 1997), tejidos infectados por nematodos (Barthels et al., 1997) células guarda (Plesch et

al., 2000) o células en proceso de senescencia (He et al., 2001). Además, los sistemas basados en el empleo de trampas han permitido la clonación de promotores específicos de embriones (*Arabidopsis*; Topping et al., 1994), de la cubierta de la semilla (tabaco; Fobert et al., 1994), de tejidos vasculares (*Arabidopsis*, Wei et al., 1997) de células guarda (*Arabidopsis*; Plesch et al., 2000), de raíces (Mollier et al., 2000; y *Lotus japonica*, Webb et al., 2000), de tejidos en crecimiento y hojas jóvenes (*Arabidopsis*, De Greve et al., 2001) y de células meristemáticas (*Arabidopsis*, Farrar et al., 2003).

En la actualidad hay una serie de colecciones generadas con trampas génicas en *Arabidopsis* (Sundaresan et al., 1995; Campisi et al., 1999; Alvarado et al., 2004), arroz (Jeon et al., 2000; Jeong et al., 2002; Wu et al., 2003; Sallaud et al., 2003; Sallaud et al., 2004; Peng et al., 2005), tomate Microtom (Meissner et al., 2000) y álamo (Groover et al., 2004).

V.- INTERÉS DEL TOMATE Y ESPECIES SILVESTRES AFINES EN LOS ESTUDIOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD Y ESTRÉS HÍDRICO

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) pertenece al género *Solanum* de la familia *Solanaceae*, la cual engloba unos 90 géneros y más de 3.000 especies. Además de la importancia económica del tomate, esta especie se ha convertido en un excelente modelo para la investigación. Su genoma es relativamente pequeño (950 Mpb) y existen numerosas fuentes genéticas y genómicas disponibles: poblaciones cartografiadas, marcadores de DNA (Tanksley et al., 1992), colecciones de ESTs (Van der Hoeven et al., 2002) *microarrays* y bases de datos públicos (Yano et al., 2007) así como librerías de insertos genómicos de tipo YAC (Bonnema et al., 1996) y BAC (Budiman et al., 2000). Asimismo, conviene indicar que en 2004 se inició el programa de secuenciación del genoma de tomate (al menos de las 220 Mpb de secuencias eucromáticas, donde se ha sugerido que se encuentran la mayor parte de los genes) a través del consorcio internacional *Solanaceae Genome Project* (SOL) y que ha sido recientemente concluido (Tomato Genome Consortium, 2012). Todos estos aspectos hacen del tomate uno de los más efectivos modelos entre las especies cultivadas (Giovannoni, 2004).

Además, el tomate ha venido despertando en los últimos años un gran interés en la comunidad científica por el efecto beneficioso que parece tener sobre nuestro organismo y son cada vez más los estudios que parecen confirmar que este vegetal es una fuente inagotable de propiedades preventivas y curativas. Aporta beneficios en la prevención de ciertos cánceres debido a su excelente perfil nutricional, basado en una combinación equilibrada de antioxidantes (vitamina C, carotenoides y flavonoides), minerales, un alto contenido en ácido fólico y un bajo nivel de grasas. Posee propiedades antienvjecimiento, debido a que tiene una sustancia que únicamente está presente en éste como es el licopeno. Desempeña un papel fundamental en la dieta diaria, ya que las variedades selectas están disponibles durante todo el año y representan un producto versátil para una gran variedad de propuestas culinarias.

En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicon* (Linnaeus, 1753). En 1754, Miller hace una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum* (Miller, 1754), lo que ayuda a aceptar a esta especie como una planta comestible. Las relaciones filogenéticas entre *Solanum* y *Lycopersicon* han sido el origen de largos debates durante mucho tiempo. Así pues, algunos investigadores reconocían *Lycopersicon* como un género distinto mientras que otros sugerían que este debía estar unido al género *Solanum*. La clasificación filogenética de las Solanáceas fue revisada posteriormente y el género *Lycopersicon* fue reintegrado dentro del género *Solanum* adquiriendo nueva nomenclatura (Peralta et al., 2005).

Lista de especies de la sección *Lycopersicon* dentro del género *Solanum* y equivalencias según la nomenclatura anterior (Peralta et al., 2005)

<i>Solanum</i> spp	Equivalencia en <i>Lycopersicon</i> spp
<i>S. arcanum</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> (L. Riley)
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal
<i>S. chmielewskii</i> (C. M. Rick, Fobes y M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson y R. K. Jansen	<i>L. chmielewskii</i> C. M. Rick, Fobes y M. Holle
<i>S. corneliomuellerie</i> J. F. Macbr.	Parte de <i>L. peruvianum</i> , conocida como <i>L. peruvianum</i> var. <i>glandulosum</i>
<i>S. galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>L. cheesmaniae</i>
<i>S. habrochaites</i> S. Knapp y D. M. Spooner	<i>L. hirsutum</i>
<i>S. huaylasense</i> Peralta	Parte de <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> Miller
<i>S. neorickii</i> (C. M. Rick, Fobes y M. Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson y R. K. Jansen	<i>L. parviflorum</i> C. M. Rick, Fobes y M. Holle
<i>S. pennellii</i> Correl	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy
<i>S. peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> (L.) Miller

Dentro del género *Solanum*, la sección *Lycopersicon* incluye al tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) (única especie domesticada) y 12 especies afines más. Estas especies afines, más conocidas como tomates silvestres, poseen una gran diversidad genética (Foolad, 2007). Gracias a su amplia diversidad genética, dichas especies representan en la actualidad el principal recurso genético en la mejora de tomate cultivado (Bai y Lindhout, 2007; Foolad, 2007).

Las herramientas de genómica funcional están permitiendo la identificación de numerosos genes inducidos por estrés, pero sólo se conoce hasta el momento la función

de un número muy limitado de los mismos (Bartels y Sunkar, 2005, Munns y Tester, 2008). Además, en la mayoría de los casos, los genes identificados proceden de especies modelo (Munns, 2005; Cuartero et al., 2006). Los mayores esfuerzos para identificar genes implicados en la tolerancia a estrés abiótico se han dirigido en la última década hacia la sobreexpresión de genes endógenos o la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes procesos (revisado en Munns, 2005; Tuberosa y Salvi, 2006; Vij y Tyagi, 2007; Cuartero et al., 2008). Uno de los objetivos que se abordan en este trabajo es estudiar la respuesta de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan dos genes implicados en mecanismos relacionados con estreses abióticos: el gen *HAL5* implicado en la homeostasis iónica y el gen *IMP1* procedente de levadura que está involucrado en la última etapa de la síntesis de myo-inositol.

Una estrategia alternativa sería la búsqueda de genes en especies tolerantes, en vez de centrarse en las especies cultivadas con mayor sensibilidad al estrés. Diferentes autores han revisado los mecanismos de tolerancia en halofitas (plantas capaces de sobrevivir y reproducirse en ambientes con altas concentraciones salinas) y han propuesto que la investigación futura se debería dirigir hacia la identificación de los determinantes de tolerancia en estas especies (Flowers y Colmer, 2008; Lugan et al., 2010). El tomate puede ser un modelo excelente en este sentido, ya que hay accesiones de especies silvestres relacionadas, como las de *S. pennellii* que hemos utilizado en la segunda parte de este trabajo, que exhiben un alto grado de tolerancia tanto a la salinidad como al estrés hídrico (Bolarin et al., 1991).

Tras evaluar las distintas estrategias biotecnológicas que se están utilizando en los últimos años para avanzar en la identificación de genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos hemos elegido la generación e identificación de mutantes insercionales mediante el empleo de una trampa de intensificadores. Una de sus ventajas sería la posibilidad de detectar genes implicados en la tolerancia no sólo a través del fenotipo, sino también mediante estudios de expresión diferencial del gen delator. Con este método la detección del gen no depende de su nivel de expresión, evitando el riesgo de despreciar genes que, pese a sus muy bajos niveles de expresión, tienen efectos fenotípicos muy importantes. Además, se facilita enormemente la clonación al estar el gen etiquetado (Cuartero et al., 2006; Zhang et al., 2007; Atarés et al., 2011). En este

trabajo se ha generado una colección de líneas T-DNA de la especie silvestre *S. pennellii* con una trampa de intensificadores y se ha estudiado su respuesta al estrés hídrico y salino con el objetivo de identificar mutantes afectados en la tolerancia a ambos estreses abióticos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es avanzar en el conocimiento de las bases fisiológicas y genéticas de la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico en una especie de interés agronómico, el tomate. Para ello, se han utilizado dos herramientas biotecnológicas, el análisis funcional de dos genes candidatos y la mutagénesis insercional mediante el empleo de una trampa de intensificadores en una especie silvestre relacionada con altos niveles de tolerancia a ambos estreses. En este contexto, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1.- Estudiar la respuesta de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan el gen *SCHAL5*, implicado en el estrés iónico inducido por salinidad y comprobar si su efecto se mantiene a lo largo del ciclo vegetativo.

2.- Estudiar la respuesta de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan un gen implicado en la síntesis de osmolitos, el gen *ScIMP1* que está involucrado en la última etapa de la síntesis de myo-inositol, para identificar su papel en la tolerancia a la salinidad y el estrés hídrico.

3.- Generar una colección de líneas T-DNA de la especie silvestre *Solanum pennellii*, empleando un vector que porta una trampa de intensificadores, para identificar mutantes insercionales en diferentes caracteres, especialmente la tolerancia al estrés hídrico y salino.

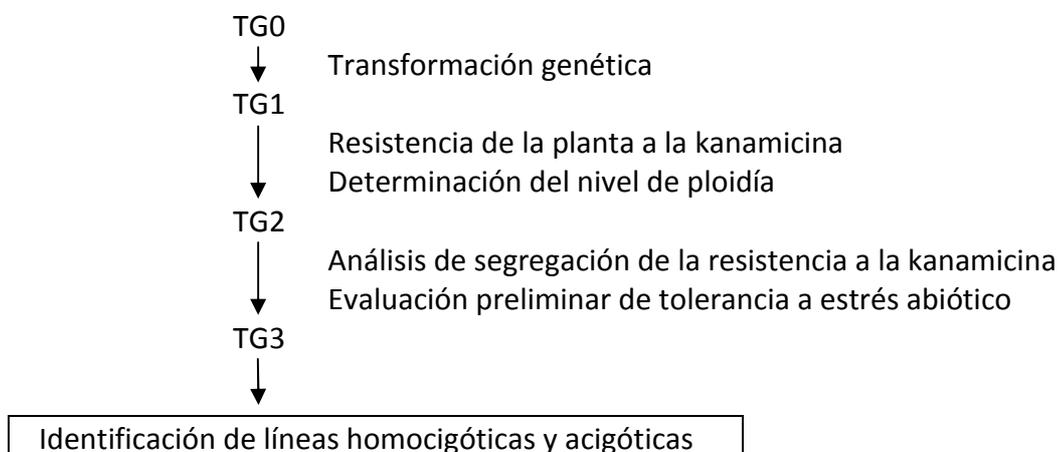
4.- Analizar el fenotipo y la expresión del gen delator de las líneas T-DNA obtenidas en ausencia y presencia de estrés con el objetivo de identificar mutantes de inserción con alteraciones en el nivel de tolerancia a los estreses salino e hídrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

I.-ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES *HAL5* E *IMP1* RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE

I.1.-Material vegetal

Se ha empleado el cultivar de tomate para consumo fresco p73, cedido amablemente por la Dra. M^a José Díez de la Universidad Politécnica de Valencia. Las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo se han obtenido en el laboratorio de Cultivo *in Vitro* y Mejora Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, dirigido por el Dr. Vicente Moreno. Los genes introducidos han sido *HAL5* e *IMP1*, ambos aislados de *Saccharomyces cerevisiae* por el grupo del Dr. Ramón Serrano del mismo Instituto. El protocolo de transformación, la identificación de plantas transgénicas diploides, la detección e identificación de líneas acigóticas y homocigóticas y la caracterización fenotípica preliminar ha sido descrito por Pineda (2005). Estos genes se han introducido bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor en un plásmido que portaba *nptII* (resistencia a la kanamicina) como gen marcador. Se han utilizado líneas homocigóticas para cada uno de los transgenes y como controles se ha utilizado la población original sin transformar (control externo) o bien una línea acigótica procedente de la misma familia transgénica (control interno). En el siguiente esquema se muestran las diferentes etapas que se han llevado a cabo para identificar las líneas homocigóticas y acigóticas para el inserto transgénico (Pineda, 2005).



I.2.-Cultivo y evaluación de las plantas en condiciones controladas

Las semillas para los distintos experimentos se sembraron en semilleros de plástico de 60x40x12 cm y 96 pocillos por bandeja. La germinación se realizó en una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 y unas condiciones de temperatura y humedad de 28°C y 80% respectivamente. Las semillas se mantuvieron en oscuridad durante las primeras 48-72 horas después de la siembra para facilitar la germinación. Las condiciones de cultivo utilizadas para los experimentos son las siguientes: humedad relativa entre un 50 y 80% y la temperatura en un rango entre 18°C (noche) y 25°C (día) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad de luz y la temperatura variaba mediante el empleo de una programación pautada para intentar reproducir en lo posible un ciclo natural. Las condiciones eran:

Tiempo (h)	2	2	8	2	2	8
Intensidad de luz ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	81	162	245	162	81	-
Temperatura (°C)	20	23	26	23	20	18

La disolución nutritiva utilizada, tanto para el riego de los semilleros como para el posterior cultivo hidropónico, fue la de Hoagland diluida al 50% (Hoagland y Arnon, 1950).

La composición de esta disolución es:

<u>Solucion A</u>	<u>g·L⁻¹</u>
NH ₄ NO ₃	8,0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	82,6
KNO ₃	35,7
<u>Solucion B</u>	<u>g·L⁻¹</u>
KNO ₃	5,0
KH ₂ PO ₄	27,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,053
H ₃ BO ₃	0,140
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,015
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,060
<u>Fe</u>	<u>g·L⁻¹</u>
Fe-EDDHA 6%	1,87

Las plántulas recién germinadas se transplantaron al sistema de cultivo definitivo cuando tenían 2-3 hojas verdaderas. Estos sistemas de cultivo pueden ser tanto el empleo de macetas con sustrato como el cultivo hidropónico.

Para el cultivo en maceta se transplantaron las plantas a macetas de 15 a 30 cm de diámetro usando como sustrato la mezcla de turba y perlita antes descrita para la germinación de las semillas. El sustrato se humedecía completamente antes de transplantar las plantas



y se dejaban las plantas unos días antes de empezar el tratamiento para permitir el desarrollo de la raíz.

El cultivo hidropónico se realizó en cubetas con capacidad para 150 L de disolución nutritiva. La disolución utilizada es la misma disolución Hoagland al 50% utilizada para el riego a la que se le añaden distintas concentraciones de NaCl. La aplicación de la sal fue gradual para así reducir en lo posible el choque osmótico. El estrés hídrico se impuso mediante reducción de riego (un 30% del control) durante 50 días.

Las condiciones del cultivo se controlaron mediante un seguimiento del pH, la conductividad eléctrica y la realización de análisis químicos periódicos, procediéndose al cambio de la disolución cada vez que fuera necesario, mínimo una vez por semana. Esta disolución es convenientemente aireada mediante un burbujeo continuo suministrado por un compresor Puska N-150-50, con un caudal de $115 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, presión máxima $10 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y capacidad de 50 litros. Las condiciones de temperatura y humedad son las mismas que las indicadas anteriormente para el cultivo en la cámara.

I.3.-Cultivo y evaluación de las plantas en el invernadero

Los experimentos a largo plazo en condiciones similares a las comerciales se realizaron en un invernadero situado en la finca experimental del CEBAS-CSIC en Santomera, Murcia. Es

un invernadero de unos 1.000 m² completamente cerrado y dotado de ventiladores y un sistema de enfriamiento para la regulación de temperatura que se activa con temperaturas superiores a 24°C. Se utiliza fibra de coco como sustrato y contenedores de poliestireno con un volumen de 32 litros y espacio para 6 plantas en cada contenedor. El riego por goteo utiliza emisores de 3 L·h⁻¹ y el marco de plantación 0,5 m x 2 m con un gotero para cada dos plantas. Las plantas se cultivaron entutoradas a un sólo tallo, eliminándose periódicamente las yemas laterales. La fertilización se ajusta para conseguir unos niveles óptimos de nutrientes para el cultivo del tomate (Cadahia, 1995).

Macronutrientes (mM)					
N(NO ₃ ⁻)	N(NH ₄ ⁺)	P(PO ₄ ³⁻)	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²
12,0	0,5	1,5	7,0	4,0	2,0
Micronutrientes (µM)					
Fe ⁺³	Cu ⁺²	Mn ⁺²	Zn ⁺²	B ⁺³	
29-59	2-5	10-20	3-7	20-45	



Se dispone de tres depósitos de 2.000 litros donde se preparan las disoluciones concentradas de abonos y micronutrientes que posteriormente se añade al agua de riego para conseguir los niveles de nutrientes deseados. Un cuarto depósito contiene ácido fosfórico para regular el pH de la disolución de riego, mientras que en un quinto depósito se utiliza para agregar mediante un sistema de mezcla por inyección automática a la solución de fertirrigación el NaCl usado para inducir el estrés salino. La regulación de la inyección se realiza mediante medidas de la conductividad eléctrica.

Periódicamente se realizaba el análisis químico tanto del agua, como de la disolución de riego y del lixiviado producido por el riego para comprobar que las condiciones de cultivo eran las deseadas. El control del riego lo realiza un autómatas que varía sus condiciones según la edad de la planta y las condiciones ambientales.

Periódicamente se realizaba el análisis químico tanto del agua, como de la disolución de riego y del lixiviado producido por el riego para comprobar que las condiciones de cultivo eran las deseadas. El control del riego lo realiza un autómatas que varía sus condiciones según la edad de la planta y las condiciones ambientales.

Las plantas se llevaban al invernadero y se transplantaban cuando habían desarrollado 7-8 hojas verdaderas. Después del transplante, tras un periodo de aclimatación a las condiciones del invernadero de entre 7 y 15 días, se iniciaba el tratamiento salino correspondiente. Dicho tratamiento se realizaba gradualmente para minimizar el choque osmótico.



I.4.-Evaluación de la tolerancia a la salinidad mediante técnicas de cultivo *in vitro*

Los explantes para la iniciación de los callos se obtuvieron a partir de folíolos de plántulas



de cuatro semanas aproximadamente germinadas *in vitro*. Se eliminó el nervio central de la hoja y se troceó en porciones de 1 cm² aproximadamente. La siembra se realizó con el envés de la hoja en contacto con el medio, a razón de 4 explantes/placa y 12 placas por línea. Se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro que llevaban unos 25 mL de

medio de cultivo. El medio utilizado había sido seleccionado previamente para el cultivo de callos de diferentes cultivares de tomate y especies silvestres (Cano et al., 1996). Se utilizó ácido naftalenacético y 6-benciladenina como reguladores del crecimiento para inducir el desarrollo desorganizado de células, dando lugar al cabo de unas cuatro semanas a callos.

Los callos se desarrollaron en una cámara de cultivo, con fotoperiodo de 16 horas de luz a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y con una intensidad luminosa de $76 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrada por tubos fluorescentes Grolux de 58 W (Sylvania).

I.5.-Caracterización fisiológica

Se ha llevado a cabo la caracterización fisiológica de las líneas seleccionadas para evaluar su comportamiento. Para ello se han analizado diferentes parámetros.

Contenido de agua

El contenido de agua se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{Contenido agua} = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso seco}$$

Para ello las muestras se pesan al ser recogidas y se mantienen un mínimo de 48 horas en una estufa a 70°C hasta conseguir un peso constante. El contenido de agua se expresa en mL de agua por gramos de peso seco.

Contenido de clorofila

La medida del contenido en clorofila se realizó con un medidor SPAD-502 (Minolta, Japón) que permite calcular semi-cuantitativamente el contenido de clorofila mediante la medida de la fluorescencia de la clorofila a dos longitudes de onda distintas, una a la que absorbe la clorofila (650 nm) y a otra longitud a la que no absorbe (940 nm) que permite compensar el grosor de la hoja (Ling et al., 2011). El aparato proporciona unas unidades relativas denominadas SPAD (Soil Plant Analysis Development, units) descrito por Hoel y Solhaug, 1998 que correlacionan con el contenido en clorofila de la planta. Se realizaron 4 medidas de la misma hoja, analizándose un mínimo de 6 plantas por línea y tratamiento.

Potencial hídrico

El potencial hídrico de las plantas se estimó mediante una cámara de presión tipo Scholander (Soil Moisture modelo 3000, EE.UU). El método está basado en la medida de la salida de la savia del xilema de una hoja o tallo cuando la presión aplicada es suficiente para forzar la salida del agua de las células vasculares. Esta presión es igual al potencial hídrico de las hojas. Para el cálculo del potencial hídrico de cada planta se realizaron tres

medidas de foliolos de la tercera o cuarta hoja completamente desarrollada. Las medidas siempre se realizaron en el mismo periodo de tiempo, tres horas a partir del inicio de la fase luminosa.

Potencial osmótico

El potencial osmótico se midió por el método crioscópico (depresión del punto de congelación) utilizando un osmómetro Osmometer automatic (Roebbling, Alemania). El aparato utiliza dos patrones, uno de agua destilada (valor 0) y otro de una disolución de NaCl de 300 mOsmol. Se utilizaban 100 μ L de extracto para cada medida. La transformación desde mOsmol a MPa se realiza por la equivalencia 400 mOsmol igual a 1 MPa.

Obtención de extractos para análisis de solutos

El procesamiento de las muestras obtenidas se realizó por dos métodos diferentes. Por digestión con nítrico/perclórico se obtuvo el material para el análisis de iones. Para el análisis de todos los solutos se partió del material utilizado para la medida del potencial osmótico que fue congelado-descongelado y posteriormente centrifugado.

El proceso de digestión es el siguiente: 100 mg de material seco y molido se depositaban en un tubo de vidrio al que se le añadían 10 mL de una disolución de HNO₃:HClO₄ en proporción 2:1 (v/v) y se introducían en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante al menos 6 horas. Cuando el material está completamente digerido se retiran las muestras del digestor y se enrasan los tubos a 50 mL, se agita la mezcla y se transfiere a un recipiente.

Para la obtención del extracto de savia, se introduce una cantidad suficiente del tejido a analizar, alrededor de 8 gramos, en puntas de pipeta de 5 mL con una pequeña cantidad de fibra de vidrio en la punta para actuar como filtro del extracto. Las puntas se congelan en nitrógeno líquido y se almacenan a -20°C hasta que se continúa con el proceso de obtención de los extractos.

Cuando se va a realizar los análisis, las puntas se dejan descongelar durante 15 minutos antes de introducirlas en la centrifuga, este proceso de congelación-descongelación permite la rotura de las células liberando su contenido al exterior. A continuación, las

puntas se centrifugan en una centrífuga Haerus labofuge II (Haerus, Alemania) durante 15 minutos a 1.000 g y 4°C. El volumen obtenido se recoge por duplicado en tubos de 1,5 mL y se vuelve a centrifugar a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C en una centrífuga Sigma 2k15 (B. Braun, Alemania). En el precipitado se quedan todas las impurezas y restos celulares recogiendo el sobrenadante.

Análisis de iones

La medida de los cationes sodio y potasio se realizó a partir de extracto vegetal crudo o material seco, molido y posteriormente digerido con HNO₃:HClO₄ (2:1 v/v). Las medidas se realizaron en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-óptico, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

Análisis de azúcares y ácidos orgánicos

Para la determinación individual de los azúcares y el análisis de los distintos ácidos orgánicos se usó la técnica del HPLC. Una dilución del extracto obtenido por centrifugación se filtra primero con un filtro de 0,45 µm (Syringe Filters PVDF, Whatman, Gran Bretaña) y posteriormente con un filtro Spe-ed SPE Octadecyl C18/18% (Mini Spe-ed Cartridge, Applied Separations, EE.UU.). Este extracto se utiliza para las medidas en el HPLC 10A (Shimadzu, Japón) equipado con una bomba, un inyector automático, un horno, un detector de índice de refracción (RID) para el análisis de carbohidratos y un espectrofotómetro UV/visible para la detección de ácidos orgánicos. Para la separación de los distintos elementos se utiliza una columna de intercambio iónico ICE Coregel 87H3 (Transgenomic, EE.UU.).

Las condiciones de trabajo del HPLC tanto para azúcares como para ácidos son:

Fase móvil: H ₂ SO ₄	0,1 N
Flujo	0,4 mL·min ⁻¹
Presión de la bomba	0,745 psi
Temperatura de la columna	37 °C
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo del cromatograma	30 min

I.6.-Caracterización molecular

La caracterización molecular de las líneas transgénicas la realizó el grupo del I.B.M.C.P., tal como describe Pineda (2005). El nivel de expresión del gen en las diferentes líneas se cuantificó por RT-PCR en un equipo RotorGen 3000 (QIAGEN, Holanda) disponible en nuestro laboratorio.

Para la extracción del ARN se utilizó material vegetal congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta el momento de la extracción que fue realizada según el protocolo utilizado habitualmente en el laboratorio (García-Abellán, 2011). Para la síntesis de ADNc se usó el protocolo comercial de SuperScript transcriptasa inversa (Invitrogen, EE.UU) partiendo de 100 ng de ARN. Para la RT-PCR, se utilizó el ADNc obtenido anteriormente utilizando el kit RotorGen SYBR Green PCR.

I.7.-Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se utilizó aplicando los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 19.0. Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA). Los valores medios se compararon mediante el test de LSD (diferencia mínima significativa) con un nivel de probabilidad del 5%.

II.-IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN *Solanum pennellii*

II.1.-Material Vegetal

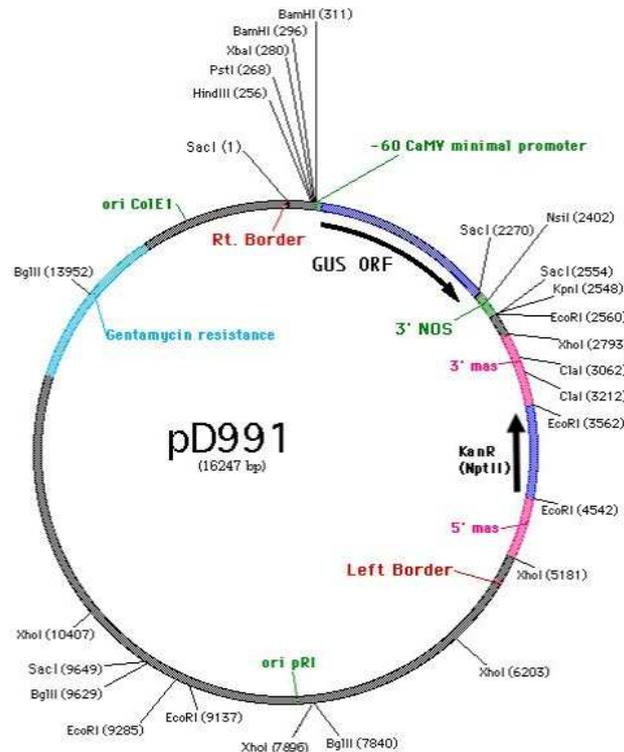
El material vegetal empleado en estos experimentos fue tres accesiones de *Solanum pennellii* ('20164' fue amablemente cedida por la Dra. M^a José Díaz del COMAV, 'LA0716' y 'PE47') sobre las que se llevó a cabo la transformación genética para la obtención de las colecciones de T-DNA y las posteriores evaluaciones. *Solanum pennellii* es una especie de fruto verde usada frecuentemente en programas de mejora por su cercanía filogenética a tomate y sus características favorables en cuanto a tolerancia a sequía (Rick, 1973), salinidad (Dehan y Tal, 1978; Tal y Shannon, 1983; Taleisnik, 1987; Saranga et al., 1991), resistencia a insectos (Goffreda y Mutschler, 1989) y enfermedades (Bournival et al., 1990).

II.2.- Generación de una colección de líneas T-DNA a partir de *Solanum pennellii*

Las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo han sido obtenidas en el laboratorio de Cultivo in Vitro y Mejora Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, dirigido por el Profesor Vicente Moreno. El protocolo de transformación ha sido descrito por Pineda (2005). De forma resumida, se emplea el cocultivo de explantes primarios de hoja con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como método para transferir el T-DNA a las células vegetales. Posteriormente, se lleva a cabo el lavado de los explantes para eliminar dicha bacteria y su subcultivo a los medios organogénicos que permiten la selección y regeneración de plantas transgénicas. Estas plantas se propagan hasta obtener un número de copias suficientes para que alguna de ellas se aclimaten y se lleven al invernadero para su cultivo y evaluación.

***Agrobacterium tumefaciens*: cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA**

Las transformaciones genéticas se realizaron con una cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. El vector utilizado como trampa de intensificadores fue el pD991, cedido por el Dr. Thomas Jack (Dpto. Ciencias Biológicas, Universidad de Dartmouth), que contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encontraba fusionada la región estructural del gen *uidA*.



Selección de plantas diploides mediante citometría de flujo

Para poder eliminar las plantas que no fueran diploides se analizaba su nivel de ploidía mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders et al. (1994). El tejido vegetal (un fragmento de hoja joven de aproximadamente 1 cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa Petri de 50 mm de diámetro. Se añaden 200 µL de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Alemania) y 800 µL de una solución que contiene 1 mg·L⁻¹ de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366 nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que

es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas. El sistema se calibra previamente situando el pico correspondiente a un contenido de ADN igual a 2C (diploide en fase G1) sobre el valor que se desee de la escala de abscisas.

Propagación clonal de plantas

La propagación clonal de plantas tiene como fin la obtención de genotipos idénticos (clones), por medio de la multiplicación vegetativa a partir del cultivo de yemas axilares y ápices meristemáticos. Para ello se utiliza botes de 150 mm de altura x 60 mm de diámetro y medio de enraizamiento.

Componentes	g·L⁻¹
Solución mineral	MS*
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
Ácido indol acético	0,0001
Agar	8

*MS: Murashige y Skoog, 1962

El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.

Los medios de cultivo se esterilizan en autoclave (115°C - 30 minutos).

Aclimatación y trasplante

Cuando han pasado aproximadamente 20 días desde la propagación clonal en medio de enraizamiento, las plantas tienen un tamaño apto para la aclimatación. Por tanto, se sacan de los botes de vidrio con mucho cuidado de no dañar el sistema radicular y se elimina el agar que pueda quedar adherido a ellas. A continuación, se trasplantan en macetas que contienen ocho partes de turba y tres de perlita previamente esterilizadas y humedecidas. Después, se tapan con un vaso de plástico transparente para que



creen una micro-atmósfera en la que se mantenga una alta humedad ambiental. Cuando ha pasado una semana se retira el vaso de forma gradual hasta que las plantas estén totalmente aclimatadas. Por último, cuando han pasado aproximadamente 15 días de aclimatación, se puede realizar el trasplante a contenedores de policarbonato expandido que contienen fibra de coco previamente humedecida en el invernadero.

II.3.-Cultivo y evaluación de las plantas en condiciones controladas

El cultivo hidropónico se realizó, como en el apartado anterior, utilizando la solución Hoagland diluida a la mitad y bien aireada. Se utilizaron unas cubetas de fibra de vidrio de 3 x 0,40 x 0,25 metros fabricadas para tal fin. Éstas se cubrían con una lámina del mismo material sobre las cuales se hicieron agujeros en los que se introducían las plantas. El sistema radicular quedaba perfectamente sumergido en la solución Hoagland, y la parte aérea no estaba en ningún momento en contacto con dicha solución. Las plantas se distribuían a lo largo de la cubeta en un número de 25 a una distancia de unos 12 cm de separación entre ellas y de forma alterna. Los genotipos se cultivaron tanto en solución control (sin ningún estrés) como en solución a la que se le añadía la concentración de NaCl prevista. En este caso, el estrés salino se aplicaba un mes después de iniciar el

cultivo hidropónico para que las plantas estuvieran adaptadas a este tipo de cultivo. Los muestreos se realizaron tanto a corto como a largo plazo tras la aplicación del estrés.

II.4.-Cultivo y evaluación de las plantas en el invernadero

Las plantas se cultivaron en condiciones similares a las expuestas en el apartado I.3. La única diferencia fue que, debido a las características de *Solanum pennellii* respecto de tomate, se realizaban dos riegos diarios menos que a las plantas de tomate.

II.4.1.-Evaluación a medio plazo

Los experimentos de evaluación a medio plazo se llevaron a cabo en macetas de 13x13x13 cm que se colocaban sobre bandejas de plástico y que se regaban manualmente. Unos días después del trasplante, cuando las plantas alcanzaban los 25-30 cm de altura (Día 0), daba comienzo el tratamiento salino mediante la adición de NaCl 150 mM a la solución nutritiva. A partir de ese momento se mantuvo el riego con esas condiciones adicionando la cantidad necesaria de solución de riego para que el sustrato permaneciera siempre húmedo.



II.4.2.-Evaluación a largo plazo

Para llevar a cabo los experimentos de evaluación a largo plazo, las plantas se cultivaron tanto entutoradas como dejando un cierto desarrollo rastrero. Para ello, al contrario que con tomate, se dejaban crecer algunas ramas laterales. El crecimiento en condiciones sin

estrés se hizo como se ha descrito en el apartado I.3. Para aplicar el tratamiento de estrés salino se iba incrementando la concentración de cloruro sódico paulatinamente hasta llegar a alcanzar la concentración máxima de NaCl 200 mM. En el caso de tratamiento de estrés hídrico lo que se hacía era dejar de regar desde el día de aplicación del tratamiento hasta el final del experimento. En todos los experimentos de medio y largo plazo, se cultivaron los testigos correspondientes en condiciones sin presión de selección.

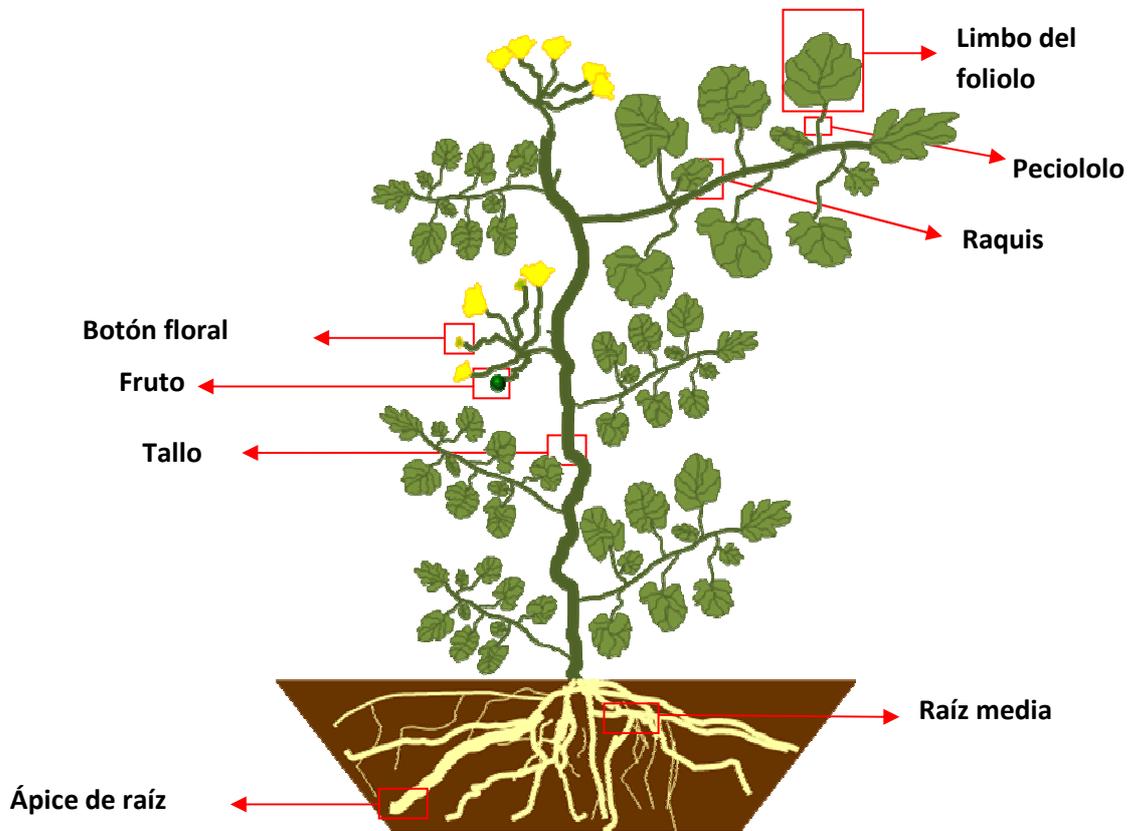
II.5.-Análisis de la expresión del gen delator en líneas T-DNA de *Solanum pennellii*

Las muestras recogidas en las líneas T-DNA para análisis X-GLUC o expresión del gen delator (*uidA*) se analizaron espacial y temporalmente. En este ensayo histoquímico las partes de las plantas utilizadas de forma sistemática para evaluar la expresión del gen delator fueron las siguientes:

- *Limbo del foliolo*: incluía el nervio central de una hoja adulta y sana sin síntomas de enfermedad o senescencia.
- *Peciololo*: se toma una parte del peciololo del foliolo que hemos utilizado.
- *Raquis*: se toma un segmento de raquis de la hoja que hemos utilizado.
- *Tallo*: se toma un segmento de tallo próximo a la hoja de la que se obtuvo la muestra.
- *Botón floral*: en este estadio la flor está completamente cerrada.
- *Flor en preantesis*: en este estadio, en la flor ya se pueden observar todos los verticilos aunque no aparece completamente abierta.
- *Frutos*: se cogen frutos recién cuajados en los experimentos que sea posible ya que dependerá del grado de desarrollo de la planta y no siempre será posible obtenerlos.
- *Ápice de raíz*: se toma la parte apical, donde se encuentra la caliptra.
- *Raíz media*: se toma un segmento de la parte central de la raíz, que no esté muy cercana al ápice y donde estén los tejidos bien diferenciados.

La toma de muestras para realizar este análisis se llevó a cabo en tres momentos diferentes teniendo como referencia el momento en el que se inicia el tratamiento estresante. En concreto, los días 1 y 7 del tratamiento se toman muestras de limbo, peciololo y raquis de la segunda hoja contando desde la más basal y tallo, si era posible sin afectar el desarrollo de la planta. Tras 30 días de tratamiento se toman muestras de

limbo, peciololo y raquis así como de tallo, capullo floral y flor en preantesis. Tras 35 días de tratamiento se tomaban muestras de la raíz.



Las muestras recogidas se ponían en placas de 96 pocillos y posteriormente se les añadía el X-GLUC en cantidad suficiente para que cubriera la muestra. Posteriormente esta placa se dejaba durante 24 horas incubando en oscuridad, a 37°C para que tuviera lugar la reacción histoquímica.



