



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Influencia Hormonal en el Uso Eficiente del Agua y
en Respuesta al Estrés Abiótico en Tomate
(*Solanum lycopersicum* L.)

D^a. Elena Cantero Navarro

2014



Influencia Hormonal en el Uso Eficiente del Agua y
en Respuesta al Estrés Abiótico en Tomate (*Solanum
lycopersicum* L.)

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad de Murcia

Elena Cantero Navarro

2014

Directores de la Tesis:

Francisco Pérez Alfocea

Investigador Científico CEBAS-CSIC

Alfonso Antonio Albacete Moreno

Investigador Postdoctoral CEBAS-CSIC

Tutor:

José Sanchez Bravo

Profesor Titular Universidad de Murcia

El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido realizado en los laboratorios e instalaciones del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Este estudio ha sido financiado por los siguientes Proyectos de Investigación:

- Influencia hormonal en los procesos de senescencia y crecimiento foliar en respuesta al estrés hídrico y salino. CEBAS-CSIC, Murcia. Entidad financiadora: CARM Ref.: 08712/PI/08. Duración 01/12/2009 - 30/11/2011.
- Identificación y explotación de la variabilidad natural en caracteres hídricos y hormonales para mejorar la eficacia del uso del agua en tomate (WUETOM). CEBAS-CSIC, Murcia, IHSM-UMA-CSIC, Málaga y LEC, Lancaster. 2007. Entidad financiadora: CICYT AGL2008-01733/AGR. Duración 01/12/2008 - 30/11/2011.

La Licenciada en Biología D^a. Elena Cantero Navarro ha contado, durante el periodo de realización del Trabajo, con una Beca-Contrato JAE del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Francisco Pérez Alfocea y al Dr. Alfonso Albacete Moreno, codirectores de este trabajo, por la confianza que depositaron en mí y la oportunidad que me brindaron de iniciarme en el mundo de la investigación. Agradecimiento especial a Alfonso, ejemplo de compañerismo y saber hacer. Gracias por todo vuestro esfuerzo, apoyo y dedicación, que han posibilitado la elaboración del presente manuscrito.

Al Dr. Rafael Fernández Muñoz y su grupo de Mejora de Hortícolas perteneciente al IHSM La Mayora UMA_CSIC por su colaboración y sus valiosas aportaciones en el estudio realizado sobre el uso eficiente del agua.

Al Profesor Dr. Thomas Roitsch de la Universidad de Karl-Franzens de Graz, en Austria, por la ayuda prestada durante mi estancia en su laboratorio y por la aportación a esta tesis.

Al Dr. Alejandro Torrecillas Sánchez, titulado superior del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, por su asistencia técnica en el manejo del equipo de HPLC-MS/MS necesaria para los análisis hormonales.

A mi Tutor de Tesis, el Dr. José Sánchez Bravo del departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, por su disponibilidad y cercanía.

Al Dr. Vicente Martínez, y a todo el personal del Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS, por su apoyo logístico en cuanto al uso de cámaras de cultivo e invernaderos así como por su ayuda para todo lo que he necesitado.

A mis compañeras de laboratorio, Cristina Martínez Andujar, Ascensión Martínez Pérez, Cristina Soriano "la Manager" y María del Puerto Sánchez Iglesias, por vuestro apoyo y ánimo en los últimos momentos de mi tesis.

Al Dr. José Antonio Hernández Cortés y su grupo (José Ramón, Pedro, Gregorio y María José), por vuestra generosidad y calidad humana, así como por la ayuda prestada en entender que el estrés también puede ser oxidativo.

A toda la gente que a lo largo de esta etapa compartieron conmigo inquietudes, penas y alegrías tanto dentro como fuera del CEBAS (Marga, Sandra, Ana, Enas, Irene, Mari, Diana, Teresa, Vicente, Fernando, Pepa, Luna, Olaya, Bea...). Especial mención a mi gran amigo Jesús, por su apoyo incondicional y sus valiosos consejos. Gracias a todos por hacer que mi trabajo sea más fácil y agradable.

A mis padres, Diego y Fina, por su esfuerzo y sacrificio en dármelo todo. Muchas gracias por ser mi pilar y estar siempre a mi lado cuando lo he necesitado. Sin vosotros esto nunca hubiera sido posible. Gracias por vuestro amor incondicional, por cuidar de mí, por vuestra educación y vuestra ayuda constante. A mi hermana y sobrinas, mis niñas. Os quiero.

A Miguel de Costa Mendiola, por esta a mi lado en la etapa más difícil de mi tesis. Gracias por tu apoyo, confianza, cariño y comprensión. Es una verdadera suerte haberte conocido. TQ.

Y en general, a todas aquellas personas que en algún momento, durante estos últimos cuatro años, se interesaron por mi trabajo.

Gracias a todos de corazón.

A mis padres, Diego y Fina

A mi nena

ÍNDICE

ABREVIATURAS	V
RESUMEN	9
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	19
1.- EL PROBLEMA DEL ESTRÉS HÍDRICO	21
1.1. Ambientes limitados de agua: regiones áridas y semiáridas del mundo	22
1.2. Impacto global del Estrés Hídrico	26
2.- INTERÉS DEL TOMATE COMO MATERIAL DE ESTUDIO	28
2.1.- Cultivo, importancia económica y adaptación a la investigación.	28
3.- USO EFICIENTE DEL AGUA	35
3.1. Perspectiva histórica	35
3.2. Definición del uso eficiente del agua	36
3.3. Uso eficiente del agua y productividad	39
3.4. Importancia de la mejora del uso eficiente del agua	41
3.5. Manipulación del uso eficiente del agua	42
3.6. Comunicación raíz-parte aérea, ácido abscísico y uso eficiente del agua	42
3.7. Otros factores hormonales susceptibles de ser explorados y explotados para mejorar el WUE	44
3.8. Caracteres no hormonales susceptibles de ser explotados para mejorar el WUE	45
4.- INJERTO DE TOMATE	46
4.1. Líneas recombinantes	46
4.2. Uso de portainjertos como medio para alterar la comunicación raíz-parte aérea	48
4.3. Consideraciones sobre el uso de portainjertos para mejorar el WUE de la parte aérea	51
5.- LAS HORMONAS VEGETALES	52
5.1.- Descubrimiento, identificación y cuantificación de las hormonas vegetales. Tipos de fitohormonas	53
5.2.- Balance hormonal en condiciones de estrés	59
6.- EFECTOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS PLANTAS	63
6.1.- Efecto osmótico	63
6.2.- Alteraciones metabólicas	65
6.3.- Estrés oxidativo	67
7.- PRODUCCIÓN, TRANSPORTE Y USO DE FOTOASIMILADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	72
8.- FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LAS INVERTASAS EN RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO	74
8.1.- Señalización y regulación	78
8.2.- El gen CIN1. Biotecnología, clonación	80

CAPÍTULO II: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN CIN1 DE UNA INVERTASA EXTRACELULAR EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO	83
INTRODUCCIÓN	85
MATERIAL Y MÉTODOS	89
1.- MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	91
2.- DISEÑO EXPERIMENTAL	92
3.- RELACIONES HÍDRICAS DE LAS PLANTAS Y FOTOSÍNTESIS	97
4.- METABOLISMO DEL CARBONO	101
5. METABOLISMO ANTIOXIDATIVO	118
6.- EXTRACCIÓN HORMONAL Y ANÁLISIS	126
7.- APROXIMACIÓN PROTEÓMICA	129
8.- METABOLÓMICA	132
9.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	134
RESULTADOS	135
1.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN CIN1 DE UNA INVERTASA EXTRACELULAR SOBRE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS DE TOMATE	137
1.1.- Análisis de la expresión del gen CIN1	137
1.2.- Biomasa y área foliar	138
1.3.- Potencial hídrico del sustrato	139
1.4.- Contenido relativo en agua	140
2.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE CIN1 SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y EL USO EFICIENTE DEL AGUA	141
2.1.- Fluorescencia de clorofilas y fotosíntesis	141
2.2.- Uso eficiente del agua	144
3.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN CIN1 SOBRE EL METABOLISMO DEL CARBONO	145
3.1.- Contenido en azúcares	145
3.2.- Efecto sobre la ultra-estructura de la hoja	146
3.3.- Actividades sacarolíticas	147
3.4.- Inhibidor de la invertasa	149
3.5.- Otras enzimas del metabolismo del carbono	151
4.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN CIN1 SOBRE EL CONTENIDO HORMONAL	153
5.- EFECTO DE CIN1 SOBRE EL METABOLISMO ANTIOXIDATIVO	155
6.- ANÁLISIS PROTEÓMICO EN PLANTAS CIN1	158
7.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN CIN1 SOBRE EL PERFIL METABOLÓMICO	160
DISCUSIÓN	163

CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN Y EXPLOTACIÓN DE LA VARIABILIDAD NATURAL EN CARACTERES HÍDRICOS Y HORMONALES PARA MEJORAR EL USO EFICIENTE DEL AGUA EN TOMATE	183
INTRODUCCIÓN	185
MATERIAL Y MÉTODOS	189
1.- ENSAYO 1: VARIACIÓN GENÉTICA DEL USO EFICIENTE DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN RECOMBINANTE DE TOMATE.....	191
1.1.- Material vegetal.....	191
1.2.- Diseño experimental.....	194
1.3 - Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	195
1.4.- Relaciones Hídricas de las plantas y Fotosíntesis.....	195
1.5.- Extracción Hormonal y Análisis.....	196
1.6.- Obtención de muestras y análisis de iones.....	197
2.- ENSAYO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LA RAÍZ Y LA PARTE AÉREA SOBRE EL USO EFICIENTE DEL AGUA.....	199
2.1.- Material vegetal.....	199
2.2.- Diseño experimental.....	200
2.3.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	204
2.4.- Relaciones Hídricas de las plantas y Fotosíntesis.....	205
2.5.- Extracción Hormonal y Análisis.....	206
2.6.- Obtención de muestras y análisis de iones.....	207
3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS RIL SELECCIONADAS.....	208
3.1.- Material vegetal.....	208
3.2.- Diseño experimental.....	209
3.3.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	211
3.4.- Relaciones Hídricas de las plantas.....	212
3.5.- Parámetros de producción de cosecha.....	213
3.6.- Extracción Hormonal y Análisis.....	213
4.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	214
RESULTADOS	215
1.- ENSAYO 1: VARIACIÓN GENÉTICA DEL USO EFICIENTE DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN RECOMBINANTE DE TOMATE.....	191219
1.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	217
1.2.- Relaciones Hídricas y Fotosíntesis.....	222
1.2.1.- Contenido relativo en en agua.....	222
1.3.- Niveles hormonales.....	229
1.4.- Concentración de iones.....	232
1.5.- Análisis de componentes principales.....	235
1.6.- Selección de líneas.....	238

2.- ENSAYO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LA RAÍZ Y LA PARTE AÉREA SOBRE EL USO EFICIENTE DEL AGUA	239
2.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	239
2.2.- Relaciones hídricas y fotosíntesis	243
2.3.- Niveles hormonales	250
2.4.- Concentración de iones	255
3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS RIL SELECCIONADAS: PRUEBA DE CONCEPTO.....	258
3.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta.....	258
3.2.- Relaciones hídricas	259
3.3.- Parámetros de cosecha	263
3.4.- Regresiones lineales.....	264
3.5.- Hormonas vegetales	266
DISCUSIÓN	273
1.- ENSAYO 1: EXISTE VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL USO EFICIENTE DEL AGUA Y PARÁMETROS RELACIONADOS EN LA POBLACIÓN RIL DURANTE EL DESARROLLO VEGETATIVO.....	275
2.- ENSAYO 2: LA PARTE AÉREA TIENE UN EFECTO PREDOMINANTE EN EL WUE Y PARAMETROS RELACIONADOS DURANTE EL DESARROLLO VEGETATIVO EN CONDICIONES ÓPTIMAS.....	282
3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS RIL SELECCIONADAS	286
CONCLUSIONES.....	295
BIBLIOGRAFÍA.....	299

ABREVIATURAS

Ψ_w	potencial hídrico
A	tasa neta de fotosíntesis
ABA	ácido abscísico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
APX	ascorbato peroxidasa
ASC	ascorbato
B	biomasa
CAT	catalasa
CK	citoquinina
cwInv	invertasa extracelular
cytInv	invertasa citoplasmática
DHA	deshidroascorbato
E	tasa de transpiración
FK	fructoquinasa
F_v/F_m	rendimiento cuántico máximo del fotosistema II
GA	giberelinas
GR	glutación reductasa
g_s	conductancia estomática
GSH	glutación reducido

GSSG	glutación oxidado
GST	glutación total
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HI	índice de cosecha
HXK	hexoquinasa
IAA	ácido indol-3-acético
IC	índice de clorofilas
InvInh	inhibidor invertasa
JA	ácido jasmónico
MDHA	monodeshidroascorbato
PCA	análisis de componentes principales
PGI	fosfoglucosa isomerasa
PFK	fosfofructoquinasa
PGM	fosfoglucosamutasa
POX	peroxidasa
RILs	líneas puras recombinantes
ROS	especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RWC	contenido relativo en agua
rZ	ribósido de <i>trans</i> -zeatina
SA	ácido salicílico

SOD	superóxido dismutasa
SS	sacarosa sintasa
<i>t-Z</i>	<i>trans</i> -zeatina
UGPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa
vacInv	invertasa vacuolar
W	consumo de agua
WT	línea silvestre
WUE	uso eficiente del agua
WUEa	uso eficiente del agua agronómico
WUEav	uso eficiente del agua agronómico en base a biomasa vegetativa
WUEay	uso eficiente del agua agronómico en base a fruto
WUE _i	uso eficiente del agua instantáneo

RESUMEN

RESUMEN

La disponibilidad de agua es una de las mayores limitaciones en la productividad vegetal (Boyer, 1982) y es uno de los principales factores en la distribución de las especies vegetales. La tolerancia de un cultivo al estrés hídrico esta esencialmente vinculada a su capacidad de acceder al agua del suelo y utilizarla de manera más eficiente. El cultivo del tomate destaca tanto por su importancia económica como por representar un elevado consumo de recursos hídricos, de manera que cualquier mejora en el uso eficiente del agua (*WUE*) tendría un gran impacto socioeconómico y medioambiental. Se estima que un incremento de un 10% en el *WUE* en este cultivo podría suponer, en la Región de Murcia, un ahorro de más de 1.1 hm³ de agua de riego, cantidad equivalente a los requerimientos anuales de una población de 20.000 habitantes.

La sección experimental del manuscrito se ha dividido en dos partes diferenciadas. En primer lugar, con el objetivo de estudiar el papel de las invertasas en la respuesta al estrés hídrico en tomate (*Solanum lycopersicon* L.), se generaron plantas transgénicas que sobreexpresaban un gen de una invertasa extracelular de *Chenopodium rubrum* (*CIN1*) bajo el control de un promotor de invertasa vacuolar de *Solanum pimpinellifolium* (*InvLp6g*). En segundo lugar, se realizó una aproximación genética con objeto de identificar y explotar caracteres hídricos y hormonales implicados en la mejora del *WUE* en tomate mediante el uso de líneas recombinantes (*RILs*) de tomate procedentes de un cruce entre *S. lycopersicum* cv Moneymaker y *S. pimpinellifolium* acc. TO-937.

La sobreexpresión del gen *CIN1* dio lugar a una disminución de la transpiración acumulada y a un incremento de la tasa fotosintética, resultando, por tanto, en un incremento del *WUE* en relación a las plantas no transformadas, al final del periodo de estrés hídrico (9 días). Esto parece estar relacionado con una mejor regulación de las relaciones fuente-sumidero a través del mantenimiento del flujo metabólico. Además, se observó una mejora en los mecanismos antioxidativos de las plantas *CIN1*. Los cambios observados

en el metabolismo primario se asociaron con cambios en el balance hormonal: incremento de las concentraciones de la CK más activa en tomate, *trans*-zeatina (*t-Z*), y disminución en los niveles del precursor del etileno ACC. De este modo, la invertasa extracelular actúa como punto integrador entre el metabolismo primario y las fitohormonas en respuesta al estrés hídrico, postulándose como una nueva estrategia para superar los efectos adversos del estrés hídricos sobre la fisiología y la productividad final del cultivo.

Por otra parte, mediante una aproximación genética se pudieron identificar aquellas señales hídricas y hormonales implicadas en la regulación del *WUE* a través del control de la biomasa foliar y de la capacidad fotosintética. La explotación de dichos caracteres mediante la tecnología del injerto ha demostrado tener una utilidad directa sobre la mejora de la productividad final de la planta a través de la comunicación raíz-parte aérea. El precursor del etileno ACC y el ABA parecen ser señales hormonales implicadas en el crecimiento foliar principalmente al final del periodo de cultivo, cuando la tasa de transpiración era más elevada. El ACC se asoció positivamente con el *WUE_{aγ}* (en base a producción de fruto) y negativamente con el *WUE_{av}* (en base a biomasa vegetativa) a través de una regulación negativa del área foliar. Otros factores hormonales, como las CKs, SA, ACC y JA también parecen ser señales (positivas) en la regulación del crecimiento foliar y por tanto del *WUE_a*.

Por tanto, mediante una aproximación funcional, se ha puesto de manifiesto el papel de las invertasas en la tolerancia al estrés hídrico a través de una modificación del balance hormonal. Por otro lado, mediante una aproximación genética usando líneas *RIL* se han identificado caracteres hormonales (principalmente ACC y CKs), implicados en la regulación del *WUE* en tomate, y que han sido explotados para mejorar la productividad mediante la tecnología del injerto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La hipótesis de partida se divide en dos partes:

1. Se ha demostrado que las invertasas juegan un papel importante en la respuesta de la planta al estrés abiótico influyendo en las relaciones hídricas de la planta y retrasando la senescencia foliar. La modulación de la actividad invertasa, utilizando estrategias biotecnológicas, podría tener un efecto positivo en la tolerancia al estrés hídrico incrementando el uso eficiente del agua.
2. La variabilidad genética presente en especies silvestres de tomate en relación a su mayor uso eficiente del agua podría ser transferida a variedades comerciales de tomate utilizando dichas especies silvestres como portainjertos.

Los objetivos concretos se pueden resumir en los siguientes puntos:

1.1.- Estudiar el papel de las invertasas en la respuesta al estrés hídrico y su influencia en el uso eficiente del agua.

1.1.1.- Caracterizar la influencia de la sobreexpresión del gen *CIN1* sobre las relaciones hídricas de las plantas y sobre la mejora del uso eficiente del agua.

1.1.2.- Identificar factores metabólicos y hormonales implicados en la tolerancia al estrés hídrico en plantas de tomate que sobreexpresan el gen de una invertasa extracelular *CIN1*.

1.2.- Identificar la variabilidad natural para el uso eficiente del agua y otros parámetros fisiológicos relacionados en una población de líneas recombinantes (RIL) de tomate procedentes de un cruce entre la especie cultivada y una especie silvestre afín (*Solanum lycopersicum* cv Moneymaker x *S. pimpinellifolium* acc. TO-937)

1.2.1.- Identificar variabilidad genética para el consumo de agua en la población *RIL* estudiada.