Solución X-GLUC	Concentraciones
X-GLUC (Disolver en DMSO 1%)	1,0 mM
Tampon Na₂HPO₄	100 mM
Tampon NaH₂PO₄	100 mM
EDTA	10 mM
K-Ferricyanide (FeIII)	0,5 mM
K-Ferricyanide (FeII)	0,5 mM
Triton X-100	0,1%
Agua destilada	Hasta 1L

Tras las 24 horas de incubación, se elimina el X-GLUC y se realizan varios lavados con etanol 70% para eliminar la clorofila de los tejidos y poder detectar mejor la tinción azul que produce la expresión del gen *uidA*. Tras conseguir esta decoloración se realizan dos lavados más con etanol puro y, por último, para el mantenimiento de las muestras, se cubren con glicerol. Las fotografías de estas muestras se tomaron con la ayuda de un estereomicroscopio SMZ1500 (Nikon, Japón) acoplado a una cámara fotográfica Nikon D70.

RESULTADOS

I.-ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES *HAL5* E *IMP1* RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE

I.1.-Análisis funcional del gen *HAL5* implicado en la tolerancia a la salinidad

Tras la generación de las plantas transgénicas y la identificación de líneas homocigóticas y acigóticas para el transgén se procede a su evaluación.

I.1.1.-Tolerancia a la salinidad a largo plazo inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* en plantas de tomate

El primer ensayo para comprobar si la sobreexpresión del gen *HAL5* inducía tolerancia a la salinidad en tomate se realizó con progenies segregantes para la copia o copias integradas (TG2). Para eliminar las plantas sin transgén (acigóticas) en las progenies, la población TG2 se germinaba en medio con agente selectivo (kanamicina para el gen marcador *nptII*), y las plantas tolerantes a kanamicina, que incluían las homocigóticas y hemicigóticas para la inserción, eran utilizadas para evaluar la tolerancia a salinidad midiendo el peso total de frutos por planta.

En este experimento se utilizaron plantas TG2 de cinco líneas que sobreexpresan el gen *HAL5* y como control se utilizó el cultivar p73 sin transformar (WT). La producción de frutos de las plantas transgénicas desarrolladas durante todo el ciclo de cultivo en 100 mM NaCl era similar o bien se incrementaba respecto del WT (Fig. 1), observándose el mayor incremento del número de frutos por planta en la línea 65.

El aumento de la cosecha de frutos en las líneas transgénicas se debía sólo a una de sus componentes, el número de frutos (Fig. 1), ya que el peso medio de los frutos era similar en las plantas WT y transgénicas. El mayor número de frutos correspondía a la línea 65, seguido de las líneas 71 y 41, mientras que las líneas transgénicas 2 y 24 mostraban valores similares al WT.

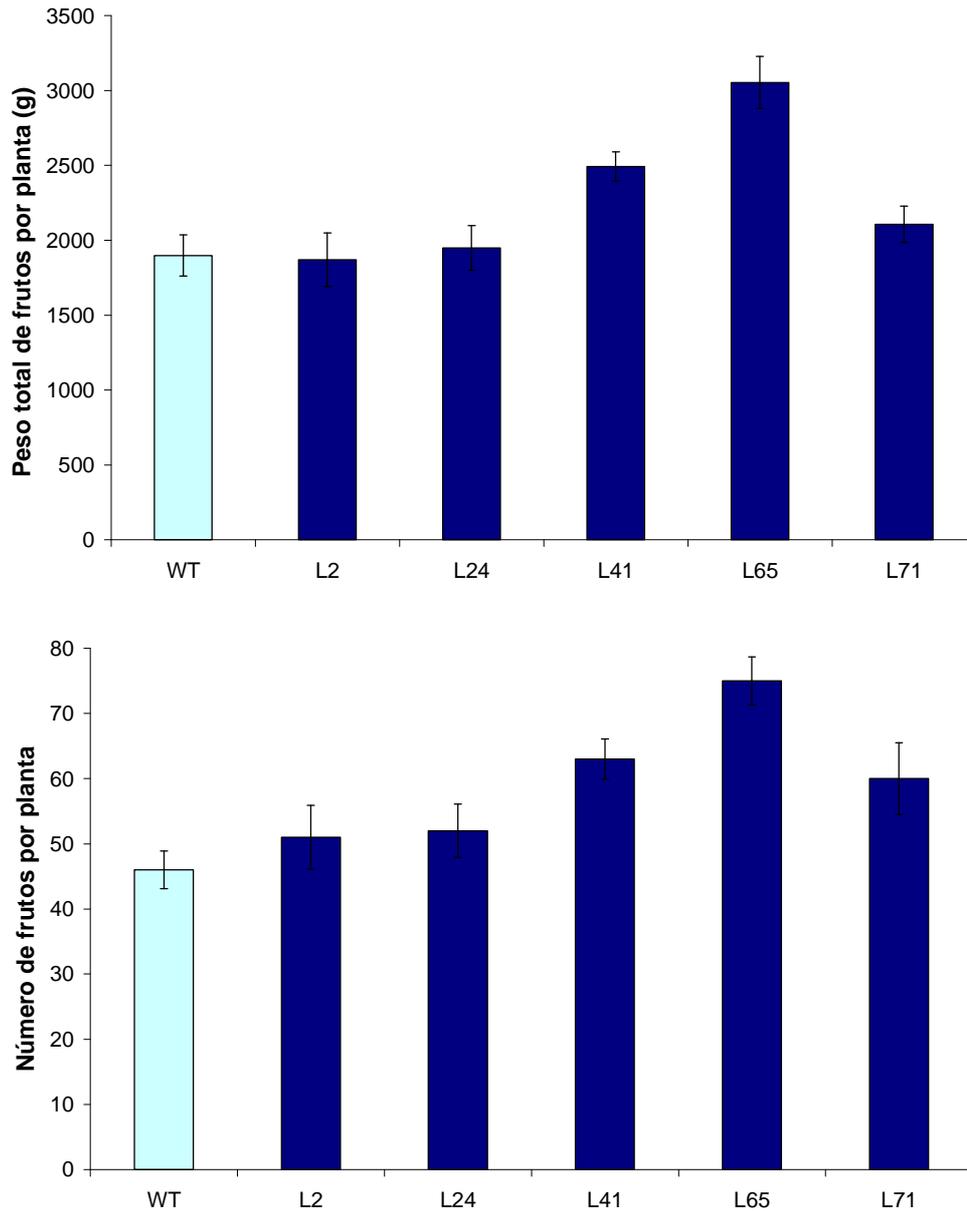


Figura 1.- Peso total y número de frutos por planta del cv p73 (WT) y de las poblaciones segregantes de diferentes líneas transgénicas de *HAL5* cultivadas con NaCl 100 mM. Valores medios de 12 plantas por línea \pm ES.

Estos resultados sugerían que la expresión del gen *HAL5* induce tolerancia a la salinidad en tomate a largo plazo y, además, la mayor tolerancia se muestra en el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico, el peso total de frutos por planta (rendimiento de la cosecha). La siguiente etapa fue identificar líneas homocigóticas (TG3) con diferentes niveles de expresión del gen *HAL5* para comprobar si la respuesta a la salinidad mostrada en las poblaciones segregantes TG2 se reflejaba en líneas homocigóticas para ese gen. Tras la identificación de varias líneas diploides cuyas

descendencias TG2 habían segregado para una copia del inserto transgénico, se cuantificó por RT-PCR los niveles de expresión del gen *HAL5*, seleccionándose finalmente las líneas 2, 65 y 71 (utilizadas en el ensayo anterior con poblaciones segregantes) que mostraban niveles de expresión desde 29 hasta 56 veces respecto al WT (Fig. 2). Estas líneas se cultivaron tanto en condiciones control como en medio salino.

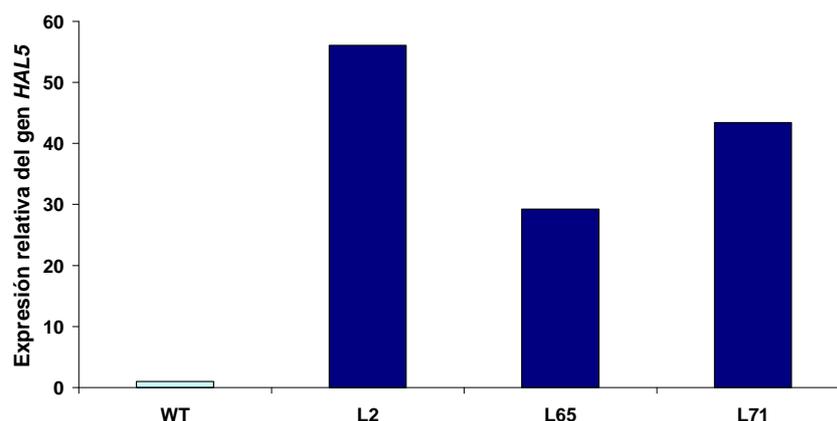


Figura 2.- Niveles de expresión relativa del gen *HAL5* en las plantas directamente transformadas (TG1) con dicho gen.

El interés de cultivarlas sin sal era comprobar si en ausencia de estrés las líneas transgénicas mostraban o no un menor rendimiento de la cosecha, tal como se ha observado en ocasiones, y que ha sido atribuido al coste energético generado por la expresión constitutiva (bajo el control del promotor 35S) de los transgenes. Se observan valores similares en el peso total de frutos por planta entre líneas acigóticas y homocigóticas independientemente del nivel de expresión del gen y, además, éstos no difieren significativamente de la variedad sin transformar (WT) (Fig. 3A). Estos resultados ponen de manifiesto que la sobreexpresión del gen *HAL5* no genera coste energético en ausencia de estrés y, por tanto, se puede equiparar el comportamiento del control externo (WT) con el interno (línea acigótica).

Aunque los datos de peso total de frutos por planta en medio salino (100 mM NaCl) eran relativamente bajos (inferiores a 1kg), se observó un mayor rendimiento de cosecha relativo en condiciones de estrés salino, respecto a las plantas WT y acigóticas, en las dos líneas (71 y 65) que sobreexpresan el gen *HAL5* y que ya habían mostrado mayor

tolerancia en la población segregante TG2 (Fig. 1). Sin embargo, la línea 2, que es la de mayor nivel de expresión del gen *HAL5*, muestra valores similares a los de la línea acigótica, lo que sugiere que la mayor tolerancia no está siempre relacionado con el nivel de expresión del transgén.

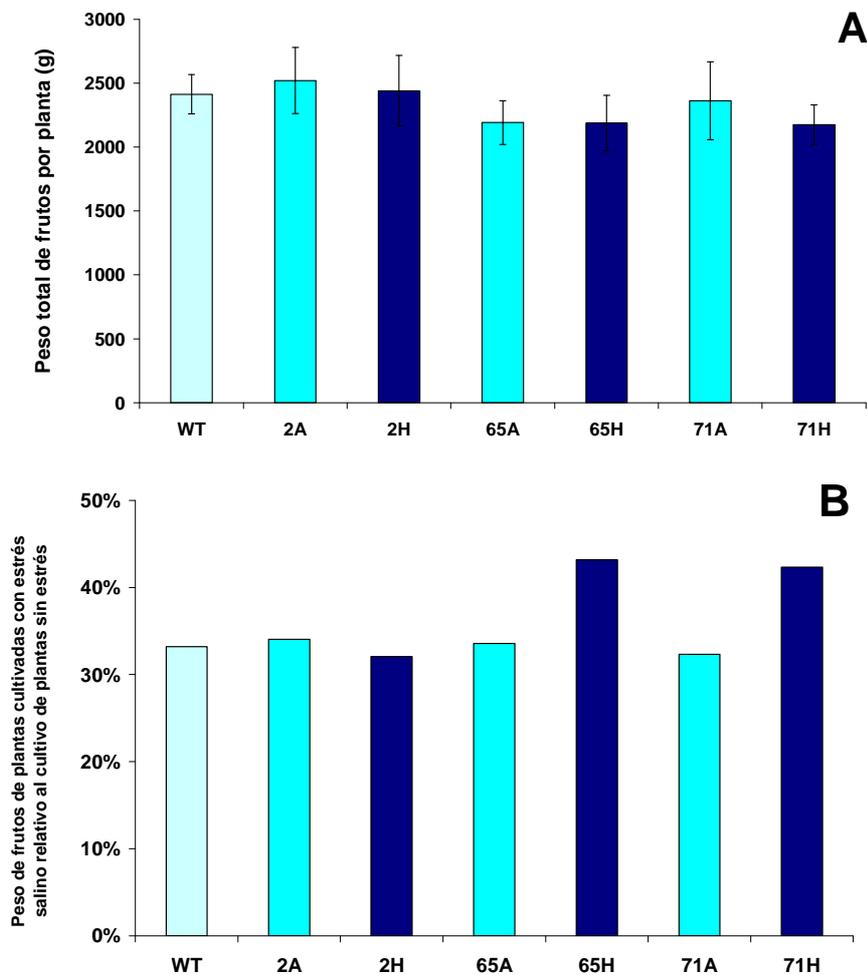


Figura 3.- Peso total de frutos por planta del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) de 3 líneas transgénicas de *HAL5* (2, 71 y 65) cultivadas sin estrés salino (A) y sus correspondientes valores porcentuales cuando se cultivan con estrés salino (B) (Peso total fruto 100 mM NaCl / Peso total fruto 0 mM NaCl). Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

En base a los resultados de cosecha, la tolerancia a la salinidad no sólo se muestra en las poblaciones segregantes TG2 sino también en líneas homocigóticas para el gen *HAL5* (Figura 3). El hecho de que L2 presente una mayor expresión del transgén y muestre una respuesta similar al WT puede ser debido a que la acumulación excesiva de un cierto

transcrito puede conducir a un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional, como han señalado algunos autores (Kohli et al., 2003).

Finalmente, se realizó un experimento a largo plazo con las dos líneas seleccionadas, L65 y L71, en el que se analizó la respuesta agronómica y fisiológica. A diferencia del experimento anterior, donde se hicieron cuatro recogidas semanales de frutos rojos (estado comercial), en este experimento se extendió el periodo de recolección de frutos con recogidas semanales durante dos meses. Cuando las plantas se cultivaron sin estrés, las líneas transgénicas presentaron una producción similar al WT (Fig. 4). En condiciones de estrés salino, la línea 71 tiende a aumentar su producción respecto al WT pero no se llegan a alcanzar diferencias significativas, mientras que la línea 65 incrementa el peso total de frutos por planta respecto al WT tanto a un nivel moderado de salinidad (75 mM NaCl) como a un nivel más alto de estrés (100 mM de NaCl) (Fig. 4).

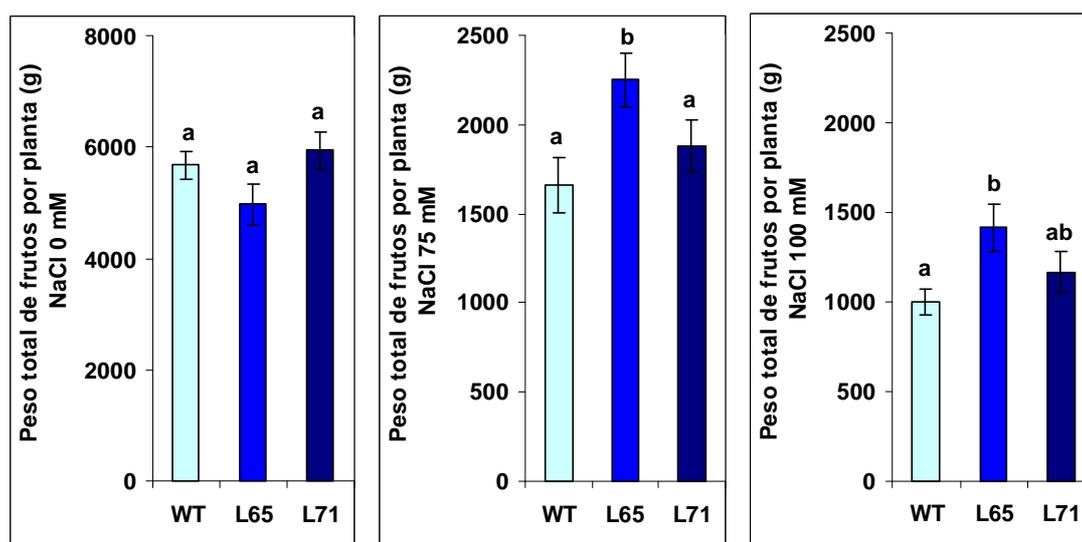


Figura 4.- Peso total de frutos por planta de la variedad sin transformar (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* a diferentes niveles de salinidad. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias (LSD_{5%}).

Estos resultados confirman los obtenidos en el experimento anterior (Fig. 3), puesto que nuevamente se observa que el peso total de frutos por planta de las líneas transgénicas es similar al del WT cuando se cultiva en condiciones control. En medio salino, es interesante señalar el diferente grado de tolerancia de las dos líneas cultivadas con 75 mM NaCl, ya que L65 es la única que presenta una diferencia significativamente mayor al WT. A un nivel más alto de estrés (100 mM NaCl), la diferencia entre líneas no llega a ser

significativa, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento anterior (Fig. 3).

Los resultados de tolerancia a la salinidad de la línea 65 en base a la producción parecen estar relacionados con cambios fisiológicos en las hojas (Fig. 5). Se analizaron los contenidos iónicos y azúcares en la tercera hoja completamente desarrollada. La concentración de Na^+ aumenta con el nivel salino en el WT y en las dos líneas transgénicas, pero la mayor acumulación de Na^+ tiene lugar en el WT, seguida de L71 y de L65. Estos resultados indican que la mayor tolerancia de la línea 65 puede estar asociada a la menor acumulación de Na^+ en las hojas. La línea 71 muestra una respuesta intermedia, ya que acumula más Na^+ en las hojas que L65 y tiende a acumular menos que el WT, aunque sólo se alcanzan diferencias significativas entre WT y L71 a 100 mM NaCl. La respuesta intermedia de L71 entre WT y L65 se observa claramente en la relación Na^+/K^+ (Fig. 5).

Respecto a los cambios en K^+ y azúcares, éstos son bastante similares (Fig. 5). Las concentraciones son similares en condiciones control y en el tratamiento 100 mM NaCl para WT y las dos líneas transgénicas. Sólo se observa una tendencia a aumentar la concentración de K^+ y azúcares en las líneas transgénicas desarrolladas a 75 mM NaCl, respecto al WT, y sólo en L65 se alcanzan diferencias significativas respecto al WT.

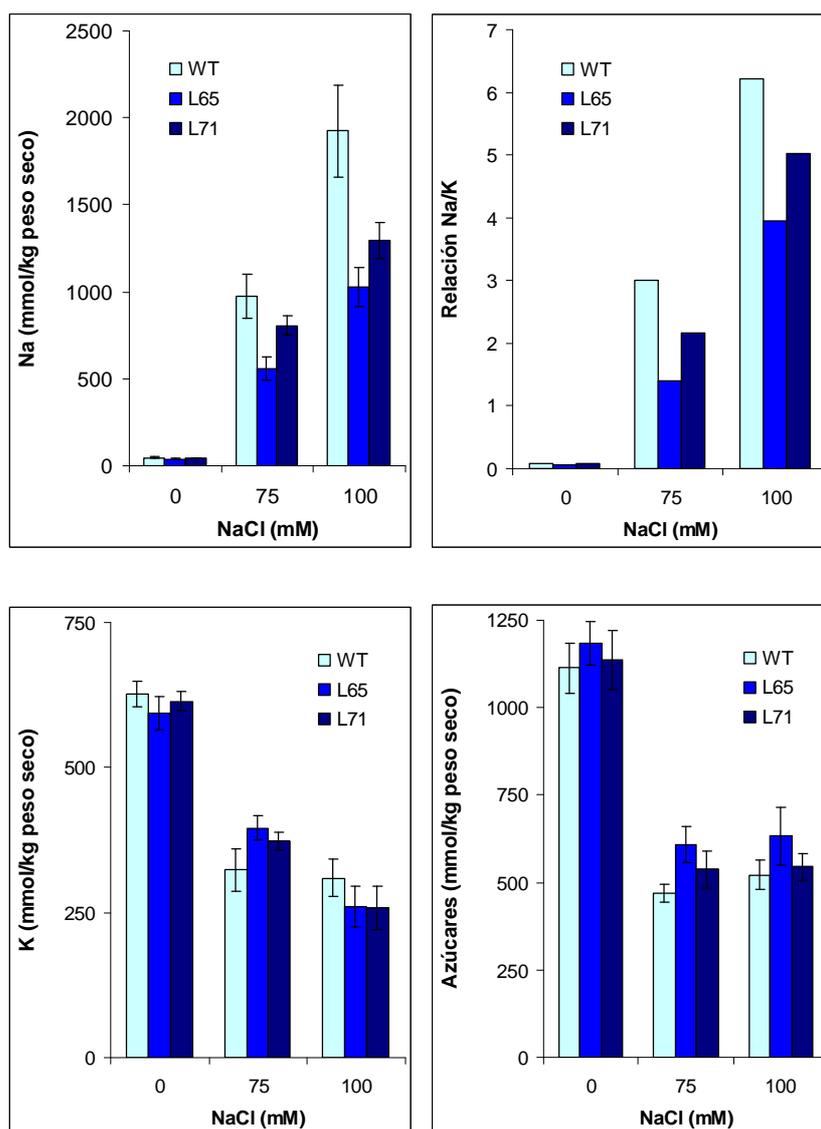


Figura 5.- Concentraciones de Na⁺, K⁺, azúcares y relación Na⁺/K⁺ en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* L65 y L71 desarrolladas a diferentes niveles de salinidad durante 50 días. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES.

Se puede concluir que la expresión del gen *HAL5* incrementa la tolerancia a la salinidad en tomate debido fundamentalmente a una menor acumulación de Na⁺ en las hojas, lo que indica que el papel de este gen está relacionado con la homeostasis iónica. También se ha comprobado que, en las líneas analizadas, un nivel de expresión del gen excesivamente alto puede provocar mecanismos de silenciamiento post-transcripcional, ya que la línea con mayor expresión del gen *HAL5* (L2) muestra una respuesta similar al WT mientras que la línea con menor expresión de dicho gen (L65) incrementa significativamente la tolerancia respecto al WT sobre la base del peso total de frutos por planta.

I.1.2.-Tolerancia a la salinidad *in vitro* inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* en plantas de tomate

El siguiente objetivo propuesto en este trabajo fue comprobar si la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* se manifestaba a nivel celular, tal como se observó al sobreexpresar el gen *HAL1* que también está implicado en la homeostasis iónica (Gisbert et al., 2000; Rus et al., 2001). Para ello, se estudió la respuesta a nivel celular utilizando callos procedentes de hoja de las mismas líneas transgénicas utilizadas a largo plazo (L65 y L71). Se realizaron tres experimentos, en los que se usaron los mismos niveles de sal, 0 (control), 75 y 150 mM de NaCl, y se determinó el desarrollo de los callos en base a su peso fresco. Se presentan los valores medios de todos los experimentos.

En primer lugar, se analizó el desarrollo de callos en la variedad sin transformar (WT) y las correspondientes líneas acigóticas y homocigóticas, tal como se había realizado en el ensayo a largo plazo llevado a cabo en invernadero. Al igual que en ese experimento donde se cultivaron plantas, no se observaron diferencias en el peso fresco de los callos de los distintos genotipos analizados en medio control (Tabla 1), estando los valores comprendidos entre 1.155 mg y 1.363 mg después de 25 días de cultivo. Estos resultados confirman que la expresión constitutiva del promotor 35S no genera un coste energético en las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* ni a nivel de planta ni a nivel celular.

Tabla 1.- Desarrollo de los callos procedentes del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) de líneas transgénicas de *HAL5* (L65 y L71) desarrollados en medio de cultivo control durante 25 días. Valores medios de 60 callos por línea \pm ES.

Genotipo	Peso fresco (mg)
WT	1.222 \pm 73
L65A	1.325 \pm 84
L65H	1.155 \pm 76
L71A	1.363 \pm 115
L71H	1.251 \pm 114

La tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* también quedaba de manifiesto a nivel celular, tal como se observa en el diferente desarrollo de los callos del WT y de L65 después de 25 días de tratamiento salino (75 mM NaCl), mientras que en control no había diferencias (Fig. 6 y Fig. 7).

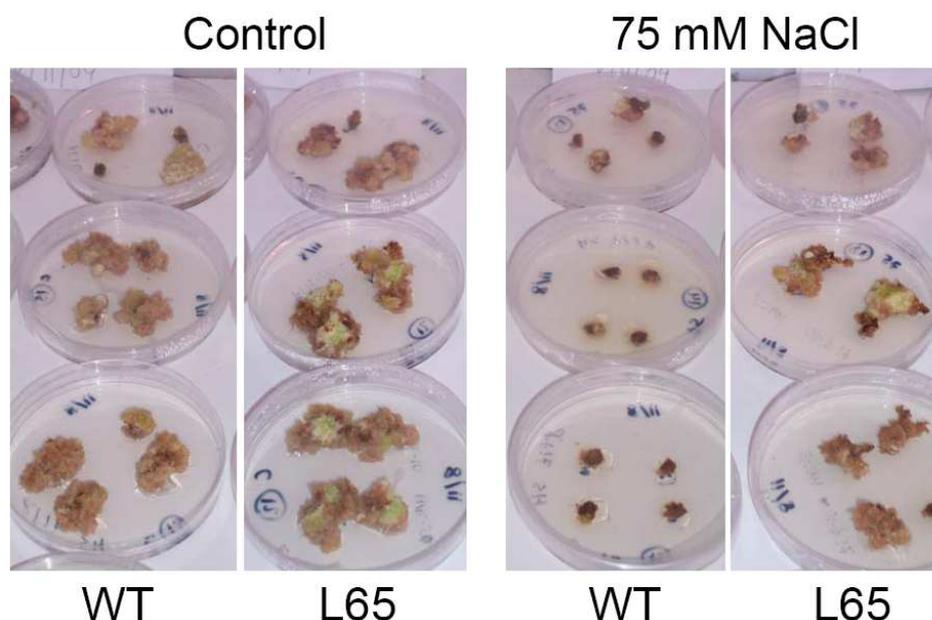


Figura 6.- Desarrollo de callos de la variedad sin transformar (WT) y de la línea homocigótica para el gen *HAL5* (L65) en medio de cultivo sin sal (control) y con sal (75mM de NaCl) durante 25 días.

A 75 mM NaCl, ambas líneas transgénicas mostraban la misma respuesta a la salinidad (Fig. 7), ya que el peso de los callos durante los primeros 25 días de tratamiento fue de 331 mg en el WT y de 515 y 567 mg en las líneas L65 y L71, respectivamente, manteniéndose estas diferencias entre WT y ambas líneas transgénicas al final del experimento. Además, las diferencias entre WT y las líneas transgénicas eran evidentes a los 25 días de tratamiento.

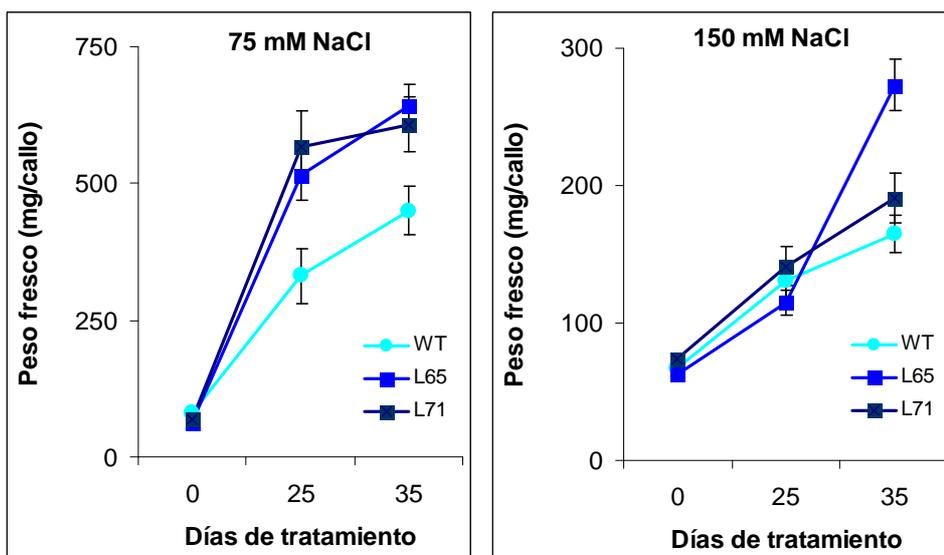


Figura 7.- Evolución del peso fresco de callos de la variedad sin transformar (WT) y de las líneas homocigóticas para el gen *HAL5* (L65 y L71) durante los 35 días de tratamiento (75 y 150 mM de NaCl). Valores medios de 60 callos por línea \pm ES.

Sin embargo, la respuesta era diferente al incrementar el nivel de estrés hasta 150 mM NaCl (Fig. 7), como el desarrollo de los callos era mucho mas lento y a los 25 días no se observaban diferencias entre el WT y las líneas transgénicas, estableciéndose las diferencias entre los 25 y 35 días de tratamiento. En este segundo periodo, la línea 71 tiende a aumentar su desarrollo respecto al WT, pero no se alcanzan diferencias significativas entre los valores medios del WT y L71 a los 35 días. Por el contrario, la línea 65 incrementa significativamente la velocidad de crecimiento durante este periodo, hasta alcanzar un incremento medio de un 50% respecto al WT y L71.

Estos resultados ponen de manifiesto que la tolerancia inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* se manifiesta a nivel celular, y corroboran la mayor tolerancia de L65 tal como se observaba al evaluar la tolerancia en base al rendimiento en fruto. Si bien, la diferente respuesta de ambas líneas frente a la salinidad queda de manifiesto a diferentes niveles de estrés. En base al rendimiento en fruto, la mayor tolerancia de L65 respecto a L71 se observó a 75 mM NaCl, mientras que a nivel celular esta mayor tolerancia se refleja a 150 mM NaCl, pero no a 75 mM NaCl donde ambas líneas muestran una respuesta similar. Realmente, los mecanismos de tolerancia son muy diferentes a nivel celular y de planta. En este último interviene el transporte de iones salinos a la parte aérea, mientras que a

nivel celular podría estar predominando el estrés osmótico provocado por el potencial osmótico del medio de cultivo, lo que explicaría la baja velocidad de desarrollo de los callos a 150 mM NaCl. Independientemente del proceso o mecanismo predominante a nivel celular, es interesante señalar que la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* también opera a nivel celular.

I.1.3.- Caracterización fisiológica de la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5*

Una vez comprobado el diferente comportamiento de las líneas seleccionadas se abordó su caracterización fisiológica para profundizar en el conocimiento de los efectos que produce la sobreexpresión del gen *HAL5* para proporcionar una mayor tolerancia a la salinidad.

Acumulación de Na⁺ en hojas de líneas homocigóticas con diferente nivel de expresión del gen HAL5

En primer lugar, se evaluó si la baja tolerancia a la salinidad en la línea con mayor nivel de expresión (L2) estaba asociada o no a la acumulación de Na⁺. Se realizó un experimento en cultivo hidropónico aplicando el tratamiento salino (150 mM NaCl) cuando las plantas alcanzaron el estado de desarrollo de dos hojas verdaderas. Al final del experimento (20 días) se analizó la concentración de Na⁺ en hoja joven y adulta (tercera hoja completamente desarrollada). Además de la línea homocigótica L2, se analizaron plantas WT y la línea homocigótica L65 que había mostrado mayor tolerancia a salinidad (Fig. 8).

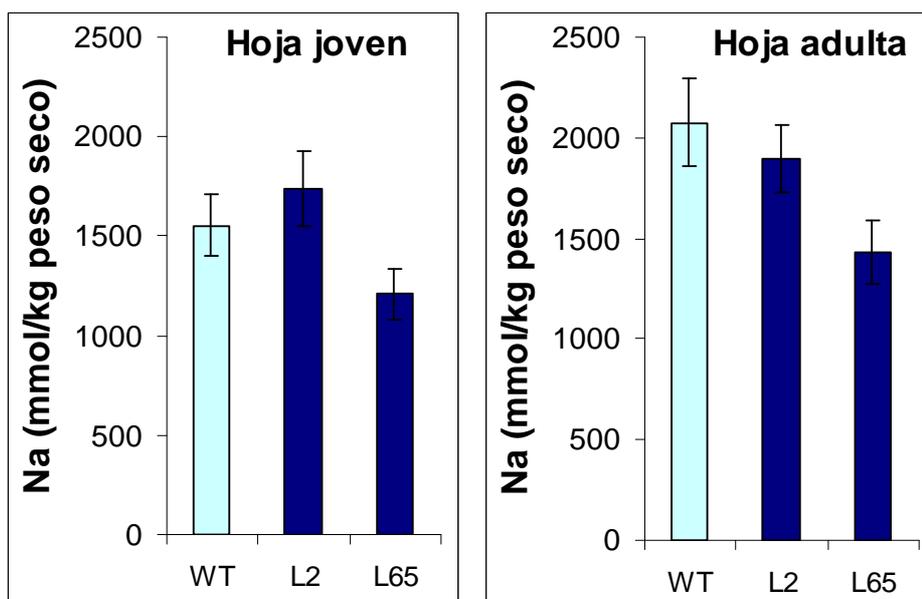


Figura 8.- Concentración de Na⁺ (mmol/kg peso seco) en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de las correspondientes líneas homocigóticas para el gen *HAL5* (L2 y L65) desarrolladas en sal (150 mM NaCl) durante 20 días. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES.

Los resultados corroboran que la mayor tolerancia inducida por el gen *HAL5* está asociada a una menor acumulación de Na⁺ en hojas jóvenes y adultas, como se observa en la línea 65, mientras que L2 muestra niveles de Na⁺ similares al WT, lo que explicaría el similar grado de tolerancia entre L2 y el WT.

Cambios inducidos por la expresión del gen HAL5 en la absorción y transporte iónico a niveles moderados de estrés

Los siguientes experimentos se realizaron con la línea 65 que había mostrado mayor tolerancia a salinidad. Se consideró interesante estudiar la respuesta fisiológica a medio plazo aplicando en primer lugar un nivel moderado (100 mM NaCl) y posteriormente un nivel alto de salinidad (200 mM NaCl), ya que las plantas pueden utilizar diferentes mecanismos para recuperar la homeostasis según el nivel de estrés y duración del tratamiento.

El experimento se realizó en condiciones controladas, en cultivo hidropónico, y se aplicó el tratamiento salino (100 mM NaCl) en el estado de desarrollo de dos hojas verdaderas.

Se determinó el peso de las plantas y los contenidos de Na^+ y K^+ en raíz, tallo y hoja (tercera hoja completamente desarrollada). Al final del experimento (28 días de tratamiento), no se alcanzaron diferencias significativas en el desarrollo de las plantas WT y L65, aunque los valores de L65 tendían a ser mayores que los del WT en el peso total de la planta ($96,7 \pm 9,0$ g y $116,7 \pm 13,1$ g en WT y L65, respectivamente). No se observaron diferencias entre WT y L65 en las concentraciones de K^+ (Datos no mostrados). Respecto a la acumulación de Na^+ , tampoco se observaron claras diferencias en raíz pero sí en la parte aérea (Fig. 9). Así, la concentración de Na^+ era significativamente menor en la hoja y el tallo de L65 respecto al WT a los 28 días de tratamiento 100 mM NaCl.

Es interesante señalar que durante los primeros 14 días de tratamiento se observa un incremento muy importante de Na^+ en las tres partes de la planta y especialmente en el tallo, mientras que entre los 14 y 28 días de tratamiento las plantas del WT continúan incrementando la acumulación de Na^+ pero a una tasa mucho menor y la línea que sobreexpresan el gen *HAL5* no continúa incrementando, mostrando incluso una tendencia a disminuir respecto al día 14 (Fig. 9).

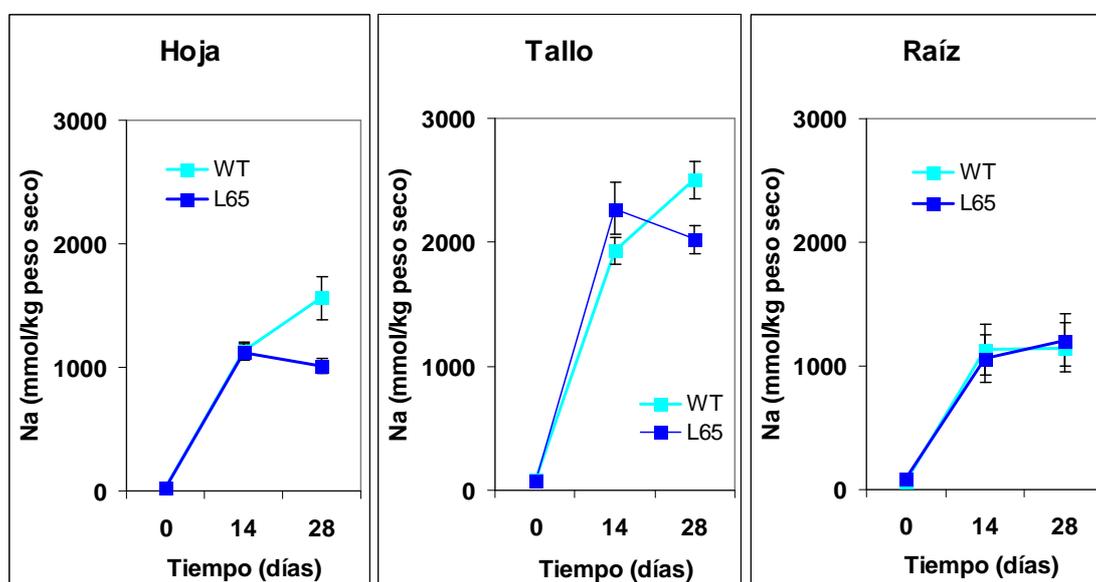


Figura 9.- Concentración de Na^+ (mmol/kg peso seco) en hoja, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (100 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).

Esta respuesta sugiere que inicialmente las plantas tratan de recuperar la homeostasis osmótica, debido al estrés osmótico inducido por la salinidad y después la homeostasis iónica. La respuesta durante la primera fase es similar en las plantas del WT y L65, lo que sugiere que la expresión del gen *HAL5* no afecta a la homeostasis osmótica. Las diferencias entre WT y L65 aparecen en la segunda fase que puede ser asociada al estrés iónico. Además, es en esta fase donde L65 muestra una mayor capacidad para regular el transporte de Na⁺ a la parte aérea, ya que las concentraciones de Na⁺ en las hojas y el tallo se reducen respecto al WT.