1.2.2.- Identificar factores nutricionales y hormonales relacionados con el *WUE* (del inglés, Water Use Efficiency).

1.2.3.- Selección de líneas de interés con alto y bajo *WUE*, que se corresponderán o no con alto y bajo vigor.

1.3.- Identificar caracteres hídricos y hormonales relacionados con el uso eficiente del agua discriminando entre los aportados por la raíz y los aportados por la parte aérea.

1.3.1.- Identificar variabilidad genética en parámetros relacionados con el *WUE* tanto hídricos, como no hídricos.

1.3.2.- Identificar la influencia de la raíz y de la parte aérea sobre el *WUE* y sus componentes, así como de la importancia relativa de los parámetros implicados.

1.3.3.- Determinar el efecto que las hormonas procedentes de la raíz (ABA, citoquininas y ACC) ejercen sobre parámetros relacionados con el *WUE* en la parte aérea.

1.4.- Determinar la potencial explotación de los caracteres aportados por la raíz en la mejora del *WUE*, seleccionando las líneas más adecuadas para ser utilizadas como portainjertos de variedades comerciales.

1.4.1.- Identificar líneas con determinados caracteres aportados por la raíz que puedan ser utilizadas como portainjertos para aumentar significativamente el *WUE* en el cultivo de tomate, susceptibles de ser explotados comercialmente.

1.4.2.- Identificar la relación entre el aumento en el *WUE* aportado específicamente por el sistema radicular y las particularidades hídricas, nutricionales y hormonales que actúen sobre el suministro de agua a la parte aérea, la tasa de transpiración, el tamaño foliar y la eficacia fotosintética.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

1.- EL PROBLEMA DEL ESTRÉS HÍDRICO

Los organismos vivos tienen dos propiedades que los definen: organización celular y requerimiento de agua líquida. Los organismos son capaces de explotar cualquier nicho ecológico, no importa cómo sea de extremo, siempre que esté disponible el agua libre. Kramer and Boyer (1995) resumieron las cuatro funciones del agua en las plantas. El agua es sin duda el componente más importante de una planta, alcanzando más del 90% del peso fresco en la mayoría de las plantas herbáceas. El agua también es un solvente con propiedades biofísicas únicas, como una temperatura de vaporización, constante dieléctrica y tensión superficial elevadas. Estas propiedades únicas permiten al agua permanecer líquida en un amplio rango de temperaturas y disolver una extensa variedad de iones, minerales y moléculas. Además de ser un solvente, el agua actúa como reactivo en una serie de reacciones bioquímicas fundamentales, incluyendo servir como donador de electrones primario en la fotosíntesis. Finalmente, desde una perspectiva fisiológica, el agua es el componente clave en el mantenimiento de la turgencia celular (Wood, 2005).

La disponibilidad de agua es una de las mayores limitaciones en la productividad vegetal (Boyer, 1982), y es uno de los principales factores en la distribución de las especies vegetales. Más del 35% de la superficie terrestre está considerada árida o semiárida, experimentando precipitaciones insuficientes para la mayoría de usos agrícolas. Además, como consecuencia del cambio climático, algunas regiones que presentan precipitaciones adecuadas podrían transformarse en ambientes con limitación de agua. Predicciones a medio plazo estiman que muchas regiones agrícolas experimentarán una "estación seca"

predecible, mientras que en otras es impredecible. Las regiones agrícolas afectadas por la sequía soportan importantes pérdidas en el rendimiento. El desarrollo de cultivos cada vez más tolerantes que mantengan la productividad, es un requisito fundamental para el sostenimiento de la agricultura y las demandas alimenticias futuras (Munns et al., 2010).

La tolerancia de un cultivo al estrés hídrico esta esencialmente vinculada a su capacidad de acceder al agua del suelo y utilizarla de manera más eficiente (Richards et al., 2010). Las plantas desarrollan una serie de estrategias para tolerar condiciones de déficit hídrico que pueden ser muy diferentes entre plantas anuales y perennes. Para cultivos anuales como el trigo y la cebada en ambientes semiáridos, una estrategia exitosa es un desarrollo acelerado y un tiempo de floración y maduración corto, permitiendo que el agua disponible pueda ser usada por la planta antes del periodo de fuerte evaporación como consecuencia del aumento de temperatura. Otra estrategia es elegir un cultivo de desarrollo lento y siembra temprana (Passioura & Angus, 2010). Las especies perennes pueden emplear una estrategia conservadora, minimizando el uso del agua para evitar el riesgo de deshidratación de la hoja, y reanudando un crecimiento rápido cuando regresa la temporada de lluvias.

1.1. Ambientes limitados de agua: regiones áridas y semiáridas del mundo

El agrupamiento de los elementos del clima en clases, se puede fundamentar en gran número de parámetros; la dificultad reside en establecer criterios generales partiendo de los componentes climáticos que consideramos representativos. La primera y más generalizada regionalización se debe a los griegos, y dividía la Tierra en tres grandes zonas climáticas, basándose en la distribución de las temperaturas: tropical, templada y polar. Desde entonces pueden observarse dos tendencias principales en la clasificación: clasificaciones genéticas, basadas en los factores que generan la diversidad

climática, y las llamadas empíricas, basadas en elementos del clima combinados en índices (Cuadrat & Pita López, 2006).

Las principales clasificaciones son las siguientes:

- Clasificación genética de Flohn
- Clasificación de Budyko
- Sistema de Thornthwaite
- Clasificación de Köppen

Entre ellas, la última constituye el mejor ejemplo de clasificación empírica y es uno de los esquemas más conocidos y de mayor aplicación por los geógrafos. Este sistema de clasificación climático reconoce cinco tipos climáticos principales (Fig. 1.1) (Köppen, 1936).

- a. Climas húmedos tropicales
- b. Climas secos
- c. Climas húmedos de latitudes medias con inviernos suaves
- d. Climas húmedos de latitudes medias con inviernos fríos
- e. Climas polares

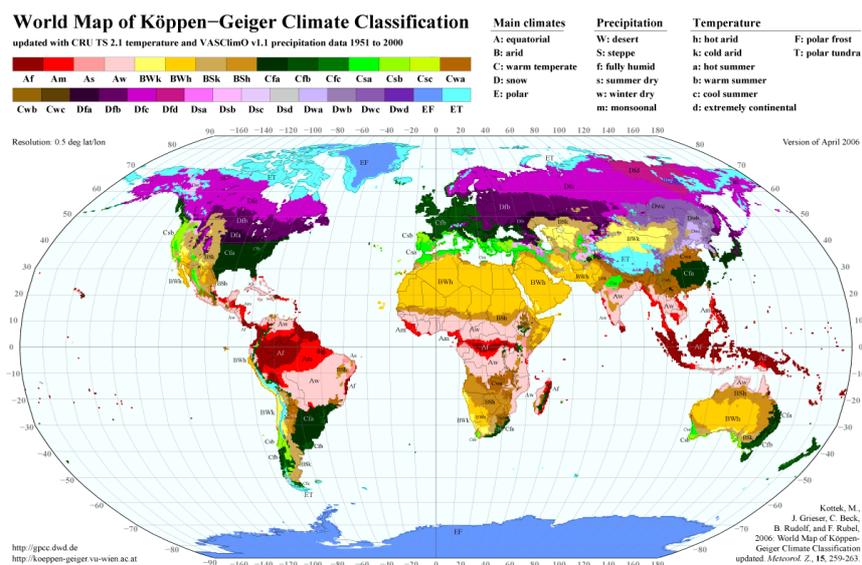


Figura 1.1.- Mapa mundial de la Clasificación Climática de Köppen-Geiger para el periodo 1951-2000.

Los climas secos se reconocen fácilmente, pero es más difícil de clasificarlos con precisión por zonas. Quizás el sistema más sencillo y ampliamente utilizado es el que desarrolló Meigs (1953), basado en la precipitación media (Fig. 1.2). Las tierras *extremadamente áridas* tienen al menos 12 meses consecutivos sin lluvias, las tierras *áridas* tienen menos de 250 mm³ de precipitación anual, y las *semiáridas* una media anual de entre 250 y 500 mm³.

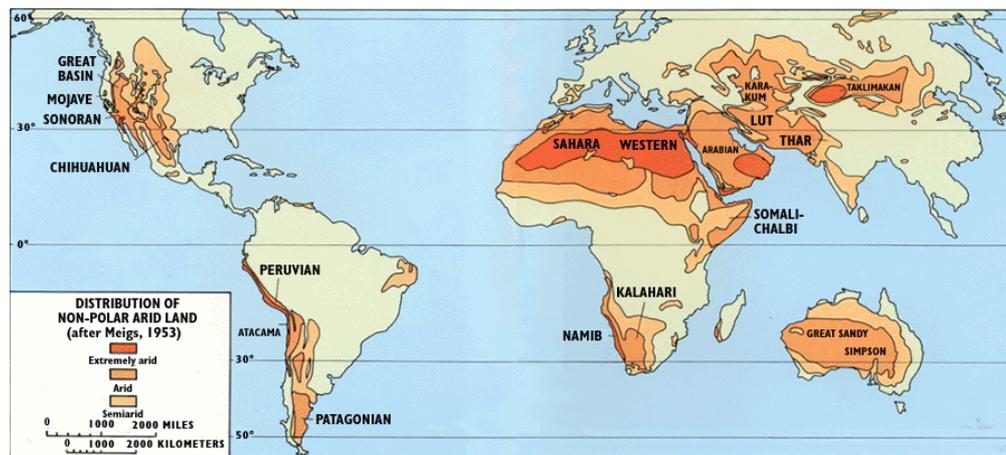


Figura 1.2.- Regiones áridas y semiáridas del mundo. Basado en Meigs (1953) y obtenido a través del "United States Geologic Survey" (USGS) (Walker, 1997).

La mayoría de los desiertos se encuentran cerca del ecuador, entre el Trópico de Cáncer (30°N) y el Trópico de Capricornio (30°S), abarcando la mayor parte de África, península Arábiga, costa oeste de América del Sur y casi toda Australia. Excepciones considerables son la Patagonia de América del Sur, Sonoran, Mojave y la Gran Cuenca del oeste de EE.UU., y el Lut, Karakum y Taklimakan de Asia central. El desierto de Atacama, a la sombra de la cordillera de los Andes, es el desierto más seco del mundo con precipitaciones una vez cada diez años (Walker, 1997). Por otra parte, aunque el problema de la desertificación y la sequía afecta en mayor medida al continente africano, el problema no se localiza únicamente en las tierras secas de ese continente, ya que una tercera parte de la superficie terrestre se encuentra amenazada por problemas de desertificación, incluidos los países del Mediterráneo.

Respecto a Europa, con el previsible aumento de las temperaturas en las próximas dos décadas (alrededor de 0,2°C por década), se espera que las precipitaciones sean más fuertes en el norte de Europa y más escasas en el sur. De hecho, las sequías han tenido graves repercusiones económicas en el pasado en algunos de estos países (CNULD, 2013).

En España la situación no es muy diferente al resto de los países europeos. La Agencia Europea del Medio Ambiente (AEMA) prevé reducciones en torno a un 25% del agua disponible para el año 2030. Esto implica que el 65% de la población española sufrirá las consecuencias de la escasez de recursos hídricos, casi el doble que en la actualidad. A ello hay que unir el hecho de que amplias zonas de nuestra geografía se encuentran potencialmente afectadas por el proceso de desertificación. De hecho, más de dos terceras partes del territorio español pertenecen a las categorías de áreas áridas, semiáridas y sub-húmedas secas. En el mapa de aridez de España (Fig. 1.3) se observa que toda la mitad sur, a excepción de las cadenas montañosas más elevadas, junto a la meseta norte, la cuenca del Ebro y la costa catalana entran dentro de alguna de estas categorías y, por lo tanto, son susceptibles de sufrir procesos de desertificación.

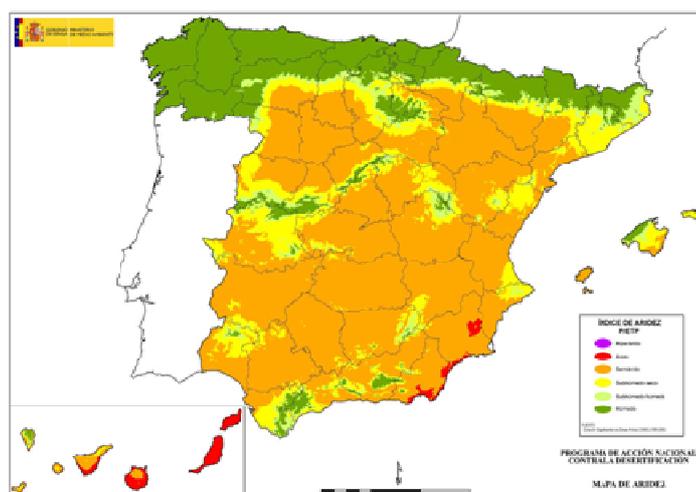


Figura 1.3. Mapa de aridez en España (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) (Anuario de Estadística Agraria, 2013).

1.2. Impacto global del Estrés Hídrico

En la actualidad, la superficie cultivada a nivel mundial asciende a 1,5 x 10⁹ hectáreas. De esta cifra, el 74% está destinada a cultivos de secano y genera el 60-65% del suministro mundial de alimentos (Döll & Siebert, 2002). Sin embargo, durante los últimos 50 años, el área de riego ha aumentado de forma notable, especialmente en países en vías de desarrollo, y actualmente supone un 87% del consumo de agua a nivel mundial (Shiklomanov, 1999).

Futuras asignaciones de agua de riego serán objeto de una creciente competencia entre las ciudades, las industrias manufactureras y las necesidades del medio ambiente. Las áreas de secano suelen estar destinadas a cultivos de grano para el consumo humano y materia prima, mientras que las áreas de regadío se destinan a cultivos de alto valor como hortalizas, aunque también a determinados cultivos de grano (Passioura & Angus, 2010).

El agua es un bien escaso en muchas partes del mundo, y los cambios climatológicos previstos agravarán la situación en un futuro. Además de la disminución en la cantidad y frecuencia de las precipitaciones, el aumento de la temperatura global favorecerá aun más las pérdidas de agua por evapotranspiración (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007). La sobreexplotación de las aguas subterráneas como consecuencia del incremento en las necesidades de riego es otro factor que puede agravar más el problema (Konikow & Kendy, 2005; Oki & Kanae, 2006).

Contrario al crecimiento de la superficie irrigada a lo largo del tiempo, la población mundial continúa incrementando, siendo en el presente de 7 mil millones de personas, pudiendo crecer a 8,3 en 2030 y cerca de 9 en 2050. Como consecuencia del aumento de la población y del cambio climático, un incremento en la demanda de riego en climas semiáridos podría exacerbar el

proceso de sequía. Aunque el incremento de las temperaturas beneficiaría algunos cultivos en determinadas zonas, por el contrario afectaría a muchos otros como consecuencia de un estrés térmico y/o un incremento en la evapotranspiración (Fig. 1.4).

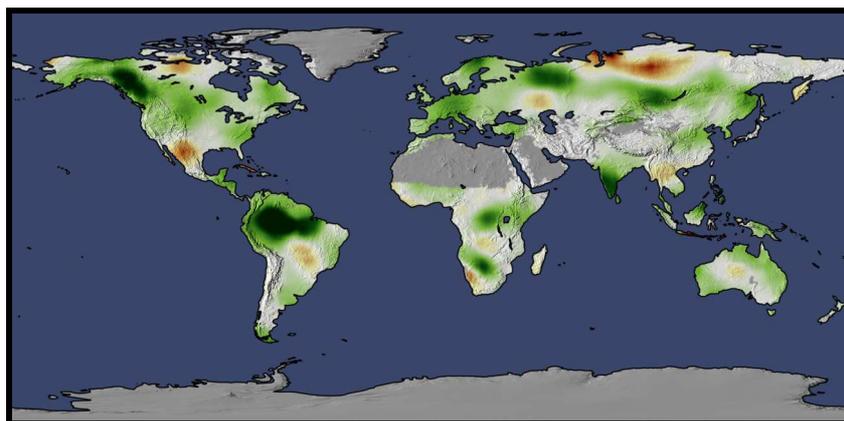


Figura 1.4.- Incremento (áreas verdes) y descenso (áreas marrones) en la productividad vegetal global durante el período 1982-1999 (Earth Observatory, 2003).

A escala Europea, el 45% del total de la extracción de agua se usa para la agricultura, el 40% para la industria y el proceso de generación de energía de las torres de refrigeración y el 15% restante se destina al abastecimiento del agua pública. Según la Agencia Europea del Medio Ambiente, cerca del 8% del sur, centro y este de Europa (o lo que es lo mismo, 14 millones de hectáreas) presentan una vulnerabilidad alta o muy alta a la desertificación (y esto excluye a Chipre, Kosovo, Malta y Turquía) (Ambiente, 2012). En términos de abastecimiento, se estima que 12 millones de hectáreas de tierra producen alrededor de 20.000 toneladas de grano al año. Si se incluyen las áreas de vulnerabilidad moderada, se puede concluir que 40 millones de hectáreas de suelo Europeo están amenazadas, lo que equivale a la extensión de Suecia. El sur de Portugal, España, Sicilia, el sureste de Grecia, Bulgaria y Rumania son las zonas más afectadas por la desertificación en Europa, según una estimación basada en un índice compuesto que mide características como las propiedades

del suelo, el clima y la vegetación y excluye las influencias socioeconómicas y humanas (CNULD, 2013).

En términos globales, en Europa, ocho países padecen actualmente estrés hídrico: Alemania, Reino Unido, Italia, Malta, Bélgica, España, Bulgaria y Chipre, que, en conjunto, representan el 46% de la población europea. Algunos de los países europeos con tierras secas, como Chipre, Bulgaria, España, Italia y Malta hacen uso en la actualidad de más del 20% de sus suministros de agua a largo plazo. Chipre, por ejemplo, que ha estado sufriendo severas sequías, ha consumido más del 40% de sus suministros renovables (CNULD, 2013).

En España hay una gran cantidad de suelos afectados por el proceso de desertificación, particularmente en el sur de la Comunidad Valenciana, Región de Murcia y este de Andalucía, asociado a la expansión del riego. En la actualidad la superficie nacional afectada asciende a 2,4 millones de hectáreas (FAO, 2013).

2.- INTERÉS DEL TOMATE COMO MATERIAL DE ESTUDIO

2.1.- Cultivo, importancia económica y adaptación a la investigación.

El tomate pertenece a la familia de las Solanáceas (*Solanaceae*), subfamilia *Solanoideae* y tribu *Solaneae* (Taylor & Van Staden, 1998). En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicum* L. (Linnaeus, 1753). Por estar estrechamente relacionada con la belladona y la mandrágora (plantas del género *Solanum*) fue considerada una planta venenosa. 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 éste debía estar unido al género *Solanum*. Recientemente y basándose en datos morfológicos y moleculares, se ha vuelto a adoptar el nombre científico de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado mientras que las otras especies de *Lycopersicon* han sido incorporadas al género *Solanum* (Foolad, 2007).

La familia de las Solanáceas incluye otros cultivos vegetales importantes como el chili y el pimiento (*Capsicum spp.*), patata (*Solanum tuberosum*), berenjena (*Solanum melongena*), tomatillo (*Physalis ixocarpa*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Es originario de la costa occidental de Sudamérica, entre Ecuador y Chile, teniendo lugar su domesticación en México (Bai & Lindhout, 2007; Sims, 1980). El tomate fue introducido en Europa a mediados del siglo XVI y es ahora uno de los productos vegetales más populares en el mundo junto a las bananas, manzanas, naranjas y uvas (Wien, 1997). Es una planta perenne, de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinado) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminado). La temperatura óptima para su cultivo es de 23°C durante el día y 17°C durante la noche. Temperaturas superiores a los 30-35°C tienen un impacto negativo sobre el desarrollo de los óvulos fecundados y, por tanto, afectan al crecimiento de los frutos, y al desarrollo general de la planta. Temperaturas inferiores a 10°C también tienen un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Durante el período de floración la temperatura es un factor crítico, ya que por encima de los 25°C o por debajo de los 12°C se inhibe la fecundación. La temperatura también tiene una influencia directa en el desarrollo de los frutos, acelerándose la maduración a medida que incrementa la temperatura. En cuanto a la humedad relativa, el óptimo oscila entre el 60% y 80%. Cuando la humedad

relativa incrementa por encima del 80% el riesgo de incidencia de enfermedades en la parte aérea es mayor, y puede determinar, además, el agrietamiento de los frutos y dificultades en la polinización, debido a que el polen se apelmaza. En el otro extremo, una humedad relativa menor al 60% dificulta la fijación de los granos de polen al estigma, lo que dificulta la polinización. La intensidad lumínica es otro parámetro ambiental muy importante ya que si las condiciones lumínicas son deficientes, los procesos de crecimiento, desarrollo, floración, polinización y maduración de los frutos pueden verse negativamente afectados. El tomate no es exigente en cuanto a las condiciones y características del suelo, excepto en lo que se refiere al drenaje, que debe ser bueno para facilitar la aireación y el acceso del oxígeno. El tomate se desarrolla mejor en suelos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. Sin embargo, se adapta perfectamente al cultivo sin suelo. Por otra parte, a pesar de la importancia de los cultivos sin suelo en el sureste peninsular, no se conoce con precisión la superficie ocupada por los mismos, de forma que existen estudios basados en encuestas a agricultores que señalan la existencia de casi 5.000 hectáreas de cultivo hidropónico sólo en la provincia de Almería (Céspedes López et al., 2009), mientras que otras estimaciones asocian esa superficie a todo el sureste peninsular (Urrestarazu Gavilán, 2004), siendo la perlita, la lana de roca, la arena y la fibra de coco los sustratos más utilizados.

La industria asociada al cultivo de tomate es una de las industrias hortícolas más avanzadas y globalizadas. La mayoría de la producción está localizada en zonas templadas con veranos calurosos y secos (Urrestarazu Gavilán, 2004). Sin embargo, en las prácticas de cultivo, la cantidad de producción destinada para procesado o consumo en fresco, así como la organización y estructura de la industria y mercados, varían mucho entre los diferentes países.

Tabla 1.1.- Principales países productores de tomate a nivel mundial (año 2013)

	Producción (t)	Porcentaje del total (%)
China	41.879.684	17,02
Estados Unidos de América	12.902.000	5,24
India	11.979.700	4,87
Turquía	10.052.000	4,08
Egipto	8.544.990	3,47
Italia	6.024.800	2,45
Irán (República Islámica del)	5.256.110	2,14
España	4.312.700	1,75
Brasil	3.691.320	1,50
México	2.997.640	1,22
República de Uzbekistán	2.347.000	0,95
Federación de Rusia	2.000.000	0,81
Nigeria	1.860.600	0,76
Ucrania	1.824.700	0,74
Grecia	1.406.200	0,57
Portugal	1.406.100	0,57
Marruecos	1.277.750	0,52
República Árabe Siria	1.156.300	0,47
Túnez	1.100.000	0,45
Iraq	1.013.180	0,41
MUNDO	123.032.774	100

(Fuente: FAOSTAT, FAO (2013))

La producción mundial de tomate (fresco y procesado) ha aumentado en un 300% en las últimas cuatro décadas. Según datos de la FAO del año 2013 a nivel mundial, España, con un volumen de producción de aproximadamente 4.312.700 t, representa poco más de 1,7% del total, y ocupa el octavo lugar tras China, Estados Unidos, India, Turquía, Egipto, Italia e Irán. (Tabla 1.1). En Europa es la tercera nación que más superficie destina a este cultivo (58.300 ha) detrás de Italia (118.822 ha) y La Federación de Rusia (115.200 ha); en cuanto a

los rendimientos por hectárea ocupa el décimo quinto puesto con 739.743 kg ha⁻¹. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2.- Producción en los países europeo (año 2013)

	Área cosechada (Ha)	Rendimiento (Hg/ Ha)
Italia	118.822	507.044
Federación de Rusia	115.200	173.611
España	58.300	739.743
Rumanía	49.755	154.463
Grecia	28.000	502.214
Serbia	20.181	93.857
Portugal	16.000	878.813
Polonia	14.487	467.763
Ucrania	8.360	218.266
Belarús	7.365	421.126
Albania	6.161	323.459
Francia	5.978	982.914
República de Moldova	5.977	95.752
Ex República Yugoslava de Macedonia	5.665	296.575
Bosnia y Herzegovina	3.573	102.524
Bulgaria	2.924	391.946
Eslovaquia	2.703	134.876
Hungría	1.874	716.510
Países Bajos	1.700	4.794.118
Montenegro	972	230.761
Croacia	946	355.687
Bélgica	500	5.250.000
Lituania	433	58.291
Malta	410	355.415
República Checa	389	186.067
Alemania	322	2.275.932
Reino Unido	213	4.192.488
Suiza	180	1.611.111
Austria	175	2.528.057

Estonia	168	308.571
Eslovenia	117	321.880
Finlandia	114	3.438.421
Dinamarca	60	3.383.333
Suecia	60	2.666.667
Irlanda	35	3.714.286
Noruega	34	3.799.118
Letonia	7	34.286
Islandia	4	4.050.000
Luxemburgo	1	710.000
MUNDO	478.165	51.465.945

(Fuente: FAOSTAT,FAO (2013))

En cuanto a la producción de tomate en España por Comunidades Autónomas en el año 2011, el primer lugar corresponde a Extremadura y Andalucía (1.275.368t y 1.553.966t, respectivamente), que en conjunto representan poco más del 75% de la cosecha nacional de este producto hortícola; le siguen la Región de Murcia con 311.065t, Navarra con 158.844t, Canarias con 133.321t, Galicia con 116.492t y Castilla la Mancha con 97.372t. En cuanto al tomate para procesado, es Extremadura la Comunidad Autónoma que más produce (1.237.683t), concentrándose la mayoría de la producción (1.080.585t) en la provincia de Badajoz, le sigue por importancia productiva Andalucía con 396.607t, Navarra con 136.583t y Castilla la Mancha con 100.271t (Anuario Estadística Agraria, MARM, 2011).

Además de su importancia económica, la planta de tomate se adapta muy bien a la investigación porque posee una serie de atributos que la hacen idónea para la manipulación genética y el desarrollo de estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y moleculares (Rick, 1987). Se desarrolla bien en un amplio rango de condiciones tanto *in vivo* como *in vitro* y es fácil de reproducir. Debido a su alta autogamia, las líneas puras se mantienen con facilidad. Además, la existencia de una amplia variabilidad genética en especies silvestres

emparentadas, con las que, en la mayor parte de los casos, presenta una buena cruzabilidad, facilita enormemente su inclusión en programas de mejora vegetal (Cuartero et al., 1984; Rick, 1979). Es, por otro lado, una planta de fácil manipulación mecánica y que se adapta perfectamente a la tecnología del injerto (Pardo et al., 1998; Zijlstra et al., 1994). Posee un alto potencial reproductivo con abundante producción de semillas (de 5.000 a 25.000 por planta en ciclo completo). Se ha usado como planta modelo para el estudio de procesos fisiológicos y bioquímicos en el desarrollo de las semillas, germinación y dormancia (Suhartanto, 2002). Su citogenética es bastante conocida, y su genoma, ubicado en 12 cromosomas básicos, ha sido completamente secuenciado recientemente (Mueller et al., 2005). Por lo tanto el tomate constituye un material vegetal excelente para el estudio de los cultivos hortícolas (Taylor & Van Staden, 1998).

En el contexto de la Región de Murcia destacan las líneas de investigación llevadas a cabo por el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), en cuyo Departamento de Nutrición Vegetal se han desarrollado importantes investigaciones con el tomate como sujeto de estudio en áreas como la evaluación fisiológica y agronómica de variedades mejoradas genéticamente (regulación iónica y metabolismo del carbono y del nitrógeno), cruces interespecíficos con variedades silvestres, halocondicionamiento, uso de injertos y aplicación de sustancias bioestimulantes. Todo lo anterior ha sido planteado en pro del fomento de la tolerancia a condiciones ambientales desencadenantes de estrés hídrico o salino en las plantas y del uso eficiente de los recursos.

3.- USO EFICIENTE DEL AGUA

3.1. *Perspectiva histórica*

Rendimiento y uso del agua, son parámetros estrechamente relacionados con la fotosíntesis y la transpiración (Bacon, 2004). De acuerdo con Stanhill (1986) la primera investigación científica acerca del crecimiento y el rendimiento vegetal en relación con el uso del agua fue la llevada a cabo por Woodward en la “Philosophical Transactions of the Royal Society”, donde se describe un aumento en el crecimiento de la planta de menta en relación con el gasto de agua (Woodward, 1699). Lawes en 1850 llevó a cabo la primera serie de experimentos para evaluar el uso del agua en el cultivo, a través de mediciones gravimétricas de la pérdida de agua de grandes recipientes sembrados con cereales, leguminosas y trébol, y fue uno de los primeros en reconocer una clara relación entre la transpiración y la producción de biomasa (Stanhill, 1986).

Un hito en el estudio del uso eficiente del agua de las plantas, el también llamado *WUE* (del inglés, Water Use Efficiency) llegó a principios del siglo XX con el trabajo de Briggs y Shantz (1913) en Akron, Colorado. Ellos determinaron la tasa de transpiración (tasa de agua transpirada por peso seco producido - el recíproco del uso eficiente de agua) de 62 especies diferentes de plantas (Briggs & Shantz, 1916). Mientras que la validez del enfoque de Briggs y Shantz fue cuestionada, particularmente contra las nuevas técnicas meteorológicas por Penman (1948), el re-análisis de la “Serie Akron” demostró que dicho análisis era válido y que es posible extrapolar los resultados de experimentos con contenedores a los del campo (De Wit, 1958; Penman, 1948). Estos estudios pusieron de manifiesto la estrecha relación positiva entre la cantidad total de agua transpirada por un cultivo y su rendimiento mediante la evaluación del rendimiento del cultivo y el uso del agua en respuesta a diferentes cantidades

de agua (Day et al., 1987; Innes & Blackwell, 1981; Jones, 1992; Kramer & Boyer, 1995).

En la segunda mitad del Siglo XX, el descubrimiento de la capacidad de fraccionamiento de los isótopos de carbono del proceso de fotosíntesis, y la proporción resultante de isótopos estables de carbono dentro de los tejidos vegetales, resultó ser una herramienta válida para evaluar tanto la medida instantánea como la integrada del *WUE* de la planta (Farquhar & Richards, 1984).

3.2. Definición del uso eficiente del agua

A pesar de las múltiples definiciones de este término en la literatura, es importante comprender el significado fisiológico y agronómico de este parámetro con el fin de saber sobre qué factores se puede actuar para su mejora con un mínimo impacto en la productividad de los cultivos.

En diversas áreas de la ciencia relacionadas con la tolerancia de las plantas a la sequía se han empleado una amplia gama de definiciones para el *WUE*, como la definición básica a escala de planta, que es la relación entre la tasa de producción de biomasa (YH) y la tasa de transpiración (E). Esta relación se representa con el símbolo de WUE_t , también conocida como la eficiencia de la transpiración. A escala de cultivo o vegetación, el *WUE* puede ser expresado como la relación entre la producción de biomasa total (B), biomasa aérea (S), o productividad de cosecha (Y) respecto a la evapotranspiración total (E_a) o la transpiración de la planta (E_p) (Loomis & Connor, 1992). Aunque habitualmente la biomasa se expresa en términos de masa seca (d), también se puede expresar en masa fresca (f) o en el equivalente en glucosa de dichas masas (g). La utilización de equivalentes en glucosa es particularmente útil para la comparación de cultivos con diferente composición química. Los valores para

los distintos cultivos dependen tanto de la especie como de la fuente de nitrógeno utilizada. La relación más usada es la producción de biomasa con la transpiración del cultivo, ya que el uso de la evapotranspiración total puede dar resultados erróneos cuando la evaporación del suelo domina la pérdida de agua, especialmente en los cultivos de cobertura completa y en situaciones de estrés hídrico.

A escala de hoja WUE_i se define como el cociente entre la tasa neta de fotosíntesis (A) y la transpiración (E). El WUE basado en el intercambio gaseoso puede ser convertido a WUE definido en términos de materia seca usando la conversión: 0,61-0,68 kg de materia seca/kg CO_2 .

En términos agronómicos es más común describir el WUE como la relación entre la producción de biomasa o rendimiento de cosecha y el agua total aplicada (incluyendo la lluvia). Aunque existe un amplio rango de variantes, especialmente en la literatura agronómica, los términos descritos anteriormente son los más utilizados.

3.2.1.- *Uso eficiente del agua instantáneo*

El valor observado del WUE en cualquier situación depende de las condiciones ambientales como, por ejemplo, cambios en el déficit de humedad de la atmósfera, que pueden alterar la tasa de evaporación incluso cuando la apertura de estomas y, por tanto, la tasa de asimilación, no cambia. Es particularmente interesante determinar cualquier diferencia intrínseca subyacente en el WUE que pudiera existir con independencia de las condiciones medioambientales específicas. Tal medida es concretamente útil para aquellas situaciones en las que estamos interesados en la mejora del WUE , por ejemplo a través de la mejora vegetal. Aunque es posible normalizar la medida de WUE en base a la demanda evaporativa, según lo sugerido por Wil (1958), tal vez el

enfoque más útil en general es definir de una manera sencilla, fisiológicamente, el WUE como una medida instantánea de la relación entre la asimilación neta de carbono en el proceso fotosintético y la pérdida de agua por transpiración (De Wit, 1958). Por tanto el “uso eficiente del agua instantáneo” (WUE_i) se calcula mediante la siguiente fórmula (Farquhar et al., 1986):

$$WUE_i = A/E \text{ o } A/g_s$$

donde A es la tasa de fotosíntesis, E corresponde a la tasa de transpiración y g_s la conductancia estomática.

Esta variable da una medida directa de la actividad subyacente del sistema fotosintético normalizado a la constante conductividad estomática. Una ventaja adicional de WUE_i es que la relación de A/g_s se mantiene prácticamente constante en un rango amplio de conductancia estomática, con lo que la relación es bastante lineal, excepto con los estomas muy abiertos, donde la limitación estomática de la fotosíntesis disminuye (Farquhar et al., 1986). El uso de la discriminación isotópica de carbono también da una medida del uso eficiente del agua instantáneo, ya que principalmente mide la relación A/g , donde g es la conductancia en fase gaseosa total del CO_2 .

3.2.2.- Uso eficiente del agua agronómico

Como hemos comentado anteriormente, desde un punto de vista agronómico, la medida del WUE incluye la planta entera y se define como la integral en el tiempo de dicha relación, expresada como la cantidad de biomasa cosechable producida por volumen de agua consumido (Jones, 2004; Martin et al., 1989; Reina-Sánchez et al., 2005).

$$WUE_a = \text{Biomasa/volumen de agua consumido}$$

La importancia del *WUE* fisiológico queda resaltada en el algoritmo [$GY = W \times WUE \times HI$], donde *GY* es la biomasa cosechable, *W* es la cantidad de agua consumida por el cultivo y *HI* es el índice de cosecha calculado como la relación entre el *GY* y la biomasa total producida (Passioura, 1977). Por consiguiente, aumentar el *WUE* agronómico, esto es, aumentar o mantener el rendimiento agronómico (*GY*), manteniendo o disminuyendo el consumo de agua (*W*), se podría conseguir aumentando el *WUE* fisiológico y/o aumentando el índice de cosecha (*HI*) reduciendo la proporción de biomasa vegetativa respecto de la biomasa cosechable.

3.2.3.- *Uso eficiente del agua instantáneo frente a integral*

Los estudios de intercambio de gases generalmente dan una estimación del WUE_i , mientras que los análisis de cosecha o métodos de discriminación isotópica medidos en los tejidos vegetales acumulados representan una medida integral. Sin embargo, es bastante difícil integrar las medidas instantáneas durante periodos más largos, como los cambios diurnos de la conductancia estomática y las condiciones ambientales, lo que implica que el *WUE* promedio de un largo plazo sólo puede estar relacionado vagamente con cualquier valor de medición instantánea. Se pueden lograr mejoras significativas en el *WUE* mediante el cierre de los estomas al mediodía (Tenhunen et al., 1982) y su apertura sólo por la mañana. El *WUE* integral depende del valor dado cuando los estomas están más abiertos.

3.3. *Uso eficiente del agua y productividad*

En los primeros estudios de las relaciones de la transpiración se observó que “cuanto más transpira una planta por unidad de materia seca producida, más transpira por unidad de superficie de hoja” (Maximov, 1929). En otras palabras, *WUE* disminuye a medida que aumenta la tasa de transpiración y,

debido a la estrecha asociación entre la tasa de transpiración y la tasa de asimilación, hay una tendencia de *WUE* a disminuir con el incremento de la productividad. Esta observación inicial, sin embargo, fue empañada en parte por la introducción de especies C_3 y C_4 en muchos estudios posteriores (Maximov, 1929) y fue sólo redescubierto recientemente. La importancia de esta observación reside en que la selección de un alto *WUE* en cualquier programa de mejora de cultivos puede ser perjudicial para la productividad en general siempre que el agua no sea limitante. De hecho, existe la idea generalizada de que la mejora del *WUE* es todo lo que se requiere para mejorar el rendimiento en condiciones de sequía (Udayakumar et al., 1998). Dado que en la mayoría de las situaciones la productividad disminuye a medida que aumenta el *WUE*, se deduce que maximizar simplemente el *WUE* no conduce necesariamente a la producción máxima.