Estos resultados ponen de manifiesto que el mecanismo de acción del gen *HAL5* está relacionado con una menor absorción y transporte hacia la parte aérea del ión Na⁺ evitando así que se lleguen a alcanzar niveles tóxicos en las hojas. Esto se puede observar claramente al calcular la tasa de translocación desde raíz a la parte aérea (Taleisnik y Grunberg, 1994), que no sólo tiene en cuenta la acumulación iónica por día en parte aérea sino también el desarrollo de la raíz (Tabla 2). Así, la tasa de translocación de Na⁺ es ligeramente superior en L65 que en el WT entre los 0 y 14 días de tratamiento, mientras que en el segundo periodo (14-28 días) se reduce un 33% en L65 respecto a WT.

Tabla 2.- Translocación de Na⁺ a la parte aérea (mmol/kg peso fresco raíz) y flujo hacia la hoja (mmol/kg peso fresco) durante el primer (0-14 días) y segundo periodo de tratamiento (14-28 días) en plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen *HAL5* (L65) desarrolladas a 100 mM de NaCl.

Genotipo	Translocación a la parte aérea		Flujo hacia la hoja	
	0-14 días	14-28 días	0-14 días	14-28 días
WT	47,8	32,1	20,8	14,2
L65	55,9	22,3	22,2	9,0

Es interesante señalar que el flujo de Na⁺ se reduce en el segundo periodo en WT y L65, lo que indica que tras una primera fase de acumulación para recuperar la homeostasis osmótica en tomate, la planta intenta regular el proceso para evitar que se alcancen niveles tóxicos de Na⁺ (Tabla 2). Así, en WT el flujo de Na⁺ se reduce de 20,8 a 14,2

mmol/kg peso fresco entre el primer y segundo periodo, mientras que en L65 se reduce desde 22,2 a 9,0 mmol/kg peso fresco.

Cambios inducidos por la expresión del gen HAL5 en la absorción y transporte iónico a niveles altos de estrés

El diseño del experimento fue similar al anterior, pero aplicando un mayor nivel de estrés (200 mM NaCl). A los 28 días de tratamiento, la línea homocigótica incrementa significativamente el peso de la planta respecto al WT, tanto a nivel de peso de la parte aérea como de raíz (Tabla 3).

Tabla 3.- Peso de raíz y parte aérea (g) de plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen *HAL5* (L65) desarrolladas a 200 mM de NaCl durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. Diferencias entre medias ($LSD_{5\%}$).

Genotipo	Raíz	Parte Aérea
WT	17,6 \pm 2,1 ^b	37,3 \pm 6,2 ^b
L65	33,9 \pm 5,1 ^a	60,1 \pm 9,1 ^a

Además del efecto significativo sobre el peso de la planta, el fenotipo de L65 mostraba claramente una mayor tolerancia a la salinidad, ya que las hojas no presentaban clorosis debido a la toxicidad iónica, como ocurría en las hojas de las plantas WT y las raíces de L65 mostraban un mayor desarrollo (Fig. 10).



Figura 10.- Caracterización fenotípica de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5*. Hojas y raíces de plantas WT (izquierda) y plantas transgénicas (derecha) a los 28 días de tratamiento salino (200 mM NaCl).

En el experimento anterior se había observado una primera fase que mostraba una alta tasa de acumulación de Na^+ y una segunda fase en la que se regulaba el transporte iónico, siendo en esta fase cuando se observaban las diferencias entre WT y la línea transgénica. En base a estos resultados, en este experimento se siguió la evolución iónica a lo largo del tiempo midiendo la acumulación en raíz, tallo y hoja (tercera hoja desarrollada) después de 2, 7, 14, 22 y 28 días de tratamiento salino.

En primer lugar, se observa una rápida e importante acumulación en raíz y transporte de Na^+ al tallo, ya que ambos órganos de la planta alcanzan durante los dos primeros días de estrés concentraciones superiores a los 1000 mmol/kg peso seco, y estas son similares en WT y la línea transgénica (Fig. 11). La alta velocidad de acumulación se mantiene en tallo de WT y L65 hasta los 7 días, alcanzando valores próximos a 2000 mmol/kg peso seco, pero no en raíz donde se inicia un cambio en la pendiente de la velocidad de

acumulación. En tallo, la reducción de la tasa de acumulación se observa a partir de los 7 días.

Si se analizan los cambios inducidos por la expresión del gen *HAL5* en cada órgano de la planta, se observa que en raíz y tallo no se alcanzan diferencias entre WT y L65 durante los primeros 14 días de tratamiento, de manera similar a la respuesta observada en las plantas desarrolladas a 100 mM NaCl (Fig. 9). Sin embargo, a diferencia de la respuesta observada a 100 mM NaCl, al incrementar el nivel de estrés a 200 mM NaCl empieza a observarse desde los 14 días una mayor acumulación de Na⁺ en las raíces de la línea transgénica respecto al WT, mientras que a 100 mM NaCl no se encontraron diferencias. Esto sugiere que los mecanismos son diferentes en función del nivel de estrés, aunque puede ser también una consecuencia de que la planta necesita periodos de tiempo más o menos largos para recuperar la homeostasis iónica según el nivel de estrés. En cualquier caso, la línea transgénica muestra un mecanismo de tolerancia tratando de evitar el transporte de Na⁺ a la parte aérea mediante la acumulación en raíz. Efectivamente, la reducción de la acumulación de Na⁺ en tallo de L65 se observa cuando empieza a incrementar su acumulación en raíz, mientras que en el WT se mantiene constante.

Es interesante señalar que las mayores diferencias entre WT y L65 en la acumulación de Na⁺ de la parte aérea se observan en las hojas, y además es donde se muestran primero, ya que a los 14 días se reduce significativamente la concentración de Na⁺ en L65 respecto al WT, diferencias que se mantienen hasta el día 28 (Fig. 11). En base a la evolución iónica observada en las tres partes de la planta, parece ser que entre los 7 y 14 días de tratamiento se inicia la segunda fase o fase iónica, después de una primera fase que debe corresponder a la fase osmótica, donde no hay diferencias de acumulación entre WT y L65. Así, al comparar la tasa de acumulación por día en el periodo 7 - 14 días de tratamiento (Fig. 12), se observa que las plantas ya no son capaces de regular el transporte iónico y el Na⁺ empieza a acumularse mayoritariamente en las hojas. Pero hay importantes diferencias entre WT y L65, como L65 incrementa la acumulación en raíz un 70% (31,8 y 54,3 mmol Na⁺/día en WT y L65, respectivamente) y reduce significativamente el transporte de Na⁺ a la parte aérea, siendo este efecto muy significativo en tallo, que mantiene el nivel de Na⁺ durante este periodo, y especialmente

en las hojas donde se reduce la tasa de acumulación un 55% en L65 respecto al WT (212 y 97 mmol Na⁺/día en WT y L65, respectivamente).

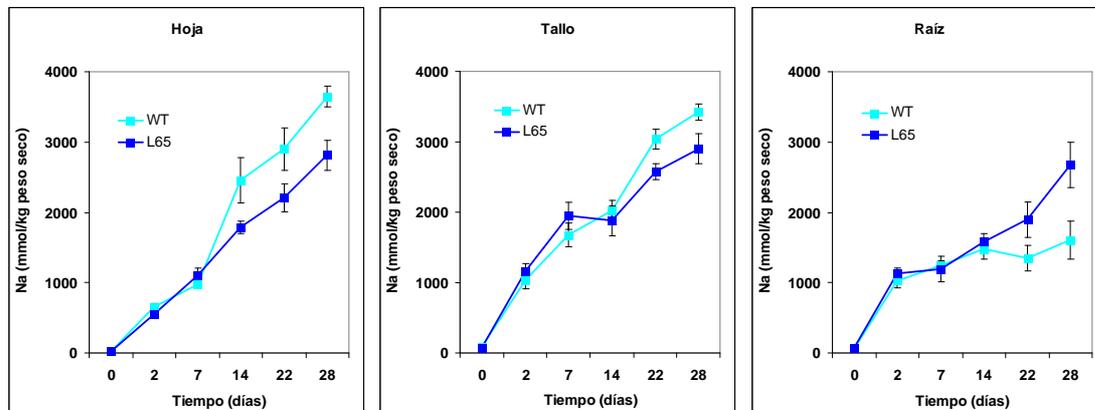


Figura 11.- Evolución de la concentración de Na⁺ (mmol/kg peso seco) en las hojas, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (200 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea ± ES.

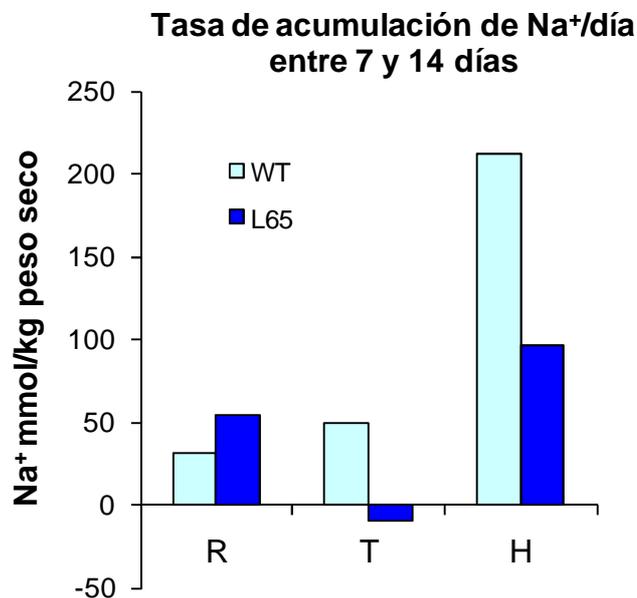


Figura 12.- Tasa de acumulación de Na⁺ (mmol/kg peso seco) por día entre los 7 y 14 días de tratamiento (200 mM NaCl) en las hojas, tallo y raíz de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5*.

Entre los días 14 y 28 se estimó de manera análoga al experimento anterior la translocación de Na^+ a parte aérea, donde se tiene en cuenta el desarrollo de la raíz, y el flujo de Na^+ hacia tallo y hojas. La línea transgénica reduce de manera importante el transporte de Na^+ a la parte aérea respecto al WT. Aunque los valores obtenidos en las plantas desarrolladas a 100 mM NaCl (Tabla 2) eran muy inferiores a los obtenidos a 200 mM NaCl (Tabla 4), es interesante señalar que los porcentajes de reducción en la translocación de Na^+ a la parte aérea de L65 respecto al WT son idénticos (31,3 y 30,7% a 100 y 200 mM NaCl, respectivamente). Estos resultados sugieren que el mecanismo que está operando en las plantas que sobreexpresan el gen *HAL5* es independiente del nivel de estrés, y las mayores diferencias encontradas al aumentar el nivel de estrés obedecen a los altos niveles de Na^+ absorbidos y transportados a la parte aérea cuando se multiplica por dos el nivel de estrés. Los valores de flujo hacia tallo y hojas también son menores en L65 que en el WT, lo que corrobora los resultados obtenidos en la translocación de Na^+ a parte aérea.

Tabla 4.- Translocación de Na^+ a parte aérea (mmol/kg peso fresco raíz) y flujo hacia tallo y hojas (mmol/kg peso fresco órgano) durante el segundo periodo de tratamiento (14-28 días) en plantas de la variedad sin transformar (WT) y de la línea de sobreexpresión del gen *HAL5* (L65) desarrolladas a 200 mM de NaCl.

Genotipo	Translocación a la parte aérea	Flujo al tallo	Flujo hacia la hoja
WT	57,1	11,7	29,3
L65	35,4	8,5	23,2

El mecanismo del gen *HAL5* en levadura parece estar implicado en la fosforilación del transportador de potasio de alta afinidad Trk1/Trk2 lo que conduciría a la activación del sistema de transporte de potasio (Mulet et al., 1999). Por tanto, el gen *HAL5* podría inducir tolerancia al estrés salino aumentando el transporte de K^+ , lo que reduciría la entrada de Na^+ . A 100 mM NaCl no se detectaron cambios significativos en los niveles de K^+ durante los 28 días de tratamiento, mientras que a 200 mM NaCl se ha observado una tendencia a aumentar la concentración de K^+ en las hojas de las plantas transgénicas, respecto al WT, desde los 7 días de tratamiento aunque no se alcanzan diferencias

significativas hasta el día 22 (Fig. 13). La mayor diferencia entre WT y L65 se observa a los 28 días de tratamiento, debido a que el WT continúa reduciendo la concentración de K^+ en las hojas al aumentar el tiempo de tratamiento, mientras que en L65 se mantiene constante desde los 2 días de tratamiento.

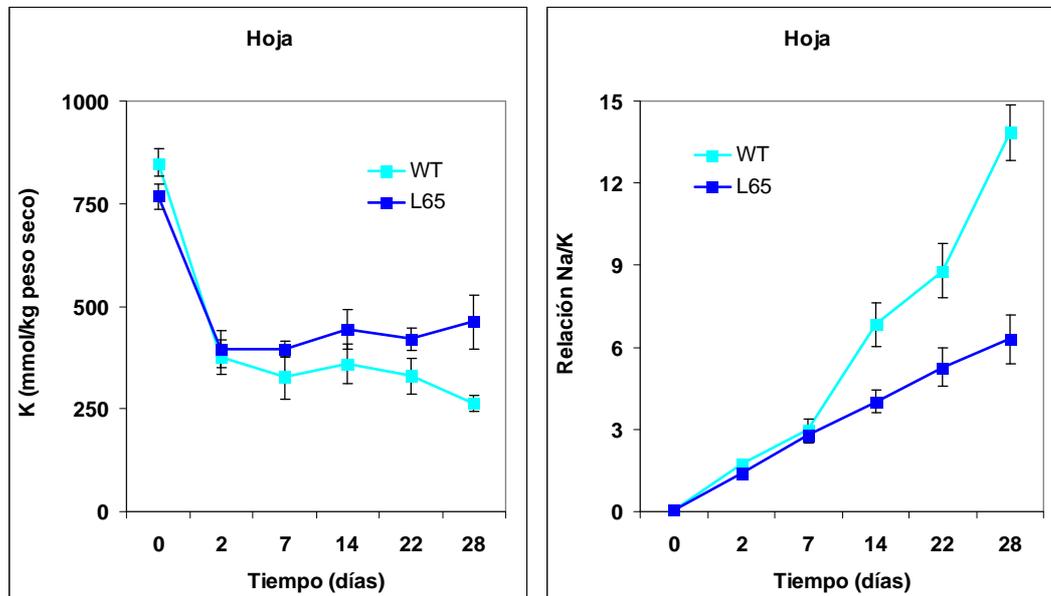


Figura 13.- Evolución de la concentración de K^+ (mmol/kg peso seco) y de la relación Na^+/K^+ en las hojas de plantas del cv p73 (WT) y de la línea 65 homocigótica para el gen *HAL5* desarrolladas en sal (200 mM NaCl) durante 28 días. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

Un carácter relacionado con la tolerancia a salinidad en la mayoría de las especies es la relación Na^+/K^+ (Munns y Tester, 2008), incluido el tomate (Estañ et al., 2005). El incremento de la relación Na^+/K^+ empieza siendo similar en las hojas del WT y L65 durante los 7 primeros días de tratamiento, pero después de este tiempo la relación continúa incrementando linealmente en L65, mientras que en el WT los incrementos son mucho mayores, especialmente a los 28 días de tratamiento como consecuencia de la reducción en la acumulación de Na^+ y el aumento de K^+ , donde se alcanza un valor medio de 14 en el WT y de 6 en la línea transgénica. Se puede concluir que la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* está relacionada con la homeostasis iónica, y especialmente con la capacidad para reducir la relación Na^+/K^+ en las hojas a medio y largo plazo debido fundamentalmente a la menor acumulación de Na^+ en las hojas.

I.2.-Análisis funcional del gen *IMP1* implicado en la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico

Tras la generación de las plantas transgénicas y la identificación de líneas homocigóticas y acigóticas para el transgén se procede a su evaluación.

I.2.1.-Tolerancia a la salinidad y estrés hídrico a largo plazo inducida por la sobreexpresión del gen *IMP1* en plantas de tomate

Antes de estudiar el efecto que provoca el gen *IMP1* en la respuesta de las plantas ante ambos estreses abióticos, se comprobó el desarrollo de las plantas transgénicas en ausencia de estrés, ya que en el proceso de transformación se ha utilizado el promotor constitutivo 35S, que puede provocar un efecto negativo en el desarrollo de las plantas. Además, una de las dudas que surgen en la mayoría de los trabajos con plantas transgénicas es el control a utilizar para estudiar el efecto del gen. Como controles se utilizaron la variedad sin transformar o control externo (WT) y las líneas procedentes de la transformación genética en las que no se ha incorporado el transgén (líneas acigóticas o control interno).

Se utilizaron 4 líneas transgénicas (L10, L17, L21 y L36) y sus correspondientes controles interno (acigóticas) y externo (WT). Se cultivaron en invernadero, en cultivo de primavera-verano con alta tasa de transpiración de las plantas como consecuencia de la temperatura y baja humedad relativa. En estas líneas se determinó el rendimiento en fruto mediante recogidas semanales de frutos maduros. Los valores de rendimiento en fruto son similares en el WT y en las líneas acigóticas (Fig. 14). En las líneas homocigóticas para el gen *IMP1*, los rendimientos de L10 y L21 no difieren significativamente de los correspondientes a sus líneas acigóticas y a la variedad sin transformar (WT). Sin embargo, las otras dos líneas (L17 y L36) tienen un rendimiento menor que las restantes, lo que puede ser debido al coste energético ocasionado por la expresión constitutiva. Es interesante por tanto seleccionar líneas en las que no se vea afectado su desarrollo sin estrés.

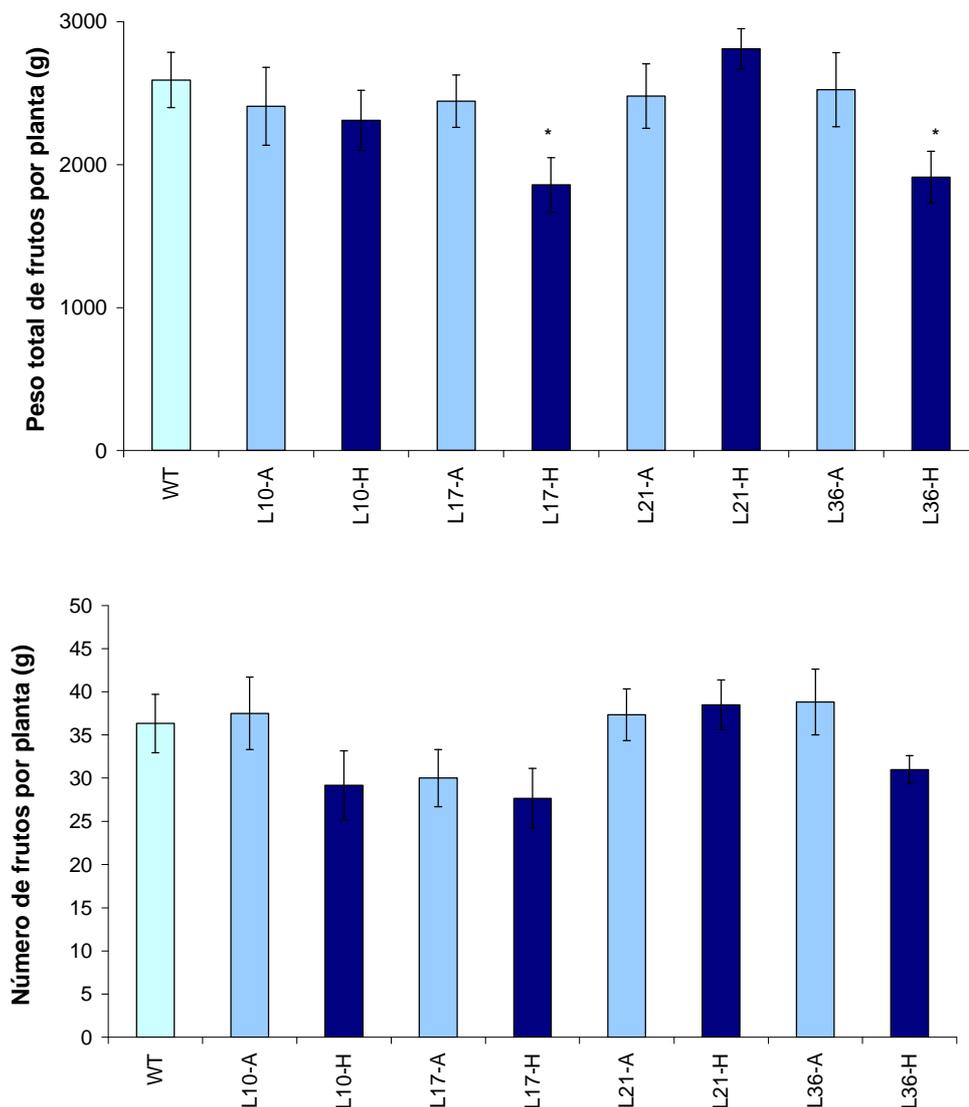


Figura 14.- Peso total y número de frutos por planta del cv p73 (WT) y de líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) para el gen *IMP1* desarrolladas en condiciones control. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias del peso total de frutos (LSD_{5%}).

Las cuatro líneas homocigóticas para el gen *IMP1* también se desarrollaron en salinidad (50 mM NaCl). El efecto negativo inducido por la salinidad sobre la producción fue importante en todas las líneas. Así, el porcentaje de reducción inducido por la sal en L10 (la más tolerante a salinidad) fue 35, y en las restantes líneas próximo al 50%.

Es interesante señalar que las dos líneas transgénicas que reducían su rendimiento en control (L17 y L36) eran las que menos producían (Fig. 15). Si no se hubiese cultivado en

control, la conclusión sería que estas líneas son más sensibles a salinidad, mientras que esto no es así ya que es solo una consecuencia del efecto pleiotrópico que produce la expresión del gen en ambas líneas. Las otras dos líneas (L10 y L21) mostraban valores similares de rendimiento, aunque el porcentaje de reducción fue algo menor en L10. Para completar el análisis funcional del gen, se seleccionó la línea 10 porque además tenía una sola inserción identificada por análisis Southern.

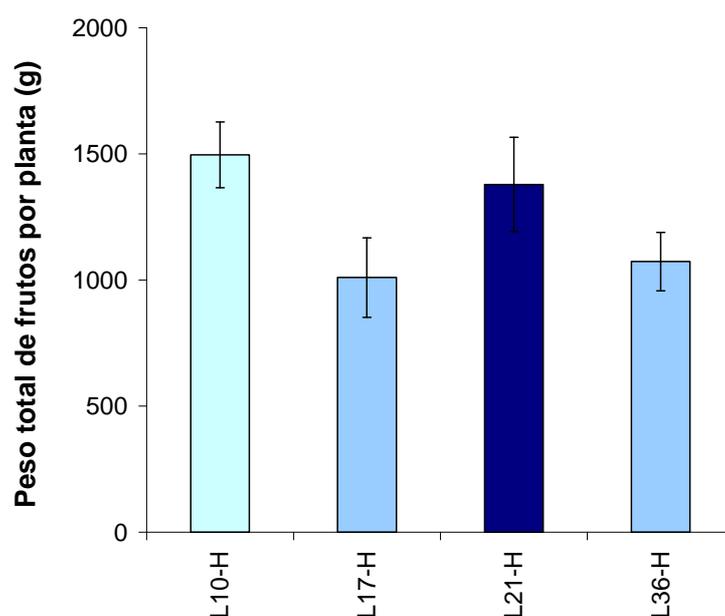


Figura 15.- Peso total de frutos por planta de líneas homocigóticas para el gen *IMP1* desarrolladas en 50 mM NaCl. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

Para evaluar la tolerancia a la salinidad de la línea transgénica L10, se repitió un experimento en las mismas condiciones ambientales (cultivo de verano), donde la transpiración en las plantas era muy alta ya que se alcanzaban temperaturas muy elevadas (40°C). Nuevamente se observa que no hay diferencias en el rendimiento de la línea acigótica y homocigótica, mientras que a 50mM de NaCl el rendimiento en la línea homocigótica incrementaba significativamente (un 40%) respecto a la acigótica (Fig. 16). Los resultados obtenidos confirman la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *IMP1* en tomate.

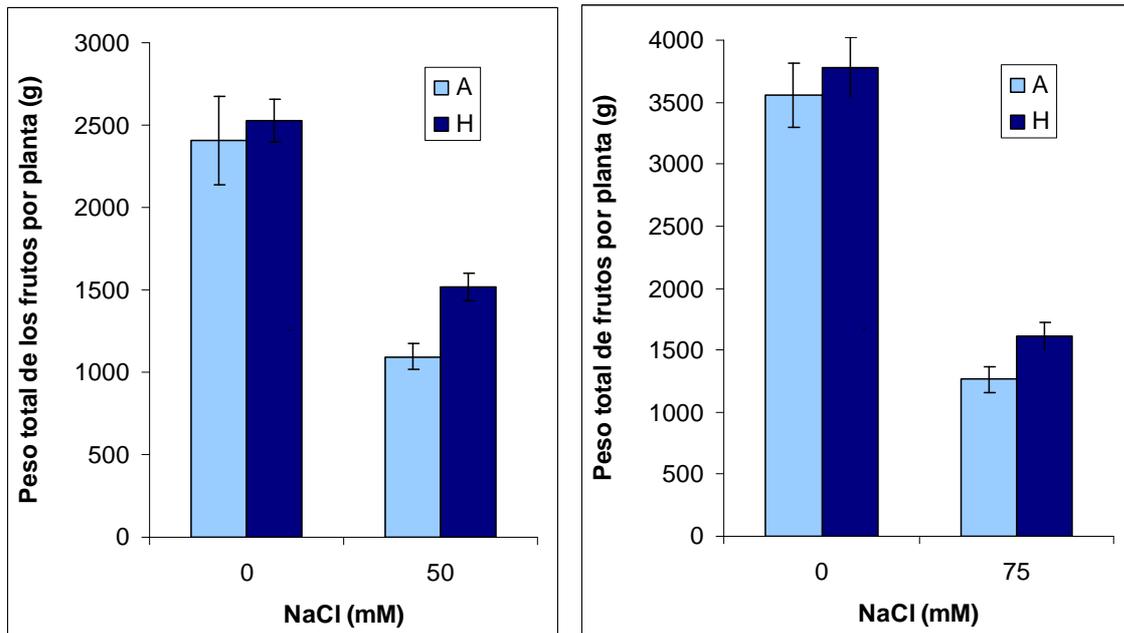


Figura 16.- Peso total de frutos por planta de la línea acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* (L10) desarrolladas en control y 50 mM NaCl en cultivo de verano (izquierda) y en control y 75 mM NaCl en cultivo de invierno (derecha). Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

Seguidamente, se evaluó la tolerancia a la salinidad de la misma línea transgénica (L10) en cultivo de invierno donde hay menor transpiración debido a la menor temperatura media alcanzada en invernadero, pero se incrementó el nivel de estrés a 75 mM NaCl (Fig. 16). Es interesante señalar que se sigue observando la mayor tolerancia de la línea homocigótica para el gen *IMP1*, aunque las diferencias son menores que a 50 mM NaCl, pues el rendimiento de la línea homocigótica incrementa menos de un 30% respecto a la acigótica. Este experimento se repitió en condiciones de invierno el siguiente año y la respuesta fue similar, confirmándose el papel del gen en la tolerancia a sal independientemente de las condiciones ambientales. En resumen, el gen *IMP1* induce tolerancia a la salinidad y el grado de tolerancia es mayor a un nivel moderado de sal (50 mM NaCl) que al aumentar el nivel a 75 mM NaCl, a pesar de que las condiciones ambientales en este último eran menos drásticas.

Para comprobar si la sobreexpresión del gen *IMP1* inducía tolerancia no sólo a estrés salino sino también a estrés hídrico, se realizó un experimento con las líneas L10 y L17, que se habían utilizado en los ensayos de salinidad, y L105 que también tenía un inserto. Estas líneas junto a sus correspondientes controles internos (líneas acigóticas) y externo (WT), se cultivaron en una cámara de condiciones controladas. El estrés hídrico se impuso mediante reducción de riego (un 30% del control) durante 50 días y al final del experimento se determinó el desarrollo vegetativo y reproductivo mediante el peso de la biomasa vegetativa de la parte aérea y de los frutos (Fig. 17). La biomasa vegetativa en el WT y en las líneas acigóticas muestra valores similares a los 50 días de tratamiento. En las líneas homocigóticas, L10 es la única que incrementa la biomasa vegetativa y especialmente el peso de los frutos respecto a su correspondiente línea acigótica y WT, lo que indica que esta línea es tolerante no solo al estrés salino sino también al estrés hídrico. La línea 17, que reduce el desarrollo de la línea homocigótica respecto a la acigótica y WT, muestra también una respuesta similar en estrés hídrico y estrés salino. Finalmente, la línea 105 no muestra ningún efecto por la sobreexpresión del gen *IMP1*.

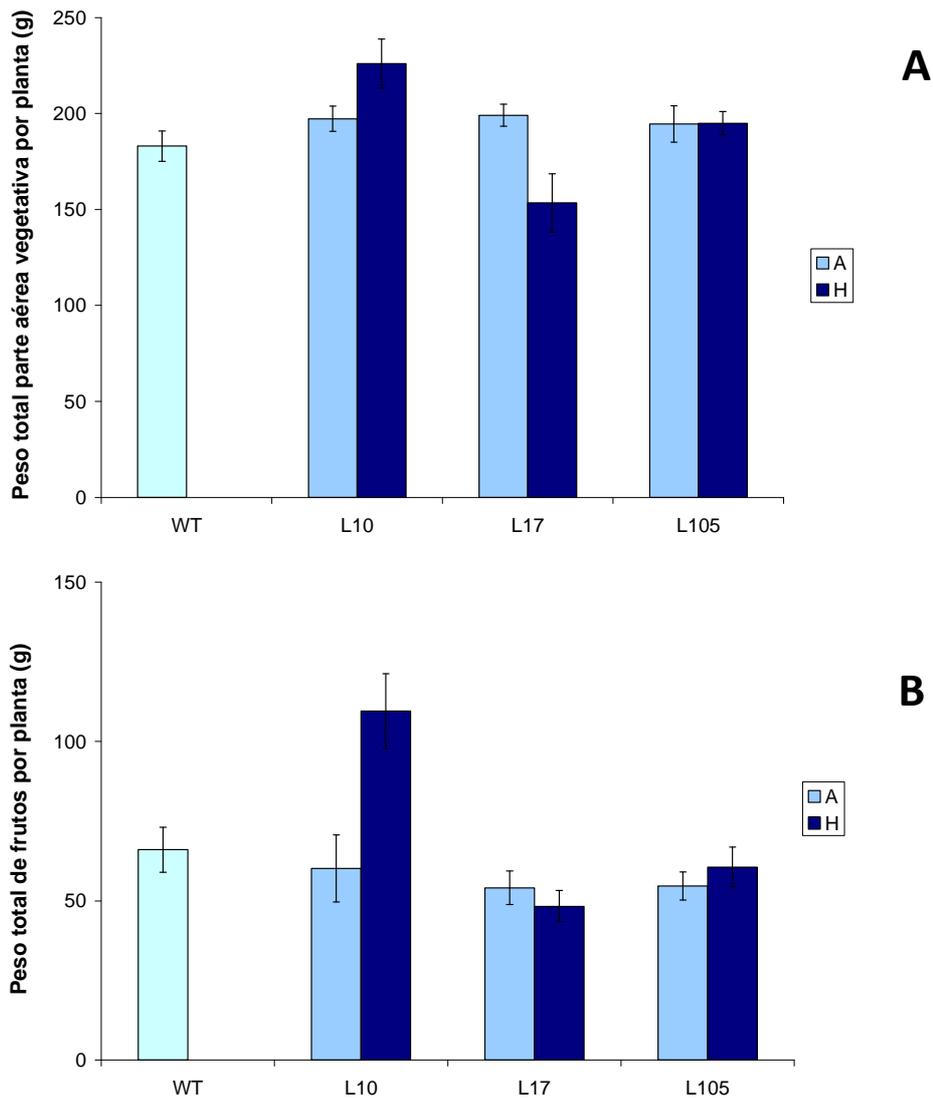


Figura 17.- Peso total por planta de la parte aérea vegetativa (A) y de frutos (B) del cv p73 (WT) y de líneas acigóticas (A) y homocigóticas (H) para el gen *IMP1* desarrolladas en condiciones de estrés hídrico durante 50 días. El estrés se aplicó por reducción del riego (30%) del volumen aplicado a las plantas control. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

I.2.2.-Caracterización fisiológica de la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico inducida por la sobreexpresión del gen *IMP1*

En primer lugar se comprobó como la sobreexpresión del gen *IMP1* modificaba la respuesta fisiológica a largo plazo en L10 cultivada en condiciones de salinidad. En las plantas desarrolladas en control y 50 mM NaCl, se analizó contenidos iónicos de Na⁺ y K⁺ y potencial osmótico en la tercera hoja completamente desarrollada después de 30 y 80 días de tratamiento. La concentración de Na⁺ aumentaba con el tiempo de tratamiento en

las líneas acigótica y homocigótica, pero tanto a los 30 días como a los 80 días de tratamiento la acumulación de Na^+ es mayor en la línea homocigótica que en la acigótica (Tabla 5). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre líneas para el contenido de K^+ (Datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la mayor tolerancia de L10 está asociada a una mayor acumulación de Na^+ en las hojas.

Tabla 5.- Concentración de Na^+ y potencial osmótico de hojas de la línea acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* (L10) desarrolladas en control y a 50 mM NaCl. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($\text{LSD}_{5\%}$).

Tiempo (días)	NaCl (mM)	Genotipo	Na^+ (mM)	Potencial osmótico (MPa)
30	0	L10A	8,5 \pm 0,6	-1,30 \pm 0,03
		L10H	12,4 \pm 2,9	-1,33 \pm 0,02
	50	L10A	51,3 \pm 2,7	-1,32 \pm 0,04
		L10H	64,8 \pm 4,6*	-1,43 \pm 0,02*
80	0	L10A	11,1 \pm 0,9	-1,14 \pm 0,01
		L10H	11,2 \pm 0,8	-1,18 \pm 0,02
	50	L10A	102,4 \pm 7,9	-1,51 \pm 0,05
		L10H	120,1 \pm 5,8*	-1,61 \pm 0,02*

El papel de los genes implicados en la síntesis de osmolitos se ha relacionado con un papel osmótico para evitar o reducir el estrés osmótico inducido por la salinidad. La reducción del potencial osmótico (Ψ_s) inducida por la salinidad en las hojas es mayor en la línea homocigótica que en la acigótica en el primer muestreo y se mantienen las diferencias en el segundo muestreo (Tabla 5). Estos datos sugieren que la mayor tolerancia de la línea homocigótica para el gen *IMP1* está asociada a la tolerancia al estrés osmótico.

Con el objetivo de dilucidar el papel del gen en la tolerancia al estrés hídrico, se llevó a cabo un experimento en el que las plantas se sometían a ciclos sucesivos de deshidratación-rehidratación, es decir, el grado de estrés iba incrementando a lo largo del ciclo hasta la marchitez de las hojas y esta etapa iba seguida de una recuperación. Una de

las medidas no destructivas e indicativas del grado de estrés que sufre la planta es la medida de clorofila, parámetro que se midió a la mitad del cuarto ciclo de deshidratación, cuando las plantas no mostraban aún signos externos de deshidratación. La línea homocigótica presenta mayores valores medios de clorofila que la línea acigótica (62,4 y 48,1 en las líneas homocigótica y acigótica, respectivamente), lo que refleja que la línea homocigótica mantiene la maquinaria fotosintética en mejores condiciones que la acigótica frente al estrés.

Los parámetros fisiológicos se analizaron al finalizar la fase de recuperación del cuarto ciclo, con el fin de que las plantas tuviesen un grado de hidratación similar y las medidas realizadas reflejasen realmente los cambios fisiológicos inducidos por la expresión del gen y no por el diferente grado de deshidratación. Se comprobó que el contenido de agua en las hojas era similar en control y estrés hídrico para ambas líneas, con valores alrededor de 5 g de agua por g de peso seco.

La reducción del potencial hídrico por el estrés era menor en la línea homocigótica que en la acigótica, mientras que ocurría lo contrario para el potencial osmótico (Tabla 6). Estos resultados confirman que la línea homocigótica es capaz de mantener un mayor nivel de hidratación en base a la menor reducción del potencial hídrico, y que ello se debe a la mayor capacidad para reducir el potencial osmótico, es decir muestra tolerancia osmótica tal como se había observado en condiciones de salinidad a largo plazo.

Tabla 6.- Potencial hídrico, osmótico y potencial de turgor (MPa) en las hojas de la línea 10 acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($LSD_{5\%}$).

Genotipo	Potencial hídrico	Potencial osmótico
L10A	- 1,408 \pm 0,17	-1,116 \pm 0,02
L10H	- 1,130 \pm 0,10*	-1,418 \pm 0,06*

En este experimento se analizaron las concentraciones de solutos inorgánicos y orgánicos involucrados en el ajuste osmótico. Respecto a K^+ , la concentración aumentaba en las plantas procedentes de estrés hídrico pero no había diferencias entre líneas (Tabla 7). En

azúcares sí había diferencias incrementando significativamente los niveles de azúcares en la homocigótica respecto a la acigótica tanto en control como en estrés hídrico.

Tabla 7.- Concentraciones de K^+ , azúcares y ácidos orgánicos en las hojas de la línea 10 acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES. *Diferencias significativas entre medias ($LSD_{5\%}$).

Genotipo	K^+ (mM)		Azúcares (mM)		Ác. Orgánicos (mM)	
	Control	EH	Control	EH	Control	EH
L10A	147,2 \pm 23,8	196,6 \pm 28,2	37,5 \pm 2,6	49,8 \pm 5,5	127,6 \pm 14,5	142,8 \pm 17,0
L10H	172,6 \pm 8,3	209,5 \pm 17,4	46,0 \pm 3,8*	81,3 \pm 8,1*	147,2 \pm 17,8	207,2 \pm 23,4*

La línea homocigótica también incrementaba significativamente la concentración de ácidos orgánicos respecto a la acigótica en las plantas procedentes de estrés hídrico, lo que sugiere que la sobreexpresión del gen *IMP1* induce tolerancia osmótica y esta tolerancia se traduce en una mayor acumulación de los principales solutos orgánicos que intervienen en el ajuste osmótico. Así, la contribución de los solutos analizados al ajuste osmótico era -0,97 y -1,25 MPa en la línea acigótica y homocigótica, respectivamente. Estos valores eran ligeramente inferiores a las medidas de potencial osmótico (1,12 y 1,42), puesto que no se han analizado todos los solutos que contribuyen al ajuste, pero es interesante señalar que el incremento de la línea homocigótica respecto a la acigótica es idéntico en ambos casos (28% de incremento en la contribución de solutos y 27,1% en el potencial osmótico).