En consecuencia, el concepto de *WUE* es de aplicabilidad limitada dentro de un contexto de adaptación de las planta a condiciones de baja disponibilidad de recursos hídricos. Esto es especialmente cierto para los ecosistemas naturales, donde los factores dominantes en relación con la supervivencia o la competitividad incluyen procesos tales como la efectividad de mecanismos como el cierre estomático o el desarrollo radicular, que impiden que ocurran daños en la planta ante el déficit de agua. Mejoras en el *WUE per se* es probablemente un parámetro donde hay poca competencia. No sirve de mucho para una planta que tenga un *WUE* alto, si las plantas de alrededor utilizan toda el agua disponible en primer lugar. Incluso en un contexto agrícola u hortícola, sigue pareciendo más importante el uso eficiente del agua disponible en el suelo en lugar del uso eficiente del agua *per se* (Jones, 1981).

3.4. Importancia de la mejora del uso eficiente del agua

Aunque la escasez de recursos hídricos no es un problema nuevo, el incremento de las zonas áridas y de la incidencia de los periodos de sequía asociados al cambio climático, junto a una creciente población mundial, suponen un impacto aún más negativo sobre la disponibilidad de dichos recursos. Estos hechos enfatizan la necesidad de desarrollar estrategias para adaptar la agricultura al cambiante panorama medioambiental. Además de cambios en las prácticas agronómicas, la mejora convencional o biotecnológica de los cultivos mediante selección de caracteres relacionados con la tolerancia a la sequía y al *WUE*, va a ser cada vez más necesaria.

En nuestro país, el cultivo del tomate destaca tanto por su importancia económica como por representar un elevado consumo de recursos hídricos, de manera que cualquier mejora en el *WUE* tendría un gran impacto socioeconómico y medioambiental. Aunque el cultivo de tomate en invernadero reduce en un 70% el consumo de agua con respecto al cultivo al aire libre, las pérdidas de agua por transpiración siguen siendo muy elevadas en relación a la cantidad de biomasa producida, de manera que en el mejor de los casos tan sólo se producen unos 25 g de fruto por litro de agua consumido (Reina-Sánchez et al., 2005; Soria & Cuartero, 1997). Por tanto, mejorar el uso eficiente del agua requiere un mayor control de las pérdidas de agua por transpiración o una mayor eficiencia transpiratoria. Se estima que un incremento de un 10% en el *WUE* en este cultivo podría suponer, en la Región de Murcia, un ahorro de más de 1.1 hm³ de agua de riego, cantidad equivalente a los requerimientos anuales de una población de 20.000 habitantes (WWF-ADENA, 2005).

3.5. Manipulación del uso eficiente del agua

Tanto factores externos (edáficos y climáticos) como factores endógenos a la planta, y sus interacciones, pueden influir en el *WUE* a través de sus efectos sobre la absorción de agua por las raíces y su difusión por transpiración a través de superficie foliar. Diversos estudios han permitido aumentar el *WUE* en el cultivo de tomate, controlando el déficit hídrico ambiental para reducir las tasas de transpiración (Romero-Aranda & Longuenesse, 1995; Romero-Aranda et al., 2002).

Sin embargo, son pocos los intentos que se han hecho para mejorar el *WUE* en el cultivo del tomate, estando aún sin explotar la elevada variabilidad que existe entre las especies silvestres (Foolad, 2007). En este sentido, los únicos trabajos desarrollados (Martin et al., 1988; Martin et al., 1989; Martin et al., 1999), han permitido identificar algunos marcadores moleculares tipo RFLP asociados al *WUE*, pero la complejidad de este carácter ha puesto de manifiesto la dificultad a la hora de seleccionar líneas de uso comercial (Foolad et al., 2007). De ahí el interés en seguir profundizando en los mecanismos fisiológicos implicados, tanto en la raíz como en la parte aérea, así como en la búsqueda de alternativas más directas e inmediatas, como puede ser el uso de los portainjertos, para mejorar el *WUE* de variedades comerciales.

3.6. Comunicación raíz-parte aérea, ácido abscísico y uso eficiente del agua

Durante los últimos 20 años, numerosos estudios han demostrado la importancia de la comunicación raíz-parte aérea en el desarrollo de respuestas de adaptación de la planta frente a situaciones de estrés hídrico tanto en el sustrato como en el ambiente aéreo, destacando la particular relevancia de las hormonas vegetales en esta comunicación (Davies & Zhang, 1991). Quizás la

mejor evidencia de la comunicación raíz-parte aérea sea la relacionada con el control del cierre estomático.

Los estomas son capaces de responder a numerosas hormonas vegetales entre las que destaca el ácido abscísico (ABA) (Dodd, 2003; Dodd, 2005). Esta hormona puede iniciar el cierre estomático e inhibir la apertura estomática, y por tanto limitar la pérdida de agua. Puesto que la repercusión del incremento de ABA en el xilema suele ser mayor sobre la reducción de la conductancia estomática que sobre la reducción de la fotosíntesis, el incremento de ABA en xilema produce un incremento significativo en el *WUE* (Socias et al., 1997) y parece estar en la base del éxito comercial para determinados cultivos del sistema de riego conocido como PRD o “partial root drying” (Davies et al., 2002; Loveys et al., 2004). El efecto que el ABA procedente de la raíz ejerce sobre el cierre estomático está avalado por una amplia información generada por aproximaciones clásicas (Dodd, 2005), y por experimentos recientes que utilizando un sistema genético transmisor e inductor de la síntesis de ABA, revelan que una situación de estrés hídrico en el medio que rodea a las raíces promueve la expresión de este transmisor en la parte aérea (Christmann et al., 2005). Por otra parte, estudios recientes parecen indicar que el suministro de ABA sintetizado en raíz puede afectar la expansión foliar en plantas sometidas a un adecuado suministro de riego (Dodd et al., 2009). Lo que estaría en contra de trabajos realizados recientemente con plantas de tomate manipuladas genéticamente para aumentar los niveles de ABA, que sugieren que esta hormona aumenta el *WUE* sin reducir la expansión foliar (Thompson et al., 2007). Y lo que es más llamativo, que este efecto es más evidente en condiciones normales de riego, lo cual abre nuevas expectativas al estudio de esta hormona en ausencia de estrés (variabilidad genética). Por lo tanto, que a pesar de las evidencias sobre el papel del ABA sintetizado en raíz como señal inductora del cierre estomático y por consiguiente sobre su contribución en la mejora del

WUE, la variación genética en la síntesis de esta hormona aún no ha sido suficientemente explotada (Soar et al., 2006).

3.7. Otros factores hormonales susceptibles de ser explorados y explotados para mejorar el WUE

El aporte más significativo hasta ahora para incrementar el *WUE* de los cultivos, está relacionado con mutaciones en genes que reducen el crecimiento vegetativo debido a una baja sensibilidad a giberelinas, aumentando así el índice de cosecha (Peng et al., 1999).

Las citoquininas son un tipo de hormonas que se cree se sintetizan mayoritariamente en la raíz e intervienen en el desarrollo de hojas y raíces, además de tener un notable y demostrado efecto en el retraso de la senescencia. También parecen tener un papel sobre la regulación estomática por interacción con ABA, aunque no existen evidencias directas (Dodd, 2005). En relación con esto, Rivero et al. (2007) han obtenido plantas de tabaco transformadas con el gen *IPT* (*isopenteniltransferasa*, clave para la síntesis de citoquininas) que presentan un *WUE* 2-3 veces superior al genotipo silvestre, lo que se ha relacionado con mayor contenido en agua y una mayor actividad fotosintética.

El etileno y su precursor ACC procedentes de la raíz han sido considerados como importantes reguladores del *WUE* en condiciones de estrés, al actuar sobre procesos tan importantes como la inducción de la senescencia, epinastia, abscisión y también como inhibidor del crecimiento foliar (Wilkinson, 2004). Se ha propuesto que el papel promotor del ABA sobre el crecimiento foliar se debe a su control inhibitorio sobre la síntesis de etileno (Sharp & Lenoble, 2002; Spollen et al., 2000).

Aunque las auxinas han sido muy poco estudiadas en relación con los estreses abióticos y prácticamente nada en relación con el *WUE*, su estudio

resulta de gran interés a este respecto ya que se cree que intervienen de forma significativa en la coordinación del crecimiento de la raíz y la parte aérea. Además, intervienen en el desarrollo del xilema, afectando así al flujo de agua. De hecho, los pocos trabajos existentes sobre este tema indican un incremento en la tolerancia al estrés hídrico y salino en plantas con mayor actividad auxínica, ya sea de origen natural o transgénico, y lo hacen a través de un mayor desarrollo de la raíz y de los vasos del xilema (Junghans et al., 2006; Park et al., 2005).

3.8. Caracteres no hormonales susceptibles de ser explotados para mejorar el WUE

Existen caracteres relacionados directamente con el estado hídrico de la parte aérea de la planta, susceptibles de influir en el *WUE* a través de sus interacciones con señales hormonales e hidráulicas procedentes de la raíz, como son los parámetros de intercambio gaseoso (conductancia estomática, fotosíntesis neta y transpiración) y el potencial hídrico foliar.

También intervienen caracteres asociados al flujo del agua en la raíz como la conductividad hidráulica. En este sentido, aunque no existe mucha información disponible sobre el control genético de caracteres de raíz que sean relevantes para el *WUE*, está ampliamente reconocido que el desarrollo del sistema radicular juega un papel importante (Sanguineti et al., 2007). La mayoría de los estudios orientados a mejorar el *WUE* se han desarrollado en cereales y son prácticamente inexistentes en cultivos hortícolas. En cereales, se ha observado una gran variación fenotípica de caracteres de desarrollo de raíz, condicionada por el ambiente y por interacciones de tipo epistático y pleiotrópico. Esto determina una gran plasticidad, de manera que caracteres morfológicos de raíz medidos en un estadio inicial de desarrollo no tienen relevancia en planta adulta (de Dorlodot et al., 2007). La especial propiedad de

adhesión/cohesión de la molécula de agua permite que la tensión creada por el flujo transpiratorio se transmita a lo largo de toda la columna de agua desde las hojas hasta las raíces (Steudle & Henzler, 1995). Esto abre la posibilidad de que las raíces puedan responder a mensajes hidráulicos procedentes de la parte aérea para mantener la homeostasis hídrica y prevenir posibles situaciones de deshidratación (Franks et al., 2007; Levin et al., 2007).

4.- INJERTO DE TOMATE

4.1. Líneas recombinantes

Las líneas recombinantes, también llamadas *RILs* (del inglés, Recombinant Inbred Lines) pueden servir como una herramienta poderosa para la elaboración de mapas genéticos. Una línea *RIL* está formada por el cruce de dos cepas puras seguido por repetidas secuencias de autofecundación o de apareamientos entre hermanos, para crear una nueva línea consanguínea cuyo genoma es un mosaico de los genomas de las cepas iniciales (Fig. 1.5A,B) (Broman, 2005). Dado que cada *RIL* es una cepa pura, y puede propagarse de forma continua, existen una serie de ventajas en el uso de líneas *RIL* para el mapeo genético: (1) únicamente es necesario genotipar cada cepa una sola vez; (2) se pueden fenotipar varios individuos de cada cepa para reducir la variabilidad individual, ambiental y de medida; (3) se pueden obtener múltiples fenotipos invasivos dentro del mismo grupo de genomas; y (4) dado que las *RILs* presentan un número mayor de puntos de ruptura que una meiosis normal, se puede obtener una mayor resolución en los mapeos genéticos.

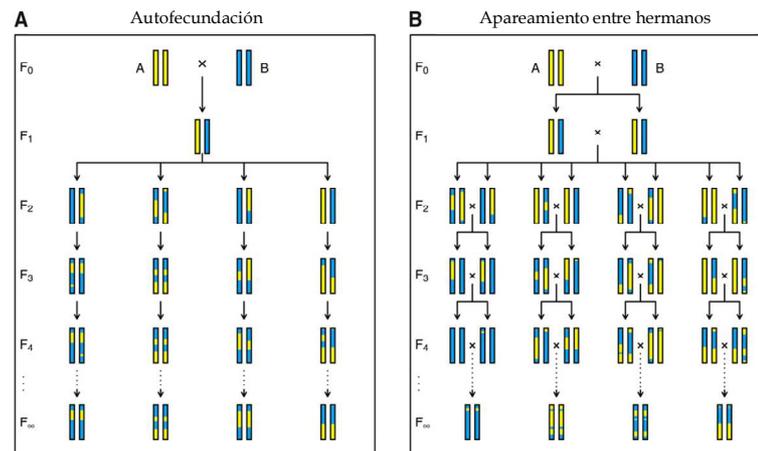


Figura 1.5.- Generación de líneas *RIL* mediante Autofecundación (a) y Apareamiento entre hermanos (b) (Broman, 2005).

Los paneles *RILs* pueden estar formados por 2 *RILs* (two-way *RIL*) (Fig. 1.6A), 4 *RILs* (four-way *RIL*) (Fig. 1.6B) y hasta incluso 8 *RILs* (eight-way *RIL*) (Fig. 1.6C) (Broman, 2012). Un panel de 8 *RILs* está formado por entrecruzamiento de las 8 cepas puras parentales, seguido por repetidos apareamientos entre hermanos para producir una nueva línea consanguínea cuyo genoma es un mosaico de las ocho cepas parentales. Este complejo panel sirve como un valioso recurso para el mapeo de los loci que contribuyen el fenotipo. El uso de dicho panel requiere una comprensión detallada de la relación entre los alelos en los loci ligados en un cromosoma de la línea endogámica, principalmente para la reconstrucción del ADN original del parental (el haplotipo) en base a marcadores genéticos como por ejemplo *SNPs* (del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms).

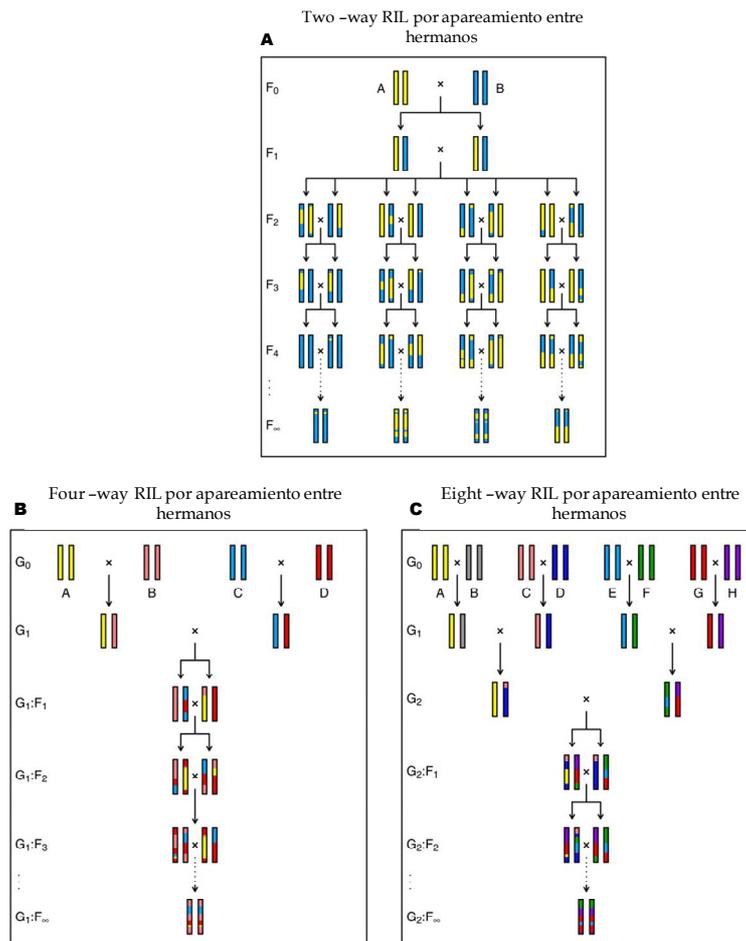


Figura 1.6.- Generación de two-way RIL (a), four-way RIL (b) y eight-way RIL (c) mediante Apareamiento entre hermanos (Broman, 2012).

4.2. Uso de portainjertos como medio para alterar la comunicación raíz-parte aérea

El injerto es un método de propagación vegetativa artificial de los vegetales en el que una porción de tejido procedente de una planta (la variedad o injerto propiamente dicho) se une sobre otra ya asentada (el patrón, portainjerto o pie), de tal modo que el conjunto de ambos crezca como un solo organismo (Hartmann & Kester, 1991).

Las finalidades del injerto pueden ser muy diversas (Hartmann & Kester, 1991):

- Perpetuar clones que no pueden mantenerse con facilidad con otros procedimientos de multiplicación
- Cambiar los cultivares de plantas ya establecidas
- Acelerar la madurez reproductora de selecciones de plántulas obtenidas en programas de hibridación
- Obtener formas especiales de crecimiento de las plantas
- Estudiar enfermedades virales
- Obtener beneficios de ciertos patrones

En Europa el injerto de hortalizas se utiliza desde 1947 entre los horticultores holandeses, aunque fue Daskaloff, en 1950, quien recomendó este procedimiento para las cucurbitáceas y solanáceas. Las investigaciones de Bravenboer (1962) fueron el origen del injerto de solanáceas (Louvet, 1974). Respecto a la técnica, el injerto de aproximación se introdujo en Japón en 1950 procedente de Europa (Suzuki, 1972).

Para que el injerto tenga éxito ha de haber una coincidencia de los tejidos próximos a la capa del *cambium* que produce callo. El injerto está limitado, en las angiospermas, a las dicotiledóneas y, en las gimnospermas, a las coníferas. Ambas tienen una capa de *cambium* vascular que se extiende entre el xilema y el floema (Hartmann & Kester, 1991).

No hay ningún método para predecir el resultado de un injerto, pero en términos generales se puede decir que cuanta más afinidad botánica haya entre las especies, mayores son las probabilidades de éxito del injerto.

1) Afinidad morfológica, anatómica, de constitución de sus tejidos, lo que quiere decir que los haces conductores de las dos plantas que se unen tengan diámetros semejantes y estén en igual número aproximadamente.

2) Afinidad fisiológica, de funcionamiento y analogía de savia, en cuanto a cantidad y constitución (S.E.A., 1978).

Entre las especies hortícolas, sólo se injertan las solanáceas (tomate, pimiento, berenjena) y cucurbitáceas (melón, sandía y pepino). Su buena aptitud para el injerto parece estar unida a la extensión del *cambium* (Louvet, 1974). El tomate (*Solanum lycopersicum*) se puede injertar sobre *Datura stramonium*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), y beleño negro (*Solanum nigrum*) (Hartmann & Kester, 1991). También se ha injertado tomate sobre patata (*Solanum tuberosum*), produciendo a la vez frutos de tomate y tubérculos de patata (Miguel, 1993). El fenómeno por el cual dos partes distintas y a veces diferentes se unen para formar una unidad se produce en dos fases: una en la que se produce una reacción de compatibilidad y otra en la que se completa la unión (Lindsay et al., 1974). En tomate la capacidad para cohesionar aumenta con el tiempo. La firmeza de la unión aumenta lentamente al principio y sólo lo hace rápidamente en un estado avanzado de la fase de injerto. La unión depende de una rápida división de los tejidos adyacentes de las superficies opuestas, y la efectividad del mismo se consigue mediante la formación de elementos vasculares. Durante los 4 primeros días hay una activa división celular y un gran aumento en el número de traqueidas y en los 3 días siguientes las traqueidas continúan diferenciándose pero no aumentan en número. La resistencia del injerto es proporcional a la cantidad de polisacáridos depositados en la unión. La restauración de la continuidad vascular se produce al final de la primera y durante la segunda fase, por el aumento del número de elementos traqueidales.

El establecimiento de injertos permite producir plantas quiméricas con diferentes genotipos en la raíz y en la parte aérea, siendo una alternativa quirúrgica a la mejora vegetal, ya que permite manipular la parte aérea de la planta actuando únicamente sobre la raíz a través de la comunicación raíz-parte aérea. La técnica de injerto empezó a utilizarse para mejorar la resistencia frente a plagas y patógenos de la raíz, mejorándose también la resistencia de la parte aérea frente a situaciones de estrés. Por tanto, la técnica de injerto permite explorar la comunicación raíz-parte aérea utilizando sistemas radicales derivados de genotipos tolerantes a la salinidad y más eficientes en el uso del agua. Mientras que los portainjertos intraespecíficos aportan una variabilidad genética muy limitada, la utilización de líneas recombinantes (*RILs*) que contengan segmentos del genoma procedentes de especies silvestres pero introducidos en el genoma de tomate cultivado, aporta un mayor rango de combinaciones genéticas, químicas y hormonales. Además estudios preliminares recientes indican que el uso de agua salina y de diferentes portainjertos cuyos genotipos proceden de especies silvestres, inducen una importante variabilidad en la superficie foliar, en el potencial hídrico foliar y en la fluorescencia de las clorofilas registrándose diferencias significativas en los parámetros relacionados con la producción (Albacete et al., 2009). Esto implica importantes diferencias en el índice de cosecha y probablemente en el *WUE*.

4.3. Consideraciones sobre el uso de portainjertos para mejorar el WUE de la parte aérea.

Si bien el papel de la parte aérea es importante, diversos estudios han mostrado que el efecto de la raíz es suficiente para modificar significativamente el comportamiento de la parte aérea de la planta, condicionando la acumulación en hoja de diversos osmolitos e iones tóxicos y nutricionales, y modificando el potencial hídrico foliar y la superficie y senescencia foliar en condiciones de

salinidad (Albacete et al., 2008; Albacete et al., 2009; Estañ et al., 2005; Ghanem et al., 2011). Por tanto, no debería existir ninguna duda razonable sobre la validez del injerto como estrategia para explorar y explotar la comunicación raíz-parte aérea utilizando sistemas radicales derivados de especies silvestres afines para mejorar el *WUE* en el cultivo de tomate.

5.- LAS HORMONAS VEGETALES

Las hormonas vegetales conforman un grupo de sustancias orgánicas naturales que actúan sobre diferentes procesos fisiológicos de la planta a bajas concentraciones, principalmente a nivel de crecimiento, desarrollo y diferenciación.

Went y Thimann (1937) definieron hormona como una sustancia que se transporta desde una parte a otra de un organismo (Went & Thimann, 1937). Su uso original en fisiología vegetal derivaba del concepto de hormona aplicado a mamíferos. Este concepto implicaba un sitio de síntesis localizado, transporte a través del flujo sanguíneo a un tejido diana, y el control de un proceso fisiológico en el tejido diana a través de la concentración de la hormona. Sin embargo, la síntesis de hormonas vegetales puede ser localizada en unos casos, pero en otros se produce en un gran número de tejidos o de células dentro de los tejidos. Además, mientras que en el caso de las hormonas animales su acción se produce en zonas diferentes al lugar de síntesis, en el caso de las hormonas vegetales esto no siempre es así.

El término "hormona" proviene del griego, y significa "estimular" o "poner en marcha". Por tanto, el origen del nombre no implica la noción de transporte *per se*. Su única característica común es que son componentes naturales de las

plantas con capacidad para actuar sobre diferentes procesos fisiológicos a concentraciones mucho menores que las de nutrientes o vitaminas.

5.1.- Descubrimiento, identificación y cuantificación de las hormonas vegetales.

Tipos de fitohormonas

El concepto de hormona vegetal probablemente deriva de las observaciones realizadas por Sachs entre 1880 y 1893. Este investigador sugirió que “las diferencias morfológicas entre órganos vegetales se debían a diferencias en su composición” y postuló la existencia de sustancias producidas en raíces, flores y otros órganos que se movían en direcciones diferentes dentro de la planta.

Darwin (1880), realizando ensayos sobre el fototropismo de coleóptilos, postuló que determinadas señales se transportaban desde la punta del coleóptilo hacia las zonas curvadas más abajo. Finalmente fue Went a finales de la década de 1920 quien aisló esta sustancia por difusión desde las puntas del coleóptilo hacia bloques de agar. Originalmente Went la llamó wuchsstoff, aunque posteriormente adoptó el nombre definitivo de auxina (Went & Thimann, 1937).

Diferentes líneas de investigación han permitido el descubrimiento de otras hormonas: investigaciones en patología vegetal permitieron conocer las giberelinas (GAs); ensayos con cultivo de tejidos condujeron al descubrimiento de las citoquininas (CKs); estudios sobre abscisión y dormancia revelaron la existencia del ácido abscísico (ABA); y los efectos del gas del alumbrado en la defoliación de los árboles en 1901, dieron pistas sobre la presencia de una sustancia gaseosa, el etileno.

Más recientemente se han descubierto otros compuestos que se han añadido a la lista de hormonas vegetales: brasinoesteroides, jasmonatos, ácido salicílico y péptidos. Las poliaminas, que son compuestos esenciales para todas

las formas de vida, también se han categorizado como hormonas vegetales dado que son capaces de regular el crecimiento y desarrollo, aunque los niveles en planta suelen ser superiores a los de las otras hormonas.

Inicialmente, la cuantificación de las hormonas vegetales requería la purificación de decenas o incluso centenares de kilogramos de tejido. Sin embargo, las técnicas actuales (cromatografía gaseosa o líquida acoplada a espectrometría de masas) permiten su determinación a partir de unos pocos miligramos de material vegetal, haciendo posible el análisis individual de hojas, brotes o incluso de diferentes tejidos dentro de un órgano.

5.1.1.- Auxinas

El ácido indol-3-acético (IAA) es la principal auxina en la mayoría de las plantas (Fig. 1.7). Existen diferentes precursores del IAA que a veces también presentan actividad auxínica (indolacetaldehído, ácido indol-3-pirúvico, ácido indol-3-propiónico, etc.). Además, en el mercado se pueden encontrar muchas auxinas sintéticas que se utilizan para aplicaciones exógenas.

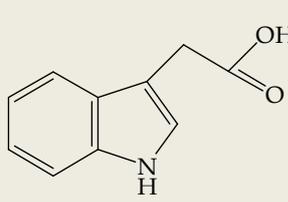
EFECTOS DE LAS AUXINAS:	ACIDO IDOL-3-ACÉTICO
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Elongación celular</i> - <i>División celular</i> - <i>Diferenciación de tejidos vasculares</i> - <i>Iniciación radical</i> - <i>Gravitropismo y fototropismo</i> - <i>Dominancia apical</i> - <i>Retraso senescencia</i> - <i>Abscisión de frutos y hojas</i> - <i>Crecimiento del fruto</i> - <i>Distribución de fotoasimilados</i> - <i>Retraso de la maduración de frutos</i> - <i>Desarrollo floral</i> 	

Figura 1.7.- Efectos de las auxinas sobre distintos procesos de la fisiología de la planta y estructura química del ácido indol-3-acético.

El IAA se sintetiza a partir del triptófano o el indol, principalmente en primordios de hoja y hojas jóvenes, así como en semillas en desarrollo. Se transporta célula a célula a través del cambium vascular y las células epidérmicas. Además, en el transporte hacia la raíz también está implicado el floema.

5.1.2.- Citoquininas

Las citoquininas son sustancias naturales derivadas de adenina. La forma química más común en plantas es la *trans*-zeatina (*t-Z*) (Fig. 1.8). Las citoquininas también pueden aparecer como ribósidos o ribótidos (Fig. 1.9).

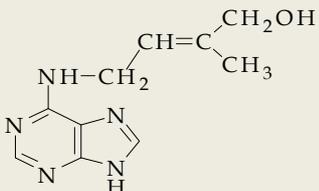
EFECTOS DE LAS CITOQUININAS:	ZEATINA
<ul style="list-style-type: none"> - División celular - Morfogénesis (iniciación parte aérea) - Crecimiento de brotes laterales - Expansión foliar - Retraso senescencia foliar - Apertura estomática - Desarrollo de los cloroplastos 	

Figura 1.8.- Principales funciones de las citoquininas en plantas y estructura molecular de la *trans*-zeatina.

Se sintetizan a partir de una modificación bioquímica de la adenina en zonas apicales de la raíz y semillas en desarrollo. Se transportan a través de la sabia xilemática desde la raíz hacia la parte aérea.

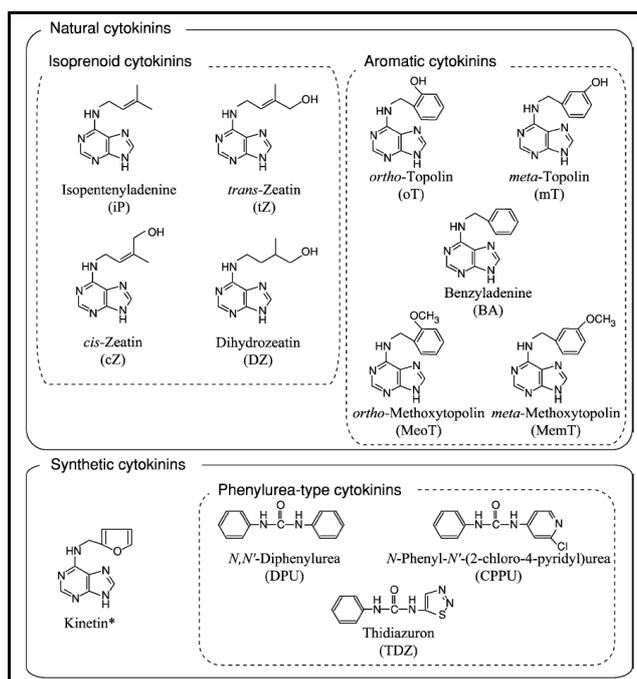


Figura 1.9.- Estructura química de las principales citoquininas. Las abreviaciones de los nombres triviales se muestran entre paréntesis (Sakakibara, 2006).

5.1.3.- Ácido abscísico

El ácido abscísico es un compuesto simple, que se sintetiza a partir de gliceraldehido-3-fosfato a través del isopentenyl difosfato y carotenoides (Fig. 1.10). Los principales lugares de biosíntesis son las raíces y las hojas maduras, fundamentalmente como respuesta a un estrés hídrico. Las semillas suelen ser también ricas en ABA importado desde las hojas o sintetizado *in situ*.

El ABA se exporta desde las raíces a través del xilema y desde las hojas a través del floema. Algunas evidencias apuntan a que el ABA podría circular hacia las raíces en el floema y volver hacia la parte aérea vía xilema.

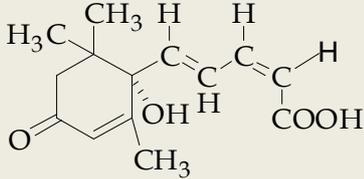
EFECTOS DEL ÁCIDO ABCSÍCSICO:	ÁCIDO ABCSÍCSICO
<ul style="list-style-type: none"> - Cierre estomático - Inhibición del crecimiento de la parte aérea - Síntesis de proteínas de reserva en semillas - Inducción y mantenimiento de la dormancia en semillas - Defensa frente ataques de insectos 	

Figura 1.10.- Principales procesos fisiológicos sobre los que interviene el ácido abscísico y estructura molecular.

5.1.4.- Giberelinas

Las giberelinas conforman una familia de compuestos basados todos ellos en la estructura básica *ent*-giberelano. Existen alrededor de 125 compuestos dentro de este grupo de hormonas. El ácido giberélico (GA₃) es un producto fúngico ampliamente utilizado en aplicaciones exógenas de GAs. Sin embargo, la GA más importante en plantas es GA₁ (Fig. 1.11).

Estos compuestos se sintetizan a partir del gliceraldehido-3-fosfato a través del isopentenil difosfato, en tejidos jóvenes de la parte aérea y semillas en desarrollo. Su biosíntesis comienza en los cloroplastos. Algunas GAs se transportan probablemente a través del floema y del xilema. Sin embargo, el transporte de GA₁ parece ser muy restringido.

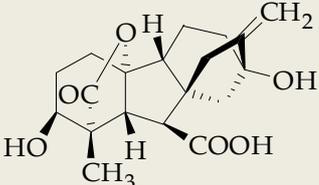
EFECTOS DE LAS GIBERELINAS:	GIBERELINA A ₁
<ul style="list-style-type: none"> - Crecimiento del tallo (elongación de entrenudos) - Espigado en plantas de día largo - Inducción de la germinación de semillas - Producción enzimática durante la germinación - Formación y desarrollo del fruto 	

Figura 1.11.- Efectos de las giberelinas en la planta y estructura química de la giberelina A₁.

5.1.5.- Etileno

El gas etileno se sintetiza a partir de la metionina en la mayoría de los tejidos de la planta, comúnmente en respuesta a un estrés. Normalmente las mayores tasas de producción de etileno aparecen en tejidos senescentes y en fruto en maduración (Fig. 1.12).

Dado que es un gas, el etileno se mueve por difusión desde los lugares de síntesis. Un precursor crucial en su biosíntesis es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual puede ser transportado produciendo efectos a distancia.

EFECTOS DEL ETILENO:	ETILENO
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Mantenimiento del gancho apical en plántulas</i> - <i>Estimulación de respuestas de defensa</i> - <i>Ruptura de la dormancia</i> - <i>Crecimiento y diferenciación de raíz y parte aérea</i> - <i>Formación de raíces adventicias</i> - <i>Abscisión de flores y frutos</i> - <i>Inducción floral en algunas plantas</i> - <i>Senescencia de hojas y flores</i> - <i>Maduración de frutos</i> 	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$

Figura 1.12.- Procesos fisiológicos en los que interviene el etileno y estructura molecular.

5.1.6.- Brasinoesteroides, ácido jasmónico y ácido salicílico

Los brasinoesteroides son un grupo de alrededor de 60 compuestos esteroideos, que tienen como estructura base el brasinolido, aislado por primera vez a partir del polen de *Brassica*. Actúan sobre la división y elongación celular y la diferenciación vascular, son importantes para la fertilidad, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz, y pueden promover la síntesis de etileno.

Otro grupo importante de hormonas vegetales son los jasmonatos. Están representados principalmente por el ácido jasmónico y su metil éster. El ácido jasmónico se sintetiza a partir del ácido linolénico. Este grupo de compuestos tiene un papel muy importante en las respuestas de las plantas ante condiciones de estrés. Asimismo, inhiben el crecimiento de la planta y la germinación de las semillas, promueven senescencia y maduración de frutos, y favorecen la formación de pigmentos.

Por último, el ácido salicílico, más recientemente considerado como un regulador de la fisiología de la planta, se sintetiza a partir del aminoácido fenilalanina. Sus efectos sobre la planta son variados, destacando su papel en la defensa frente estreses bióticos. Además, también favorece el desarrollo y longevidad de la flor, inhibe la síntesis de etileno y, en algunos casos, revierte los efectos del ABA.

5.2.- Balance hormonal en condiciones de estrés

La sequía, la salinidad y las bajas temperaturas son los principales factores medioambientales que determinan el crecimiento de las plantas y la productividad (Mittler & Blumwald, 2010; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Tras la exposición a condiciones de estrés abiótico, las plantas responden y adoptan estrategias como la alteración del metabolismo, crecimiento y desarrollo. Esto se lleva a cabo por un elaborado y complicado circuito regulador que incluye sensores al estrés, vías de señalización y salida de proteínas o metabolitos (Knight & Knight, 2001). Entre estos procesos, la regulación a nivel transcripcional juega un papel muy importante para la adaptación de las plantas a cambios en el entorno (Cai et al., 2011; Singh et al., 2002).

Las fitohormonas son esenciales para la capacidad de las plantas a adaptarse al estrés abiótico por medio de una amplia gama de respuestas adaptativas (Messing et al., 2010; Peleg & Blumwald, 2011; Santner & Estelle, 2009; Wang et al., 2009). A menudo alteran la expresión génica rápidamente por inducción o prevención de la degradación de reguladores transcripcionales a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Santner & Estelle, 2010). Uno de los temas más estudiados en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, especialmente al estrés hídrico, es la señalización de ABA y los genes sensibles a ABA. La síntesis de ABA es una de las respuestas más rápidas al estrés abiótico, provocando la expresión de genes ABA-inducibles (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006) y causando el cierre estomático, reduciendo así la pérdida de agua por transpiración (Aroca et al., 2012; Wilkinson & Davies, 2010) y finalmente limitando el crecimiento celular. Además el ABA también está involucrado en la regulación de la actividad invertasa en condiciones de estrés abiótico (Albacete et al., 2008; Yang et al., 2004).

Otras hormonas, en particular CK, SA, etileno, y JA, también juegan un papel importante directo o indirecto en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. CK es una antagonista de ABA, y la exposición de plantas a condiciones de estrés hídrico provoca una disminución de los niveles de CK (Pérez-Alfocea et al., 2011). Por otra parte, el etileno ha sido considerado durante mucho tiempo una hormona relacionada con el estrés que interviene en la senescencia foliar en ausencia de riego (Munné-Bosch & Alegre, 2004). Su biosíntesis se eleva en plantas de tomate sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico como la sequía (Aroca et al., 2012; Liang, 2003; Sozzi et al., 2000).

El examen de datos publicados de expresión a través de microarrays de *Arabidopsis thaliana* reveló numerosos genes que codifican proteínas asociadas con las vías de señalización de CK que fueron afectadas de manera diferente

por varios estreses abióticos (Argueso et al., 2009). La coincidencia entre el juego de genes regulados por hormonas durante las respuestas adaptativas de las plantas a los estreses medioambientales sugiere la existencia de una compleja red con una amplia intercomunicación entre las distintas vías de señalización hormonales.