Se analizó por HPLC las concentraciones de inositol, azúcares y ácidos orgánicos (Fig. 18). En control la línea homocigótica tendía a incrementar la concentración de inositol, respecto a la acigótica, aunque no se llegaban a alcanzar diferencias significativas entre la línea acigótica y homocigótica, mientras que en estrés la línea homocigótica incrementaba significativamente respecto a la acigótica. Es interesante que la concentración de inositol no incrementara en la línea acigótica con el estrés, mientras que en la línea homocigótica había un incremento del 40%. Respecto a los azúcares, tanto en la línea acigótica como en la homocigótica aumentaba la concentración de hexosas

con el estrés, pero el incremento era mayor en la homocigótica (un 50 y 100% en la acigótica y homocigótica, respectivamente). Por tanto, el aumento en la línea homocigótica respecto a la acigótica en las plantas sometidas a estrés se debía a las hexosas (Fig. 18). Sacarosa sin embargo no incrementaba con el estrés en la homocigótica, sino que era la línea acigótica la que mostraba una tendencia a incrementar. La característica de la línea homocigótica es que presentaba mayores niveles que la acigótica en control, es decir esta línea parece mantener niveles estables de sacarosa independientemente del estrés.

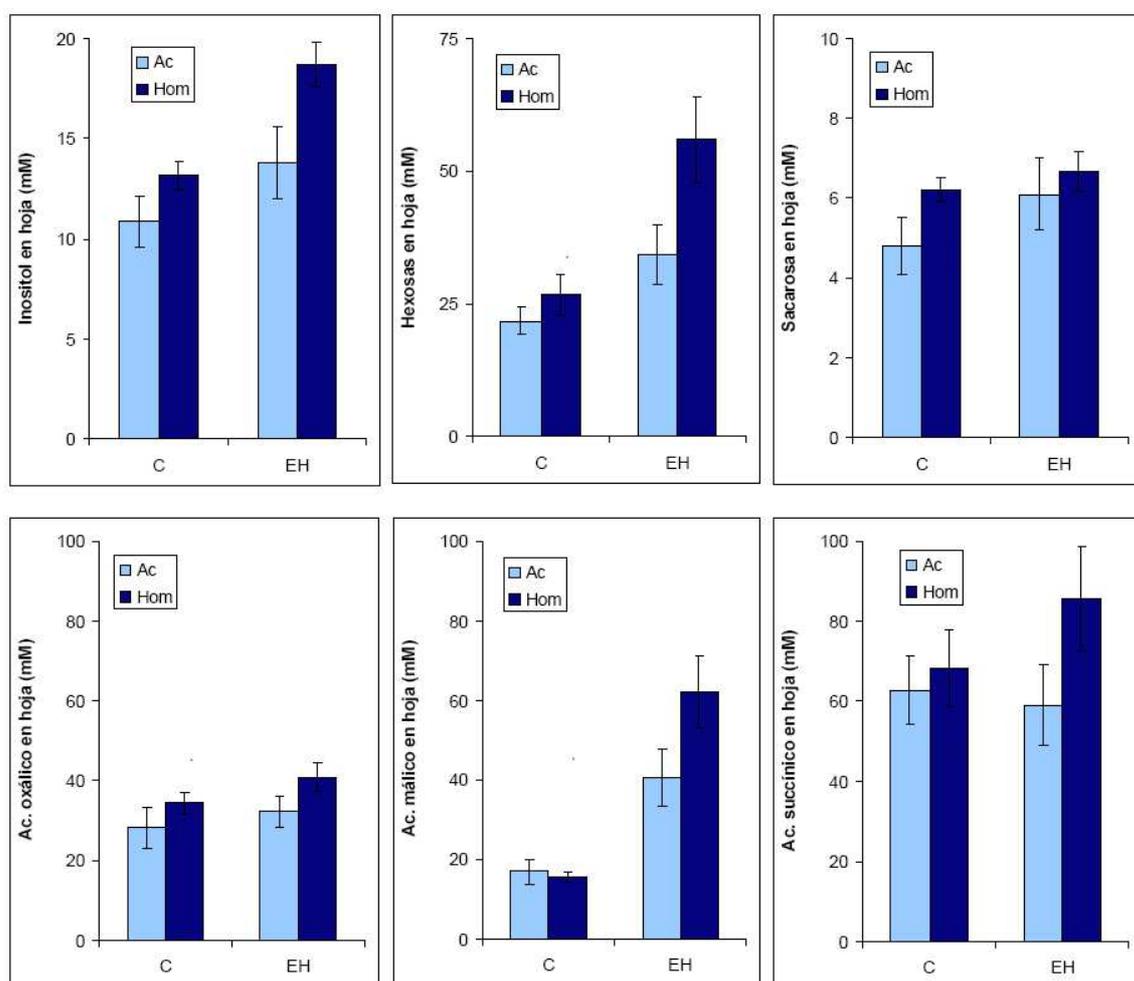


Figura 18.- Concentraciones de inositol, azúcares y ácidos orgánicos en las hojas de la línea 10 acigótica (A) y homocigótica (H) para el gen *IMP1* durante la etapa de recuperación del cuarto ciclo de deshidratación. Valores medios de 6 plantas por línea \pm ES.

El aumento de ácidos orgánicos en las hojas de la línea homocigótica procedentes de estrés se debía a los ácidos oxálico, málico y succínico (Fig. 18). En control no había diferencias entre la línea acigótica y homocigótica, mientras que en estrés la línea homocigótica incrementaba significativamente respecto a la acigótica los niveles de estos tres ácidos orgánicos. En la línea acigótica, sin embargo, el único ácido que incrementaba con el estrés era el ácido málico, pero oxálico y succínico mantenían los mismo niveles en control y estrés hídrico.

Los resultados obtenidos en las plantas que sobreexpresan el gen *IMP1* indican que la mayor tolerancia de las líneas transgénicas está asociada a la mayor capacidad para reducir su potencial osmótico en condiciones de salinidad y estrés hídrico, lo que le permite un mejor mantenimiento del desarrollo a largo plazo que se refleja en una mayor producción. En medio salino puede utilizar los iones salinos procedentes del sustrato como Na^+ para ajustarse osmóticamente, mientras que en estrés hídrico utiliza azúcares y ácidos orgánicos para realizar el ajuste osmótico. También es interesante el hecho de que las plantas homocigóticas acumulen inositol en condiciones de estrés hídrico.

II.-IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN *Solanum pennellii*

II.1.- Selección de accesiones de especies silvestres para abordar un programa de identificación y aislamiento de genes mediante mutagénesis insercional

La integración de un T-DNA dentro de la secuencia estructural o los elementos de regulación de un gen endógeno puede ocasionar su interrupción y la subsiguiente anulación de función. De forma alternativa, la integración del T-DNA corriente arriba o abajo del gen puede alterar su nivel de expresión. Este método de generación de mutantes ha llegado a convertirse en una herramienta importante en el campo de la genómica funcional y se ha denominado mutagénesis insercional dado el efecto fenotípico que provoca.

Como en cualquier estrategia de mutagénesis, un punto crucial es la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de obtener mutantes interesantes. En nuestro caso, para lograr ese objetivo, es preciso disponer de un método eficaz de transformación en las accesiones con las que se pretenda trabajar. Además de este requisito, sería recomendable obtener las progenies con facilidad para poder analizar no sólo las mutaciones dominantes sino también las recesivas. Por último, un aspecto muy importante es trabajar con un material vegetal que presente una expresión adecuada de aquellos caracteres sobre los que se pretende incidir, en nuestro caso una alta tolerancia a sequía y salinidad.

En este contexto, se realizó una caracterización fenotípica y fisiológica de diversas accesiones silvestres del género *Solanum* de forma análoga a otros trabajos que se habían llevado a cabo en nuestro grupo con materiales similares (Bolarín et al., 1991; Cano et al., 1996; Rus et al., 1999; Santa-Cruz et al., 1999). En estos experimentos, la accesión que tuvo un mejor comportamiento fue la '20164' de *Solanum pennellii*. Este genotipo fue capaz de crecer durante varios meses con un tratamiento de riego con NaCl 200 mM sin presentar ningún síntoma de marchitamiento o senescencia, como sí pasaba, como era de esperar, con el tomate cultivado (Fig. 19).



Figura 19.- Plantas de *S. lycopersicum* (parte superior) y de *S. pennellii* '20164' parte inferior) cultivados en invernadero sin ningún tratamiento (izquierda) y tras dos meses sometidas a un tratamiento de NaCl 200 mM (derecha).

Además, pudimos corroborar que las especies silvestres evaluadas utilizan mecanismos de inclusión de iones Na^+ y una menor producción de osmolitos compatibles para compensar los efectos negativos de la sal. Por tanto, son capaces de compensar el estrés osmótico con un menor coste energético (Datos no mostrados).

Sin embargo, una vez obtenidas las plantas transgénicas y llevadas al invernadero, se observó, en distintos ciclos de cultivo, que había un gran porcentaje de genotipos que, o no producía semillas, o las que producía no eran viables. *Solanum pennellii* está descrita como una especie parcialmente autoincompatible (Hardon, 1967). Recientemente se ha calificado a la especie *Solanum pennellii* como de "Sistema reproductivo facultativo, mayoritariamente autoincompatible y con algunas poblaciones autocompatibles" (Bedinger et al., 2011). En nuestras condiciones, aunque se han hecho grandes esfuerzos para conseguir semillas (modificación de épocas de cultivo, tipo de poda, polinización

manual, etc), no se ha podido conseguir descendencia de forma sistemática a partir de plantas transgénicas procedentes de esta primera accesión.

Debido a los problemas para conseguir semillas con este material, se intentó ampliar la gama de accesiones de *S. pennellii* y transformar otros materiales para ver si se podía obtener descendencia con mayor facilidad. En este contexto se abordó la transformación de dos nuevas accesiones de *S. pennellii*. 'LA0716' se eligió porque es la accesión de *S. pennellii* con la que más se ha trabajado en la búsqueda de marcadores moleculares y para la obtención de líneas de introgresión con tomate (Frary et al., 2011; Zhou et al., 2006; Van der Knaap et al., 2004). La accesión 'PE47' se había utilizado, entre otros en nuestro grupo, para estudiar los mecanismos de tolerancia a salinidad a nivel celular y de planta entera (Cano et al., 1998; Santa Cruz et al., 1999). Además, se realizó un experimento similar al efectuado con la accesión '20164' y se detectó un nivel de tolerancia a los estreses hídricos y salinos muy parecidos (Datos no mostrados). La transformación genética de estos materiales se realizó de forma similar a la empleada con la accesión '20164'. A continuación se describen los resultados obtenidos.

II.2.- Generación de una colección de líneas T-DNA a partir de *Solanum pennellii*

La obtención de plantas transgénicas de las distintas accesiones de *S. pennellii* se consiguió mediante cocultivo de explantes de hoja con la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se ha utilizado el vector pD991 gentilmente cedido por el Dr. Thomas Jack (Department of Biological Sciences; Dartmouth College, USA) que funciona como una trampa de intensificadores. En el T-DNA de este vector, el gen marcador *nptII*, bajo control del promotor pmas, está cerca del borde izquierdo. La región estructural del delator (*uidA*), con un promotor mínimo, que no permite niveles detectables de transcripción, queda adyacente al borde derecho. Como ya se ha comentado, en esta estrategia es importante obtener una cantidad considerable de plantas transformadas para poder detectar el mayor número posible de mutantes y poder identificar así los genes etiquetados. Por tanto, en este caso, es prácticamente imprescindible disponer de un método de transformación eficaz.

Todas las transformaciones se realizaron en el laboratorio de Cultivo in Vitro y Mejora Vegetal del IBMCP, dirigido por el Dr. Vicente Moreno. Las plantas transgénicas obtenidas

se evaluaron mediante citometría de flujo para comprobar su nivel de ploidía y poder seleccionar las líneas diploides.

Con la accesión '20164' se había obtenido eficacias de transformación del 6.1% (Gisbert et al., 1999). Esta eficacia, claramente insuficiente para llevar a cabo un programa de mutagénesis insercional, se ha mejorado gracias a diversas modificaciones realizadas en el método de transformación entre las que destacan un mejor balance hormonal en los medios de cultivo y el cambio de antibiótico para el control de *Agrobacterium*. Con estas nuevas condiciones se obtuvieron 1.363 plantas transformadas a partir de 816 explantes utilizados. Un 81% de estas plantas eran diploides y el resto tetraploides. Por tanto, se consiguieron 1.105 líneas T-DNA diploides lo que significa una frecuencia de transformación del 135%. Con la transformación de la accesión 'LA0716' y 'PE47' se consiguieron 50 y 421 líneas T-DNA diploides respectivamente. Por tanto, se han generado una colección de 1.576 líneas T-DNA de *S. pennellii* (Tabla 8).

Tabla 8.- Número de plantas obtenidas en cada transformación con las distintas accesiones de *S. pennellii*.

Accesión	Nº de explantes	Nº de plantas generadas	Nº de plantas diploides	Frecuencia transformación
<i>S. pennellii</i> '20164'	816	1.363	1.105	135%
<i>S. pennellii</i> 'LA0716'	312	71	50	16%
<i>S. pennellii</i> 'PE47'	480	562	421	88%
Total	1.608	1.996	1.576	98%

Como se puede ver en la Tabla 8, el mayor esfuerzo en la obtención de plantas transgénicas se llevó a cabo en las accesiones '20164' y 'PE47' ya que la eficacia de transformación era muy superior a la que se logró con la accesión 'LA0716'. Por otra parte, cabe destacar que el método de transformación ha permitido mantener el porcentaje de plantas diploides en estas accesiones en niveles cercanos al 80%.

Tras la obtención de las plantas transgénicas éstas se tenían que clonar y mantener mediante técnicas de cultivo in vitro. Además, alguna de las copias clonales se aclimataba y se cultivaba en el invernadero tanto para obtener la descendencia como para evaluar su fenotipo en cuanto a la tolerancia al estrés hídrico y salino (Fig. 20).



Figura 20.- Mantenimiento de las plantas transgénicas en la cámara de cultivo (izquierda) y crecimiento en el invernadero tras su aclimatación (derecha).

Con las líneas T-DNA obtenidas se han realizado distintos experimentos con el fin de detectar mutantes insercionales para los caracteres de interés. En esta Tesis nos centramos en el análisis de plantas TG1 para la detección de mutantes dominantes, semidominantes y aditivos. Debido a la dificultad que hemos tenido para obtener descendencias a partir de las líneas TG1, sólo se pudo evaluar una pequeña muestra de progenies TG2, donde también es posible la detección de mutantes recesivos. Por último, en estas líneas también se llevó a cabo el análisis de expresión del delator para poder detectar elementos de regulación de genes implicados en desarrollo y estreses abióticos tales como estrés hídrico y estrés salino.

II.3.-Análisis de la expresión del gen delator en líneas T-DNA de *Solanum pennellii*

Los análisis de expresión del delator en líneas T-DNA con trampas génicas permiten detectar señales de regulación de genes implicados en una amplia gama de procesos. Como se ha indicado anteriormente, se ha utilizado una trampa de intensificadores (vector pD991) que contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA*. El promotor mínimo no es capaz de alcanzar un nivel de transcripción detectable, pero su integración en el área de actuación de un determinado intensificador debería activar la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno (Fig. 21).



Figura 21.- Trampa de intensificadores. **RB** Right Border; **LB** Left Border; **TT**, terminador; **35S**, promotor constitutivo; **PM**, promotor mínimo.

Estos análisis de expresión del gen delator se realizaron principalmente en la colección de líneas T-DNA que se generó mediante la transformación genética de las accesiones de *S. pennellii* '20164' y 'LA0716'. El ensayo histoquímico empleado para evaluar la expresión del gen delator se realizó en un total de 1148 líneas TG1. Este material fue analizado para los órganos vegetativos (hoja, tallo y raíz) cuando las plantas tenían una altura de entre 30 y 40 centímetros y para los reproductivos (flores y frutos) en estadios de desarrollo más avanzados.

La expresión del gen delator se ha detectado en diferentes órganos vegetativos y reproductivos de las plantas crecidas sin condiciones de estrés, lo cual puede ser interesante para el estudio de caracteres relacionados con el desarrollo (Fig. 22).

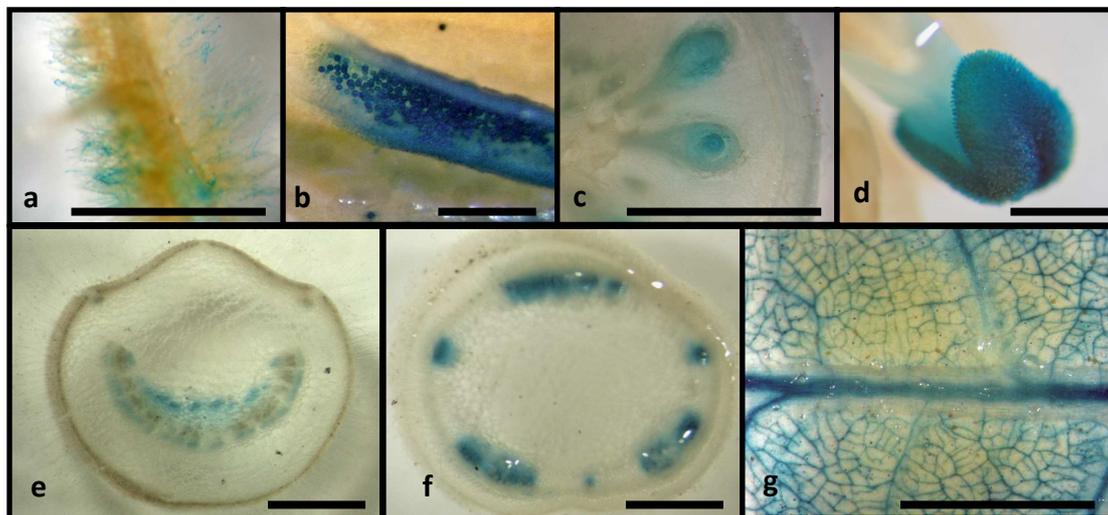


Figura 22.- Expresión del gen delator en diferentes órganos de la planta. **a** Pelos radiculares. **b** Granos de polen y tejido de la antera. **c** Semillas inmaduras. **d** Estigma. **e-g** Vasos conductores de raquis (**e**), tallo (**f**) y foliolo de hoja (**g**). La barra representa 1 mm.

De todas las plantas analizadas, 311 presentaron expresión del gen delator en alguno de los explantes analizados, lo cual supone el 28,1% de las líneas estudiadas. De estas líneas, 212 genotipos presentaron expresión en más de un explante, lo que supone el 19,0% del total.

II.3.1.-Análisis de la expresión del gen delator en líneas cultivadas sin estrés y en condiciones de salinidad o sequía

En este experimento se analizó la expresión del gen delator a distintos tiempos y en distintos órganos de plantas cultivadas en condiciones normales y con estrés salino. Se evaluó la práctica totalidad de las líneas TG1 obtenidas en las accesiones '20164' y 'LA0716' para poder detectar patrones de expresión diferenciales entre las plantas sometidas o no al tratamiento salino.

La expresión del gen delator se analizó en 1148 líneas T-DNA de las accesiones '20164' y 'LA0716'. Para ello se aclimataron y cultivaron en maceta dos réplicas clonales de cada genotipo. Cuando las plantas alcanzaban un tamaño de entre 30 y 40 cm se iniciaba, en una de las dos copias, el tratamiento salino (NaCl 150 mM) mientras que la otra copia se seguía regando con solución de fertirrigación. La toma de muestras para llevar a cabo este análisis se realizó 1, 7 y 30 días después de iniciar el tratamiento salino tanto en las plantas sometidas a estrés como en las que se regaron con solución nutritiva. Los explantes analizados en este experimento fueron: foliolo, peciololo (unión del foliolo con el raquis), raquis (eje central de la hoja compuesta de *Solanum pennellii*) y tallo (Tabla 9).

Tabla 9.- Porcentaje de líneas T-DNA de *Solanum pennellii* que presentan expresión del gen delator en diferentes estructuras de la parte aérea en plantas sin tratamiento 0 mM y con tratamiento salino (150 mM de NaCl) tras 1, 7 y 30 días de tratamiento (DT).

NIVELES SALINOS	NaCl 0 mM			NaCl 150 mM			
	DÍAS DE TRATAMIENTO	1 DT	7 DT	30 DT	1 DT	7 DT	30 DT
FOLILOLO		14,4%	12,9%	10,4%	13,6%	11,1%	7,1%
PECIOLOLO		14,2%	14,4%	12,2%	14,2%	11,8%	9,1%
RAQUIS		-	-	19,1%	-	-	13,1%
TALLO		-	-	25,3%	-	-	16,9%

En general, los valores obtenidos en las plantas sin tratamiento salino de este experimento son muy similares a los observados en plantas de tomate transformados con la misma trampa de intensificadores (Angarita, 2009). En ese trabajo los porcentajes de expresión del gen delator, para el mismo tipo de explante, variaban entre 14.0% y 19.6%. En las plantas que no estaban sometidas a estrés, el porcentaje de explantes con expresión del gen delator no varió significativamente a lo largo de todo el experimento. Por otra parte, la disminución progresiva del porcentaje de eventos de expresión en plantas que han sido sometidas a tratamientos de estrés sugiere una menor actividad génica de estas plantas durante el crecimiento en condiciones salinas (Tabla 9).

Por otra parte, al análisis de la expresión diferencial del gen delator en condiciones normales de cultivo y condiciones de estrés, tanto salinidad como sequía, ha permitido la identificación de algunas líneas T-DNA que pueden ser interesantes. Por ejemplo, la línea 1066 ET SP presenta un patrón de expresión diferencial. En los estomas de esta planta se observó expresión del gen delator en todas las partes analizadas procedentes de plantas crecidas en condiciones normales y en las muestras de las plantas cultivadas durante uno y siete días con estrés salino. En cambio, las muestras tomadas de las plantas crecidas durante un mes en condiciones de salinidad no mostraban ninguna expresión (Fig. 23).

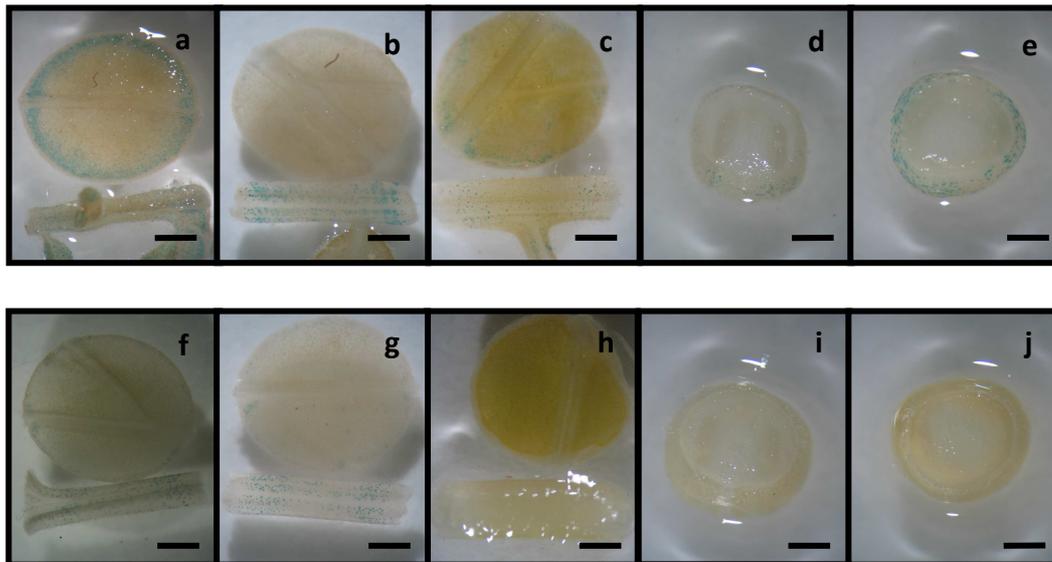


Figura 23.- Expresión del gen delator en diferentes órganos de la línea 1066 ET SP procedentes de plantas sometidas a un tratamiento de estrés hídrico (f-j) y los correspondientes controles cultivados en condiciones normales (a-e). f Limbo y peciololo tras un día de estrés hídrico. g Limbo y peciololo tras siete días de estrés hídrico. h Limbo y peciololo tras treinta días de estrés hídrico. i Sección transversal de raquis tras treinta días de estrés hídrico. j Sección transversal de tallo tras treinta días de estrés hídrico. La barra representa 1 mm.

En esta línea, en la que no se detectó ningún rasgo fenotípico diferente al del testigo sin transformar, se podría haber etiquetado una señal de regulación específica de estomas que se reprimiera cuando la planta estuviera sometida a estrés durante un largo periodo de tiempo.

Por último, aunque el número de líneas analizadas para detectar expresión diferencial del gen delator entre plantas crecidas en condiciones normales y plantas crecidas con estrés hídrico fue menor, también se han identificado algunas líneas con expresión diferencial bajo este tipo de estrés abiótico. En concreto, la línea 492 ET SP presentaba una mayor expresión del gen delator en diversos tejidos procedentes de plantas sometidas a un tratamiento de estrés hídrico (Fig. 24).

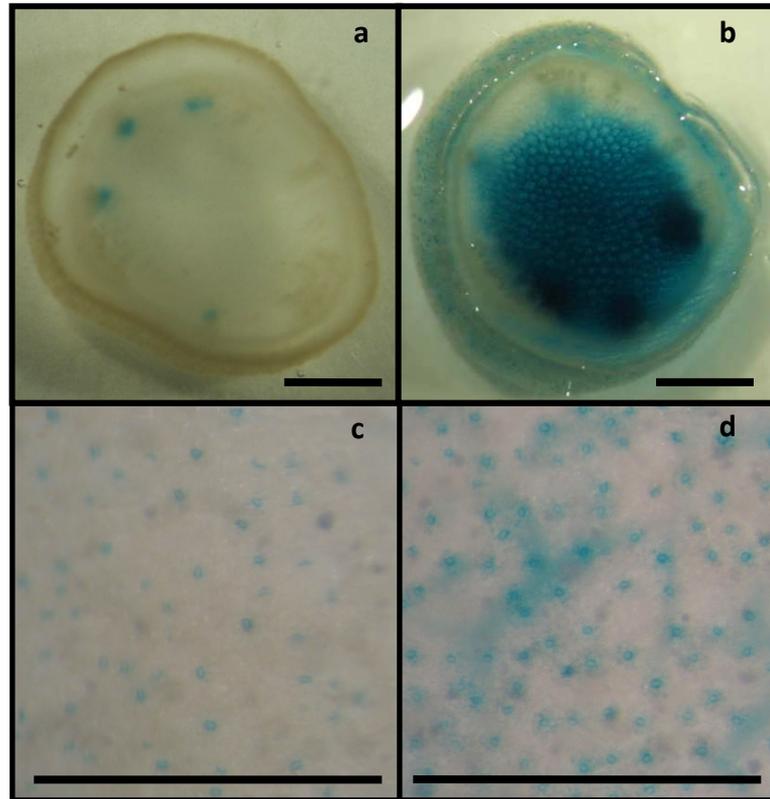


Figura 24.- Expresión del gen delator en secciones transversales de tallo (**a** y **b**) y epidermis de hoja (**c** y **d**) procedentes de plantas de la línea 492 ET SP cultivadas en condiciones normales (**a** y **c**) y con un tratamiento de estrés salino (**b** y **d**). La barra representa 1 mm.

Por el contrario, la línea 464 ET SP mostró una alta expresión del gen delator en el tallo y el raquis de las plantas crecidas sin estrés, frente a una leve tinción Xgluc en los vasos conductores de ambas muestras en las plantas sometidas a un tratamiento de sequía prolongado (Fig. 25).

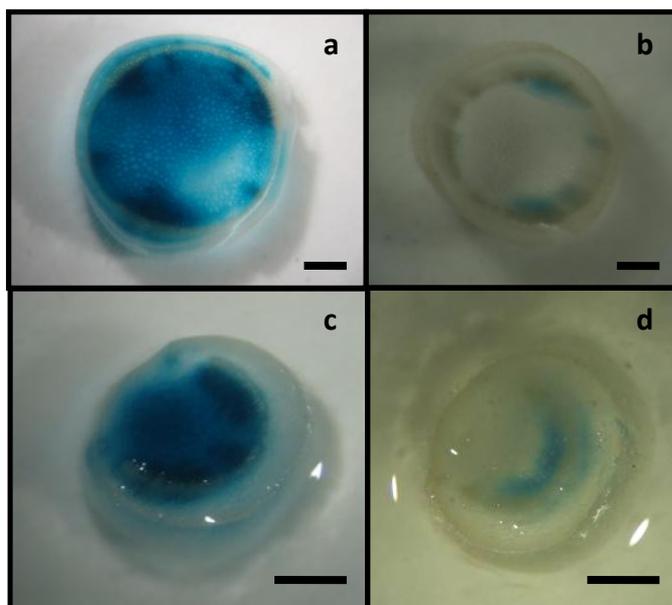


Figura 25.- Expresión del gen delator en secciones transversales de tallo (**a** y **b**) y de raquis de hoja (**c** y **d**) procedentes de plantas de la línea 464 ET SP cultivadas en condiciones normales (**a** y **c**) y con un tratamiento de estrés hídrico (**b** y **d**). La barra representa 1 mm.

II.3.2.-Detección de líneas con expresión del gen delator en tricomas, raíces o estomas

Además del análisis de la expresión diferencial del gen delator entre plantas cultivadas en condiciones normales y otras sometidas a tratamientos estresantes, con este abordaje hemos podido llevar a cabo la detección de líneas que expresan el gen delator en órganos o tejidos muy concretos y que pueden ayudar a la identificación de señales de regulación específicas. En otras palabras, gracias a la naturaleza dual de la trampa génica empleada, se pueden identificar genotipos interesantes sobre la base del análisis espacio-temporal de la expresión del gen delator. En este sentido, se han detectado diversos genotipos que presentan un patrón de expresión del gen delator que son altamente interesantes por su posible relación con caracteres de interés agronómico y, más concretamente, con la tolerancia a estreses. En este apartado veremos que hay líneas que expresaron el gen delator en diferentes estructuras específicas tales como tricomas, raíces y estomas.

Tricomas

Los tricomas son estructuras uni o pluricelulares de la epidermis de las plantas y pueden ser glandulares y no glandulares. Las funciones que desempeñan son variadas debido a

sus características morfológicas (tamaño, densidad, textura superficial, forma, orientación, etc) y por ello pueden conferir a las plantas funciones como la regulación de la temperatura, la dispersión de semillas y frutos, la protección contra agentes abrasivos, la percepción de estímulos y la resistencia a insectos. Además, se han atribuido a cierto tipo de tricomas funciones como la capacidad de almacenar agua en situaciones de estrés hídrico y la capacidad de secuestrar iones tóxicos en condiciones de estrés salino, para mantener la homeostasis iónica dentro de los tejidos fotosintéticamente activos (Agarie et al., 2007).

En el género *Solanum*, la principal función que se atribuye a los tricomas es la protección contra distintos tipos de plagas (Simmons y Gurr, 2005). En este contexto, se han seleccionado diez líneas T-DNA sobre la base de la expresión específica del gen delator en tricomas. Entre estas líneas, excepto una en la que se vio que se teñían también los tricomas tipo VI, los tricomas tipo IV, mayoritarios en *S. pennellii*, son los que se han visto teñidos o en su totalidad o en la parte terminal del mismo (Fig. 26).

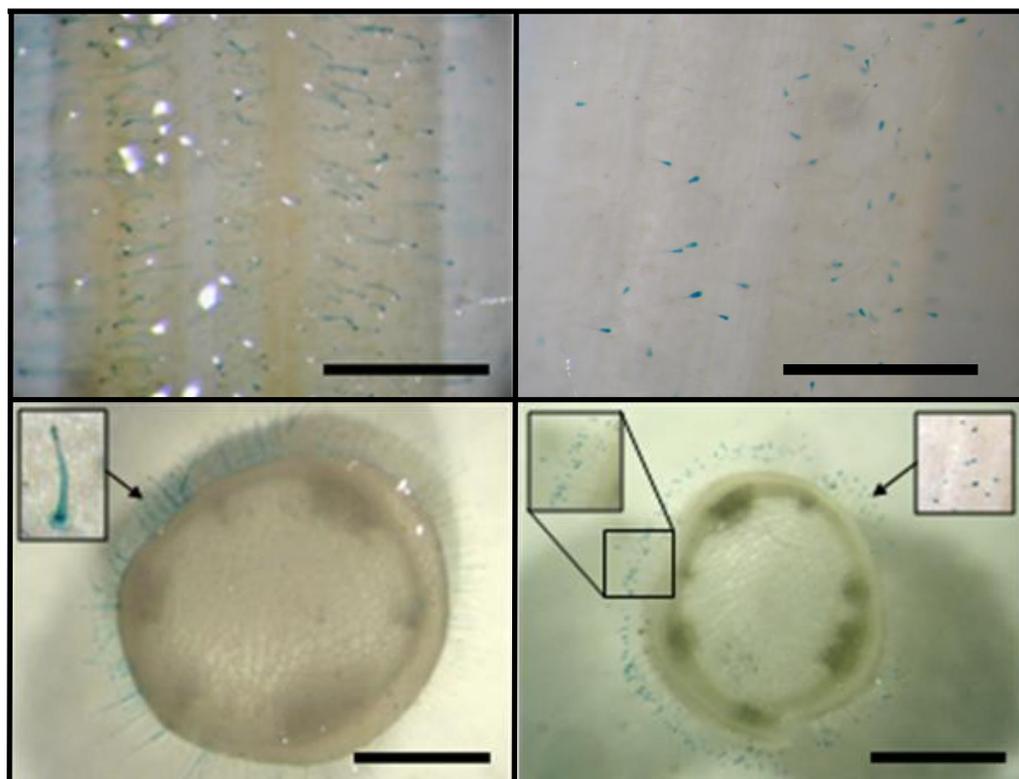


Figura 26.- Expresión en explantes de tallo del gen delator en todo el tricoma (izquierda) o únicamente en su parte terminal (derecha). La barra representa 1 mm.

A continuación se detallan las líneas con expresión del gen delator en tricomas que pueden ser más interesantes para trabajos futuros y algunas de sus características (Tabla 10).

Tabla 10.- Genotipos con expresión del gen delator en tricomas.

Genotipo	Accesión	Expresión
33 ET SP	'20164'	Exclusiva en tricomas clase IV Expresión en todo el tricoma
46 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
57 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en la glándula del tricoma
115 ET SP	'20164'	Tricomas de clase VI y otros tejidos
118 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y estomas Expresión en todo el tricoma
184 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
280 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en la glándula del tricoma
335 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
363 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV, estomas y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
608 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV, estomas y haces vasculares Expresión en todo el tricoma
946 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y estomas Mayor expresión en la glándula
1016 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
1060 ET SP	'20164'	Tricomas de clase IV y otros tejidos Expresión en todo el tricoma
7040 ET SP	'LA0716'	Exclusiva en tricomas clase IV Expresión en la glándula del tricoma

Raíces

La raíz es un órgano fundamental en la respuesta que tiene una planta frente a una situación de estrés hídrico y/o salino. Por la especial dificultad de trabajar con raíces, si no se parte de material cultivado en sistemas hidropónicos, se analizó la expresión del gen delator en este órgano en una muestra más reducida de líneas transgénicas. Además, en algunas líneas se evaluó la expresión de raíces de plantas cultivadas en condiciones

normales y con estrés salino. Se observó expresión del gen delator en al menos una de las condiciones evaluadas en el 21,3% de las líneas analizadas. Además, se detectaron genotipos que mostraron expresión del gen *uidA* únicamente en determinada zona de la raíz (Fig. 27).

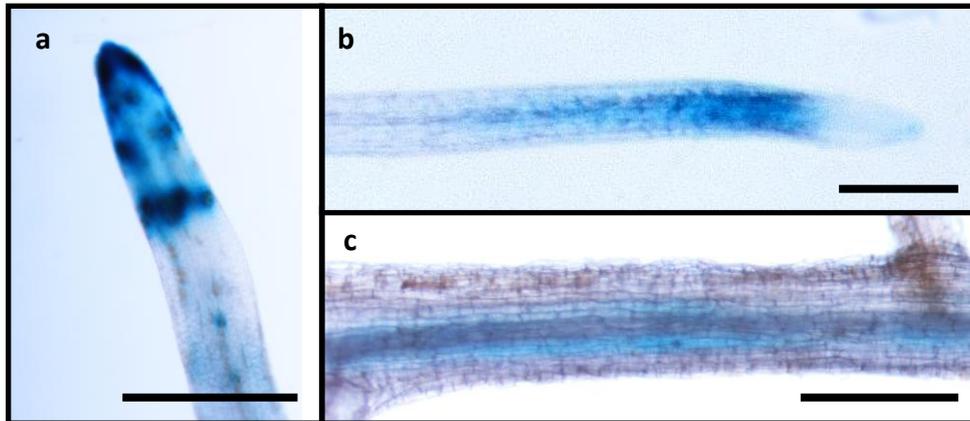


Figura 27.- Expresión del gen delator en diferentes partes de la raíz. **a** Zona meristemática. **b** Zona cercana al meristemo. **c** Tejidos conductores. La barra representa 1 mm.

A continuación se detallan las líneas con expresión del gen delator en raíces que pueden ser más interesantes para trabajos futuros y algunas de sus características (Tabla 11).

Tabla 11.- Genotipos con expresión del gen delator en raíces.

Genotipo	Accesión	Expresión
300 ET SP	'20164'	Raíz y otros tejidos Exclusiva tras aplicación de estrés salino
319 ET SP	'20164'	Específica de raíz
428 ET SP	'20164'	Específica de raíz
447 ET SP	'20164'	Específica de raíz y estomas Tras aplicación de estrés salino
462 ET SP	'20164'	Específica de raíz
464 ET SP	'20164'	Raíz y otros tejidos Tras aplicación de estrés salino
478 ET SP	'20164'	Raíz y otros tejidos Tras aplicación de estrés salino
523 ET SP	'20164'	Zona meristemática y otros tejidos Exclusiva tras aplicación de estrés salino
534 ET SP	'20164'	Raíz y otros tejidos Tras aplicación de estrés salino
591 ET SP	'20164'	Específica de zona meristemática de raíz

Estomas

Los estomas son estructuras que se encuentran en la epidermis de los tejidos vegetales y cuya función principal es la de regular la transpiración en las plantas. Constan de dos células oclusivas que delimitan un orificio llamado ostiolo que se hace mayor cuando las células oclusivas están turgentes. Además, tienen unas células anexas que rodean a las anteriores y que participan en la fisiología de la apertura y cierre del ostiolo. La apertura y cierre de estomas está regulada por factores ambientales como luz, concentración de dióxido de carbono y disponibilidad de agua.