La evidencia que apoya la existencia de una intercomunicación hormonal proviene principalmente a partir de análisis de fenotipos mutantes de *A.thaliana* (Santner & Estelle, 2009). La acción hormonal sinérgica o antagónica y la regulación coordinada de las vías de biosíntesis de hormonas juegan un papel crucial en la adaptación de las plantas al estrés abiótico. Recientemente, se ha postulado el papel de las axinas en la tolerancia al estrés hídrico: TLD1/OsGH3.13, que codifica el ácido indol-3-acético (IAA)-amido sintetasa, mejora la expresión de genes LEA (embriogénesis tardía abundante), lo cual se correlaciona con el incremento de la tolerancia a la sequía de plántulas de arroz (Zhang et al., 2009). Se ha demostrado que la expresión de muchos otros genes asociados a la síntesis, percepción y acción de auxina está regulada por etileno (Stepanova & Alonso, 2009). Entre ellos, los factores sensibles a auxina ARF2 y ARF19 (Li H, Johnson P et al., 2004; Li J et al., 2006), los transportadores de axina PIN1, PIN2, PIN4 y AUX1 (Růžička et al., 2007), y genes que codifican enzimas para la síntesis de auxina (ASA1/WEI2/TIR7, ASB1/WEI7, TAA1/SAV3/WEI8) (Stepanova et al., 2005; Stepanova et al., 2008). Por el contrario, se encontró que la auxina afecta a la biosíntesis del etileno. Se demostró que varios miembros de la familia génica *1-amino-ciclopropano-1-carboxilato sintasa* (ACS), que codifican enzimas limitantes de la síntesis de etileno, son regulados por tratamiento de auxina (Tsuchisaka & Theologis, 2004). Recientemente, se demostró que CK también es un regulador positivo de la biosíntesis de auxina, y se postula que un circuito regulatorio de retroalimentación homeostática que implica CK e IAA actúa para mantener

concentraciones apropiadas de CK e IAA en el desarrollo de los tejidos de la raíz y la parte aérea (Jones et al., 2010). GA y BR regulan muchos procesos fisiológicos comunes. Se demostró que OsGSR1, un miembro de la familia génica GAST (GA-estimulador de la transcripción), desempeña un papel clave en las rutas de señalización tanto de BR como de GA (Wang et al., 2009). ARNi de plantas transgénicas de arroz con una expresión reducida de OsGSR1 muestran fenotipos similares a plantas deficientes en BR, incluyendo raíces primarias cortas, hojas erectas y fertilidad reducida. GA está asociado también con SA. La aplicación exógena de GA (GA₃) induce un aumento de los niveles de expresión de ICS1 (isocorismato sintasa 1) y NPR1 (nonexpresor de genes relacionados con la patogénesis 1), genes implicados en la biosíntesis y acción de SA, respectivamente (Alonso-Ramírez et al., 2009). Plantas transgénicas de *A.thaliana* que expresan constitutivamente un gen sensible a GA de *Fagus sylvatica* mostraron una mejora en la tolerancia a estrés abiótico y la tolerancia al estrés estaba correlacionada con el aumento de los niveles endógenos de SA (Alonso-Ramírez et al., 2009).

ABA regula la apertura estomática durante el estrés, sin embargo, estudios recientes sugieren que hormonas como CK, etileno, BR, JA, SA, y NO también afectan a la función de los estomas (Acharya & Assmann, 2009). Mientras que ABA, BR, SA, JA y NO inducen cierre estomático, CK e IAA promueven la apertura. NO funciona como un intermediario clave en la red de señalización mediada por ABA que regula el cierre estomático (Ribeiro et al., 2009). ABA es también un regulador de la biosíntesis de estrigolactonas, como muestran mutantes de tomate ABA-deficientes de los distintos pasos de la ruta de biosíntesis de ABA (López-Ráez et al., 2010).

6.- EFECTOS INDUCIDOS POR EL ESTRÉS HÍDRICO EN LAS PLANTAS

La baja disponibilidad de agua es el principal factor ambiental que afecta al crecimiento y rendimiento de las plantas en diferentes regiones del mundo (Chaves, 2003). Con el fin de hacer frente a la escasez de agua, las plantas desarrollan estrategias de adaptación a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular, que permitan su supervivencia y desarrollo (Wang, 2001). Sin embargo, dichas estrategias varían enormemente de unas plantas a otras y, además, deben de funcionar de forma coordinada, de ahí que sea necesario estudiarlas a los tres niveles de organización (Borsani et al., 2003; de Campos et al., 2011; Munns, 2002; Munns & Tester, 2008; Tester & Davenport, 2003).

6.1.- Efecto osmótico

Las plantas crecen en tamaño por extensión de la pared celular, siendo la presión de turgencia la fuerza responsable de dicho crecimiento. El crecimiento celular por alargamiento de las células vegetales ocurre debido a que la concentración de solutos intracelulares es lo suficientemente elevada como para bajar el potencial hídrico y poder así extraer agua del medio que le rodea mediante osmosis. El primer efecto provocado por el estrés hídrico es la disminución del potencial hídrico del medio, lo que restringe la absorción de agua por las raíces y es lo que se conoce como efecto osmótico. En la mayoría de los casos, cuando se detecta un estrés osmótico, la primera respuesta de la planta es evitar la bajada del potencial hídrico (ψ_w) mediante la disminución de la conductancia estomática y, a largo plazo, por cambios en el crecimiento de las raíces con el fin de maximizar la absorción de agua (Kramer & Boyer, 1995). La

desventaja en estos casos es la disminución de la tasa de fotosíntesis, debido a la reducción de entrada de CO₂ a través de los estomas y el desplazamiento de los recursos al crecimiento de la raíz a expensas de los tejidos fotosintéticos y reproductivos. Por otra parte, con la prolongación del déficit de agua estas respuestas ya no confieren protección contra la disminución del potencial hídrico (Verslues et al., 2006).

Como mecanismo adicional de tolerancia, las plantas evitan la deshidratación celular mediante: (i) reducción de la pérdida de agua a través del endurecimiento de la pared celular, y/o (ii), facilitando la entrada de agua como resultado de la acumulación de solutos activos, que disminuye el potencial osmótico a través de un proceso llamado “ajuste osmótico” (Zhang et al., 1999). El mantenimiento de la absorción de agua y el potencial de presión celular a su vez puede contribuir al sostenimiento de procesos fisiológicos, como la apertura de estomas, la fotosíntesis y el crecimiento (Blum, 1996). Estos cambios de desarrollo parecen estar regulados por señales metabólicas (azúcares) y hormonales (Koch, 1996; Munns, 2002).

La adecuación del potencial hídrico interno o “ajuste osmótico”, como ya hemos mencionado anteriormente, implica, por una parte, la absorción y acumulación de iones procedentes del sustrato y, por otra, la biosíntesis endógena de solutos orgánicos. Frecuentemente, ambos mecanismos operan en conjunto, si bien su importancia relativa varía entre especies y genotipos, e incluso entre los distintos tejidos de la misma planta (Epstein, 1983). Según Munns (1988), el ajuste osmótico puede ser más bien una adaptación a la supervivencia en condiciones de estrés hídrico, que para el desarrollo durante el mismo (Munns, 1988).

6.2.- Alteraciones metabólicas

La sequía prácticamente afecta a todos los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas destacando entre ellos los relativos a la síntesis de proteínas, a la fotosíntesis y respiración y a las hormonas. También se han detectado cambios en el metabolismo de lípidos y en la síntesis de ácidos nucleicos. A nivel subcelular, se ve afectada la integridad de las membranas y paredes y también se produce una modificación de la estructura de los cloroplastos, mitocondrias y sistemas de Golgi.

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés hídrico, y también a otro tipo de estreses como la salinidad y el frío, aparece como consecuencia de cambios en la expresión genética a nivel celular. A los genes inducidos durante condiciones de estrés hídrico se les asignan funciones tanto en la protección de las células frente al déficit hídrico como en la regulación de genes para señales de transducción en respuesta al estrés (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Los productos de estos genes pueden ser clasificados en dos grupos.

Un grupo lo constituyen las proteínas que protegen directamente contra el estrés; dentro de este grupo tenemos proteínas implicadas en el transporte de agua a través de las membranas, enzimas necesarios en la biosíntesis de osmoprotectores como prolina, glicina, betaína o azúcares, proteínas que puedan proteger macromoléculas y membranas, las LEAs, dehidrinas, LTPs (proteínas de transferencia de lípidos), RABs (proteínas de respuesta al ácido abscísico), chaperonas, osmotina, proteínas anticongelación y enzimas de detoxificación (Ramanjulu & Bartels, 2002).

Otro grupo de proteínas es el que regula la expresión de los genes y señales de transducción en la respuesta al estrés, que incluyen factores de transcripción y proteínas quinasas. El control de los genes o proteínas que inician, potencian

o regulan simultáneamente las diversas respuestas al estrés preexistentes en todas las plantas, se utiliza para intentar aumentar la tolerancia de los cultivos al estrés hídrico (Hasegawa et al, 2000b; Zhu, 2002). Recientemente se ha descubierto que la proteína quinasa activada por mitógenos (*MAPK*, del inglés mitogen-activated protein kinase) y las fosfatasas quininas activadas por mitógenos (*MKPs*, del inglés mitogen-activated protein kinase phosphatases) regulan negativamente la tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de tabaco (Li et al., 2012). Las proteínas tirosinas fosfatasas (*PTPase*, del inglés, protein tyrosine phosphatases) también están implicadas en la red de señalización de las plantas mediante el control del cierre estomático (MacRobbie, 2002).

En condiciones de estrés hídrico, los poros estomáticos localizados en la epidermis de la planta regulan la pérdida de agua por transpiración y la fosforilación reversible de proteínas participa en la regulación de la apertura estomática (Li et al., 2012). El ABA induce el cierre estomático, con la consecuente reducción de pérdida de agua por transpiración (Astacio & van Iersel, 2011). La mayoría de estudios han demostrado que el aumento de la resistencia estomática durante el déficit hídrico es el principal factor limitante de la fotosíntesis (Chernyad'ev, 1997). Por lo tanto, el estrés hídrico provoca normalmente la disminución de la fotosíntesis y un aumento de la respiración, y como tal disminuye la cuantía de los productos fotosintéticos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento del estado energético. La disminución de la tasa de fijación de CO₂ por unidad de superficie foliar, que según Hsiao et al (1976) y Osmond et al (1982), es consecuencia de la disminución de la superficie foliar y aumento de la resistencia estomática, cutícula y células del mesófilo, está determinada por el déficit hídrico (Munns, 2002; Fricke et al, 2006).

6.3.- Estrés oxidativo

Las plantas sometidas a estrés hídrico se ven seriamente afectas por daños secundarios causados por estrés oxidativo. Como se mencionó anteriormente, una de las primeras respuestas para evitar la pérdida de agua implica el cierre de estomas, que posteriormente reduce la tasa de fotosíntesis debido a una disminución en la entrada de CO₂ (Medrano et al., 2002). Como consecuencia, la cadena de transporte de electrones fotosintética se reduce más, dando lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, del inglés reactive oxygen species), como radicales superóxido (O₂ •⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilo (OH•) (Apel & Hirt, 2004). En las células vegetales, la producción excesiva de *ROS* es potencialmente perjudicial para los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Halliwell et al., 1989), cuya oxidación a su vez puede dar lugar a efectos perjudiciales tales como inhibición enzimática, degradación de clorofila, alteración de la integridad de las membranas, pérdida de las funciones de los orgánulos y reducción de la eficiencia metabólica y la fijación de carbono, entre otros (Scandalios, 2005).

Varios sistemas enzimáticos y moléculas antioxidantes son responsables de contrarrestar los efectos nocivos de las *ROS*. En condiciones normales, la rigurosa regulación de los diferentes sistemas antioxidantes así como el estricto control, tanto en la compartimentación de las *ROS* como del balance de su producción/eliminación, permite la supervivencia celular a pesar de su continuo contacto con las *ROS* derivadas del metabolismo celular normal. Además, algunos autores sugieren que bajo condiciones de estrés, donde tiene lugar una sobreproducción de *ROS* dentro de las células vegetales como se ha comentado anteriormente, estas pueden controlar los daños debido a su capacidad para incrementar y/o inducir la actividad de las enzimas

antioxidantes, así como la síntesis y regeneración de metabolitos antioxidantes (De Gara, 2003; Torres, 2010; Torres et al., 2006).

El estrés oxidativo tiene su origen en la alteración de metabolismo celular de forma que se produce un desequilibrio entre los agentes oxidantes (*ROS*) y los mecanismos antioxidantes. Frente a estas condiciones, las plantas estimulan la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (*GSH*), el ascorbato (*ASC*) y el α -tocoferol, y la síntesis de enzimas antioxidantes del ciclo *ASC-GSH* (*APX*, *GR*, *DHAR*, *MDHAR*), catalasa (*CAT*), peroxidasa (*POX*) y superóxido dismutasa (*SOD*) (Hernández et al., 2000).

La disminución de la síntesis de *ROS* en paralelo a la acumulación de metabolitos protectores, es una característica dominante en los cambios metabólicos ocurridos durante las fases tempranas del establecimiento de una interacción susceptible (Parker et al., 2009). En una interacción incompatible aumenta la producción de *ROS*, pero también de forma paralela se ha descrito que se produce el debilitamiento de algunos sistemas antioxidantes como las enzimas detoxificadoras *APX* y *CAT* (Apel & Hirt, 2004; Mittler et al., 1999; Mittler et al., 2004). Esta respuesta favorecería la generación y acumulación de *ROS* y la activación de la muerte celular programada (*PCD*). Numerosos datos apoyan la hipótesis que una regulación precisa de los sistemas antioxidantes es parte de la ruta de señalización que activa la respuesta de defensa. Sin embargo, es difícil determinar si los cambios en los sistemas antioxidantes están directamente implicados en la activación de la respuesta de defensa de la planta o son una mera consecuencia del estrés oxidativo que ocurre en las células infectadas (De Gara, 2003).

Por tanto, la primera etapa enzimática en el proceso de detoxificación es la actividad de *SOD*, que constituye una familia de metaloenzimas que cataliza el desproporcionamiento del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) hasta oxígeno molecular y

H₂O₂ (Fig. 1.13). Al eliminar dicho radical, previene la posible formación del radical hidroxilo por la reacción Haber-Weiss catalizada por metales (Fridovich, 1986).

A continuación el H₂O₂ es reducido a agua por la actividad de ascorbato peroxidasa (*APX*), que se encuentra localizada en casi todos los compartimentos de la célula vegetal y emplea el ascorbato como sustrato reducido. El ascorbato debe ser regenerado rápidamente ya que, en su ausencia, la *APX* puede perder actividad siendo entonces muy susceptible de ser inhibida por H₂O₂ (Asada, 1988; Foyer & Halliwell, 1976).

La enzima catalasa convierte el H₂O₂ en oxígeno molecular y agua. Son enzimas ubicuas en todos los organismos aerobios. Debido a la citotoxicidad del H₂O₂, tanto directa como indirecta, la supervivencia de las plantas va a depender de su eficiente eliminación. Las catalasas representan una herramienta muy eficiente para el control y la eliminación de elevados niveles de H₂O₂, pero debido a su menor afinidad por el H₂O₂, en comparación con la *APX* (Nicholls et al., 2001), esta enzima se considera menos apropiada para controlar de forma precisa los mecanismos de regulación que impliquen bajos niveles de H₂O₂. La principal ventaja de las catalasas reside en que, a diferencia de otras enzimas eliminadoras de H₂O₂, no dependen de ningún compuesto reducido para la eliminación de H₂O₂.

Por otra parte también intervienen defensas no enzimáticas en la eliminación de compuestos *ROS*, incluyendo compuestos con propiedades antioxidantes intrínsecas, como ascorbato, α -tocoferol, glutatión reducido, β -caroteno, poliaminas y zeaxantina (Scandalios, 2005).

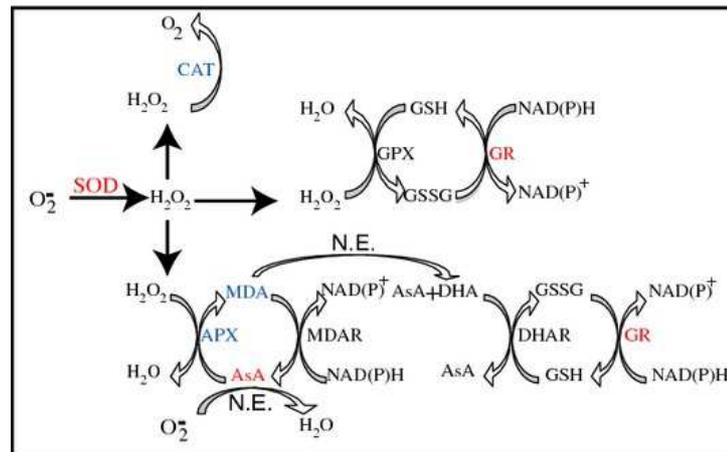


Figura 1.13.- Modo de actuación de los antioxidantes no enzimáticos y de las antioxidantes del ciclo ASC-GSH. CAT, catalasa; GPX, glutatión peroxidasa; APX, ascorbato peroxidasa; MDA, monodeshidroascorbato; AsA, ácido ascórbico; MDAR, MDA reductasa; DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA reductasa; N.E., reacción no enzimática.

Entre ellos, el ascorbato es una molécula capaz de secuestrar directamente radicales hidroxilo (OH^\cdot), oxígeno singlete (1O_2), y radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y en plantas es el antioxidante más importante para la eliminación de H_2O_2 . El ascorbato está presente en cloroplastos, vacuolas, citosol y espacio apoplástico en altas concentraciones (Foyer, 1994) así como en mitocondrias y peroxisomas (Jiménez et al., 1997). Su gran capacidad reductora lo convierte, según Foyer et al., 1994 en el antioxidante natural conocido más importante. La oxidación del ascorbato ocurre en dos etapas secuenciales formando primero monodeshidroascorbato (*MDHA*), y posteriormente deshidroascorbato (*DHA*). Esta oxidación también ocurre por medio de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (*APX*). En cuanto a su regeneración, el ascorbato es regenerado directamente por acción de la monodeshidroascorbato reductasa (*MDHAR*) en una reacción dependiente de $NAD(P)H$ o por acción de la deshidroascorbato reductasa (*DHAR*) utilizando glutatión (*GSH*) como poder reductor. A su vez, el *MDHA* puede ser reducido directamente a ascorbato usando electrones de la cadena de transporte fotosintética.

El Glutatión (g-glutamyl-cisteinil glicina) (*GSH*) es el principal compuesto tiólico de bajo peso molecular en plantas (Foyer et al., 1994). Está presente en todos los compartimentos celulares con concentraciones en un rango de milimolar. La forma reducida (*GSH*) es predominante en los tejidos vegetales, aunque también se detecta la forma oxidada (*GSSG*) formada por dos moléculas de *GSH* unidas por un puente disulfuro (con la eliminación de dos protones y dos electrones). La regeneración de *GSH* a partir de *GSSG* es catalizada por la actividad glutatión reductasa (*GR*) en una reacción dependiente de NAD(P)H, que mantiene alta la relación *GSH/GSSG* en la célula. El *GSH* puede reaccionar directamente con *ROS* como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), y radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) oxidándose, o también regenerar el ácido ascórbico a partir de *DHA* (vía *DHAR*), dentro del ciclo *ASC-GSH*, que es el principal mecanismo de detoxificación de H_2O_2 y regenerador de NADP en las plantas (Foyer & Rennenberg, 2000). La capacidad del sistema redox de *GSH* para detoxificar *ROS* es dependiente de la cantidad total de *GSH* y de la relación *GSH/GSSG*, así como de la actividad *GR*.