Se identificaron ocho líneas con expresión del gen delator en estomas de entre las evaluadas en condiciones normales y con estrés. Estas líneas pueden tener gran interés para la identificación de señales de regulación específicas de estas estructuras claves para la regulación del intercambio hídrico de las plantas con su entorno (Fig. 28).

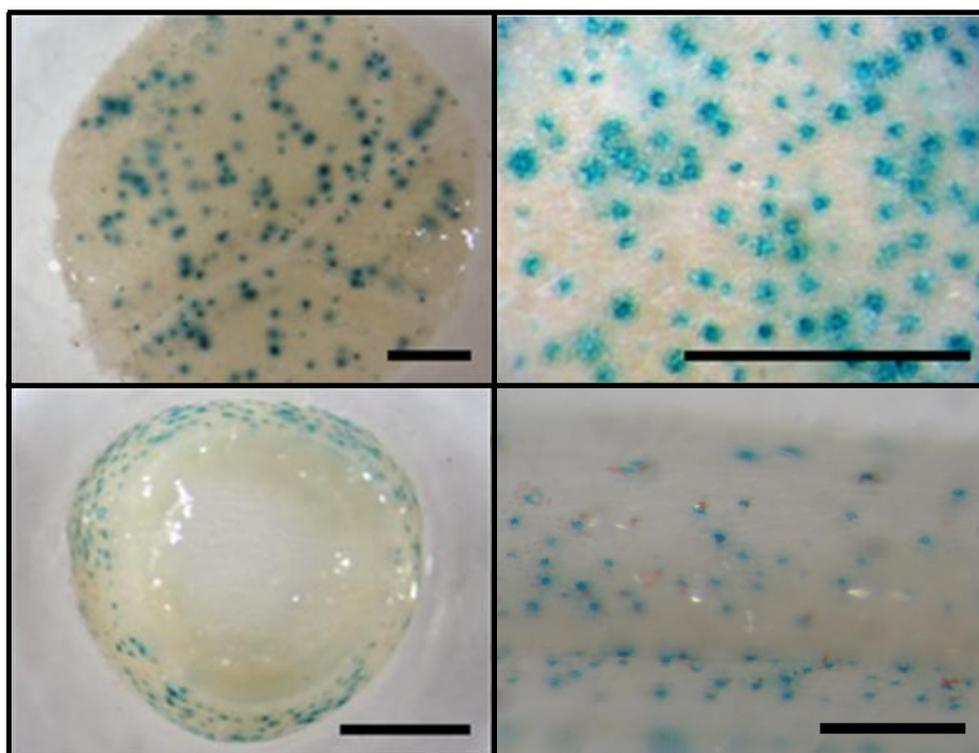


Figura 28.- Expresión del gen delator en estomas presentes en la epidermis de distintas partes de la planta (limbo de la hoja en la parte superior y tallo y peciolo en la parte inferior). La barra representa 1 mm.

A continuación se detallan las líneas con expresión del gen delator en estomas que pueden ser más interesantes para trabajos futuros y algunas de sus características (Tabla 12).

Tabla 12.- Genotipos con expresión del gen delator en estomas.

Genotipo	Accesión	Expresión
118 ET SP	'20164'	Estomas, tricomas y haces vasculares
123 ET SP	'20164'	Estomas y haces vasculares
363 ET SP	'20164'	También tricomas y otros tejidos
447 ET SP	'20164'	Específica de estomas y raíz
492 ET SP*	'20164'	Estomas y otros tejidos Mayor expresión con estrés hídrico
608 ET SP	'20164'	También tricomas y haces vasculares
946 ET SP	'20164'	También tricomas Menor expresión con estrés salino
1066 ET SP	'20164'	Específica de estomas Menor expresión con estrés salino

*Esta línea T-DNA presentó alteraciones fenotípicas

II.4.- Identificación de mutantes en la colección de líneas T-DNA

En el presente trabajo se ha empleado la mutagénesis insercional para la identificación de genes implicados en procesos del desarrollo de las plantas y su adaptación a ambientes desfavorables, en concreto, el estrés hídrico y salino. Mediante esta estrategia se puede producir la integración del T-DNA en un gen endógeno. Este evento puede ocurrir en la secuencia codificante o en cualquier elemento de control de dicho gen, lo cual puede originar la anulación o la alteración de su nivel de expresión. A partir de este proceso podemos obtener una valiosa información sobre la función del gen mutado. Además, a diferencia de cuando se utilizan técnicas con otros agentes mutagénicos (radiaciones, EMS, etc), el gen queda etiquetado por el T-DNA. Por tanto, su identificación y clonación se convierte en una tarea más sencilla (Radhamony et al., 2005).

La caracterización fenotípica de líneas T-DNA procedentes de la transformación genética con la trampa de intensificadores vista anteriormente nos ha permitido identificar algunos mutantes afectados en diferentes caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo así como en el grado de tolerancia a salinidad y sequía según el siguiente esquema.

Se presentan a continuación las descripciones fenotípicas junto con, en algunos casos, los primeros experimentos para su caracterización, de los mutantes más interesantes detectados en la especie silvestre *Solanum pennellii*.



II.4.1.- Mutantes afectados en el desarrollo vegetativo

Tras el proceso de obtención de las plantas transgénicas con la trampa de intensificadores, se debe pasar por una serie de subcultivos en los que se mantiene y multiplica las plantas obtenidas para tener suficientes réplicas clonales con las que realizar las siguientes tareas (aclimatación, evaluación de la tolerancia a diversos tipos de estrés, etc.). En este proceso podemos observar el fenotipo de las plantas y detectar mutantes alterados en el desarrollo vegetativo. Además, por el hecho de utilizar el cultivo *in vitro* para este fin, disponemos de un sistema adecuado para detectar mutantes alterados en características de la raíz ya que en estas condiciones, a diferencia de lo que ocurre cuando se cultiva en una maceta con sustrato, podemos observar perfectamente dicho desarrollo. A continuación se describen cuáles han sido los mutantes más interesantes afectados en caracteres del desarrollo vegetativo, tanto de la parte aérea como de la raíz, detectados en nuestra colección de líneas T-DNA.

El mutante **4728 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') presenta un alto número de tricomas en varias de sus estructuras vegetativas tanto en cultivo *in vitro* como en cultivo *in vivo*. Además, se ha observado un desarrollo anómalo en el sistema radicular de las plantas cultivadas *in vitro*. En estas condiciones, el enraizamiento era claramente menor que el mostrado por la planta silvestre mientras que el crecimiento de la parte aérea no mostraba diferencias significativas (Fig. 29).

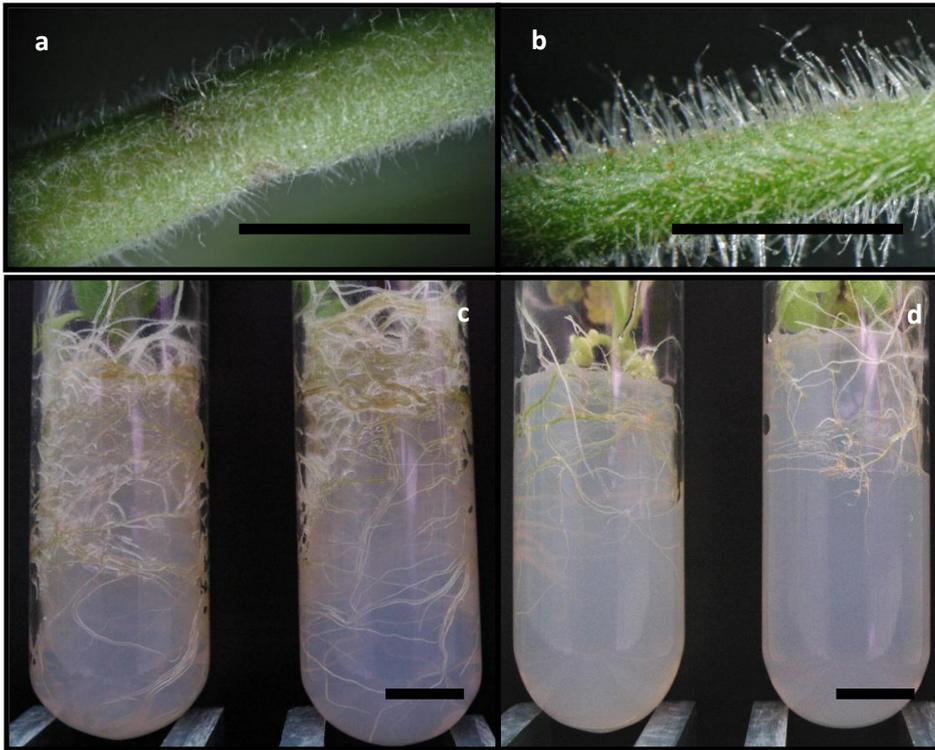


Figura 29.- Tricomas en el tallo y sistema radicular generado tras el cultivo de segmentos de tallo con yemas axilares en medio de enraizamiento; **a y c)** *S. pennellii* 'PE47'; **b y d)** mutante 4728 ET SP. La barra representa 10mm.

La expresión del gen delator en esta línea se observó en varias estructuras en cultivo *in vitro*: foliolo, peciolo, peciololo, raíz, tricomas, estomas y tallo y en cultivo *in vivo*: tallo, foliolo, tricomas y estomas.

El mutante **4874 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') presenta una alteración en el desarrollo radicular. Este mutante se detectó porque durante los distintos ciclos de multiplicación que se llevó a cabo con este material se vio como sistemáticamente presentaba un menor desarrollo radicular cuando se cultivan yemas axilares en el medio de enraizamiento. Se evaluó esta línea en condiciones de cultivo hidropónico y se pudo comprobar como en estas condiciones también se podía observar un menor desarrollo de la raíz (Fig. 30).



Figura 30.- Sistema radicular generado tras el cultivo de segmentos de tallo con yemas axilares en medio de enraizamiento (parte izquierda) y cultivo hidropónico (parte derecha) de *S. pennellii* 'PE47' (izquierda) y el mutante 4874 ET SP (derecha).

El mutante **646 ET SP** (*S. pennellii* '20164') presenta múltiples alteraciones en su desarrollo vegetativo. La planta tiene un menor ritmo de crecimiento, tiene dificultades para enraizar y la morfología de las hojas presenta ciertas alteraciones. Todos estos cambios han hecho inviable su aclimatación por lo que sólo se ha podido evaluar su fenotipo en condiciones de cultivo *in vitro*. Además, en alguna ocasión se ha observado la aparición de flores en dichas condiciones lo cual no ha ocurrido en ninguna ocasión con las plantas WT (Fig. 31).



Figura 31.- Fenotipo del mutante 646 ET SP que presenta la formación de flores en condiciones de cultivo *in vitro*.

II.4.2.-Mutantes afectados en el desarrollo reproductivo

La evaluación de los caracteres relacionados con el desarrollo reproductivo se han realizado en las plantas transgénicas que, tras su aclimatación, se han llevado al invernadero para obtener descendencias o para realizar algún otro tipo de experimento. En cualquier caso, entre estas plantas se han podido detectar líneas T-DNA afectados en distintos caracteres del desarrollo reproductivo y a continuación se describen cuáles han sido los mutantes más interesantes.

El mutante **475 ET SP** (*S. pennellii* '20164') fue seleccionado por la caída sistemática de sus flores. Las flores pasaban por todos los estadios de desarrollo desde botón floral hasta flor en anthesis como el WT pero en ese momento, probablemente debido a alguna alteración en la zona de abscisión del pedúnculo floral, se marchitaban y caían (Fig. 32). Las demás estructuras vegetativas eran similares a las presentadas por la línea sin transformar. La expresión del gen delator en esta línea se observó en el tallo.



Figura 32.- a planta de *S. pennellii* '20164' en floración y detalle de inflorescencia. b planta de 475 ET SP y detalle de inflorescencia.

El mutante **7027 ET SP** (*S. pennellii* 'LA0716') tiene un desarrollo vegetativo igual al WT pero presenta flores con múltiples alteraciones. Aunque estos cambios se aprecian desde los primeros estadios del desarrollo floral se pueden observar más claramente en anthesis. En concreto, se puede ver como los sépalos tienen aspecto foliar, los pétalos son sepaloideos y los estambres tiene una morfología distinta (no se observa la formación de granos de polen) y no están fusionados (Fig. 33). Todas estas alteraciones han hecho inviable la obtención de semillas tras autofecundación o retrocruce.



Figura 33.- Flores de *S. pennellii* 'LA0716' (parte superior) y del genotipo 7027 ET SP (parte inferior) en preanthesis y anthesis.

El mutante **450 ET SP** (*S. pennellii* '20164') presenta inflorescencias que tienen casi el triple de flores por inflorescencia que la planta silvestre (50,3 frente a 17,5 que presentan las plantas sin transformar). Las demás estructuras vegetativas de la planta no presentan alteraciones respecto del fenotipo de las plantas testigo aunque, en las plantas analizadas, se observó un cierto adelanto del inicio de la floración del mutante respecto del testigo sin transformar (Fig. 34)

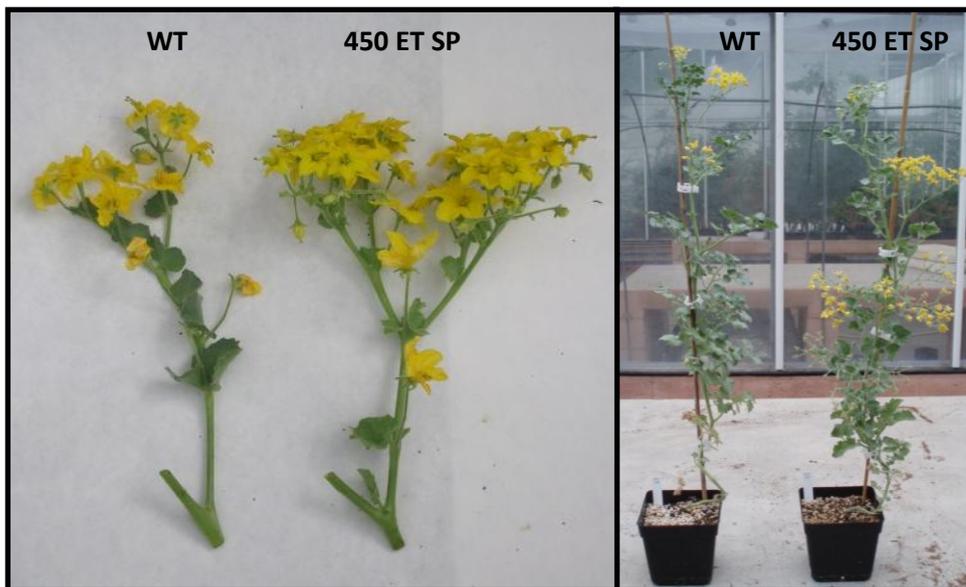


Figura 34.- Inflorescencias y plantas de *S. pennellii* '20164' y 450 ET SP crecidas en el invernadero.

Hasta el momento no se ha observado expresión del gen delator en el mutante 450 ET SP. Además, en esta línea el grupo de la Universidad de Almería realizó un Southern para conocer el número de insertos que había integrado. El resultado de este experimento fue que el mutante tiene dos insertos de T-DNA, uno completo y otro parcial (Datos no mostrados).

Se ha detectado otro mutante de multifloración, **561 ET SP**, que presenta un fenotipo similar al observado en el 450 ET SP. En este caso sí que se ha detectado expresión del gen delator en diferentes estructuras vegetativas y reproductivas (Fig. 35). Además, en esta línea, gracias a la colaboración con el grupo de la Universidad de Almería sabemos que este mutante ha integrado un único inserto de T-DNA (Datos no mostrados).

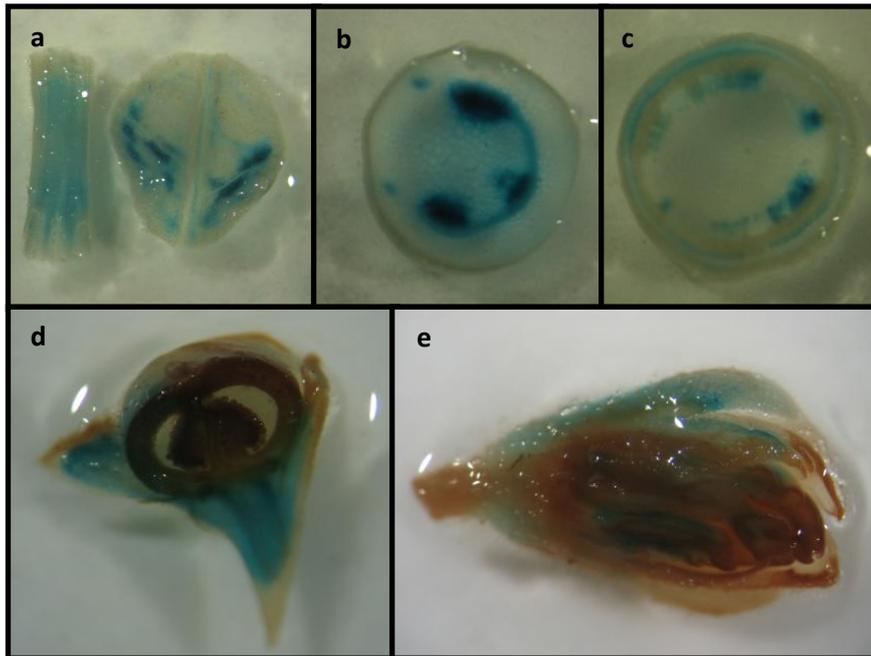


Figura 35.- Expresión del gen delator en diferentes estructuras vegetativas y reproductivas del mutante 561 ET SP. **a** foliolo y peciololo. **b** raquis. **c** tallo. **d** fruto. **e** flor en preantesis.

El mutante **483 ET SP** (*S. pennellii* '20164') se seleccionó inicialmente por mostrar un mayor tamaño de frutos respecto a la planta sin transformar. Tanto los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo como las flores e inflorescencias de esta línea no diferían de los de las plantas de la accesión '20164'. Además este genotipo presenta expresión del gen delator en granos del polen y el pericarpo del fruto (Fig. 36).

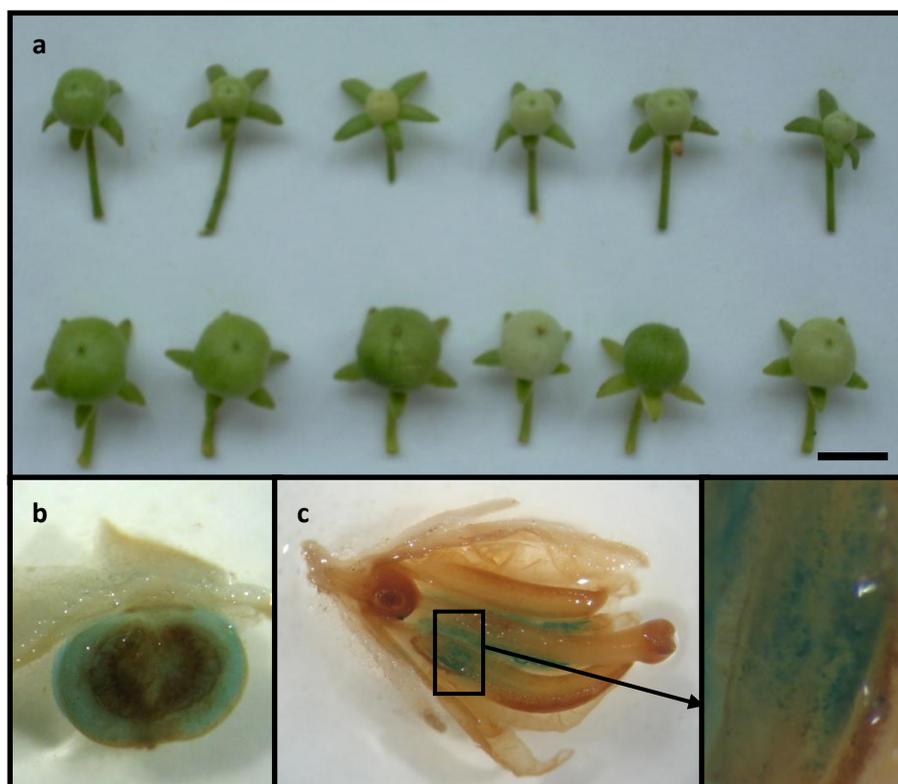


Figura 36.- Fenotipo y expresión del gen delator en diferentes estructuras reproductivas del mutante 483 ET SP. **a** Frutos de *S. pennellii* '20164' (parte superior) y 483 ET SP (parte inferior). Expresión del gen delator en: **b** pericarpio del fruto y **c** granos de polen de flor en anthesis. La barra representa 10 mm.

El mutante **488 ET SP** (*S. pennellii* '20164') se seleccionó inicialmente, al igual que el anterior, por el mayor tamaño de fruto respecto de la planta sin transformar. Además, sabemos que este mutante ha integrado un único inserto de T-DNA (Datos no mostrados). El desarrollo de este mutante a nivel vegetativo es igual al de la planta sin transformar y presenta expresión del gen delator en distintas partes del fruto (Fig. 37).

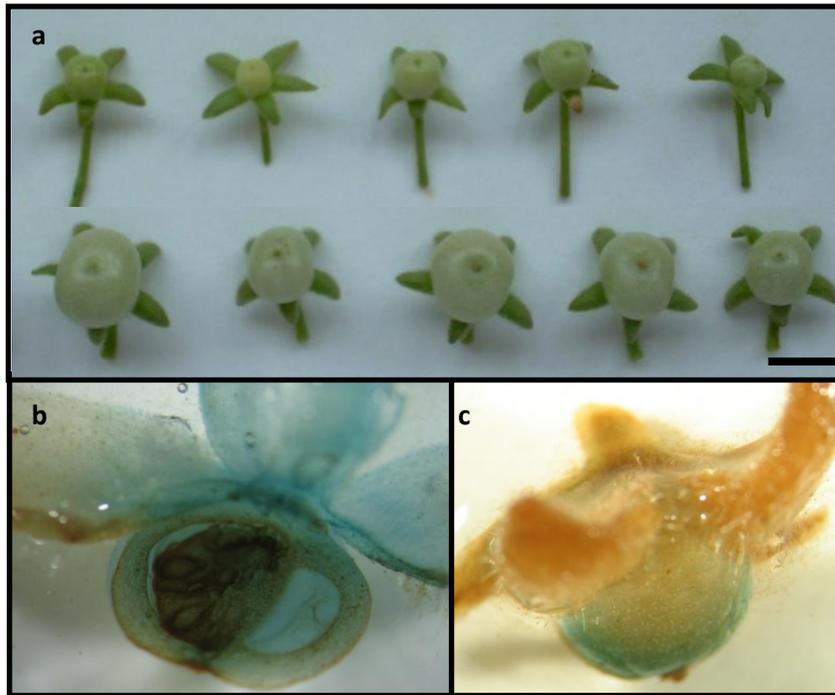


Figura 37.- Fenotipo y expresión del gen delator en el fruto del mutante 488 ET SP. **a** Frutos de *S. pennellii* '20164' (parte superior) y 488 ET SP (parte inferior). Expresión del gen delator en: **b** pericarpio y sépalos y **c** epidermis del fruto. La barra representa 10 mm.

En este caso se obtuvieron semillas viables de estos frutos, por lo que se han realizado experimentos con la segunda generación (TG2). Se analizaron 13 plantas TG2, y los resultados obtenidos fueron que 2 de las 13 plantas analizadas no presentaban frutos y en sus tejidos no se observó expresión del gen delator. Estas plantas serían las acigóticas para el transgén. En las descendencias de las otras plantas que presentaban el fenotipo mutante se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen *nptII*. De las 11 plantas TG2 evaluadas, sólo 6 dieron suficientes semillas viables TG3. En 4 de ellas la segregación no difería significativamente de 3 Kan^R: 1 Kan^S, lo cual se ajusta perfectamente a lo esperado de plantas hemicigóticas para el transgén. Las otras 2 descendencias TG3 fueron todas ellas resistentes a la kanamicina, lo cual se ajusta a lo esperado en plantas homocigóticas para el transgén. Por otro lado, la tinción GUS se pudo observar en alguno de los tejidos analizados de las 11 plantas con frutos mientras que las 2 que no tenían fruto no presentaron ningún tejido X-GLUC positivo. Por tanto, pese a que sería conveniente

realizar este ensayo con un mayor número de descendencias, hasta el momento todo apunta a que existe cosegregación entre el T-DNA y el fenotipo mutante.

El mutante **529 ET SP** (*S. pennellii* '20164') se seleccionó por el tamaño de fruto ya que se observó que era mayor que el de la línea sin transformar, de hecho su diámetro medio era más del doble que el de '20164' (9,0 mm y 4,0 mm respectivamente). Las demás estructuras vegetativas eran similares a las de la planta sin transformar, sin embargo, las flores presentaban un tamaño algo superior a las de genotipo silvestre (Fig. 38). Además, en esta línea, gracias a la colaboración con el grupo de la Universidad de Almería sabemos que este mutante ha integrado al menos cinco insertos de T-DNA (Datos no mostrados).

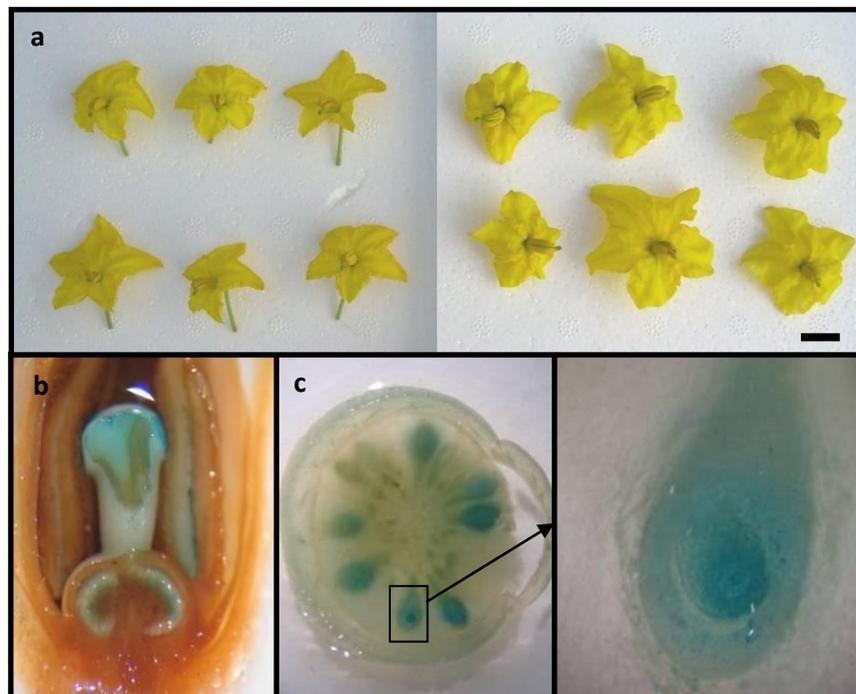


Figura 38.- Fenotipo y expresión del gen delator en diferentes estructuras reproductivas del mutante ET SP 529. **a** flores de *S. pennellii* '20164' (izquierda) del mutante (derecha). Expresión del gen delator en: **b** estigma, estilo y ovario de flor en preantesis, **c** pericarpo y semillas de fruto. La barra representa 10 mm.

En este mutante se observó que el tamaño del fruto estaba relacionado de forma directa con el número de semillas ya que, a mayor número de semillas mayor era el tamaño presentado por los frutos (Fig. 39).

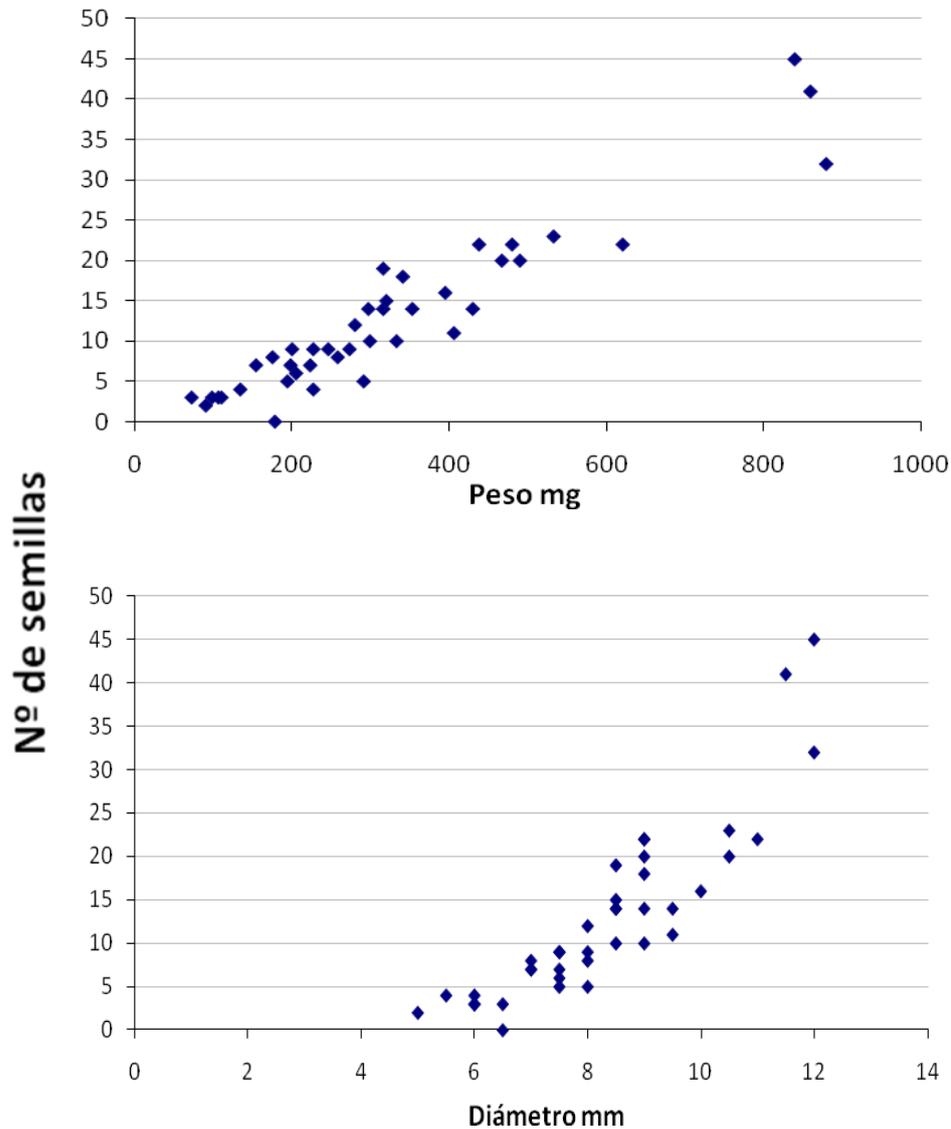


Figura 39.- Correlación entre el número de semillas y el peso (parte superior) o el diámetro (parte inferior) de los frutos de 529 ET SP.

Este resultado, junto con la constatación en el último ciclo de cultivo de invernadero de la presencia de frutos WT tan grandes como alguno de los mutantes calificados inicialmente como de tamaño de fruto, nos hizo reevaluar lo visto en dichos mutantes.

El mutante **698 ET SP** (*S. pennellii* '20164') fue seleccionado porque presentó un fenotipo similar al visto en los mutantes anteriores. Cuando se analizó la alteración que presentaba este mutante en comparación con un WT que produjo una pequeña cantidad de frutos con semillas se pudo ver que la diferencia no era únicamente el aumento de tamaño. En el mutante había un mayor número de frutos con semillas y que, como consecuencia, presentaban un mayor tamaño (Fig. 40).

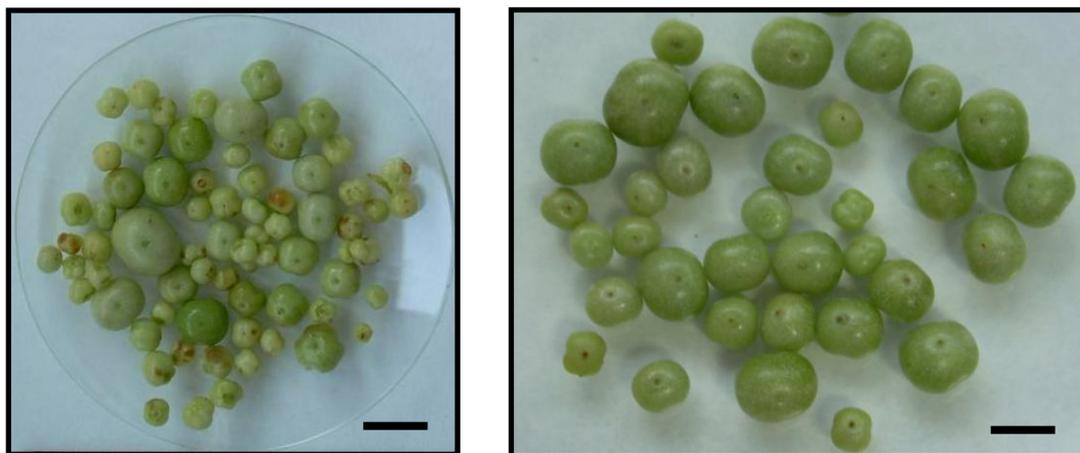


Figura 40.- Frutos de la línea '20164' (izquierda) y de la línea 698 ET SP (derecha). La barra representa 10 mm.

Cabe recordar que en la mayor parte de ciclos de cultivo en invernadero las plantas WT de la línea '20164' sólo presentaban unos pequeños frutos sin semillas que eran con los que se comparaban los posibles mutantes. Por tanto, el mecanismo que podría estar afectando al tamaño de los frutos en todos estos mutantes podría estar relacionado con el proceso de fertilización y formación de semillas que, como consecuencia de su alteración, hace que se desarrollen una mayor cantidad de frutos grandes.

El mutante **4777 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') fue seleccionado por el altísimo número de frutos cuajados. Además, al contrario que alguno de los mutantes anteriores, se pudo comprobar que estos frutos no tenían semillas viables. En cuanto al resto de caracteres, no se apreció ninguna otra diferencia con la planta silvestre (Fig. 41).

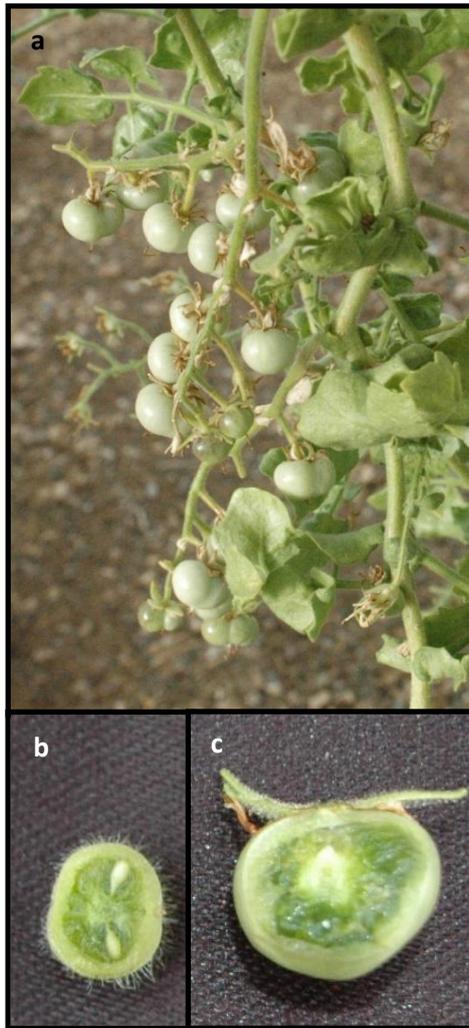


Figura 41.- Frutos de: **a** y **c** 4777 ET SP y **b** *S. pennellii* 'PE47'.

II.4.3.- Mutantes afectados en la tolerancia a estrés hídrico

Se ha realizado un análisis fenotípico y de expresión del gen *uidA* de las líneas T-DNA en condiciones de estrés hídrico a largo plazo. Esto permitió la preselección de varios mutantes que presentaron características de hipersensibilidad a la sequía. Así, de los nueve mutantes sensibles detectados en el primer experimento, tres volvieron a mostrar un fenotipo de hipersensibilidad cuando se repitió el experimento a medio plazo. A continuación presentamos las características evaluadas en los genotipos más interesantes.

El mutante **492 ET SP** (*S. pennellii* '20164') presentó sensibilidad a estrés hídrico ya que las plantas tras 30 días de exposición al tratamiento, mostraron indicios de necrosis en las

hojas basales (Fig. 42). Tras 60 días de sequía estos síntomas fueron más evidentes exhibiendo más hojas afectadas. La planta silvestre no presentaba sensibilidad a estrés hídrico tras 30 días de tratamiento y tras 60 días de exposición se apreciaban las hojas basales cloróticas, pero no presentaban zonas necróticas.



Figura 42.- a Planta de 492 ET SP planta sin tratamiento. Planta de, b 492 ET SP y c *S. pennellii* '20164', tras 30 días de estrés hídrico. Planta de, d 492 ET SP y e *S. pennellii* '20164', tras 60 días de estrés hídrico.

Se detectó expresión del gen delator en múltiples estructuras vegetativas y reproductivas. Además, como se vio en el apartado II.3.1, se ha detectado una expresión diferencial entre las plantas cultivadas en condiciones control y con estrés. En esta línea, gracias a la colaboración con el grupo de la UAL sabemos que este mutante ha integrado cuatro insertos de T-DNA (Datos no mostrados).

El mutante **515 ET SP** (*S. pennellii* '20164') se seleccionó porque presentó ápices con zonas necróticas en las plantas que se encontraban en estrés hídrico. Esta alteración, que

nunca se observó en plantas sin transformar, apareció tras ocho días de sequía. Las demás estructuras, tanto vegetativas como reproductivas, eran similares a las observadas en la planta sin transformar (Fig. 43). Los ápices afectados se mostraban a lo largo de todo el tratamiento. A consecuencia de esta necrosis el desarrollo de los folíolos era menor que el que se observaba en la planta silvestre.

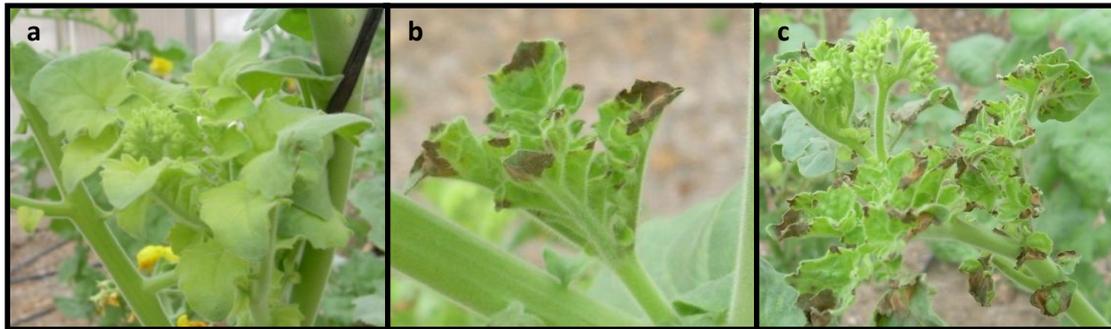


Figura 43.- Ápices del mutante 515 ET SP de plantas sin tratamiento (a), tras 21 (b) y 35 (c) días de tratamiento estresante.

II.4.4.- Mutantes afectados en la tolerancia a estrés salino

Se ha realizado un análisis fenotípico y de expresión del gen *uidA* de las líneas T-DNA en condiciones de estrés salino a largo plazo. Esto permitió la preselección de varios mutantes que presentaron características de hipersensibilidad a la salinidad. Así, de los diez mutantes sensibles detectados en el primer experimento, cuatro volvieron a mostrar un fenotipo de hipersensibilidad cuando se repitió el experimento a medio plazo. A continuación presentamos las características evaluadas en los genotipos más interesantes.

El mutante **4794 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') se seleccionó como sensible a estrés salino, porque bajo condiciones de estrés a 200mM de NaCl su desarrollo era mínimo respecto a la planta que se encontraba sin tratamiento y a la planta silvestre en ambas condiciones. Tras 30 días sometida a estrés salino, no incrementó ni su altura ni su masa vegetativa. El tamaño era el mismo que en el momento de imponer el estrés. Además de la reducción del tamaño, el color de las hojas era verde claro/amarillento. A los 60 días de tratamiento salino la planta está casi muerta, con los folíolos muy afectados y varias hojas marchitas.



Figura 44.- Planta de 4794 ET SP sin tratamiento (izquierda) y planta de 4794 ET SP tras 30 días de estrés salino NaCl 200 mM. La barra representa 10 cm.

Este mutante puede ser interesante ya que el cambio en la concentración de clorofila y, por tanto, en la eficacia fotosintética, ha servido como criterio de selección de mutantes afectados en su nivel de tolerancia a estreses abióticos (Carrari et al., 2003; Nunes-Nesi et al., 2005). La investigación de los mecanismos que tienen afectados este tipo de mutantes puede ofrecer una valiosa información sobre la relación que hay entre la tolerancia a la sal y la capacidad de algunas plantas para almacenar Na^+ en los cloroplastos.

El mutante **4542 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') fue seleccionado por su sensibilidad a la sal. Presenta una importante pérdida de turgencia tras ocho días de tratamiento salino con NaCl 200 mM. Cuando el estrés se prolonga hasta las dos semanas la mayoría de sus hojas presentan necrosis mientras que las plantas testigo prácticamente no sufren ninguna alteración importante por estar cultivadas en presencia de sal. Actualmente, estamos estudiando la respuesta a la sal en la descendencia TG2. Los resultados preliminares sugieren que hay una segregación 3 sensibles: 1 silvestre lo que correspondería con una mutación de tipo dominante. Por otra parte, gracias a la colaboración con el grupo de la UAL sabemos que este mutante ha integrado un inserto de T-DNA (Datos no mostrados).



Figura 45.- Planta de 4542 ET SP sin tratamiento (izquierda), con tratamiento salino NaCl 200 mM durante 8 días (centro) y 15 días (derecha). La barra representa 10 mm.

Por último, además de los genotipos que presentaron hipersensibilidad al estrés salino, se han analizado las características de un mutante del desarrollo frente a este tipo de estrés. El mutante **4706 ET SP** (*S. pennellii* 'PE47') se seleccionó inicialmente porque presentaba crecimiento compacto ya que tenía entrenudos más cortos que la línea sin transformar. Esta característica se observó en tres condiciones de cultivo diferentes: en invernadero, en cámara de cultivo con condiciones controladas y en cultivo *in vitro*.

Los folíolos tenían un color verde más intenso que el de la planta silvestre. A pesar del crecimiento compacto que presentó, las estructuras vegetativas y reproductivas, a excepción de los entrenudos del tallo, presentaron un tamaño similar al de la planta silvestre (Fig. 46). Además, esta línea mantenía este tipo de crecimiento a lo largo de todo el ciclo de cultivo.

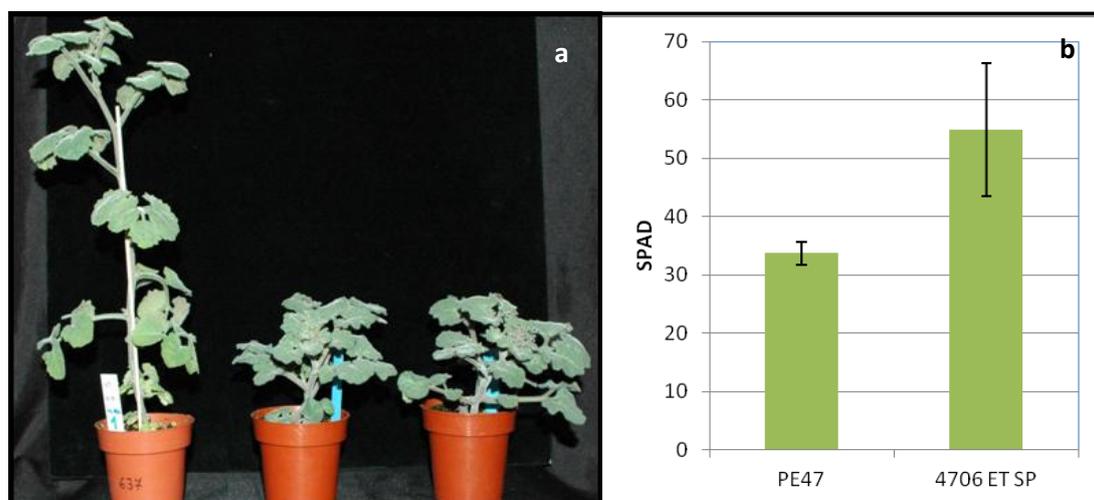


Figura 46.- a) plantas cultivadas en cámara de condiciones controladas de 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (centro y derecha). b) Contenido en clorofila (media \pm ES) de estas plantas cultivadas sin presión de selección.

En este mutante se han llevado a cabo una serie de análisis fisiológicos por su desarrollo en condiciones de estrés salino en cámara de cultivo. Tras 16 días de estrés salino a 200mM de NaCl, las plantas aparecían sin síntomas provocados por la salinidad, incluso se pudo observar que mantenía un mayor contenido en clorofila respecto de las plantas silvestres sometidas al mismo tratamiento (Fig. 47).

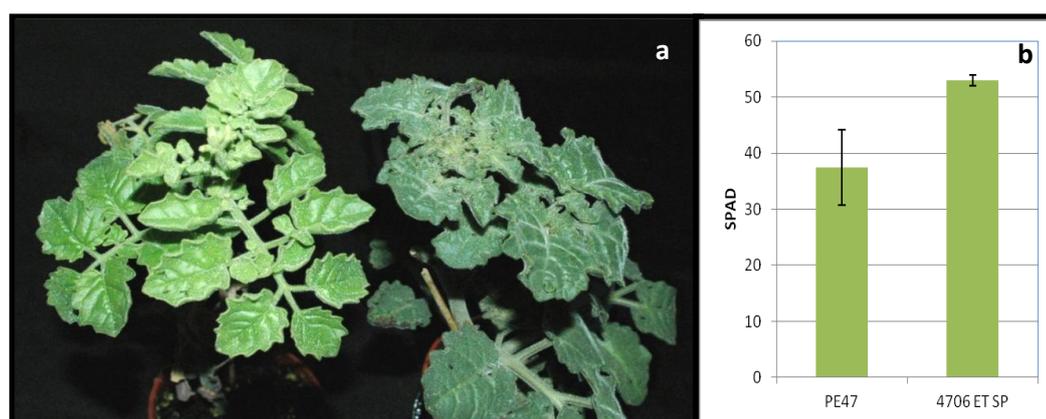


Figura 47.- a) plantas cultivadas durante 16 días con 200 mM de NaCl en cámara de condiciones controladas, 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (derecha). b) Contenido en clorofila (media \pm ES) de estas plantas cultivadas con un tratamiento de estrés salino.

Se repitió el cultivo en condiciones de invernadero primavera-verano con un tratamiento de estrés salino de NaCl 200mM. Tras 17 días de exposición, en las plantas del mutante aparecían indicios leves de estrés en comparación con las plantas sin transformar que mostraban síntomas más agudos con hojas necróticas. Se analizaron los iones en este punto del ensayo y el resultado obtenido fue que la línea 4706 ET SP presenta una menor acumulación de iones Na^+ que la planta sin transformar (261,54 mM vs 341,52 mM). Además, la relación Na^+/K^+ también era menor en el mutante que en la línea silvestre (1,50 vs 2,88).

Se realizó el mismo tipo de análisis tras 35 días de estrés salino. De nuevo, el resultado obtenido fue que la línea 4706 ET SP presenta una menor acumulación de iones Na^+ que la planta sin transformar (241,28 mM vs 269,03 mM). Además, la relación Na^+/K^+ también era menor en el mutante que en la línea silvestre (2,77 vs 3,89).

Estos resultados indican que esta línea acumula menor cantidad de iones Na^+ en la parte aérea cuando es sometida a estrés salino. Respecto a la clorofila, se pudo apreciar que el mutante tenía mayor concentración de clorofila que la planta silvestre tras 35 días de tratamiento salino a 200mM de NaCl (Fig. 48). De hecho, la protección frente a la presencia de iones perjudiciales como el sodio en las hojas podría estar relacionada con la mayor concentración de clorofila que tienen estas plantas en comparación con los testigos cuando ambos se ven sometidos a un tratamiento de estrés salino.

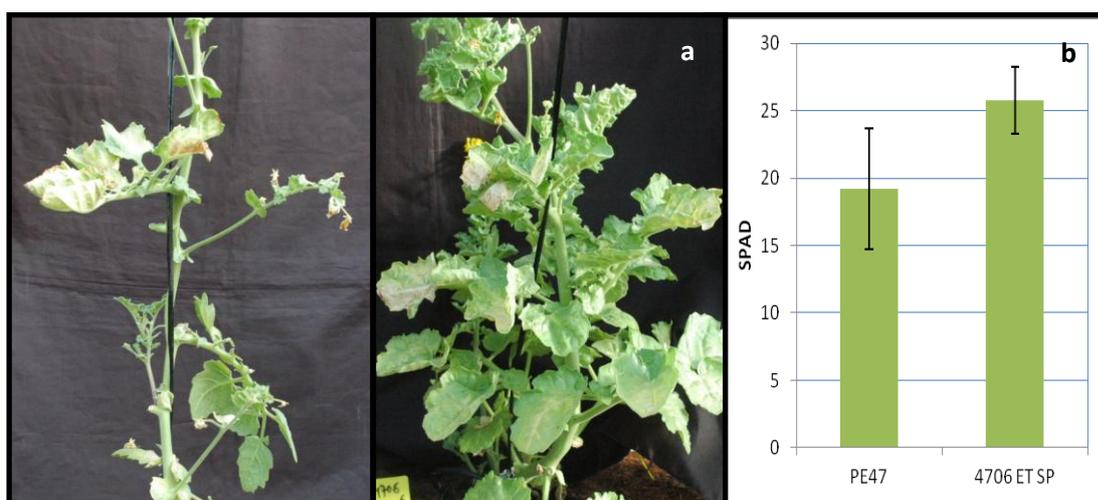


Figura 48.- a) plantas cultivadas durante 35 días con 200 mM de NaCl en el invernadero, 'PE47' (izquierda) y 4706 ET SP (derecha). b) Contenido en clorofila (media ± ES) de estas plantas cultivadas con un tratamiento de estrés salino.

Por último, el estudio de los mecanismos alterados en este mutante nos puede ayudar a encontrar estrategias de mejora frente a este tipo de estrés abiótico.

Discusión

I.-ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES *HAL5* E *IMP1* RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TOMATE

I.1.-Importancia del material vegetal y del proceso de evaluación en la identificación de genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos

La tolerancia a la salinidad y estrés hídrico de las plantas que sobreexpresan los genes *HAL5* e *IMP1* se ha evaluado en líneas homocigóticas identificadas en la tercera generación, ya que un aspecto importante a la hora de estimar la tolerancia es el material vegetal empleado. Así, el uso de transformantes primarios (TG1) puede conducir a conclusiones erróneas debido a los cambios epigenéticos que usualmente exhiben las plantas regeneradas *in vitro*. La evaluación en la generación siguiente (TG2) solventa el problema anterior, pero hay que tener en cuenta que se trata de una progenie segregante. En general, lo mejor es llevar a cabo la evaluación con líneas homocigóticas y acigóticas para el transgén (obtenidas en la generación TG3), tal como se ha realizado en este trabajo.

Por tanto, en la tercera generación se identificaron líneas homocigóticas y líneas acigóticas para el transgén procedentes del mismo evento de transformación. Además, antes de proceder al análisis funcional del gen, es conveniente seleccionar líneas transgénicas que no muestren alteraciones en su desarrollo en ausencia de estrés. De esta forma, al llevar a cabo la caracterización funcional de ese gen, los efectos observados serán los debidos exclusivamente al estrés y no a otros cambios producidos por la sobreexpresión del gen. El menor desarrollo observado en ocasiones en ausencia de estrés en las líneas transgénicas ha sido atribuido al coste energético generado por la expresión constitutiva de los transgenes (Gisbert et al., 2000; Rus et al., 2001). Este efecto negativo inducido por la sobreexpresión de un transgén bajo el promotor constitutivo 35S se observó cuando se sobreexpresó otro gen de la familia HAL implicado en la homeostasis iónica, el gen *HAL1* (Muñoz-Mayor et al., 2008).

En este trabajo se ha comprobado si en ausencia de estrés las líneas transgénicas mostraban alguna alteración (i.e. menor rendimiento) respecto el material de partida. En las líneas que sobreexpresaban *HAL5*, los valores medios de rendimiento en fruto de tres líneas homocigóticas con diferentes niveles de expresión del gen no diferían

significativamente del rendimiento de la variedad sin transformar (WT) así como del correspondiente a las líneas acigóticas (sin transgén y procedentes del mismo evento de transformación). Por tanto, la sobreexpresión de *HAL5* no genera un coste energético apreciable en ausencia de estrés, lo que es de gran interés desde un punto de vista agronómico.

En las líneas que sobreexpresan el gen *IMP1*, los rendimientos de dos de ellas no diferían significativamente de los correspondientes a sus líneas acigóticas y a la variedad sin transformar (WT), pero en las otras dos líneas (L17 y L36) sí se observó un efecto negativo en ausencia de estrés. Cuando estas líneas se cultivaron en sal, mostraron la misma respuesta, siendo su rendimiento menor que el de las otras dos líneas. El hecho de haber utilizado diferentes líneas nos ha permitido comprobar que algunas de las líneas que sobreexpresan *IMP1* están afectadas en el desarrollo en ausencia de estrés, mientras que otras no lo están. Si no se hubiesen cultivado en ausencia de estrés las dos líneas afectadas en su desarrollo, podríamos haber llegado a una conclusión errónea, que estas líneas eran más sensibles a la salinidad.

Una de las causas que probablemente han limitado la validez de algunos estudios dirigidos a identificar genes implicados en la tolerancia a estreses abióticos ha sido el modo en que se ha evaluado dicha tolerancia. Diferentes revisiones recogen un gran número de genes implicados en tolerancia a salinidad, especialmente en especies modelo como *Arabidopsis* (Hirayama y Shinozaki, 2010), pero en la mayor parte de los trabajos relacionados con el tema, el efecto de los transgenes se evalúa mediante ensayos de germinación de semillas, tratamientos muy cortos o de choque, o bien sobre la base de variables de crecimiento vegetativo. Es conocido que la tolerancia a la salinidad mostrada por una planta a corto plazo puede ser diferente a la mostrada a largo plazo, ya que diferentes mecanismos frente a los estreses osmótico e iónico inducidos por la salinidad pueden operar de manera preferencial en un caso u otro (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008).

El proceso de evaluación es incluso más complejo en la tolerancia al estrés hídrico debido a los diferentes mecanismos utilizados por las plantas frente a la respuesta a la sequía (Berger et al., 2010). Una de las estrategias frente a la sequía es evitar la deshidratación, considerada como una estrategia adaptativa donde las plantas cierran estomas para

evitar la pérdida de agua y mantener el estado hídrico. La otra estrategia es la tolerancia a la deshidratación, donde las plantas mantienen el turgor a través del ajuste osmótico (Collins et al., 2008; Blum 2009). Desde un punto de vista agronómico, la tolerancia a la deshidratación es la mejor estrategia ya que permite mantener el rendimiento en condiciones de estrés.

Debido a los diferentes mecanismos de tolerancia que las plantas utilizan para mantener el desarrollo frente al estrés hídrico, así como a los cientos o miles de genes que incrementan o reducen su expresión bajo sequía (Shinozaky y Yamaguchi-Shinozaky, 2007), y que pueden variar en función del estado de desarrollo, del órgano de la planta e incluso del momento del día analizado, es muy común encontrar en la literatura que la tolerancia a la sequía es un carácter muy complejo (Sinclair 2011). Sin embargo, Blum (2011) señalaba recientemente que la complejidad no se debe a la tolerancia a la sequía *per se*, sino al uso de procedimientos experimentales inadecuados que llegan a producir resultados confusos. Un ejemplo son las plantas transgénicas acumuladoras de ABA, que se mantienen turgentes durante más tiempo en condiciones de sequía debido a su mayor cierre estomático y se definen como tolerantes. Hay numerosos artículos donde la mejora de la tolerancia a la sequía está asociada a la acumulación de ABA a causa de la reducción en la transpiración (Blum, 2011). Sin embargo, los resultados a largo plazo pueden ser totalmente distintos, ya que la transpiración mantenida mediante un mejor ajuste osmótico es el carácter relacionado con la tolerancia al ser capaz de mantener la producción a largo plazo (Blum, 2009).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre tolerancia a la sequía se han llevado a cabo con tratamientos de choque que inducen estrategias de evitación del estrés y cuya respuesta es medida a las pocas horas o días (Verslues et al., 2006, Passioura y Angus, 2010). Un buen ejemplo de las diferentes respuestas que se pueden encontrar en función del modo de aplicar el estrés hídrico es la diferente respuesta a la sequía encontrada en un mutante del gen *SAL1*, un inositol polifosfato 1-fosfatasa que fue originalmente aislado de *Arabidopsis* (Quintero et al., 1996). El mutante *fry1-1* (*fiery*), que tiene mayor nivel basal de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y mayor expresión de algunos genes de respuesta, fue caracterizado por Xiong y colaboradores (2001) utilizando agentes de estrés y paradójicamente encontraron que este mutante era muy sensible a la salinidad, el frío y

la sequía. Posteriormente, Wilson y colaboradores (2009) comprobaban que tanto *fry1-1* como otros mutantes del gen *SAL1* mostraban mayor tolerancia a la sequía cuando el estrés hídrico se aplicaba mediante la retirada del riego de las plantas. Estos autores justificaban los resultados contradictorios sobre la tolerancia a la sequía del mutante *fry1-1* como una consecuencia de las diferentes condiciones de imposición del estrés hídrico. En este sentido, los tratamientos con altas concentraciones de manitol o PEG pueden conducir a efectos no relacionados con el estrés hídrico (Verslues et al., 2006). Sin embargo, la evaluación de la tolerancia a la sequía mediante tratamientos de deshidratación a plantas intactas también es complejo, ya que debe hacerse de manera muy cuidadosa y se requieren controles adecuados que aseguren que todas las plantas están expuestas al mismo nivel de estrés (Verslues et al., 2006).

Según Blum (2011), cuando se ha identificado un gen candidato y se procede a evaluarlo rigurosamente los resultados conducen a mecanismos de tolerancia a la sequía realmente simples como la capacidad de ajuste osmótico de las hojas, el más importante para mantener el rendimiento en muchas especies (Blum, 2011) incluido el tomate (Muñoz-Mayor et al., 2008). En este sentido, Varshney y colaboradores (2011) mostraban el creciente número de publicaciones entre 2000 y 2009 sobre mejora molecular e ingeniería genética aplicada a la sequía, mientras que el número de publicaciones sobre experimentos a largo plazo de transformación genética era muy escaso.

Para dilucidar si los genes *HAL5* e *IMP1* inducen tolerancia a la salinidad y/o estrés hídrico en tomate se han realizado ensayos a largo plazo para ver cómo se veían afectadas las plantas desde un punto de vista fisiológico y agronómico. Para evaluar la tolerancia al estrés hídrico, se utilizó en primer lugar un nivel constante de riego para evaluar la respuesta a largo plazo de las plantas que sobreexpresaban el gen *IMP1*. De este modo las plantas mantienen su crecimiento a largo plazo y se pueden observar las diferencias en el desarrollo causadas por el efecto del transgén. Además, para llevar a cabo la caracterización fisiológica, se utilizó la deshidratación progresiva del sustrato hasta marchitez seguida de la recuperación de las plantas, es decir, el nivel de estrés se iba incrementando con el tiempo. De esta forma se pueden observar tanto los mecanismos de evitación como los de tolerancia a la deshidratación. Además, para asegurarnos de que las plantas recibían el mismo nivel de estrés hídrico, en estos ensayos se ponían

enfrentadas (en el mismo recipiente) una planta homocigótica y su correspondiente control (planta acigóticas). De esta manera los cambios detectados no podían ser debidos diferencias entre las velocidades de deshidratación de las diferentes macetas empleadas.

I.2.-La sobreexpresión del gen *HAL5* incrementa la tolerancia a salinidad en tomate a nivel de planta y a nivel celular

Se ha demostrado que la sobreexpresión de *HAL5* incrementa la tolerancia a la salinidad en tomate en base al peso total de frutos por planta, el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. Además, la tolerancia a la salinidad se muestra tanto en las poblaciones segregantes como en líneas homocigotas para *HAL5*. Esto no ocurría al sobreexpresar el gen *HAL1* en tomate, ya que la mayor tolerancia inducida por la expresión de este gen a largo plazo se manifestaba principalmente en las poblaciones segregantes TG2 (donde predominan las plantas hemicigóticas) o bien en las líneas hemicigóticas obtenidas por cruzamiento entre acigóticas y homocigóticas (Rus et al., 2001), mientras que la expresión del transgén en homocigosis no confería mayor tolerancia que en hemicigosis (Muñoz-Mayor et al., 2008).

La alta expresión de un gen en las plantas transgénicas de partida no tiene porqué ser un indicativo del grado de tolerancia a la salinidad de las correspondientes líneas transgénicas. Se cuantificó por RT-PCR los niveles de expresión de *HAL5* en varias líneas homocigóticas y se seleccionaron tres líneas de alto, medio y bajo nivel de expresión. De acuerdo con los resultados obtenidos, el nivel de expresión del gen *HAL5* no presenta una correlación directa con el nivel de tolerancia, ya que la línea con mayor expresión de *HAL5* (L2) muestra una respuesta similar al WT, mientras que la línea con menor expresión de *HAL5* de las tres analizadas (L65) muestra la mayor tolerancia a salinidad. El hecho de que L2 de mayor expresión del gen muestre una respuesta similar al WT puede ser debido a un silenciamiento del gen. De hecho, la cantidad de transcrito que generaran determinadas plantas homocigóticas para el inserto transgénico podría exceder un umbral crítico, lo que activaría mecanismos de silenciamiento post-transcripcional (Kohli et al., 2003). Este tipo de silenciamiento génico puede ocurrir en plantas transgénicas que portan potentes promotores como el 35S, aunque suele estar condicionado por los efectos de posición, es decir, por la localización específica del T-DNA en el cromosoma de

la planta. Por tanto, la idea inicial de que un mayor nivel de expresión del gen se debe reflejar en un mayor grado de tolerancia no siempre es así.

Diferentes estudios llevados a cabo por nuestro grupo entre diferentes líneas de tomate habían demostrado que la respuesta a la salinidad en cultivo de callos estaba relacionada con la tolerancia a nivel de planta (Cano et al., 1996; Rus et al., 1999). Esta correlación *in vivo-in vitro* también se había detectado en diferentes trabajos en los que se evaluaba la respuesta a la salinidad en plantas transgénicas (Rus et al., 2001; Muñoz-Mayor et al., 2008). Hemos comprobado que la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *HAL5* también se expresa a nivel celular puesto que en estas condiciones la línea 65, que presentaba un mejor comportamiento a largo plazo, fue la que mostró un mayor nivel de tolerancia a salinidad. Por otra parte, también hemos demostrado que la tolerancia inducida por la sobreexpresión de *HAL5* se manifiesta a medio plazo en el desarrollo vegetativo de la planta, sin necesidad de llegar a completar el ciclo vegetativo. Si bien, las diferencias entre el grado de tolerancia a la salinidad de las líneas transgénicas evaluadas a medio plazo, a nivel de planta o a nivel celular, se observan a mayores niveles de estrés que los utilizados al evaluar la tolerancia a largo plazo en base al peso total de frutos por planta. Esto puede ser interpretado como una respuesta bifásica frente a los cambios inducidos por un tratamiento salino. Una primera fase es la osmótica y la segunda fase vendría determinada por el daño provocado por la acumulación de los iones salinos, de manera que el tiempo requerido para detectar diferencias entre genotipos puede depender del grado de tolerancia a la sal del genotipo y del nivel de estrés aplicado (Pérez-Alfocea et al., 1993). Así, genotipos con diferente grado de tolerancia a la salinidad pueden mostrar respuestas similares si la duración del tratamiento no es suficiente para alcanzar la segunda fase, ya que los resultados mostrarían la respuesta debida exclusivamente al efecto osmótico, mientras que a mas largo plazo quedaría de manifiesto el diferente grado de tolerancia a la salinidad de los genotipos en base al estrés iónico, tal como ha sido observado en tomate (Martínez-Rodríguez et al., 2008). Esta parece ser una de las principales causas que limitan la validez de los resultados encontrados en el análisis funcional de diferentes genes (Pineda et al., 2012). La otra causa es el nivel de estrés, que es la que justifica que la tolerancia a la salinidad de las plantas que sobreexpresan *HAL5* se muestre a mayores niveles de estrés cuando se

acorta el periodo de aplicación del tratamiento salino, lo que está de acuerdo con el hecho de que la segunda fase (iónica) empieza a manifestarse antes al incrementar los niveles de estrés.

I.3.-La tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* en tomate está asociada a la regulación del transporte de Na^+ a la parte aérea y menor acumulación de Na^+ en hoja

En tomate se ha comprobado que, además del efecto específico de la sal, el efecto osmótico inducido por la sal fuera de las raíces puede tener un efecto importante sobre el desarrollo y rendimiento, y por tanto no solo el estrés iónico debería ser tenido en cuenta para mejorar el rendimiento de los cultivos (Estañ et al., 2005; Martínez-Rodríguez et al., 2008). La importancia del efecto osmótico quedó claramente demostrada cuando se sobreexpresó otro de los genes de levadura que regulan el transporte de Na^+ , el gen *HAL1*. La mayor tolerancia estaba asociada a la capacidad de las plantas que expresan *HAL1* para mantener la homeostasis iónica a lo largo del ciclo vegetativo, reduciendo significativamente la acumulación de Na^+ en hojas (Muñoz-Mayor et al., 2008). Sin embargo, la elevada capacidad de exclusión de Na^+ de la línea homocigótica causaba otro tipo de problema que se reflejaba negativamente en la tolerancia. Así, la alta exclusión de Na^+ en las hojas inducía una mayor síntesis y acumulación de solutos orgánicos (azúcares y ácidos orgánicos) para mantener el balance osmótico, lo cual es energéticamente mucho más costoso (Muñoz-Mayor et al., 2008).

Sin embargo, esto no parece ocurrir en las plantas que sobreexpresan *HAL5*. Así, la tasa de acumulación iónica a lo largo del tiempo muestra una pendiente mucho mayor durante los primeros días de tratamiento tanto en plantas WT como transgénicas, seguida de una segunda etapa donde la velocidad de acumulación es mucho menor e incluso tiende a estabilizarse o mantenerse con el tiempo de tratamiento. Esta respuesta en dos fases sugiere que inicialmente las plantas tratan de recuperar la homeostasis osmótica, debido al estrés osmótico inducido por la salinidad y después la homeostasis iónica. Durante esta primera fase, la acumulación de Na^+ en las plantas transgénicas es similar e incluso tiende a aumentar respecto al WT, lo que indica que la expresión de *HAL5* no afecta a la homeostasis osmótica y utiliza iones del sustrato como Na^+ para realizar el

ajuste osmótico. Respecto a los solutos orgánicos, las plantas transgénicas solo muestran una ligera acumulación de azúcares a largo plazo. Por tanto, las plantas que expresan *HAL5* son capaces de recuperar la homeostasis osmótica en condiciones de estrés salino utilizando iones del sustrato que son menos costosos desde un punto de vista energético. Esta es la mayor ventaja que presenta el gen *HAL5* frente al gen *HAL1* estudiado anteriormente, y es que la estrategia excluidora de Na^+ se mostraba a lo largo del ciclo de cultivo en las plantas que sobreexpresaban *HAL1* (Muñoz-Mayor et al., 2008), mientras que en *HAL5* no ocurre así hasta después de un cierto tiempo de tratamiento.

No es descartable que *HAL5* pudiera incluso estar induciendo una mayor absorción y transporte de iones a la parte aérea tras la imposición del estrés para recuperar la homeostasis osmótica, estrategia utilizada por las plantas tolerantes a la salinidad (Mian et al., 2011), puesto que tanto en las plantas desarrolladas a 100 como a 200 mM NaCl se ha observado una tendencia a incrementar la acumulación de Na^+ en tallo e incluso en algún caso también en hoja. No sería éste el primer gen que actuase de manera diferente según el nivel de estrés. Un ejemplo es el transportador de Na^+ de membrana plasmática *SOS1*, cuya función parece ser diferente en función del nivel de estrés en *Arabidopsis*. A niveles moderados de estrés, *SOS1* parece funcionar en la carga de Na^+ del xilema para transportar Na^+ a la parte aérea y almacenarlo en las células del mesófilo, lo que facilitaría el ajuste osmótico y desarrollo de la planta (Shi et al., 2002). A altos niveles de estrés, este transportador parece funcionar restringiendo la absorción en raíz y recuperando Na^+ desde el xilema en la raíz adulta, ayudando ambos procesos a limitar la rápida acumulación de Na^+ en la parte aérea, ya que las plantas que sobreexpresaban *SOS1* acumulaban menos Na^+ en el xilema y en la parte aérea (Shi et al., 2003). En tomate, *SOS1* parece transportar iones a la parte aérea y redistribuirlos hacia las hojas adultas para evitar la toxicidad en la hojas jóvenes (Olias et al., 2009).

Con el objetivo de dilucidar si la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *HAL5* estaba asociada o no a la acumulación de Na^+ , se analizó la concentración de Na^+ en las hojas de las plantas de las líneas transgénicas con diferentes niveles de expresión. Los resultados corroboran que la mayor tolerancia inducida por *HAL5* en la línea transgénica L65 estaba asociada a una menor acumulación de Na^+ en hoja, mientras que

la línea L2 que no incrementaba su tolerancia respecto al WT tenía niveles de Na^+ en hoja similares a los del WT después de 50 días de tratamiento salino.

Además, al estudiar la velocidad de acumulación y de translocación a la parte aérea de Na^+ desde la aplicación del estrés se comprobó que las plantas transgénicas eran capaces de regular el transporte de Na^+ a la parte aérea a partir de un periodo de tratamiento que debe corresponder a la fase iónica, donde las concentraciones de Na^+ en hoja y tallo son significativamente menores en las plantas transgénicas que en el WT. Por tanto, el mecanismo de acción de *HAL5* está relacionado con una menor absorción y reducción del transporte de Na^+ hacia la parte aérea, evitando así que se lleguen a alcanzar niveles tóxicos de Na^+ en hoja. En esta segunda fase (entre los 14 y 28 días) se observa sin embargo una diferente respuesta en función del nivel de estrés. En las raíces de las plantas desarrolladas a 100 mM NaCl no se encuentran diferencias en la acumulación de Na^+ del WT y la línea transgénica durante todo el periodo de tratamiento (28 días). Sin embargo, al incrementar el nivel de estrés a 200 mM NaCl empieza a observarse desde los 14 días una mayor acumulación de Na^+ en las raíces de la línea transgénica respecto al WT. Esta diferente respuesta sugiere que al incrementar el nivel de estrés la línea transgénica es capaz de reducir el transporte de Na^+ a la parte aérea mediante la acumulación en raíz, mientras que el WT no es capaz de retenerlo. Esto no demuestra que los mecanismos sean diferentes en función del nivel de estrés, sino que al incrementar el nivel de estrés se alcanzarán antes los niveles tóxicos, y esto provocará que se pongan en marcha los mecanismos dirigidos a recuperar la homeostasis iónica.

En resumen, las plantas tolerantes a la salinidad que sobreexpresan *HAL5* son capaces de incrementar significativamente la acumulación de Na^+ en raíz cuando se desarrollan a un nivel de estrés elevado y reducir el transporte de Na^+ a la parte aérea. Es interesante señalar que los porcentajes de reducción en la translocación de Na^+ a la parte aérea de las plantas transgénicas, respecto al WT, son del mismo orden (alrededor del 30%) independientemente del nivel de estrés (100 y 200 mM NaCl), lo que sugiere que el mecanismo que está operando en las plantas que sobreexpresan *HAL5* es independiente del nivel de estrés, y las mayores diferencias encontradas al aumentar el nivel de estrés obedecen a los mayores niveles de Na^+ absorbidos y transportados a la parte aérea cuando se duplica el nivel de estrés.

El potasio tiene varias funciones dentro del metabolismo de las células, ya que es uno de los principales solutos para mantener el turgor y, por tanto, para la expansión celular. También influye en el funcionamiento de los estomas y es necesario para la actividad de muchas enzimas participando en la fotosíntesis, la síntesis de proteínas y el metabolismo oxidativo (Amtmann et al., 2004; Shabala, 2003; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Ante un estrés salino, se induce generalmente una deficiencia de K^+ debido al aumento de la concentración de Na^+ , ya que el Na^+ compite con K^+ interfiriendo su absorción y transporte por los transportadores de K^+ , tanto de alta como de baja afinidad (Nieves-Cordones et al., 2010). Por ello, mantener unos niveles de potasio elevados durante el estrés salino es una de las estrategias para aumentar la tolerancia al estrés salino, y un aumento en la relación K^+/Na^+ es uno de los parámetros más importantes usados para definir la tolerancia (Olias et al., 2009).

El gen *HAL5* de levadura codifica una proteína quinasa y su mecanismo se ha correlacionado con el sistema de transporte de K^+ *Trk1/Trk2* (*TRK1* y *TRK2* son dos genes redundantes de levadura que codifican para un sistema de entrada de K^+ de alta afinidad). Sin embargo, no se ha podido demostrar la existencia de una interacción entre *HAL5* y *TRK1* (Pérez-Valle et al., 2010). Las proteínas *Trk1/Trk2* de levaduras son las homologas de los transportadores HKT que esta relacionados no tanto con el transporte de K^+ como con el transporte de Na^+ a larga distancia dentro de la planta. Transportadores del tipo HKT están descritos en *Arabidopsis*, *AtHKT1;1* (Rus et al., 2001); en arroz, *OsHKT1;5* (Ren et al., 2005) y en tomate (Asins et al., 2012). Hasta ahora no se conoce ningún estudio sobre los cambios inducidos por el gen *HAL5* en la respuesta fisiológica de las plantas ni tampoco hay ningún gen en plantas que presente homología con *HAL5*.

En este trabajo también se ha estudiado si la sobreexpresión de *HAL5* afecta a la homeostasis de K^+ en condiciones de estrés. Solo se han observado cambios en las hojas de las plantas transgénicas desarrolladas a 200 mM NaCl, pero no a un nivel de estrés menor, y además la concentración de K^+ solo incrementó significativamente en las hojas de las plantas transgénicas, respecto a las del WT, durante el periodo final de tratamiento. Es interesante señalar que en todos los experimentos llevados a cabo la relación Na^+/K^+ es menor en las plantas transgénicas que en el WT, ya que la relación Na^+/K^+ está asociada con la tolerancia a la salinidad en la mayoría de las especies (Munns

y Tester, 2008), incluido el tomate (Estañ et al., 2005). Sin embargo, los cambios en la relación Na^+/K^+ se deben principalmente a Na^+ . Se puede concluir que la tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión de *HAL5* se debe al mantenimiento de la homeostasis iónica, y especialmente a la capacidad para reducir el transporte de Na^+ a la parte aérea y la toxicidad provocada por la acumulación de Na^+ en hoja.

I.4.-La sobreexpresión del gen *IMP1* incrementa la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico en tomate

El inositol (Ins) se ha relacionado desde hace tiempo con la tolerancia a distintos estreses abióticos (Lou et al., 2007; Valluru y Van der Ende, 2011). En 1985, Sacher y Staples ya observaron que las plantas de tomate adaptadas a la salinidad presentaban mayores niveles de inositol que las no-adaptadas y una respuesta similar se observó en estudios llevados a cabo por nuestro grupo (Cayuela et al., 1996). Recientes revisiones sobre el papel del inositol en la tolerancia a estreses abióticos indican que este osmolito es punto de partida de la síntesis de fosfoinosítidos, responsables de la transmisión de señales y de adaptación al estrés. (Munnik y Vermeer, 2010; Khodakovskaya et al., 2010) y que la ruta de los fosfoinosítidos e inositol (1,4,5) trifosfato (InsP_3) está implicada en la respuesta de las plantas al estrés (Valluru y Van der Ende, 2011). En los primeros trabajos donde se utilizó la sobreexpresión para identificar genes implicados en la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico los genes candidatos eran osmolitos como prolina, glicina-betaina, manitol, etc (Reguera et al., 2011, y referencias citadas *Biochimica et Biophysica Acta*; Varshney et al., 2011). Sin embargo, son muy escasos los trabajos que demuestran realmente que la sobreexpresión de genes implicados en el metabolismo de inositol permite evitar, al menos en parte, las pérdidas de producción ocasionadas por salinidad y estrés hídrico.