En las plantas superiores, los compuestos isoprenoides son sintetizados a partir del precursor C5 isopentenil difosfato (*IPP*) y su isómero dimetilalil difosfato (*DMAPP*) (Croteau, 2000; Chappell, 1995). La adición de unidades *IPP* a *DMAPP* conduce a la síntesis de prenil difosfatos tales como geranil difosfato (*GPP*, C10), farnesil difosfato (*FPP*, C15) y geranilgeranil difosfato (*GGPP*, C20), que son los puntos de partida para múltiples ramas que conducen a los productos isoprenoides finales (Fig. 1.14). A diferencia de la mayoría de los organismos, las plantas tienen dos vías separadas para la biosíntesis de *IPP* y *DMAPP*: la vía del ácido mevalónico (*MVA*), que produce *IPP* citosólica y la vía localizada en el plasto, metil eritritol 4-fosfato (*MEP*) (Eisenreich, 2001; Lichtenthaler, 1999; RodríguezConcepción, 2002). Isoprenoides plastídicos, incluyendo los principales pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides),

así como otros compuestos clave relacionados con la fotosíntesis (plastoquinonas, filoquinonas y tocoferoles), hormonas (giberelinas y ácido abscísico) y monoterpenos, son sintetizados a partir de precursores derivados de *MEP* (Fig. 1.14) (CarreteroPaulet, 2006; Loyola et al., 2012).

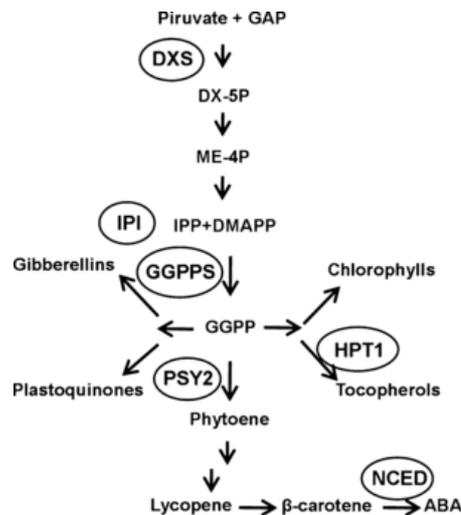


Figura 1.14.- Ruta de síntesis de compuestos isoprenoides.

El α -Tocoferol o vitamina E está considerada como el antioxidante más importante presente en las membranas lipídicas (Diplock, 1983). En los cloroplastos, cuyas membranas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, encontramos una elevada concentración de α -tocoferol que actuaría protegiendo las membranas de este orgánulo contra los daños oxidativos (Halliwell et al., 1989).

7.- PRODUCCIÓN, TRANSPORTE Y USO DE FOTOASIMILADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

Una de las respuestas fisiológicas más comunes de las plantas al estrés hídrico, con independencia de la especie, es el cierre de los estomas, reduciendo la fotosíntesis y, por tanto, afectando al metabolismo del carbono (Chaves, 2009;

Muller et al., 2011). Por ello, se podría esperar que en estas condiciones ocurriera un déficit de carbono. Sin embargo, la literatura demuestra que a menudo los compuestos de carbono se acumulan en los órganos, dando lugar a un incremento de las concentraciones de carbono. Dicha acumulación se ha visto en varias especies, distintas partes de la planta y para carbono soluble o estructural. Se han descrito acumulaciones de carbohidrato soluble en hojas de maíz (Kim, 2000), algodón (Timpa, 1986), cebada (Teulat, 2001), eucalipto y sorgo (Turner, 1978), lupino y eucalipto (Quick, 1992), pino (Marron, 2003), álamo (Bogeat-Triboulot, 2006), y vid (Cramer, 2007). Los hidratos de carbono también se acumulan en los tallos (Bogeat-Triboulot, 2006), flores, y frutos (Liu, 2004; McLaughlin & McLaughlin, 2004; Mercier, 2009), así como en las raíces (Jiang, 2001; Sharp, 1990). La acumulación se produce tanto después de rápidos shocks osmóticos, por ejemplo con polietilenglicol (PEG) o manitol (Zrenner, 1991), como durante un desarrollo lento de déficit hídrico (Cramer, 2007; Hummel, 2010).

Los carbohidratos a menudo se acumulan en forma de azúcares solubles como glucosa, fructosa y sacarosa. Sin embargo, en respuesta a déficit hídrico también se pueden acumular una amplia gama de compuestos ricos en carbono. Estos incluyen azúcares menores como trehalosa (Farias Rodriguez, 1998) o manitol (Guicherd, 1997), aunque también se produce una acumulación de ciertos aminoácidos (Morgan, 1992), en particular aquellos con una alta relación C/N como prolina (Hare, 1997). Ácidos orgánicos como malato (Franco, 2006), fumarato (Hummel, 2010) o citrato (Timpa, 1986) también se acumulan en respuesta a déficit hídrico en una amplia gama de especies, incluyendo *Arabidopsis* (Hummel, 2010). Muchos compuestos están considerados como "solutos compatibles", ya que pueden acumularse en grandes cantidades sin perturbar las funciones celulares, y se cree que protegen las estructuras subcelulares contra los efectos nocivos de la pérdida de agua de la célula.

En condiciones de estrés hídrico también se acumulan compuestos estructurales ricos en carbono como la celulosa y la lignina. De hecho, el déficit hídrico acelera la lignificación (Timpa, 1986; Vincent, 2005), disminuyendo los espacios intercelulares de la hoja (Hsiao, 1974), y aumentando el grosor de la misma (Hummel, 2010). Todas estas reacciones contribuyen al aumento de masa foliar específica que ocurre bajo déficit hídrico (Tardieu & Tardieu, 1999).

8.- FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LAS INVERTASAS EN RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO

En la mayoría de las plantas el disacárido sacarosa es el principal producto final de la fotosíntesis. La sacarosa es sintetizada en hojas maduras (hojas fuente) y trasladada a tejidos sumidero vía floema para sostener el metabolismo heterotrófico y el crecimiento, o para ser almacenada como sacarosa o almidón. El crecimiento y desarrollo de las plantas está acompañado por cambios en las relaciones fuente-sumidero (Roitsch & González, 2004). La sacarosa y sus productos de degradación glucosa y fructosa son las moléculas centrales para la translocación de carbohidratos, metabolismo y detección en las plantas superiores (Koch, 2004; Roitsch & González, 2004; Trouverie, 2004). El catabolismo de la sacarosa en plantas es uno de los mayores flujos metabólicos del planeta, después de los flujos de asimilación de carbono primario. Solo dos tipos de enzimas pueden catalizar la sacarosa en condiciones fisiológicas: invertasas y sacarosa sintasa (SS) (Barratt et al., 2009; Koch, 2004; Roitsch & González, 2004; Trouverie, 2004).

La glicosiltransferasa sacarosa sintasa (SS) cataliza la degradación reversible de la sacarosa a UDP-glucosa y fructosa conservando la energía del enlace α 1- β 2-glicosídico. En contraste, las invertasas (β -fructosidasa, β -

fructofuranosidasa) catalizan la hidrólisis irreversible a glucosa y fructosa. Basándonos en su solubilidad, localización subcelular, pH-óptimo y punto isoeléctrico, podemos distinguir tres tipos diferentes de isoenzimas invertasas: invertasa unida a la pared celular (cwInv, del inglés cell wall-bound invertase), invertasa citoplasmática (cytInv, del inglés cytoplasmic invertase) e invertasa vacuolar (vacInv, del inglés vacuolar invertase), que se localizan en el apoplasto, el citoplasma y la vacuola, respectivamente (Koch, 2004; Roitsch & González, 2004; Tang et al., 1999). VacInv y cwInv son glicoproteínas que comparten varias propiedades bioquímicas, por ejemplo tienen un pH óptimo entre 4.5 y 5.0 y atacan el disacárido a través de la fructosa. Por lo tanto, también se denominan invertasas ácidas y son β -fructofuranosidasas que también hidrolizan otros oligosacáridos que contienen fructosa, como por ejemplo rafinosa y estaquiosa. La cytInv está menos caracterizada, no está glicosilada y, por su pH óptimo neutro o ligeramente alcalino, es también conocida como invertasa neutra o alcalina. En contraste con las invertasas ácidas, la cytInv ataca específicamente a la sacarosa (Huang, 2007; Roitsch & González, 2004).

Las invertasas tienen un papel clave en varios aspectos del ciclo vital de la planta y en respuesta a estímulos medioambientales, ya que sus sustratos y productos de reacción son nutrientes y moléculas de señalización (Roitsch & González, 2004; Vargas, 2007). Los estreses abióticos, como la salinidad o el estrés hídrico, modifican las relaciones fuente-sumidero que influyen en el crecimiento de la planta así como en la adaptación al estrés y, por consiguiente, afectan a la productividad de los cultivos. Aunque se conoce poco sobre los mecanismos responsables de la reducción del crecimiento en condiciones de estrés hídrico o salino, la tolerancia a estreses abióticos y la productividad de los cultivos dependen de la capacidad de la planta no solo para suministrar recursos a los tejidos sumidero en crecimiento activo (biomasa vegetal y

cosechable), sino también para mantener la producción de asimilados en hojas maduras (a través del retraso en la senescencia) (Balibrea et al., 2003; Balibrea et al., 2000; Roitsch, 1999; Roitsch & González, 2004). La regulación metabólica de la senescencia de la hoja es, por tanto, un proceso de desarrollo importante en la respuesta de las plantas al estrés. El estrés puede influir en la senescencia foliar mediante la alteración del metabolismo del carbono, por ejemplo por degradación del almidón o alteración del metabolismo de la sacarosa y su interacción con fitohormonas (Wingler & Roitsch, 2008).

Hasta la fecha, un número creciente de estudios han puesto de manifiesto el papel fundamental de las invertasas en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, su importancia en condiciones de estrés abiótico no ha sido del todo aclarada.

El estrés hídrico conlleva cambios en las relaciones fuente-sumidero con limitaciones en los tejidos fuente dando lugar a una reducción en la tasa de exportación de fotoasimilados y, por tanto, a una disminución del rendimiento de la planta (Luquet, 2008; Pelleschi et al., 2006). Varios estudios sobre el efecto de estreses abióticos en invertasas señalan su importancia en el desarrollo reproductivo en condiciones de estrés hídrico (Roitsch & González, 2004). En un estudio realizado en plantas de maíz sobre la respuesta al estrés hídrico, se sugería la existencia de un mecanismo compensatorio tanto a nivel del floema en la fuente como del sumidero final, que tiende a incrementar las eficiencias de exportación e importación. La regulación diferencial de vacInvs en ambos tejidos, fuente y sumidero podría ser un mecanismo compensatorio (Trouverie, 2006). Asimismo, en hojas maduras de maíz se vio que el déficit hídrico daba lugar a una estimulación temprana y fuerte de la actividad vacInv, mientras que la actividad cwInv permanecía constante. Esta respuesta está fuertemente relacionada con los niveles de ARNm para el gen *Ivr2*, que codifica una

isoforma de vacInv (Pelleschi, 1999; Pelleschi et al., 1997). En este sentido, la inducción específica de la actividad vacInv en órganos fuente y sumidero de plantas de maíz en condiciones de estrés hídrico se correlacionó con un incremento en la expresión de *Ivr2* y así como de los niveles de proteína vacInv (Kim, 2000). El ABA parece estar implicado en la expresión del gen *Ivr2* y, por tanto, en la activación de la actividad vacInv (Trouverie, 2003). Por otro lado, se ha demostrado recientemente que un adecuado balance entre la actividad de las invertasas ácidas y SS está asociado con una mayor tolerancia a la sequía en las plántulas de trigo (Bogdan, 2009), y por lo tanto, parece ser que la SS tiene también un papel en la regulación del estrés hídrico.

El análisis de la actividad y expresión de las invertasas indica que estas enzimas responden a variaciones en los niveles de carbohidratos y hormonas vegetales (Kim, 2000; Trouverie, 2004; Trouverie, 2003; Werner, 2008). La activación de la cwInv y otras enzimas sacarolíticas mediadas por citoquininas, podría dar lugar a la inducción del metabolismo en tejidos sumideros, incrementando con ello la tolerancia al estrés hídrico (así como otros estreses abióticos), manteniendo el crecimiento y retrasando la senescencia foliar (Guivarc'h, 2002; Lara et al., 2004; Roitsch & Ehneß, 2000). Como ya se ha comentado, otras hormonas vegetales como el ABA parecen ser claves en la regulación de la actividad invertasa en condiciones de déficit hídrico (Yang et al., 2004). En este sentido, en hojas y raíz de plantas de maíz sometidas a estrés hídrico se observó una fuerte inducción, dependiente de la concentración de ABA, tanto de la expresión como de la actividad de la cwInv, mientras que otros factores como la glucosa fueron poco eficaces en el desencadenamiento de dicha respuesta (Trouverie, 2004; Trouverie, 2003).

8.1.- Señalización y regulación

Como hemos visto anteriormente, las invertasas juegan un papel fundamental en condiciones de estrés abiótico. Durante la aclimatación a las condiciones de estrés, se ponen en marcha mecanismos de regulación diferencial de las invertasas a nivel transcripcional y post-transcripcional en los que están implicados azúcares, fitohormonas e inhibidores proteicos. Además de eso, se han identificado otros métodos de control como el tráfico de proteínas y el turn-over de transcritos (revisado ampliamente por Huang (2007)). Todos estos mecanismos permiten una fina regulación de la actividad invertasa, así como de la acumulación, y distribución de azúcares.

En plantas los azúcares solubles proporcionan energía y esqueletos carbonados, actuando además como moléculas de señalización para regular la expresión génica. El término “regulación metabólica” fue introducido por Karrer and Rodriguez (1992). En general, las hexosas favorecen la división y expansión celular, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación y maduración. Diversos estudios han resaltado la importancia de la naturaleza y ubicación exacta de la señal-azúcar, así como el papel de las invertasas como moduladores de la relación sacarosa/fructosa (Bolouri Moghaddam, 2010; Weschke et al., 2003). Se conocen muchos genes regulados por azúcares que cubren diferentes rutas fisiológicas, incluyendo las invertasas (Bolouri Moghaddam, 2010; Koch, 1996; Roitsch, 1999; Sheen, 1999). Cabe destacar distintas *cwInvs* que son metabólicamente inducidas por glucosa, proporcionando un mecanismo de retro-alimentación positiva que también es relevante en la regulación asociada a otros estímulos. De hecho la sobrerregulación de una *cwInv* por cualquier tipo de estímulo puede ser mantenida o amplificada a través de la señalización por azúcares generada a partir de una elevada actividad invertasa para incrementar aún más el flujo de

asimilados (Roitsch et al., 2003; Roitsch & González, 2004). Por lo tanto, el metabolismo de la sacarosa es el punto central de un sistema de desarrollo que se auto-regula en plantas superiores. Además, el hecho de que tanto los azúcares como los estímulos generados a partir de un estrés ambiental que han sido estudiados en diferentes sistemas contribuyan a la regulación de las invertasas, los hace candidatos adecuados para ser utilizados como genes marcadores en el análisis de vías de señalización (Roitsch et al., 2003).

Las hormonas vegetales, que juegan un papel integral en el control del crecimiento, diferenciación y desarrollo vegetal, también parecen ser fundamentales en la regulación de las invertasas (Roitsch & González, 2004; Tymowska Lalanne & Tymowskalalanne, 1998), lo que, a su vez, implica que las invertasas participan en la mediación de la correspondiente respuesta hormonal, como se ha descrito anteriormente, en diferentes situaciones de estrés abiótico. Además del mencionado efecto de las citoquininas, ABA, auxinas, jasmonatos y giberelinas (Proels, 2006; Ranwala, 2008), se ha demostrado que los brasinosteroides (Godt & Goetz, 2000) y el etileno (Linden, 1996) juegan un papel en la regulación de las invertasas. La regulación metabólica por los azúcares quizás represente un metabolismo regulatorio a corto plazo para ajustar la importación de carbohidratos a la demanda real, mientras que la regulación hormonal se integra en un programa de desarrollo para ajustar las relaciones fuente-sumidero (Pérez-Alfocea et al., 2010). La interacción de las invertasas con las fitohormonas también pone de manifiesto su posición central en las vías de señalización.

Otro mecanismo de regulación y control de la actividad invertasa es la presencia de proteínas inhibidoras endógenas. A pesar de que esta regulación post-traducciona de las invertasas se conoce desde hace tiempo, no se ha estudiado a fondo su papel fisiológico, especialmente en condiciones de estrés

(Bonfig, 2010; Rausch & Greiner, 2004). En plantas de *Arabidopsis* se observó que estos inhibidores de invertasas (*InvInh*) muestran patrones de expresión específicos en respuesta a una serie de estreses o durante ciertos estadios del desarrollo vegetal (Rausch & Greiner, 2004). Recientemente, Bonfig (2010) encontró que, tras una infección de hojas de *Arabidopsis thaliana* por *Pseudomonas syringae*, la actividad invertasa incrementaba por represión de la expresión del inhibidor, asociándose así la inducción local de la fuerza sumidero a la respuesta de defensa. En plantas transgénicas de *A. thaliana* que albergan un gen *InvInh* (*At3g17225*), se vio que aplicaciones exógenas de ABA afectaban a la estabilidad de los transcritos del *InvInh*, lo cual sugiere que las hormonas vegetales también juegan un papel en la regulación de los inhibidores y, por tanto, en la actividad final de la invertasa (Koh, 2008).

La regulación coordinada observada de las relaciones fuente/sumidero y las reacciones de defensa en respuesta a los azúcares y a varios estímulos relacionados con el estrés (Ehness et al., 1997; Roitsch et al., 2003) plantea la cuestión sobre los mecanismos a través de los cuáles se realiza la integración de diversas señales para dar lugar a respuestas coordinadas. Una adecuada modulación de los procesos implicados en el metabolismo del carbono y la producción de energía resulta crucial en la adaptabilidad de las plantas a situaciones de estrés abiótico. Las invertasas funcionan, por tanto, en el punto de integración de señales metabólicas, hormonales y de estrés (Proels & Roitsch, 2009).

8.2.- El gen *CIN1*. Biotecnología, clonación

Durante los años noventa se produjeron importantes avances en el estudio de las invertasas vegetales. Roitsch et al. (1995) clonaron el ADNc completo que codifica una cwInv de *Chenopodium rubrum*, *CIN1*. El alto punto isoeléctrico de 9.9 de la secuencia proteica deducida es característico de invertasas apoplásticas

y la carga positiva resultante es importante para la unión a la pared celular cargada negativamente (Unger et al., 1994). Se demostró que el gen *CIN1* codifica una cwInv mediante purificación de la proteína correspondiente a partir de cultivos celulares en suspensión de *C. rubrum* y por análisis de los aminoácidos de la secuencia peptídica (Ehneß & Roitsch, 1997). Las isoenzimas vacuolar y extracelular se caracterizan por un marcado aminoácido diferente en la caja conservada WEC-P/VD. Las invertasas en general tienen la siguiente secuencia de aminoácidos en su centro catalítico: cisteína (C) - prolina (P) - asparragina (D) que, a nivel de ácido nucleico, corresponde a TGT/C - CCT/C/A/G - GAT/C en el caso de cwInv, y cisteína (C) - valina (V) - asparraginas (D), o a nivel de ácido nucleico, TGT/C, GTT/C/A/G - GAT/C para vacInv. Se ha demostrado que la presencia del residuo prolina (P) en las cwInvs determina un pH óptimo más ácido y una mayor especificidad por rafinosa frente a las vacInvs que tienen el residuo valina (V) en esa posición (Goetz & Roitsch, 1999).