En tomate se ha comprobado recientemente que el incremento del metabolismo de inositol (1,4,5) trifosfato (InsP_3) induce tolerancia a la sequía (Khodakovskaya et al., 2010). Para incrementar la hidrólisis de InsP_3 en tomate, estos autores obtuvieron líneas transgénicas que expresaban el gen de tipo humano Inositol polifosfato 5-fosfatasa que hidroliza específicamente InsP_3 e InsP_4 pero no los fosfolípidos de Ins. Es interesante señalar que cuando esta misma construcción se utilizó en *Arabidopsis*, la tolerancia a la sequía también estaba relacionada con menores niveles basales de InsP_3 (Perera et al.,

2008). Sin embargo, aún hay un gran desconocimiento sobre el papel de los genes de la ruta de síntesis de inositol en la tolerancia del tomate a la salinidad y estrés hídrico.

En este estudio se ha utilizado el gen que conduce a la síntesis de Inositol a partir de glucosa-6-fosfato y myo-inositol-1-fosfato, *IMP1* que codifica el enzima inositol mono-fosfatasa. La inositol mono-fosfatasa, soluble y sensible al Li^+ , defosforila a su vez el inositol-1-fosfato derivado de la degradación de fosfatidil-inositoles en la vía de transmisión de señales (Munnik y Vermeer, 2010). Por tanto, inositol monofosfatasa se encuentra en un punto clave de la síntesis de Ins y podría ser un regulador de las diferentes rutas derivadas del metabolismo de inositol. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la sobreexpresión del gen *IMP1* en tomate incrementa la tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico a largo plazo. Respecto a la tolerancia a la salinidad, las plantas que sobreexpresan *IMP1* incrementan su rendimiento en fruto en medio salino, pero el grado de tolerancia es mayor a un nivel moderado de sal (50 mM NaCl) que al aumentar el nivel a 75 mM NaCl. Estos resultados sugieren que el papel del gen *IMP1* podría estar relacionado con la homeostasis osmótica mas que con la homeostasis iónica, ya que es la que se muestra preferentemente a niveles moderados de estrés salino en tomate (Estañ et al., 2005).

1.5.-La tolerancia inducida por la sobreexpresión del gen *IMP1* en tomate está asociada a la tolerancia al estrés osmótico inducido por la salinidad y estrés hídrico

Las plantas transgénicas desarrolladas a un nivel moderado de salinidad (50 mM NaCl) muestran mayores reducciones del potencial osmótico en la línea homocigótica que en la acigótica tanto a medio como a largo plazo (30 y 80 días de tratamiento salino). Esta misma respuesta se observa en las plantas sometidas a cuatro ciclos sucesivos de deshidratación-rehidratación, lo que confirma que la mayor tolerancia de la línea homocigótica para *IMP1* está asociada a la tolerancia al estrés osmótico, mecanismo que permite a las plantas mantener el turgor a través del ajuste osmótico y que está asociado al mantenimiento del rendimiento en condiciones de estrés (Blum, 2011).

Para realizar el ajuste osmótico las plantas necesitan acumular solutos activamente, bien solutos inorgánicos u orgánicos. En condiciones de salinidad, las plantas pueden utilizar los iones salinos para realizar el ajuste osmótico, lo que es menos costoso

energéticamente como se señaló anteriormente (Muñoz-Mayor et al., 2008). Este mecanismo parece actuar en las plantas desarrolladas en medio salino, como la concentración de Na^+ era mayor en la línea homocigótica que en la acigótica a lo largo del ciclo de cultivo. La estrategia denominada incluidora es típica de las especies silvestres de tomate tolerantes a la salinidad (Bolarín et al., 1993; Bolarín et al., 1995), e incluso de algunas variedades de tomate cultivado, como es el cv Pera, el cual incrementa el transporte de Na^+ a la parte aérea a corto plazo o cuando se aplican tratamientos moderados que no llegan a alcanzar niveles tóxicos en las hojas (Estañ et al., 2005).

La mayor acumulación de Na^+ en hoja de las plantas transgénicas puede ser debida al transporte de inositol en el floema, actuando como una señal hacia las raíces para mantener la biosíntesis de membranas y facilitar el transporte de Na^+ a larga distancia (Nelson et al., 1998). Así, en estudios realizados con un nivel salino moderado se observó una mayor concentración de Na^+ en hoja cuando el tratamiento salino se combinaba con inositol. También hay estudios que indican que los co-transportadores de Na^+ /inositol son inducidos por estrés salino en todos los órganos de las plantas, sobre todo en raíz y tallo lo que hace que el Na^+ aumente su concentración en las hojas (Nelson et al., 1999; Gaxiola et al., 1999).

Los osmolitos compatibles como los azúcares son muy importantes en las plantas para evitar el estrés osmótico (Mahajan y Tuteja, 2005; Valliyodan y Nguyen, 2006). En las plantas sometidas a ciclos de deshidratación, la tolerancia está asociada a mayores niveles de hexosas. Es interesante señalar que la tolerancia a la sequía de plantas transgénicas de tomate con hidrólisis incrementada de InsP_3 también estaba asociada con un incremento en hexosas (Khodakovskaya et al., 2010). Según estos autores, el incremento de hexosas podía explicar el mantenimiento de mayores potenciales hídricos en hojas de plantas transgénicas sometidas a déficit hídrico, de manera similar a la respuesta observada en este estudio con las plantas que sobreexpresan *IMP1*.

En el trabajo de Khodakovskaya y colaboradores (2010), donde la activación del metabolismo de inositol induce tolerancia a la sequía en tomate, se sugiere que la activación de la hidrólisis de InsP_3 podría resultar en una reducción de la síntesis de almidón y un incremento en la tasa de síntesis de sacarosa y su exportación. En nuestro estudio, el contenido de sacarosa es mayor en las plantas transgénicas desarrolladas en

control, aunque no en estrés, es decir las plantas transgénicas tienen un mayor nivel basal. Es interesante señalar que la mayor tolerancia de halofitas se ha asociado con mayores niveles basales de diferentes metabolitos antes de aplicar el estrés, sugiriendo un mecanismo constitutivo de adaptación. Así, Sánchez y colaboradores (2008) al estudiar las diferencias metabólicas entre *A. thaliana* y la halofita *T. halophila*, señalaban como el resultado más destacable las diferencias en los niveles de metabolitos entre ambas antes de la exposición al estrés. Azúcares, como sacarosa y hexosas, junto con los ácidos cítrico, málico y succínico eran constitutivamente mayores en *T. halophila* que en *A. thaliana*. Además, es interesante la mayor acumulación de inositol y de los metabolitos de la ruta de la rafinosa derivados del inositol encontrada en la halofita en respuesta al estrés salino.

Otra característica de las plantas que sobreexpresan *IMP1* es que el contenido de inositol incrementaba con el estrés hídrico en la línea homocigótica en condiciones de estrés hídrico, y esta acumulación de Inositol podría verse también reflejada en la activación de las diferentes rutas, es decir la dinámica de su metabolismo podría ser más importante que la acumulación del producto en sí mismo. Recientemente, también se ha demostrado el papel de los inositol fosfatos en la señalización hormonal (Sheard et al., 2010). Así, estos autores han identificado al inositol pentafofato como una tercera y crucial componente del complejo co-receptor de jasmonato.

Los ácidos orgánicos también incrementan significativamente con la expresión de *IMP1* en condiciones de sequía, y este incremento es debido a oxálico, málico y succínico. En las plantas acigóticas, el único que incrementa con el estrés hídrico es el ácido málico, mientras que en las plantas transgénicas incrementan los 3 ácidos y además se alcanzan mayores niveles con el estrés, lo que corrobora el mayor grado de ajuste osmótico en las plantas que sobreexpresan *IMP1* debido a la mayor contribución de azúcares y de ácidos orgánicos en condiciones de estrés hídrico.

Considerados en conjunto todos los resultados, se puede concluir que la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico inducida por la sobreexpresión de *IMP1* está asociada a la homeostasis osmótica, ya que las plantas homocigóticas son capaces de reducir el potencial osmótico de hoja tanto a medio plazo (estrés hídrico) como a largo plazo (salinidad) mediante la acumulación de solutos inorgánicos y orgánicos. Además, se ha

comprobado que en condiciones de estrés hídrico la sobreexpresión del gen *IMP1* se traduce en una acumulación del osmolito inositol en condiciones de estrés.

II.-IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO Y SALINO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA TRAMPA DE INTENSIFICADORES EN *Solanum pennellii*

II.1.-Elección de genotipos adecuados para abordar un programa de mutagénesis insercional

Los genomas de las plantas superiores están compuestos por miles de genes que controlan diferentes caracteres. La identificación de los genes implicados en la tolerancia a la sequía y la salinidad puede proporcionar la base científica para abordar los programas de mejora genética en los años venideros. En este contexto, el análisis detallado de un mutante representa uno de los caminos más exitosos para determinar la función de un gen (Giménez et al., 2010; Kuromori et al., 2009; Atkinson y Urwin, 2012). Desde un punto metodológico, los mutantes pueden ser generados a través de mutagénesis química (e.g. EMS), física (irradiación) o insercional (transposones o T-DNA). Entre estas aproximaciones, la mutagénesis insercional se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función ya que la interrupción de un gen endógeno o la integración del inserto transgénico en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de su función. Además, el uso de la mutagénesis insercional proporciona, en principio, el camino más rápido para la clonación del gen mutado (Radhamony et al., 2005) gracias a la posibilidad de identificar este gen a partir de la secuencia conocida del T-DNA (Leoni et al., 2011).

Este trabajo se enmarca en un proyecto coordinado entre los grupos de la Dra Mari Carmen Bolarín (CEBAS), Dr. Rafael Lozano y Dra. Trinidad Angosto (Universidad de Almería) y Dr. Vicente Moreno (IBMCP) en el que se está abordando mediante la mutagénesis insercional la identificación y aislamiento de genes clave en procesos del desarrollo y tolerancia a estreses abióticos de tomate y especies silvestres relacionadas como *S. pennellii*. La capacidad de generación de líneas T-DNA en un número elevado nos está permitiendo abordar un programa de este tipo en materiales distintos a las especies modelo. Aunque esto conlleve algunas dificultades nos está permitiendo analizar

procesos que no se podrían estudiar en *Arabidopsis* (e.g. desarrollo y maduración de un fruto carnoso) o que se evalúan con más dificultad debido a su pequeño tamaño (e.g. transporte iónico a larga distancia en estudios de tolerancia a estreses abióticos; Essah et al., 2003; Tester y Bacic, 2005).

En este contexto, el empleo de una especie filogenéticamente relacionada con tomate y que presenta altos niveles de tolerancia a distintos estreses abióticos pensamos que es la mejor elección si queremos encontrar genes relacionados con estos caracteres y que puedan aportar cierta mejora a la especie cultivada. Por ejemplo, se ha estudiado el comportamiento diferencial de tomate y *S. pennellii* sometidos a condiciones de estrés salino en cuanto a sus niveles de actividad enzimática antioxidante, ya que en las plantas de tomate estos niveles eran netamente inferiores. Estos resultados se vieron en hoja (Shalata et al., 2001; Mittova et al., 2003), en raíces (Shalata y Tal, 1998; Shalata et al., 2001; Mittova et al., 2003) y en mitocondrias y peroxisomas de raíz (Mittova et al., 2004). Por lo tanto, a partir de la mayor acumulación de niveles de antioxidantes en especies silvestres como *S. pennellii* se tiene una mayor protección ante los daños causados por el aumento de ROS (Especies reactivas de Oxígeno) en las plantas sometidas a procesos de estrés (Frary et al., 2010). La identificación y clonación de los genes que controlan este mecanismo de respuesta a estrés podría ser un buen punto de partida para la mejora de la tolerancia a estreses abióticos en tomate.

II.2.-Requisitos para abordar un programa de identificación de genes mediante mutagénesis insercional

La mutagénesis insercional ha supuesto un gran avance para la detección y clonación de genes y elementos reguladores implicados en diversos procesos. Para poder emplear este abordaje es necesario obtener una cantidad considerable de plantas transformadas para poder detectar un alto número de mutantes y, como consecuencia, etiquetar los genes implicados en el carácter analizado. Por tanto, para poder llevar a cabo este objetivo es imprescindible tener un método de transformación eficaz. Las transformaciones de las tres accesiones '20164', 'LA0716', y 'PE47' de *S. pennellii* se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivo in Vitro y Mejora Vegetal del IBMCP, dirigido por el Dr. Vicente Moreno. En primer lugar, se comenzó con la generación de una colección de líneas T-DNA

con una trampa de intensificadores a partir de plantas de *S. pennellii* accesión '20164'. Se lograron 1105 plantas transgénicas diploides. Posteriormente, con el mismo protocolo de transformación, se generó una segunda colección de plantas T-DNA a partir de la accesión 'LA0716' de la misma especie, de la que se obtuvieron 50 plantas T-DNA transgénicas diploides. Esta segunda colección se obtuvo porque con la primera accesión tuvimos problemas para conseguir semillas viables TG2. Algunas plantas tenían problemas de cuajado de frutos, en otras los frutos no llegaban a desarrollarse y en ocasiones las semillas que producían no eran viables. En cualquier caso, al no poder obtener la generación TG2 no se podía llevar a cabo el estudio de segregación y la identificación de mutantes recesivos. Como la accesión 'LA0716' presentó una eficacia de transformación significativamente inferior, se realizó una tercera transformación con la accesión 'PE47' de *S. pennellii* con la que se lograron 1076 plantas transgénicas diploides.

Conviene indicar que es probable que no todos los variantes identificados sean verdaderos mutantes, ya que es posible que alguna de las líneas que exhiben ciertas alteraciones fenotípicas no sea más que un variante epigenético, debido, por ejemplo, a una alteración en el proceso de metilación del DNA (Jain, 2001). En este caso, estas alteraciones no se transmiten a la descendencia. Además, podría ocurrir también que algunos de los mutantes que hemos identificado sean de tipo somaclonal y no insercional. La variación somaclonal es la variación genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro* y puede deberse a múltiples causas (Moreno, 1997). Se ha descrito que una buena parte de los mutantes puntuales de tipo somaclonal surgen como consecuencia de la activación de elementos transponibles. Por citar un ejemplo, Hirochika et al. (1996) identificaron 15 retrotransposones en arroz (*Tos6-Tos20*) que estaban inactivos (o casi inactivos) en condiciones normales de crecimiento, pero comprobaron que tres de ellos (*Tos10*, *Tos17* y *Tos19*) se activaron en condiciones de cultivo *in vitro* y que en estas condiciones el más activo era *Tos17*. La activación de elementos transponibles *in vitro* tiene los mismos efectos que una mutación insercional (anulación de función o alteración de expresión de un gen endógeno), pero la diferencia estriba en que el gen endógeno no queda etiquetado por el T-DNA, sino por el transposón. En cualquier caso, trabajos previos del grupo del IBMCP indican que, a diferencia de lo que ocurre en melón (Moreno y Roig, 1990), la tasa de variación epigenética en plantas de tomate regeneradas en

cultivo *in vitro* es muy escasa. Por último, aunque el método de regeneración desarrollado en este laboratorio para los experimentos de transformación de *S. pennellii* hace que la frecuencia de mutaciones somaclonales sea muy baja, como en tomate, es evidente que en una colección de más de 2200 líneas T-DNA puede haber algún mutante de tipo somaclonal.

II.3.-El empleo de una trampa de intensificadores para la identificación de señales de regulación mediante el análisis de la expresión del gen delator

Los análisis de expresión del delator en líneas T-DNA con trampas génicas permiten detectar señales de regulación de genes. Al utilizar una trampa de intensificadores, la integración del T-DNA en el área de actuación de un determinado intensificador debería activar la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno. De todas las plantas analizadas, 311 presentaron expresión del gen delator en alguno de los explantes analizados, lo cual supone el 28,1% de las líneas estudiadas. En un trabajo con la misma construcción realizado en tomate se detectó expresión del gen delator en el 24,6% de las plantas analizadas (Angarita, 2009). De estas líneas, 212 genotipos presentaron expresión en más de un explante, lo que supone el 19,0% del total. En el mismo trabajo previamente referido con tomate este porcentaje fue del 19,2%. Por tanto, podemos concluir que la construcción funciona de forma similar en cuanto al número de eventos de expresión del gen delator que se pueden detectar mediante pruebas histoquímicas de explantes.

Dada las características de las trampas génicas, se pueden abordar dos tipos de estudios. En primer lugar se puede utilizar el patrón de expresión del gen delator en una línea mutante para obtener información del mecanismo de acción del gen etiquetado. Por ejemplo, un mutante hipersensible al estrés hídrico con expresión del gen delator en los estomas nos indicaría que dicho fenotipo podría estar relacionado con alguna alteración en esa parte de la planta. En segundo lugar, se puede tratar de identificar líneas T-DNA en las que hayan quedado etiquetadas señales de regulación sobre la base del análisis del patrón de expresión del gen delator en plantas donde no se haya detectado previamente ningún fenotipo mutante. Con este segundo enfoque se han analizado distintos órganos de líneas T-DNA en diferentes momentos tras la aplicación o no de un tratamiento de

estrés abiótico. En este primer experimento se detectaron diferentes problemas relacionados con la expresión del gen delator. Estos problemas se pueden enmarcar en dos tipologías, la presencia de falsos positivos (se observa coloración azul en un tejido donde no se está expresando el gen *uidA*) y de falsos negativos (no se observa expresión GUS en tejidos de genotipos que habían dado previamente expresión). Para solucionar el primer problema se ajustaron, mediante el empleo de plantas no transformadas, los parámetros que evitaban la presencia de estos falsos positivos. Esto se hizo, fundamentalmente, ajustando las condiciones de incubación con Xgluc y adicionando un 20% de metanol en su preparación. El segundo problema, la falta de reproducibilidad de los resultados de expresión que se observó en algunos genotipos, es más difícil de solucionar. Las causas pueden ser múltiples, desde variaciones de expresión del gen marcador por causas que no se controlan a variaciones en el procesado de las muestras que afectan a la reacción histoquímica. En este caso la solución que tomamos es la repetición del experimento hasta comprobar que realmente el patrón de expresión observado era consistente. En este contexto, se ha logrado identificar un genotipo (ver Fig. 23) que, de forma sistemática, presenta una expresión diferencial entre las plantas crecidas en condiciones normales y las que se han visto sometidas a un largo tratamiento estresante. Aunque en este caso, cuando se le ha sometido a condiciones de estrés hídrico, no se ha observado ninguna diferencia fenotípica respecto del material de partida, sería interesante analizar si se ha etiquetado algún gen relacionado con la tolerancia a este estrés.

Por otra parte, fruto del enorme esfuerzo realizado, se ha logrado la identificación de líneas T-DNA con patrones de expresión GUS interesantes. De entre todos los genotipos detectados, se han seleccionado, por su posible relación con aspectos de mejora, aquellos que presentan expresión en tricomas, raíces y estomas.

El género *Solanum* tiene siete tipos de tricomas: cuatro glandulares (tipos I, IV, VI y VII) y tres no glandulares (tipos II, III y V) (Boughton et al., 2005). En este género, la principal función de los tricomas es la protección frente a distintos artrópodos (fundamentalmente frente a *Lepidoptera* y *Hemiptera*, aunque también se han mostrado efectivos contra *Coleoptera*, *Diptera* y *Acarina*). Además, se ha comprobado la influencia que tiene el tipo de tricoma respecto a este carácter (Simmons y Gurr, 2005). En nuestro trabajo hemos

detectado 14 líneas T-DNA que expresan el gen delator en tricomas glandulares tipo IV y tipo VI, los mayoritarios en *Solanum pennellii* y responsables, en esta especie, de la resistencia frente a diversas plagas (Simmons y Gurr, 2005). En alguna de estas líneas la expresión del gen delator era específica, incluso se han detectado cuatro líneas en las que esta expresión se detectaba no en todo el tricoma sino exclusivamente en la glándula, donde se acumulan las sustancias que confieren la tolerancia frente a las plagas. En otros géneros se han detectado funciones muy diferentes y tremendamente interesantes. De hecho, los tricomas pueden actuar en el aumento de la tolerancia a la congelación, en la capacidad de absorción de agua, en la acumulación de sal y en la exclusión de determinados iones al exterior de la planta (Wagner et al., 2004). Por ejemplo, se ha comprobado que los tricomas de *Leontodon hispidus* pueden regular el Ca apoplástico y sacarlo a la superficie evitando su acumulación alrededor de los estomas (De Silva et al., 2001). En otras especies se ha comprobado que estas estructuras permiten la acumulación de agua en épocas de sequía y el mantenimiento de la homeostasis iónica mediante el secuestro de iones cuando se ven sometidas a condiciones salinas (Agarie et al., 2007). Estudios más recientes sobre patrones de expresión génica sugieren que los tricomas de tabaco están relacionados con mecanismos de defensa frente a estreses de tipo biótico como abiótico (Harada et al., 2010). Hasta lo que nosotros sabemos, no se ha establecido ninguna relación entre los tricomas de *S. pennellii* y su tolerancia a estreses abióticos, aunque las líneas identificadas en este trabajo podrían ser una herramienta útil para profundizar en las funciones que pueden desempeñar estas estructuras especializadas.

También se han identificado distintas líneas T-DNA con expresión de gen delator en distintas partes de la raíz. En este caso, por la dificultad que entraña el análisis de esta parte de la planta en sistemas de cultivo tradicional, se decidió analizar un número menor de líneas. Aún así, se ha identificado expresión del gen *uidA* en el 21,3% de las líneas analizadas. En un trabajo previo de nuestro grupo realizado con una pequeña muestra de líneas T-DNA de tomate en las que se analizaron únicamente las raíces de las plantas crecidas en condiciones normales (sin estrés) este porcentaje se situaba en el 14% (Angarita, 2009). Además, se han identificado algunas líneas T-DNA con expresión específica en función de la parte de la raíz (e. g. ápice) o del tratamiento recibido (e. g. plantas sometidas a un tratamiento de estrés salino).

En nuestro trabajo se han identificado una serie de líneas con expresión específica en estomas. La selección de estas líneas se basa en la importancia del papel que juegan estos órganos en la adaptación de las plantas a ambientes de estrés abiótico ya que tiene función de garantizar la entrada de CO₂, necesario para la fotosíntesis, y limitar la pérdida de agua a través de la transpiración (Chaerle et al., 2005; Roelfsema y Hedrich, 2005; Casson y Gray, 2008). El etiquetado de secuencias reguladoras de genes que confieran expresión en estos órganos nos puede ayudar a dilucidar el mecanismo de apertura y cierre de los estomas así como su relación con la tolerancia a estreses abióticos. Además, en un futuro, esta información puede resultar útil en la búsqueda de estrategias de mejora que incluyan la modificación del comportamiento de los estomas (e. g. frente a estreses de tipo abiótico) ya que se podría reducir la necesidad de agua en los cultivos (Schroeder et al., 2001).

II.4.-Identificación de mutantes en caracteres del desarrollo y de tolerancia a estreses abióticos

El análisis detallado de un mutante representa uno de los caminos más exitosos para determinar la función de un gen. Entre las diferentes alternativas para obtener mutantes, la mutagénesis insercional se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. Un ejemplo de la utilidad de esta aproximación es la identificación y análisis funcional del gen *ARLEQUIN/TAGL1* de tomate a partir de arlequín, un mutante insercional (Pineda et al., 2010; Giménez et al., 2010). En la presente Tesis Doctoral se ha logrado la detección y caracterización inicial de diversos mutantes afectados en el desarrollo vegetativo, en el desarrollo reproductivo y en la tolerancia al estrés hídrico y salino. Este es el primer paso para llegar a identificar y clonar alguno de los genes responsables de estos procesos.

La detección de mutantes del desarrollo se ha llevado a cabo a partir de lo que se ha observado en los materiales cultivados para obtener las semillas TG2 o los crecidos en las condiciones control de los experimentos de evaluación de tolerancia a estrés. En este sentido, aunque a la hora de clasificar los mutantes lo hayamos hecho de esta forma y pudiera parecer que son caracteres que no tienen ninguna relación entre sí, no es

descartable que mutantes clasificados a priori como de desarrollo pudieran tener un gran interés para la mejora de la tolerancia a los estreses abióticos (por ejemplo, un mutante que presentara un mayor número o longitud de raíces podría tener un comportamiento más adecuado frente a condiciones de estrés por sequía).

En cuanto al porcentaje de mutantes detectados respecto de las plantas analizadas, hemos podido comprobar que no difiere mucho del observado en una colección similar obtenida por el grupo del Doctor Vicente Moreno en tomate (Angarita, 2009). Sin embargo, el problema de la falta de producción de semillas en muchas de las líneas T-DNA obtenidas no ha permitido evaluar un número similar de líneas TG2 que, por la experiencia que tenemos en tomate, nos podría proporcionar un número de líneas mutantes igual o superior al detectado en TG1.

Tras la detección de un mutante y siempre en función del fenotipo observado conviene realizar una primera caracterización de dicho material en comparación con plantas de fenotipo normal. En el caso de la línea 4706 ET SP se ha podido comprobar que su fenotipo de succulencia lo muestra tanto en presencia de estrés (Fig. 47) como en condiciones de crecimiento normales (Fig. 46). Además, los primeros análisis fisiológicos realizados con este material sugieren un mecanismo diferente cuando se enfrenta a condiciones estresantes. Las accesiones de *S. pennellii* han desarrollado mecanismos de homeostasis iónica que permiten la acumulación de Na⁺ sin que aparezcan fenómenos de toxicidad iónica, frecuentes en plantas que no son tan tolerantes (Cano et al., 1996; Rus et al., 2000). Al mismo tiempo, la acumulación de iones sodio sirve para que la planta se ajuste osmóticamente con un bajo coste energético (Alarcón et al., 1993; Bolarín et al., 2001). Sorprendentemente la línea 4706 ETSP presenta una menor acumulación de Na⁺ y una menor proporción Na⁺/K⁺ en las hojas debido, probablemente a su mayor capacidad para acumular agua en sus hojas más succulentas.

Otro inconveniente que conlleva la dificultad en obtener las descendencias de las líneas mutantes es que no se puede realizar un análisis genético que permita establecer una correlación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA. La forma habitual de hacerlo es estudiar la segregación del gen marcador (en nuestro caso el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina) y el fenotipo mutante. No obstante, incluso cuando se dispone de semillas TG2, el análisis puede no ser tan sencillo como podría parecer por

la posible presencia de toda una gama de procesos (e.g. silenciamiento en homocigosis del gen marcador, letalidad ocasionada por la inserción en plantas homocigóticas, letalidad a nivel de un tipo de gametos, etc.) que pueden ocasionar desviaciones en la segregación esperada. Esto se puede complicar mucho más si, en lugar de una inserción, hay dos o más inserciones del T-DNA.

Por último, conviene indicar que esta Tesis Doctoral constituye una parte de un proyecto de investigación de mayor envergadura en el que se están utilizando dos herramientas genómicas, mutagénesis insercional y *trapping*, en tomate (cvs. p73 y Moneymaker) y varias accesiones de una especie silvestre relacionada (*S. pennellii*) que exhibe un alto grado de tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico para identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos básicos del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en la tolerancia o susceptibilidad a estos dos tipos de estrés abiótico. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral servirán, en un futuro, para la identificación y análisis funcional de genes implicados tanto en estreses abióticos como genes involucrados en procesos de desarrollo a todos los niveles.

CONCLUSIONES

Conclusiones

I. Análisis funcional de los genes *HAL5* e *IMP1* relacionados con la tolerancia al estrés hídrico y salino en plantas transgénicas de tomate

I.1.- Para evaluar la tolerancia a la salinidad y estrés hídrico de las plantas que sobreexpresan los genes *HAL5* e *IMP1*, se han seleccionado líneas homocigóticas que no muestren alteraciones en el desarrollo en ausencia de estrés con el objetivo de que la respuesta de las plantas transgénicas sea debida exclusivamente al papel del gen en la tolerancia a ambos estreses abióticos.

I.2.- La sobreexpresión del gen *HAL5* incrementa la tolerancia del tomate a la salinidad en base al peso total de frutos por planta, el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. El mayor nivel de tolerancia a la salinidad de las plantas que sobreexpresan *HAL5* también se observa en el desarrollo de callos, lo que pone de manifiesto que existe correlación entre las respuestas *in vitro* e *in vivo*.

I.3.- La alta expresión del gen *HAL5* parece inducir un silenciamiento del gen, ya que el nivel de expresión del gen está inversamente relacionado con la tolerancia, siendo la línea homocigótica con menor expresión del gen *HAL5* la que muestra mayor tolerancia a salinidad *in vivo* e *in vitro*.

I.4.- La tolerancia a la salinidad inducida por la sobreexpresión del gen *HAL5* está relacionada con la homeostasis iónica, ya que las plantas transgénicas muestran mayor capacidad de regulación del transporte de Na^+ a la parte aérea y menor acumulación de Na^+ en las hojas.

I.5.- La sobreexpresión del gen *IMP1*, que codifica el enzima inositol monofosfatasa de la ruta metabólica que conduce a la síntesis de *myo*-inositol, incrementa la tolerancia del tomate al estrés hídrico y a la salinidad, especialmente a niveles moderado de estrés.

I.6.- Las plantas homocigóticas para el gen *IMP1* muestran mayores reducciones de potencial osmótico tanto en condiciones de salinidad como de estrés hídrico, lo que demuestra que la tolerancia inducida por la expresión del gen *IMP1* está asociada a la tolerancia al estrés osmótico, estrategia que permite mantener el rendimiento en condiciones de estrés.

I.7.- La mayor capacidad de las plantas transgénicas para reducir su potencial osmótico en condiciones de salinidad está asociada a la mayor acumulación de Na^+ en hoja a lo largo del ciclo de cultivo, estrategia denominada incluidora y que es utilizada por los genotipos de tomate tolerantes a la salinidad. En condiciones de estrés hídrico, son los solutos orgánicos, azúcares y ácidos orgánicos, los que contribuyen al ajuste osmótico en las plantas que sobreexpresan el gen *IMP1*.

II. Identificación de genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico y salino mediante el empleo de una trampa de intensificadores en *Solanum pennellii*

II.1.- Para abordar un programa de identificación y aislamiento de genes mediante mutagénesis insercional, se han seleccionado tres accesiones de *Solanum pennellii* por sus características de alta tolerancia a distintos tipos de estrés.

II.2.- Se ha iniciado la generación de la primera colección de mutantes insercionales de especies silvestres de tomate. Se han obtenido 1576 plantas transgénicas diploides a partir de estas tres accesiones y se ha realizado la evaluación tanto de sus fenotipos (sin y con estrés hídrico y salino) como de la expresión del gen delator en las líneas TG1 debido a las dificultades en la obtención sistemática de progenies TG2.

II.3.- El análisis de la expresión del gen delator presente en la trampa de intensificadores ha permitido la identificación de 14 líneas con expresión en tricomas, 10 líneas con expresión en raíces y 8 líneas con expresión en estomas. En alguna de estas líneas se ha observado además un fenotipo que podría estar asociado con el patrón de expresión del gen delator. Estos materiales pueden ser de gran interés para aislar regiones reguladoras específicas de estos órganos implicados en la tolerancia de las plantas a diferentes estreses bióticos y abióticos.

II.4.- Se han identificado diversos mutantes afectados en caracteres del desarrollo vegetativo, como alto número de tricomas y menor enraizamiento, desarrollo reproductivo, como multifloración y mayor tamaño y cuajado de frutos. Además, tras la evaluación en condiciones estresantes se han detectado mutantes afectados en su tolerancia a la sequía y a la salinidad. Gracias a la naturaleza insercional de estas líneas se va a poder llegar con más facilidad a los genes responsables del fenotipo de algunos de estos mutantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, T., Guenzi, A.C., Martin, B. & Cushman, J.C. (2003).** Tolerance of manitol accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*. 131: 1748-1755.
- Agarie, S., Shimoda T., Shimizu Y., Baumann K., Sunagawa H., Kondo A., Ueno O., Nakahara T., Nose A. & Cushman J.C. (2007).** Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Theoretical Applied Genetics*. 58: 1957-1967.
- Alarcón, J. J., Sánchez-Blanco, M.J., Bolarín, M.C. & Torrecillas, A. (1993).** Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum*. 89(3): 441-447.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, Ch.C. & Ecker, J.R. (2003).** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301 (5633): 653–657.
- Alvarado, M.C., Zsigmond, L.M., Kovács, I., Cséplö, A. , Koncz, C. & Szabados, L.M. (2004).** Gene trapping with *Firefly Luciferase* in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology*. 134: 18–27.
- Amtmann, A., Armengaud, P. & Volkov, V. (2004).** Potassium nutrition and salt stress. *Membrane Transport in Plants*. 15: 293-339.
- Amtmann, A. & Sanders, D. (1999).** Mechanism of Na⁺ uptake by plant cells. In Academic Press LTD-Elsevier Science LTD. Londres. *Advances in Botanical Research*. pp 75-112.
- An, S., Park, S., Jeong, D.H., Lee, D.Y., Kang, H.G., Yu, J.H., Hur, J., Kim, S.R., Kim, Y.H., Lee, M., Han, S., Kim, S., Yang, J., Kim, E., Wi, S. J., Chung, S. H., Hong, J. P., Choe, V., Lee, H.K., Choi, J.H., Nam, J., Kim, S.R., Park, P.B., Park, K.I., Kim, W.T., Choe, S., Lee, Ch.B. & An, G. (2003).** Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology*. 133: 2040–2047.
- An, G., Lee, S., Kim, S.H. & Kim, S.R. (2005).** Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant Cell Physiology*. 46(1): 14–22.
- Andre, D., Colau, D., Schell, J., Vanmontagu, M. & Hernalsteens, J.P. (1986).** Gene tagging in plants by a T-DNA insertion mutagen that generates APH(3')II-plant gene fusions. *Molecular & General Genetics*. 204(3): 512-518.

- Angarita, M.P. (2009).** Generación de líneas T-DNA de Tomate (*Solanum lycopersicum* c.v p73) e identificación de mutantes de inserción. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. & Blumwald, E. (1999).** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*. 285(5431): 1256-1258.
- Asins, M.J., Villalta, I., Aly M.M., Olías, R., Álvarez de Morales P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E.A. & Belver, A. (2012).** Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na(+)/K(+) homeostasis. *Plant Cell Environ*. 36(6):1171-91
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., García-Sogo, B., Pérez-Martín, F., Lozano, R., Flores, F. B., Moreno, V., Bolarín, M.C. & Pineda, B. (2011).** An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*. 30(10): 1865-1879.
- Atkinson, N.J. & Urwin, P.E. (2012).** The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. 63 (10): 3523-3543.
- Azpiroz-Leehan, R. & Feldmann, K.A. (1997).** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Going back and forth. *Trends in Genetics*. 13(4): 152-156.
- Bai, Y.L. & Lindhout, P. (2007).** Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of Botany*. 100(5): 1085-1094.
- Ballinger, D.G. & Benzer, S. (1989).** Targeted gene-mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(23): 9402-9406.
- Bartels, D. & Sunkar, R. (2005).** Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 24: 23-58.
- Barthels, N., Van der Lee, F.M., Klap, J., Goddijn, O.J.M., Karimi, M., Puzio, P., Grundler, F.M.W., Ohl, S.A., Lindsey, K., Robertson, L., Robertson, W.M., Van Montagu, M., Gheysen, G. & Sijmons, P.C. (1997).** Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell*. 9: 2119–2134.
- Bedinger, P.A., Chetelat, R.B., McClure, B., Moyle, L.C., Rose, J.K.C., Stack, S.M., van der Knaap, E., Baek, Y. S., López-Casado, G., Covey, P.A., Kumar, A., Li, W., Nuñez, R., Cruz-García, F. & Royer, S. (2011).** Interspecific reproductive barriers in the tomato

- clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*. 24: 171-187.
- Bellen, H.J. (1999).** Ten years of enhancer detection: Lessons from the fly. *Plant Cell*. 11:2271–2281.
- Bennetzen, J.L., Springer, P.S., Cresse, A.D. & Hendrickx, M. (1993).** Specificity and regulation of the Mutator transposable element system in maize. *Critical Review in Plant Science*. 12 (1-2): 57–95.
- Berger, B., Parent, B. & Tester, M. (2010).** High-throughput shoot imaging to study drought responses. *Journal of Experimental Botany*. 61(13): 3519-3528.
- Bishop, G.J., Harrison, K., & Jones, J.D.G. (1996).** The tomato *DWARF* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*. 8(6): 959-969.
- Birnbaum, K. & Benfey, P.N. (2004).** Network building: transcriptional circuits in the root. *Current Opinion in Plant Biology*. 7(5): 582-588.
- Blum, A. (2009).** Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*. 112: 119–123.
- Blum, A. (2011).** Drought resistance – it is really a complex trait?. *Functional Plant Biology*. 38(19): 753-757.
- Blum, A. (1988).** Plant breeding for stress environments. *Plant breeding for stress environments*. 223 pp.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. & Apse, M.P. (2000).** Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465(1-2): 140-151.
- Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P. & Ma, S. (2006).** Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - Getting genomics going. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 180-188.
- Bolarín, M.C., Fernández, F.G., Cruz, V. & Cuartero, J. (1991).** Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(2): 286-290.
- Bolarín, M.C., Alarcón, J.J., Pérez-Alfocea, F., Sánchez-Blanco, M.J. & Torrecillas, A. (1993).** Inorganic and organic solute accumulation in plants of wild and cultivated tomato species at two different stages of growth in response to saline stress. In PF Martínez, ed. Environmental constraints in protected cultivation: possibilities for new

growing techniques and crops. Office for *Official Publications of the European Communities*, Brussels. pp 75-87.

Bolarín, M.C., Santa Cruz, A., Cayuela, E. & Pérez-Alfocea, F. (1995). Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *Journal of Plant Physiology*. 147(3-4): 463-468.

Bonnema, G., Hontelez, J., Verkerk, R., Zhang, Y.Q., Van Daelen R., Van Kammen, A. & Zabel, P. (1996). An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant Journal*. 9(1): 125–133.

Bordas, M., Montesinos, C., Dabauza, M., Salvador, A., Roig, L.A., Serrano, R. & Moreno, V. (1997). Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research*. 6: 41-50.

Borsani, O., Valpuesta, V. & Botella, M.A. (2003). Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 73: 101-105.

Bouché, N. & Bouchez, D. (2001). Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology*. 4(2): 111-117.

Boursiac, Y., Boudet, J., Postaire, O., Luu, D.T., Tournaire-Roux, C. & Maurel, C. (2008). Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant Journal*. 56(2): 207-218.

Boughton, A.J., Hoover, K. & Felton, G.W. (2005). Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*. 31(9): 2211-2216.

Bournival, B.L, Vallejos, C.E. & Scott, J.W. (1990). Genetic analysis of resistances to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics*. 79: 641-645.

Budiman, M.A., Mao, L., Wood, T.C. & Wing, R.A. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*. 10: 129–136.

Cadahia, C. (1995). Fertilización. En *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. pp 169-187:

- Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heiling, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H. & Jack, T. (1999).** Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant Journal*. 17(6): 699–707.
- Cano, E.A., Pérez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M. & Bolarín M.C. (1996).** Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports*. 15(10): 791-794
- Cano, E.A., Pérez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M. & Bolarín M.C. (1998).** Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 53 (1): 19-26.
- Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Gibon, Y., Lytovchenko, A., Loureiro, M.E. & Fernie, A.R. (2003).** Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiology*. 133(3): 1322-1335.
- Carroll, B.J., Klimyuk, V.I., Thomas, C.M., Bishop, G.J., Harrison, K., Scofield, S.R. & Jones, J.D.G. (1995).** Germinal transpositions of the maize element Dissociation from T-DNA loci in tomato. *Genetics*. 139(1): 407-420.
- Casson, S. & Gray, J.E. (2008).** Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*. 178: 9–23.
- Cayuela, E., Pérez-Alfocea, F., Caro, M. & Bolarín, M.C. (1996).** Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. *Physiologia Plantarum*. 96: 231-236.
- Collins, N.C., Tardieu, F. & Tuberosa, R. (2008).** Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiology*. 147(2): 469-486.
- Cortina, C. & Culiñez-Maciá, F.A. (2005).** Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*. 169(1): 75-82.
- Cresse, A.D., Hulbert, S.H., Brown, W.E., Lucas, J.R. & Bennetzen, J.L. (1995).** Mu1-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. *Genetics*. 140: 315–324.
- Cuartero, J. Bolarín, M.C., Moreno, V. & Pineda, B. (2010).** Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In: Jain SM, Brar DS (eds) *Molecular techniques in crop improvement*. pp 373-405.

- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Moreno, V., Pineda, B. (2008).** Tolerancia a la salinidad. En: *La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en mejora vegetal*. Eds. Ávila CM, Atienza SG, Moreno M.T. y Cubero J.I. Junta de Andalucía). pp 233-261.
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asins, M.J. & Moreno, V. (2006).** Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1045-1058.
- Cuin, T.A., Bose, J., Stefano, G., Deepa, J.H.A, Tester, M., Mancuso, S. & Shabala, S. (2011).** Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na⁺/H⁺ exchangers in salinity tolerance in wheat: in planta quantification methods. *Plant, Cell and Environment*. 34: 947-961.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A. & Leigh, R.A. (2003).** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany*. 54(383): 657-661.
- Chaerle, L., Saibo, N. & Van der Straeten, D. (2005).** Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends in Biotechnology*. 23:308–315.
- Chen, S., Jin, W., Wang, M., Zhang, F., Zhou, J., Jia, Q., Wu, Y., Liu, F. & Wu, P. (2003).** Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant Journal*. 36(1): 105–113.
- Chen, T.H.H. & Murata, N. (2008).** Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*. 13(9): 499-505.
- Chen, W.J. & Zhu, T. (2004).** Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends in Plant Science*. 9(12): 591-596.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J.K. (2005).** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 45: 437-448.
- De Costa, W., Zörb, C., Hartung, W. & Schubert, S. (2007).** Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum*. 131(2): 311-321.
- De Greve, H., Nguyen, V.K., Deboeck, F., Thia-Toong, L., Karimi, M. & Hernalsteens, J.P. (2001).** T-DNA tagging of the translation initiation factor *Eif-4A1* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 161(4): 685–693.
- De Silva, D.L., Mansfield, T.A. & McAinsh, M.R, (2001).** Changes in stomatal behaviour in the calcicole *Leontodon hispidus* due to the disruption by ozone of the regulation of apoplastic Ca²⁺ by trichomes. *Plant Molecular Biology*. 18(6): 1163-1172.

- Dehan, K. & Tal, M. (1978).** Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrigation Science*. 1: 71–76.
- Deyholos, M.K. (2010).** Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant Cell Environ.*33(4): 648-54.
- Ellul, P., Ríos, G., Atarés, A, Roig, L.A., Serrano, R. & Moreno, V. (2003).** The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.] *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 462-469.
- Enoki, H., Izawa, T., Kawahara, M., Komatsu, M., Koh, S., Kyojuka, J. & Shimamoto, K. (1999).** Ac as a tool for the functional genomics of rice. *Plant Journal*. 19(5): 605–613.
- Estañ, M.T., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T.J. & Bolarín, M.C. (2005).** Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *Journal of Experimental Botany*. 56: 703-712.
- Eulgem, T. (2005).** Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*. 10(2): 71-78.
- Essah, P.A., Davenport, R. & Tester, M. (2003).** Sodium influx and accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 133: 307–318.
- Farrar, K., Evans, M., Topping, J.F., Souter, M.A., Nielsen, J. & Lindsey, K. (2003).** *EXORDIUM*— a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 33(1): 61–73.
- Feldmann, K.A. (1991).** T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis mutational spectrum. *Plant Journal*. 1(1): 71–82.
- Feldman, K.A., Marks, M.D., Christianson, M.L. & Quatrano, R.S. (1989).** A dwarf mutant of Arabidopsis generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science*. 243(4896): 1351-1354.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E & Mello, CC. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.391(6669): 806-11.
- Flowers, T.J. & Colmer, T.D. (2008).** Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*.179(4): 945-63.
- Flowers, T. J. (2004).** Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 55: 307-319.

- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. & Yeo, A.R. (1991).** Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment*. 14: 319–325.
- Fobert, P.R., Labbé, H., Cosmopoulos, J., Gottlob-McHugh, S., Ouellet, T., Hattori, J., Sunohara, G., Iyer, V.N. & Miki B.L. (1994).** T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant Journal*. 6(4): 567–577.
- Foolad, M.R. (2007).** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*. 2007: 64358.
- Franzmann, L.H., Yoon, E.S. & Meinke, D.W. (1995).** Saturating the genetic-map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant Journal*. 7(2): 341-350.
- Frary, A., Gol, D., Keles, D., Okmen, B., Pinar, H., Sigva, H. O., Yemencioğlu, A., Doganlar & S. (2010).** Salt tolerance in *Solanum pennellii*: Antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*. 6: 10: 58.
- Frary, A., Keleş, D., Pinar, H., Göl D. & Doğanlar, S. (2011).** NaCl tolerance in *Lycopersicon pennellii* introgression lines: QTL related to physiological responses. *Biologia Plantarum*. 55(3): 461-468.
- Fu, F.F., Ye, R., Xu, S.P. & Xue, H.W. (2009).** Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population. *Cell Research*. 19(3): 380-391.
- García-Abellán, J.O. (2011).** Análisis de mutantes como herramienta genómica para la identificación de genes implicados en la tolerancia a la salinidad del tomate. Tesis Doctoral: Universidad de Murcia.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Do Choi, Y., Kochian, L.V. & Wu, R.J. (2002).** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 15898-15903.
- Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L. & Fink, G.R. (1999).** The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 1480–1485.
- Gidoni, D., Fuss, E., Burbidge, A., Speckmann, G.J., James, S., Nijkamp, D., Mett, A., Feiler, J., Smoker, M., de Vroomen, M.J., Leader, D., Liharska, T., Groenendijk, J., Coppoolse, E., Smit, J.J. M., Levin, I., de Both, M., Schuch, W., Jones, J.D.G., Taylor, I.B., Theres, K. & Van Haaren, M.J.J. (2003).** Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines

designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology*. 51: 83-98.

- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V. & Lozano, R. (2010).** Functional analysis of the *arlequin* mutant corroborates the essential role of the *ARLEQUIN/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *PLOS ONE*. 5(12):e14427.
- Giovannoni, J.J. (2004).** Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: 170–180.
- Gisbert, C., Arrillaga, I., Roig, L.A. & Moreno, V. (1999).** Acquisition of a collection of *Lycopersicon pennellii* (Corr. D'Arcy) transgenic plants with uidA and nptII marker genes. *The Journal Horticultural Science and Biotechnology*. 74(1): 105–109.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, M.C., López Coronado, J.M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. & Moreno, V. (2000).** The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*. 123: 393-402.
- Goffreda, J.C. & Mutschler, M.A. (1989).** Inheritance of potato aphid resistance in hybrids between *L. esculentum* and *L. pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics*. 78: 210-216.
- Goldsbrough, A.P., Tong, Y.S. & Yoder, J.I. (1996).** Lc as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant Journal*. 9(6): 927-933.
- Groover, A., Fontana, J.R., Dupper, G., Ma, C., Martienssen, R., Strauss, S. & Meilan, R. (2004).** Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees. *Plant Physiology*. 134: 1742–1751.
- Grossniklaus, U., Bellen, H.J., Wilson, C. & Gehring W. J. (1989).** P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development*. 107(2): 189–200.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. & Martienssen, R. (1998).** The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. 125: 1509–1517.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. & Aebersold, R. (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 19(3): 1720-1730.
- Halfter, U., Ishitani, M. & Zhu, J.K. (2000).** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 97(7): 3735-3740.
- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999)**. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 286(5441): 950-952.
- Harada, E., Kim, J.A. & Meyer, A.J. (2010)**. Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiology*. 51(10): 1627–1637.
- Hardon, J.J. (1967)**. Unilateral incompatibility between *Solanum pennellii* and *Lycopersicon esculentum*. *Genetics*. 57(4): 795-808.
- Harrison, E.J., Bush, M., Plett, J.M., McPhee, D.P., Vitez, R., O'Malley, B., Sharma, V., Bosnich, W., Séguin, A., MacKay, J. & Regan, S. (2007)**. Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar. *Canadian Journal of Botany*. 85(11): 1071-1081.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J. (2000)**. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. & Hodge, S. (1997)**. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(6): 2122–2127.
- Hayashi, H., Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M. & Murata, N. (1997)**. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal*. 12: 133–142.
- He, Y., Tang, W., Swaim, J.D., Green, A.L., Jack, T.P. & Gan, S. (2001)**. Networking senescence- regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology*. 126: 707-716.
- Herman, L., Jacobs, A., Vanmontagu, M. & Depicker, A. (1990)**. Plant chromosome marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events. *Molecular & General Genetics*. 224(2): 248-256.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R. & Sevilla, F. (2001)**. Antioxidant systems and O₂(-)/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*. 127(3): 817-831

- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P. & Sevilla, F. (2000).** Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell and Environment*. 23: 853-862.
- Hirayama, T. & Shinozaki, K. (2010).** Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal*. 61(6): 1041-1052.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. & Kanda, M. (1996).** Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(15): 7783-7788.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. (1950).** The water-culture method for growing plants without Soil. *Agricultural Experiment Station*. 39 p. ill. (Circular; 347).
- Hoel, B.O. & Solhaug, K.A. (1998).** Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany*. 82(3): 389-392.
- Hong, C.Y., Hsu, Y.T., Tsai, Y.C. & Kao, C.H. (2007).** Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*. 58: 3273-3283.
- Hueros, G. & Jouve, N. (2002).** Genómica funcional en plantas. En: Genómica y Mejora Vegetal. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa D.L. (Sevilla, España). pp 331 – 364.
- Iordachescu, M. & Imai, R. (2008).** Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 1223-1229.
- Jain, S.M. (2001).** Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*. 118: 153–166
- Jefferson, J.S., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. (1987).** GUS fusions: β - Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*. 6:3901–3907.
- Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H., Jun, S.H., Jeong, D.H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M.J., Sung, R.J., Choi, H. S., Yu, J.H., Choi, J.H., Cho, S.Y., Cha, S.S., Kim, S.I. & An, G. (2000).** T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal*. 22: 561-570.
- Jeong, D.H., An, S., Kang, H.G., Moon, S., Han, J.J., Park, S., Sook Lee, H., An, K. & An, G. (2002).** T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*. 130: 1636-1644.

- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S. & Deyholos, M.K. (2007).** Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *Journal of Experimental Botany*. 58: 3591-3607.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. & Jones, J.D.G. (1994).** Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*. 266: 789–792.
- Juenger, T.E., Sen, S., Stowe, K.A & Simms, E.L. (2005).** Epistasis and genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting flowering time in Arabidopsis thaliana. *Genetica*. 123(1-2): 87-105.
- Kaiser, K. & Goodwin, S.F. (1990).** “Site–selected” transposon mutagenesis of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (5): 1686–1690.
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G., Hu, C-A.A. & Verma, D.P.S.(1995).** Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotic tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*. 108: 1387–1394.
- Keddie, J.S., Carrol, B.J., Thomas, C.M., Reyes, M.E. Klimyuk, V.I., Holtan, H., Grissem, W. & Jones J.D. (1998).** Transposon tagging of the Defective embryo and meristems gene of tomato. *Plant Cell*. 10: 877–888.
- Keddie, J.S., Carroll, B., Jones, J.D.G. & Grissem, W. (1996).** The DCL gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *The EMBO Journal*. 15(16): 4208-4217.
- Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W. (1998).** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 95(7): 1017-1026.
- Kerschen, A., Napoli, C.A., Jorgensen, R.A. & Müller, A.E. (2004).** Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letters*. 566(1-3): 223-228.
- Kertbundit, S., De Greve, H., Deboeck, F., Van Montagu, M. & Hernalsteens J.P. (1991).** *In-vivo* random b-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 5212–5216.
- Khan, M.S., Yu, X., Kikuchi, A., Asahina, M. & Watanabe, K.N. (2009).** Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*. 26(1): 125-134.
- Khan, P.S.S.V., Hoffmann, L., Renaut, J. & Hausman, J.F. (2007).** Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. *Current Science*. 93: 807-817.

- Khodakovskaya, M., Sword, C., Wu, Q., Perera, I.Y., Boss, W.F., Brown, C.S. & Winter Sederoff, H. (2010).** Increasing inositol (1,4,5)-trisphosphate metabolism affects drought tolerance, carbohydrate metabolism and phosphate-sensitive biomass increases in tomato. *Plant Biotechnology Journal*. 8(2): 170-183.
- Kohli, A., Twyman, R.M., Abranches, R., Wegel, E., Stoger, E. & Christou, P. (2003).** Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology*. 52(2): 247-58.
- Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Konczkalman, Z., Korber, H., Redei, G.P. & Schell, J. (1989).** High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(21): 8467-8471.
- Krysan, P.J., Young, J.C. & Sussman, M.R. (1999).** T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell*. 11: 2283–2290.
- Kuromori, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K. & Matsui, M. (2009).** Phenome Analysis in Plant Species Using Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutants. *Plant and Cell Physiology*. 50(7): 1215–1231.
- Lanfermeijer, F.C., Dijkhuis, J., Sturre, M.J.G., de Haan, P. & Hille, J. (2003).** Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2 from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*. 52(5): 1039-1051.
- Lee, C-Y., Agrawal, D.C., Wang, C-S., Yu, S-M., Chen, J.J.W. & Tsay, H-S. (2008).** T-DNA Activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Planta Medica*. 74(7): 780-786.
- Lee, M.K., Kim, H.S., Kim, J.S., Kim, S.H. & Park, Y.D. (2004).** Agrobacterium-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica Rapa* L. ssp pokiness) plants for insertion mutagenesis. *Journal of Plant Biology*. 47: 300-306.
- Leidi, E.O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M.T., Cubero, B., Fernández, J.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quintero, F.J. & Pardo, J.M. (2010).** The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant Journal*. 61(3): 495-506.
- Levin, J.Z., de Framond, A.J., Tuttle, A., Bauer, M.W. & Heifetz, P.B. (2000).** Methods of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in Arabidopsis and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. 44(6): 759-75.

- Leoni, C., Volpicella, M., De Leo, F., Gallerani, R. & Ceci, L.R. (2011).** Genome walking in eukaryotes. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 278(21):3953-77.
- Ling, Q.H., Huang, W.H. & Jarvis, P. (2011).** Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*. 107(2): 209-214.
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B. & Tanksley, S.D. (2002).** A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(20): 13302–13306.
- Lou, Y., Gou, J.Y. & Xue, H.W. (2007).** PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *The Plant Cell*. 19: 163-181.
- Lugan, R., Niogret, M.F., Leport, L., Guégan, J.P., Larher, F.R., Saviouré, A., Kopka, J. & Bouchereau, A. (2010).** Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant Journal*. 64(2): 215-229.
- Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005).** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444: 139–158.
- Malamy, J.E. & Benfey, P.N. (1997).** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124(1): 33-44.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V. & Rubio, F. (2004).** Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology*. 56(3): 413-421.
- Martínez-Rodríguez, M.M., Estañ, M.T., Moyano, E., García-Abellán, J.O., Flores, F.B., Campos, J.F., Al-Azzawi, M.J., Flowers, T.J., Bolarín, M.C. (2008).** The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an ‘excluder’ genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany*. 63(1-3): 392–401
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J. & Wagner, R.D. (2003).** Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*. 15: 1689-1703.
- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y. & Levy, A.A. (2000).** A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *The Plant Journal*. 22(3): 265-274.

- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A. & Pardo, J.M. (1994).** The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(12): 8792-8796.
- Mian, A., Oomen, R.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J. & Véry, A.A. (2011).** Over-expression of an Na⁺ and K⁺ permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *The Plant Journal*. 68(3): 468-479.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2009).** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*. 33(4): 453-467.
- Mittler, R. & Blumwald, E. (2010).** Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review Plant Biology*. 61: 443-462.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. & Volokita, M. (2004).** Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*. 55: 1105-1113.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. & Guy, M. (2003).** Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant, Cell and Environment*. 26: 845-856.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. & Volokita, M. (2002).** Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: Increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radical Research*. 36: 195-202.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Daros, E., De Campos, M.K. F., De Carvalho, J.F.R.P., Filho, J.C. B., Pereira, L.F.P. & Vieira, L.G.E. (2007).** Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 130(2): 218-229.
- Mollier, P., Hoffmann, B., Orsel, M. & Pelletier, G. (2000).** Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific gus expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. 19(11): 1076-1083.
- Mooney, B.P., Miernyk, J.A., Michael Greenlief, C. & Thelen, J.J. (2006).** Using quantitative proteomics of *Arabidopsis* roots and leaves to predict metabolic activity. *Physiologia Plantarum*. 128(2): 237-250.

- Moreno, V. (1997).** La selección somaclonal, una alternative biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. *Biotecnología y agricultura: las plantas del futuro. Fundación Bancaixa.* 59–96.
- Moreno, V. & Roig, L.A. (1990).** Somaclonal variation in cucurbits. En: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry.* 11: 435-464.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R. & Serrano, R. (1999).** A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Molecular and Cellular Biology.* 19(5): 3328-3337.
- Munnik, T. & Vermeer, J.E.M. (2010).** Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell & Environment.* 33(4): 655-669.
- Munns, R. & Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* 59: 651-681.
- Munns, R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytology.* 167(3): 645-663.
- Munns, R., Rebetzke, G.J., Husain, S., James, R.A. & Hare, R.A. (2003).** Genetic control of sodium exclusion in durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research.* 54: 627-635.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment.* 25: 239-250.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., García-Abellán, J. O., García-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V. & Bolarín, M.C. (2008).** The HAL1 function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia Plantarum.* 133: 288-297.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15(3): 473-497.
- Nass, R., Cunningham, K.W. & Rao, R. (1997).** Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *The Journal of Biological Chemistry.* 272(42): 26145-26152.
- Nelson, D.E., Koukoumanos M. & Bohnert, H.J. (1999).** Myo-Inositol-Dependent Sodium Uptake in Ice Plant. *Plant Physiology.* 119: 165-172.

- Nelson, D.E., Rammesmayer, G. & Bohnert, H.J. (1998).** Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *The Plant Cell Online*. 10(5): 753-764.
- Nevo, E. & Chen, G. (2010).** Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *PlantCell & Environment*. 33: 670-685.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V. & Rubio, F. (2010).** The Arabidopsis thaliana HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant*. 3(2): 326-333.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lyvtochenko, A., Smith, A.M.O., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J. & Fernie, A.R. (2005).** Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*. 137(2): 611-622.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., de Morales, P.A., Marín-Manzano, M.C., Pardo, J.M., Belver, A. (2009).** The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant Cell and Environment*. 32(7): 904-916.
- Oosumi, T., Gruszewski, H., Blischak, L., Baxter, A., Wadl, P., Shuman, J., Veilleux, R. & Shulaev, V. (2006).** High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*. 223(6): 1219-1230.
- Osborne, B.I., Corr, C.A., Prince, J.P., Hehl, R., Tanksley, S.D., McCormick, S. & Baker, B. (1991).** Ac transposition from a T-DNA can generate linked and unlinked clusters of insertions in the tomato genome. *Genetics*. 129(3): 833-844.
- Osmond, C.B. (1976).** Ion absorption and carbon metabolism in cells of higher plants. In Springer-Verlag, ed. Transport in plants II. Berlin-Heidelberg. 347-372.
- Ostergaard, L. & Yanofsky, M.F. (2004).** Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*. 39(5): 682-96.
- Ouyang, B., Yang, T., Li, H.X., Zhang, L., Zhang, Y.Y., Zhang, J.H., Fei, Z.J. & Ye, Z.B. (2007).** Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *Journal of Experimental Botany*. 58: 507-520.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O. & Quintero, F.J. (2006).** Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 57(5): 1181-1199.

- Pardo, J.M. (2010).** Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*. 21(2): 185-196.
- Passioura, J.B. & Angus, J.F. (2010).** Improving Productivity of Crops in Water-Limited Environments. *Advances in Agronomy*. 106: 37-75.
- Peng, H., Huang, H., Yang, Y., Zhai, Y., Wu, J., Huang, D. & Lu, T. (2005).** Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science*. 168: 1571–1579.
- Penna, S. (2003).** Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in Plant Science*. 8(8): 355-357.
- Peralta, I.E., Knapp, S.K. & Spooner, D.M. (2005).** New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*. 30(2): 424-434.
- Perera, I.Y., Hung, C.Y., Moore, C.D., Stevenson-Paulik, J. & Boss, W.F. (2008).** Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the type 1 inositol 5-phosphatase exhibit increased drought tolerance and altered abscisic acid signaling. *The Plant Cell*. 20(10): 2876-2893.
- Pérez-Alfocea, F., Estañ, M.T., Santa Cruz, A. & Bolarín, M.C. (1993).** Effects of salinity on nitrate, total nitrogen, soluble protein and free amino acid levels in tomato plants. *Journal of Horticultural Science*. 68:1021-1027.
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Alarcón, J.J. & Bolarín, M.C. (2000).** Composition of Xylem and Phloem Exudates in Relation to the Salt-tolerance of Domestic and Wild Tomato Species. *Journal of Plant Physiology*. 156 (3): 367–374.
- Pérez-Valle, J., Rothe, J., Primo, C., Martínez-Pastor, M., Ariño, J., Pascual-Ahuir, A., Mulet, J.M., Serrano, R. & Yenush, L. (2010).** Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryotic Cell*. 9(12): 1881-1890.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H. & Goddijn, O.J.M. (1998).** Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Journal of plant physiology*. 152(4-5): 525–532.
- Pineda, B. (2005).** Análisis funcional de diversos genes relacionados con la tolerancia a la salinidad y el estrés hídrico en plantas transgénicas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Tesis Doctoral: Universidad Politécnica de Valencia.

- Pineda, B., Giménez, E., García-Sogo, B., Atarés, A., Antón, T., Angosto, T., Lozano, R. & Moreno V. (2010).** Arlequin, a T-DNA insertional mutant of tomato affected in reproductive development. *Plant and Cell Physiology*. 51: 435-447.
- Pineda, B., García-Abellán, J.O., Pérez, F., Campos, J.F., Antón, T., García-Sogo, B., Vicente-Agulló, F., Morales, B., Capel, J., Angosto, T., Estañ, M.T., Moreno, V., Bolarín, M.C., Lozano, R. & Atarés, A. (2012).** Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance in Tomato. Eds Wiley – Blackwell. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. pp 1083-1118.
- Plesch, G., Kamann, E. & Mueller, R.B. (2000).** Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell specific gene expression. *Gene*. 249(1): 83–89.
- Plett, D. & Moller, I.S.(2010).** Na plus transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant Cell and Environment*. 33(4): 612-626.
- Prabhakar, V., Löttgert, T., Gigolashvili, T., Bell, K., Flügge, U.I. & Häusler, R.E. (2009).** Molecular and functional characterization of the plastid-localized Phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*.18;583(6): 983-991.
- Provart, N.J. & McCourt, P. (2004).** Systems approaches to understanding cell signaling and gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology*. 7(5): 605-9.
- Qin, G., Kang, D., Dong, Y., Shen, Y., Zhang, L., Deng, X., Zhang, Y., Li S., Chen, N., Niu, W., Chen, C., Liu, P., Chen, H., Li, J., Ren, Y., Gu, H., Deng, X., Li-Jia, Q. & Chen Z. (2003).** Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*. *Plant Science*. 165(5): 941–949.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K. & Pardo, J.M. (2002).** Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Science of the Unites States of America*. 99: 9061–9066.
- Quintero, F.J., García de Blas, B. & Rodríguez-Navarro, A. (1996).**The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *The Plant Cell*. 8(3): 529-537.
- Qiu, Q.S, Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S. & Zhu, J.K. (2002).** Regulation of SOS1, a plasma membrane Na exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Unites States of America*. 99: 8436–8441.

- Radhamony, R.N., Mohan Prasad, A. & Srinivasan, R. (2005).** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8: 82-106.
- Ravens, J.A. (1985).** Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: A cost-Benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytologist*. 101(1): 25-77.
- Ren, Z.H., Gao, J.P., Li, L.G., Cai, X.L., Huang, W., Chao, D.Y, Zhu, M.Z, Wang, Z.Y, Luan, S., Lin, H.X. (2005).** A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*.37(10): 1141-1146.
- Reguera, M., Peleg, Z. & Blumwald, E. (2011).** Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1819(2): 186-194.
- Rhodes, D., & Hanson, A.D. (1993).** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 44: 357–384.
- Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Watt, M., Condon, A.G. (Tony), Spielmeier, W. & Dolferus, R. (2010).** Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Functional Plant Biology*. 37: 85-97.
- Rick, C.M. (1973).** Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In A.M. Srb, (ed.) *Genes, Enzymes and Populations*. Plenum Press, New York. 255-269.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000).** Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*. 1469: 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A. & Rubio, F. (2006).** High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*. 57: 1149-1160.
- Roelfsema, M.R. & Hedrich, R. (2005).** In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist*. 167: 665–691.
- Romero, C., Bellés, J.M., Vayá, J.L., Serrano, R. & Culiáñez-Macià, F.A. (1997).** Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*. 201(3): 293-297.
- Rommens, C.M.T., Rudenko, G.N., Dijkwel, P.P., van Haaren, M.J.J., Ouwkerk, P.B.F., Blok, K.M., Nijkamp, H.J.J. & Hille, J. (1992).** Characterization of the Ac/Ds behaviour

- in transgenic tomato plants using plasmid rescue. *Plant Molecular Biology*. 20(1): 61-70.
- Roy, S.J., Tucker, E.J. & Tester, M. (2011).** Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(3): 232-239.
- Rus, A., Lee, B.H., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2004).** AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiology*. 136(1): 2500-2511.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.H., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J. K., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. (2001).** AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 14150-14155.
- Rus, A., Panoff, M., Pérez-Alfocea, F. & Bolarín, M.C. (1999).** NaCl responses in tomato calli and whole plants. *The Journal Plant Physiology*. 155: 727-733.
- Rus, A.M., Ríos, S. & Olmos, E. (2000)** Long-term culture modifies the salt responses of callus lines of salt tolerant and salt-sensitive tomato species. *Journal of Plant Physiology*. 157:413-420.
- Sacher, R.F. & Staples, R.C. (1985).** Inositol and sugars in adaptation of tomato salt. *Plant Physiology*. 77(1): 206-210.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A. & Bolarín, M.C. (1999).** Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37: 65-71.
- Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard, J.P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M., Ouwerkerk, P.B.F., Rueb, S., Delseny, M. & Guiderdoni, E. (2003).** Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics*. 106(8): 1396-1408.
- Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., Bès, M., Piffanelli, P., Piegú, B., Droc, G., Regad, F., Bourgeois, E., Meynard, D., Périn, C., Sabau, X., Ghesquière, A., Glaszmann, J.C., Delseny, M. & Guiderdoni, E. (2004).** High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant Journal*. 39(3): 450-464.
- Sánchez, D.H., Siahpoosh, M.R., Roessner, U., Udvardi, M. & Kopka, J. (2008).** Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiology Plantarum*. 132: 209-219.

- Sánchez-Alvarado, A. & Newmark, P.A. (1999).** Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(9): 5049-5054.
- Sánchez-Bell, P., Egea, I., Flores, F.B. & Bolarín, M.C. (2011).** Tomato: Grafting to improve salt tolerance. In book *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress* (Ed N. Tuteja). *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co*.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M.T., Sevillano, L., Bolarín, M.C. & Flores, F.B. (2012).** Proteome Changes in Tomato Fruits Prior to Visible Symptoms of Chilling Injury are Linked to Defensive Mechanisms, Uncoupling of Photosynthetic Processes and Protein Degradation Machinery. *Plant and Cell Physiology*. 53(2): 470-484.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., Bolarín, M.C. (1999).** Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*. 37(1): 65–71
- Saranga, Y., Marani, A., Zamir, D. & Rudich, J. (1991).** Breeding tomatoes for salt tolerance: Field screening of *Lycopersicon* accessions for yield and dry matter production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116: 1067–1071.
- Scholte, M., d'Erfurth, I., Rippa, S., Mondy, S., Cosson, V., Durand, P., Breda, C., Trinh, H., Rodríguez-Llorente, I., Kondorosi, E., Schultze, M., Kondorosi, A. & Ratet, P. (2002).** T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding*. 10(4): 203-215.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. & Waner, D. (2001).** Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 627-658.
- Serrano, R. (1996).** Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses. *International Review of Cytology*. 165: 1-52.
- Shabala, S. (2003).** Regulation of potassium transport in leaves: From molecular to tissue level. *Annals of Botany*. 92: 627-634.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. & Tal, M. (2001).** Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*. 112(4): 487-494.

- Shalata, A. & Tal, M. (1998).** The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*. 104: 169–174.
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A. & Zheng, N. (2010).** Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*. 468(7322): 400-405.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. & Zhu, J.K. (2003).** Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*. 21: 81-85.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. & Zhu, J.K. (2002).** The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*. 14(2): 465-477.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim Ch, & Zhu, J.-K. (2000).** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 6896-6901.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007).** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *The Journal of Experimental Botany*. 58(2): 221-7.
- Sickler, C.M., Edwards, G.E., Kiirats, O., Gao, Z. & Loescher, W. (2007).** Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology*. 34(4): 382-391.
- Simmons, A.T. & Gurr, G.M. (2005).** Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology*. 7: 265-276.
- Sinclair, T.R. (2011).** Challenges in breeding for yield increase for drought. *Trends Plant Science*. 16(6): 289-293.
- Smulders, M.J.M., Rus-Kortekaas, W. & Gilissen, L.J.W. (1994).** Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato *Lycopersicon esculentum* plants. *Plant Science*. 97(1): 53-60.
- Springer, P.S., McCombie, W.R., Sundaresan, V. & Martienssen, R.A. (1995).** Gene trap tagging of *PROLIFERA*, an essential *MCM2-3-5*-like gene in *Arabidopsis*. *Science*. 268: 877–880.
- Springer, P.S. (2000).** Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*. 12: 1007–1020.

- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H. & Martienssen, R. (1995).** Patterns of gene-action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Gene & Development*. 9(14): 1797-1810.
- Sundaresan, V. (1996).** Horizontal spread of transposon mutagenesis: New uses for old elements. *Trends in Plant Science*. 1(6): 184-190.
- Swaminathan, K., Yang, Y., Grotz, N., Campisi, L. & Jack, T. (2000).** An enhancer trap line associated with a D- Class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: 1658–1667.
- Takken, F.L.W., Schipper, D., John, J., Nijkamp, H. & Hille, J. (1998).** Identification and Ds-tagged isolation of a new gene at the Cf-4 locus of tomato involved in disease resistance to *Cladosporium fulvum* race 5. *Plant Journal*. 14(4): 401-411.
- Tal, M. & Shannon, M.C. (1983).** Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of *L. esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *Solanum pennellii* and F1 hybrids to high salinity. *Australian Journal Plant Physiology*. 10: 109-117.
- Taleisnik, E. & Grunberg, K. (1994).** Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiology Plantarum*. 92: 528-534.
- Taleisnik, E.L. (1987).** Salinity effects on growth and carbon balance in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Plant Physiology*. 71: 213-218.
- Tanksley, S.D, Ganai, M.W., Prince, J.P., Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Riider, M.S., Wing, R.A., Wu W., Young, N.D.. (1992).** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 132: 1141–1160.
- Tarczyński, M.C., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J. (1993).** Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*. 259(5094): 508-510.
- Tester, M. & Davenport, R. (2003).** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*. 91: 503-527.
- Tester, M. & Bacic, A. (2005).** Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*. 137: 791–793.

- Thomas, J.C., Sepahi, M., Arendall, B. & Bonhert, H.J. (1995).** Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*. 18(7): 801-806.
- Tomato Genome Consortium (2012).** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485(7400): 635-641.
- Topping, J.F., Agyeman, F., Henricot, B. & Lindsey, K. (1994).** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*. 5(6): 895-903.
- Topping, J.F. & Lindsey, K. (1995).** Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation genes and the study of development. *Transgenic Research*. 4 (5): 291–305.
- Topping, J.F. & Lindsey, K. (1997).** Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 9: 1713–1725.
- Tuberosa, R & Salvi S. (2006).** Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Science*. 11(8): 405-412.
- Vain, P., Worland, B., Thole, V., McKenzie, N., Alves, S.C., Opanowicz, M., Fish, L.J., Bevan, M.W. & Snape, J.W. (2008).** *Agrobacterium* mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6(3): 236-245.
- Valliyodan, B. & Nguyen, H.T. (2006).** Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinions in Plant Biology*. 9: 189-195.
- Van der Biezen, E.A., Brandwagt, B.F., Van Leeuwen, W., Nijkamp, H.J.J. & Hille, J. (1996).** Identification and isolation of the FEEBLY gene from tomato by transposon tagging. *Molecular and General Genetics*. 251(3): 267-280.
- Van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G. & Tanksley, S. (2002).** Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 14: 1441–1456.
- Van der Knaap, E., Sanyal, A., Jackson, S.A. & Tanksley, S.D. (2004).** High-Resolution Fine Mapping and Fluorescence in Situ Hybridization Analysis of sun, a Locus Controlling Tomato Fruit Shape, Reveals a Region of the Tomato Genome Prone to DNA Rearrangements. *Genetics* 168: 2127–2140.

- Valluru, R. & Van der Ende, W. (2011).** Myo-inositol and beyond emerging networks under stress. *Plant Science*. 181: 387-400.
- Varshney, R.K., Bansal, K.C., Aggarwal, P.K., Datta, S.K. & Craufurd, P.Q. (2011).** Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or hype? *Trends in Plant Science*. 16(7): 363-371.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. & Zhu, J.K. (2006).** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45(4): 523-539.
- Verslues, P.E. & Juenger, T.E. (2011).** Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Current Opinion Plant Biology*. 14(3): 240-245.
- Vij, S. & Tyagi, A.K. (2007).** Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants: Review article. *Plant Biotechnology Journal*. 5: 361-380.
- Villalta, I., Bernet, G.P., Carbonell, E.A. & Asins, M.J. (2007).** Comparative QTL analysis of salinity tolerance in terms of fruit yield using two Solanum populations of F7 lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 114(6): 1001-1017.
- Voinnet, O. (2002).** RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 444-451.
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K.P., Würsch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. & Apel, K. (2004).** The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of Arabidopsis thaliana. *Science*. 306(5699): 1183-1185.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M.B. (1998).** Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(23): 13959-13964.
- Webb, K.J., Skøt, L., Nicholson, M.N., Jørgensen, B. & Mizen, S. (2000).** *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 13(6): 606-616.
- Wei, W., Twell, D. & Lindsey, K. (1997).** A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 11 (6): 1307–1314.

- Wei, J.Z., Tirajoh, A., Effendy, J. & Plant, A.L. (2000).** Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid. *Plant Science*. 159: 135-148.
- Weini, S. & Kudla, J. (2009).** The CBL–CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*. 184(3): 517-528.
- Wilson, P.B., Estavillo, G.M., Field, K.J., Pornsiriwong, W., Carroll, A.J., Howell, K.A., Woo, N.S., Lake, J.A., Smith, S.M., Harvey Millar, A., von Caemmerer, S. & Pogson, B.J. (2009).** The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 58(2): 299-317.
- Wu, C., Li, X., Yuan, W., Chen, G., Kilian, A., Li, J., Xu, C., Li, X., Zhou, D.-X., Wang, S. & Zhang, Q. (2003).** Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *The Plant Journal*. 35(3): 418-427.
- Xiong, L., Lee, Bh., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. & Zhu, J.K. (2001).** FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development*. 15(15): 1971-1984.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2005).** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*. 10(2): 88-94.
- Yamaguchi, T. & Blumwald, E. (2005).** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science*. 10: 615-620.
- Yano, K., Aoki, K. & Shibata, D. (2007).** Genomic databases for tomato. *Plant Biotechnology* 24: 17–25.
- Yeo, A.R. (1983).** Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiologia Plantarum*. 58(2): 214-222.
- Yin, Z. & Wang G.L. (2000).** Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 461–470.
- Yoder, J.I. (1990).** Rapid proliferation of the maize transposable element activator in transgenic tomato. *Plant Cell*. 2: 723–730.
- Yoder, J.I., Palys, J., Alpert, K. & Lassner, M. (1988).** Ac transposition in transgenic tomato plants. *Molecular and General Genetic*. 213(2-3): 291–296.
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (2002).** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*. 30: 529-539.

- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong G.K-S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, Ch., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, L., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, Ch., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, Ch., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., Yang, H. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*. 296: 79-92.
- Zhang, H.X. & Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*. 19: 765-768.
- Zhang, Z.B., Zhu, J., Gao, J.F., Wang, Ch., Li, H., Li, H., Zhang, H. Q., Zhang, S., Wang, D.M., Wang, Q.X., Huang, H., Xia, H.J. & Yang, Z.N. (2007). Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 52(3): 528–538.
- Zhao, T., Palotta, M., Langridge, P., Prasad, M., Graner, A., Schulze-Lefert, P. & Kopyrek, T. (2006). Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. *The Plant Journal*. 47(5): 811-826.
- Zhou, H.L., Cao, W.H., Cao, Y.R., Liu, J., Hao, Y.J., Zhang, J.S. & Chen, S.Y. (2006). Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth, stress response and protein phosphorylation. *FEBS Letters*. 580(5): 1239-1250.
- Zhou, J.L., Wang, X.F., Jiao, Y.L., Qin, Y.H., Liu, X.G., He, K., Chen, C., Ma, L.G., Wang, J., Xiong, L.Z., Zhang, Q.F., Fan, L. M. & Deng, X.W. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology*. 63: 591-608.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53: 247-273.
- Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*. 6(2): 66-71.
- Zushi, K. & Matsuzoe, N. (2009). Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia Horticulturae*. 120(2): 181-187.