Las isoenzimas invertasa de *C. rubrum* comprenden una pequeña familia de genes compuesta por tres miembros. Además del gen *CIN1*, se ha clonado y caracterizado la secuencia ADNc de una segunda cwInv, *CIN2* (Ehneß & Roitsch, 1997). Se supo que era una cwInv ya que era muy probable que fuera una invertasa ácida por su bajo pH y la homología en su secuencia y en la caja conservada WEC-P/VD con respecto a *CIN1* (Roitsch et al., 1995). El tercer miembro de esta familia es el gen *CIN3*, el cual también ha sido caracterizado y secuenciado. Codifica para una invertasa intracelular con un pH óptimo neutro, a pesar de tener una secuencia con una alta homología a la invertasa extracelular. Sin embargo, su punto isoeléctrico es demasiado bajo para ser una isoenzima de pared celular, las cuales requieren un alto pI para la interacción iónica con la pared celular cargada negativamente (Ehneß & Roitsch, 1997).

En plantas *S. lycopersicum*, se demostró que la mayor actividad de cwInv en raíces comparada con los tallos y las hojas fuente se correlaciona con la distribución de los patrones de expresión de *CIN1* (Roitsch et al., 1995). Debido a la relación que existe entre la cwInv y las citoquininas, plantas de tomate que expresan *CIN1* muestran un retraso de la senescencia foliar, a través de la relación fuente/sumidero (Lara et al., 2004). Se ha clonado una invertasa de la pared celular en arroz (*Oryza sativa* L.), *OsCIN1* que se expresa en raíces y en tejidos fuente y sumidero, siendo importante para el suministro de una fuente de carbono para el desarrollo de los tejidos foliares a través de la ruptura de sacarosa (Hirose et al., 2002).

CAPÍTULO II

***EFECTO DE LA
SOBREEXPRESIÓN DEL GEN CIN1
DE UNA INVERTASA
EXTRACELULAR EN CONDICIONES
DE ESTRÉS HÍDRICO***

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua es una de las mayores limitaciones en la productividad vegetal (Boyer, 1982), y es uno de los principales factores en la distribución de las especies vegetales. Las regiones agrícolas afectadas por la sequía soportan importantes pérdidas en el rendimiento. Además la sequía ocasiona modificaciones fisiológicas como reducción de fotosíntesis y regulación transcripcional y post-transcripcional de varios genes (Seki et al., 2007; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Por ello existe una necesidad urgente de generar plantas tolerantes al estrés hídrico (Lybbert & Bell, 2010), las cuales probablemente no se pueden lograr únicamente con los métodos tradicionales de mejora.

La tolerancia de las plantas al estrés hídrico está intrínsecamente ligada a la capacidad de producir y consumir carbohidratos en tejidos específicos. En plantas superiores, el crecimiento y el metabolismo de los tejidos sumidero está sostenido por los hidratos de carbono sintetizados en las hojas fuente, que son transportados principalmente como sacarosa a través del floema (Koch, 2004). Estas relaciones fuente-sumidero son dinámicas y cambian durante el desarrollo y en respuesta a diferentes estreses abióticos (Balibrea et al., 2003; Roitsch & González, 2004). El uso de la sacarosa en los tejidos sumidero requiere la escisión del enlace glicosídico, catalizada tanto por la sacarosa sintasa como por las invertasas. Basándonos en su solubilidad, localización subcelular, pH-óptimo y punto isoeléctrico, podemos distinguir tres tipos diferentes de isoenzimas invertasas: invertasa unida a la pared celular (cwInv), invertasa vacuolar (vacInv) e invertasa citoplasmática (cytInv) (Roitsch & González, 2004). La cwInv desempeña una función crucial en el desarrollo de la planta mediante la regulación de la fuerza sumidero asegurando un suministro

constante de fotoasimilados a los tejidos sumidero (Tang et al., 1999; Weschke et al., 2003).

En condiciones de estrés hídrico, la competencia entre los diferentes procesos fisiológicos y órganos sumidero por los suministros limitantes de carbono da lugar a una reducción en la fuerza sumidero, afectando al crecimiento y a la productividad (Cuartero & Fernández-Muñoz, 1999). El aumento de la fuerza sumidero a través de la actividad cwInv es una respuesta general en condiciones de estrés. En concreto, la expresión del gen que codifica una cwInv de *Chenopodium rubrum*, *CIN1*, aumenta en respuesta a una serie de estímulos relacionados con el estrés (Roitsch et al., 2000). Además, la actividad cwInv está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional por distintos factores, incluyendo azúcares, fitohormonas e inhibidores proteicos (Bonfig, 2010; Lara et al., 2004; Roitsch & González, 2004), existiendo una estrecha relación con las citoquininas, las cuales ocasionan un retraso de la senescencia (Lara et al., 2004). Juntos, estos mecanismos permiten la regulación de la actividad cwInv para controlar el crecimiento, desarrollo y por tanto la adaptación de las plantas en condiciones de estrés abiótico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

El cultivar utilizado para los experimentos de transformación fue *Solanum lycopersicum* L. cv-73. Se obtuvo a partir del híbrido comercial Precodor (Díez, 1989). Presenta frutos de buena calidad y uniformidad, redondos y de calibre mediano. Posee una buena respuesta morfogénica, y además está considerada un buen organismo modelo para investigar cuestiones biológicas fundamentales a nivel celular, molecular y genético.

Las semillas transformadas de tomate fueron proporcionadas por el Prof. Dr. Thomas Roitsch, del Instituto de Biología Vegetal, Grupo de Fisiología Vegetal, perteneciente a la Universidad Karl-Franzens de Graz, en Austria y multiplicadas en invernadero para construir un stock de semillas para nuestros experimentos. El ADNc completo de una invertasa extracelular (cwInv) fue clonado y secuenciado de *Chenopodium rubrum*, y su identificación se probó por la expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformación consiste en la introducción de la construcción consistente en un promotor específico de fruto inicialmente, procedente de una invertasa vacuolar (vacInv) de *Solanum piminellifolium* (=InvLp6g), que se expresa en fruto, hojas y plántulas de 2,5 kb, unido a un gen de una cwInv de *C. rubrum* (CIN1) de 1,7 kb, mediante el uso del vector PBI101 (InvLp6g::CIN1) (Imagen 2.1). Los plásmidos con el inserto fueron transferidos en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas de tomate fueron transformadas con el ADNt mediante la infección de los cotiledones con *Agrobacteria* (Clough & Bent, 1998).

Para este experimento se utilizó una línea silvestre WT y 5 líneas transgénicas independientes (*CIN1-8*, *CIN1-10*, *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93*).

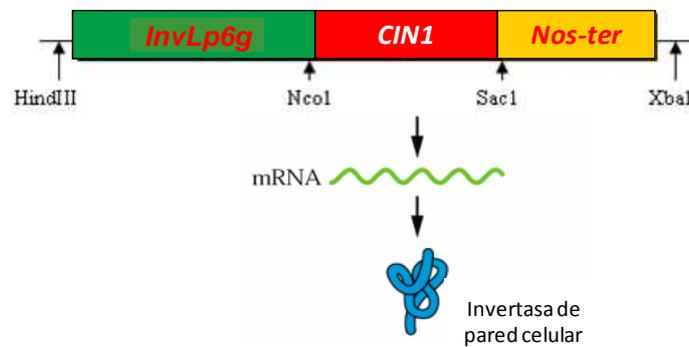


Imagen.2.1.- Construcción insertada en *Solanum lycopersicum*.

2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.- Condiciones de crecimiento

Como hemos comentado anteriormente, las plantas transgénicas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas en el Instituto de Biología Vegetal (Universidad Karl-Franzens de Graz, Austria). Se evaluaron una línea silvestre y 5 líneas transgénicas independientes (*CIN1-8*, *CIN1-10*, *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93*) con 6 réplicas cada una. Previo al experimento, las semillas se esterilizaron superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial (5% de hipoclorito sódico) diluida al 50% a la que se le añaden 2-3 gotas de detergente 7x-0 matic (Flow laboratorios). La solución desinfectante se eliminó mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos respectivamente) con agua destilada estéril. Posteriormente las plantas se germinaron en un fitotrón (Forma Scientific, Inc. Modelo 3744) en oscuridad, a una temperatura de 28°C y con una humedad relativa de 90% durante 3 días. Transcurridos 3 días se aplicó un fotoperiodo de 16 h luz, con una intensidad luminosa de 2000 luxes

(equivalente a $34 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) suministrada por una fuente de luz fría, y 8 h de oscuridad, a una temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante el periodo luminoso y de 18°C durante el periodo oscuro, y una humedad relativa constante de 60%.

La germinación y establecimiento del semillero se llevó a cabo en cámara de cultivo de condiciones controladas en bandejas de plástico ($60 \cdot 4 \cdot 12$ cm.) que contenían una mezcla de vermiculita y perlita como sustrato (relación 3:1 v/v). Las plántulas se regaron con disolución Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) diluida a la mitad. Se prepararon por separado tres soluciones concentradas, cuya composición se detalla en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Composición de la disolución de Hoagland y Arnon general (100 veces concentrada). La disolución de riego se preparaba a partir de las soluciones A, B y Fe, diluidas 200 veces para conseguir una relación $\text{NO}_3/\text{NH}_4^+ = 6/0.5$, es decir, Hoagland $\frac{1}{2}$.

Componentes de la disolución de Hoagland y Arnon (X 100)
($\text{NO}_3/\text{NH}_4^+ = 12/1$)

Solución A	(g · L⁻¹)	(mM)
NH_4NO_3	8.0	1.00
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	82.6	3.50
KNO_3	35.7	3.53
Solución B		
KNO_3	5.0	0.49
KH_2PO_4	27.4	2.01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24.6	1.00
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.053	0.003
H_3BO_3	0.140	0.023
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.015	0.001
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.008	0.0001
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.060	0.0021
Fe		
Fe-EDDHA 6%	1.87	

Las condiciones de cultivo fueron: 18-25°C de temperatura nocturna y diurna, respectivamente, fotoperiodo con 8 h de oscuridad y 16 h de luz (Lamparas Gro-lux y Luxline-es Sylvania), y una intensidad lumínica de 245/81 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (400-700 nm). La humedad relativa se mantuvo en un intervalo del 60-70%.

Transcurridos 15 días tras la siembra, doce plantas de cada línea transgénica y las plantas WT fueron transferidas a macetas de 10 litros y cultivadas durante 2 semanas. En este punto, el riego se suspendió por un periodo de nueve días. 3 plantas por línea fueron regadas con normalidad durante este periodo para utilizarlas como controles.

2.2.- Análisis de expresión génica de *CIN1*

Entre las diversas variantes de la PCR, en nuestros ensayos de detección génica de *CIN1* se utilizó la RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). Esta reacción consiste en la transcripción inversa del ARN del gen *CIN1* a su ADN complementario (ADNc) y su posterior amplificación en dos pasos consecutivos dentro de la misma mezcla de reacción. Previa a la aplicación de la RT-PCR, se tuvo que realizar la extracción del ARN.

a) Extracción de ARN

Para el aislamiento total del ARN se utilizaron tejidos frescos de hojas basales, medias y apicales.

Para la extracción del ARN se empleó 1 ml del reactivo "Total RNA Isolation" añadido a 100 mg de material vegetal homogeneizado con nitrógeno líquido y agitado hasta la completa homogeneización. Tras la adición de 200 μl de cloroformo se volvió a agitar durante 15 minutos y se centrifugó a 13.000

rpm, 4°C, durante 10 minutos. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf con 650 µl de isopropanol enfriado previamente.

El material vegetal junto con la mezcla de extracción se incubó durante 2 horas o toda la noche a -20°C. Tras este paso se hicieron tres lavados mediante centrifugación a 13.000 rpm, 4°C durante 10 min y adición de 750 µl de 3 M LiCl_{DEPC} (127,2 g/l en H₂O bidestilada, + 1/1000 vol DEPC). Después de una agitación vigorosa durante 10 minutos a máxima velocidad en una incubadora de Eppendorf se centrifugó a temperatura ambiente a 13.000 rpm durante 10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante por completo y se añadió 500 µl de 85 % EtOH_{DEPC}, seguido de agitación y centrifugación.

Por último, se dejó evaporar el etanol residual a temperatura ambiente y se re-suspendió el precipitado con 20 µl de H₂O_{DEPC} (H₂O bidestilada + 1/1000 vol DEPC) manteniéndolo durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras el aislamiento, se comprobó el éxito del mismo mediante un gel agarosa al 1,5% utilizando entre 1,5 y 3,5 µl de suspensión de ARN.

b) Transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg del ARN total. En primer lugar el ARN se incubó junto a los oligo-dT (oligo (dT) 15 primer, Promega, USA) a 70°C durante 5 minutos para eliminar estructuras secundarias, en un volumen total de 15 µl.

A continuación para que se produzca la reacción se incubó durante 5 minutos a 37°C junto con 4 µl de tampón de transcripción reversa 5x (Promega, USA), 2 µl de mezcla de dNTPs 10 mM (Promega, USA) y 1 µl de inhibidor ARNasa (20 U/µl) (Promega, USA).

El último paso de la síntesis de ADNc consistió en la adición de 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U/µl) (Promega, USA). La reacción transcurrió a 42°C durante 1 hora.

Para inactivar la retrotranscriptasa transcurrida esa hora, la reacción se dejó 10 minutos a 70°C y posteriormente en hielo.

c) RT-PCR Semicuantitativa.

El nivel de expresión del gen *CIN1* se determinó por RT-PCR semicuantitativa, en hojas, raíces y plántulas de 5 líneas transgénicas, utilizando la línea WT como control, utilizando para ello el kit FirstStrand Synthesis System (Invitrogen) para RT-PCR, siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó un aparato ABI 7000 y el SyBrGreen Kit (Applied Biosystems, CA, USA) para llevar a cabo el ensayo.

Cada tratamiento se evaluó por triplicado y para cada muestra la reacción de RT-PCR se realizó por duplicado, en placas de 96 pocillos, a partir de 2 µl de ADNc obtenido en el paso anterior. Se utilizó como control interno el ARN de la línea WT. Tanto el ADNc como el ARN se diluyeron 1/4 en un volumen total de 20 µl.

La reacción de amplificación consistió en una fase inicial de desnaturalización a 96°C durante 2 minutos, seguido de un ciclo consistente en 3 pasos: desnaturalización a 96°C, alineamiento de cebadores a 55°C y extensión a 72°C, de 30 segundos cada uno. Este ciclo se repitió 35 veces finalizándose el proceso con una fase final de extensión de 2 minutos a 72°C. Estas condiciones se emplearon tanto para el gen objeto de nuestro estudio como para el gen de referencia.

Las secuencias de los oligonucleótidos internos utilizados como cebadores para el gen *CIN1* fueron *CIN1-Forward* (5'-CCTGGGAGTATAGTGGCTGAACC-3') y *CIN1-Reverse* (5'-AGGTCTTCTCTGAATCCG-3').

Por último, para analizar las PCRs, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa) en un 1,5% (peso/volumen) con Tris acético 40 mM y EDTA 1 mM Ph 8 (Tampón TAE 1X). Antes de cargar las muestras en el gel, se añadió GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hatwad, CA, USA) que sirvió tanto como tampón de carga como para visualizar la muestra, de un stock previamente preparado 5X, que contenía además de GelRed, Orange G (SIGMA) y Sacarosa. La electroforesis se realizó a 120 V en tampón TAE 1X con 10 µl de muestra, y la visualización del gel se hizo con un analizador de imagen GeneTools (SYNGENE) con luz ultravioleta.

Los niveles de expresión se normalizaron en contra de los valores obtenidos para la actina, que fue utilizado como un gen de referencia interno. El peso del ARN fue usado como un control negativo en todas las RT-PCR realizadas.

3.- RELACIONES HÍDRICAS DE LAS PLANTAS Y FOTOSÍNTESIS

3.1.- Potencial Hídrico del Sustrato

Las medidas se tomaron en días consecutivos desde el inicio del tratamiento hasta 10 días después. Para ello se utilizaron unas sondas enterradas en el sustrato y el medidor WATERMARK, Soil Moisture Meter (IRROMETER COMPANY, INC. Riverside, California), con el cual se obtenían las medidas.

3.2.- Determinación del Contenido Relativo en Agua

El procedimiento a seguir pertenece a Sharp et al. (1990). Se tomaron fragmentos de 1 cm² de área de la hoja numerada como 4 de cada una de las plantas. Se pesaron los discos para hallar el valor del peso fresco del tejido. Se sumergieron los discos en agua des-ionizada durante 24h aproximadamente, manteniendo las muestras en oscuridad a 4°C para minimizar las pérdidas en la respiración hasta que lleguen a alcanzar un peso constante (turgencia completa). Transcurrido este tiempo se secaron las hojas ligeramente en papel de filtro. Se volvieron a pesar los discos para calcular el peso a máximo turgor. Tras el mantenimiento de los discos en una estufa a 65°C durante 24h con el propósito de deshidratarlos por completo, se pesaron con la finalidad de obtener el peso seco. El Contenido Relativo en Agua (*RWC*, del inglés Relative Water Content) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$RWC = \frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso a máximo turgor} - \text{Peso seco}} \cdot 100$$

3.3.- Medidas de intercambio gaseoso

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron en la quinta hoja totalmente expandida en cada genotipo con un sistema de intercambio de gases (LI-6400; Li-Cor). Las hojas fueron primero equilibradas con una densidad de flujo de protones de 1,000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ durante al menos 20 minutos. Después de esto, la fotosíntesis fue inducida con 1,000 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$ en torno a la hoja. La temperatura de la hoja se mantuvo a 25°C, y el déficit de vapor de presión entre la hoja y el ambiente que la rodea se conservó entre 1 y 1,3 kPa. Estas condiciones se mantuvieron constantes para la determinación de la tasa de fotosíntesis (*A*), tasa de transpiración (*E*) y conductancia estomática (*g_s*).

3.4.- *Transpiración Acumulada*

El agua transpirada se midió gravimétricamente por el peso diario de las plantas en maceta durante el experimento. Como referencia para medir la cantidad de agua evaporada se usó una maceta con la misma cantidad de sustrato pero sin planta, pesada diariamente junto con el resto de macetas.

3.5.- *Uso Eficiente del Agua y Transpiración Acumulada*

El uso eficiente del agua (*WUE*) de las plantas se determina mediante el análisis de 3 parámetros:

- Evaporación
- Transpiración
- Evapo-transpiración

Para medirlos se observó la evolución del peso de la planta junto con la maceta, así como una maceta sin planta, durante 10 días tras el inicio del estrés hídrico utilizando un método gravimétrico.

La evaporación es la pérdida de agua de la maceta sin planta. Se calcula mediante la diferencia de peso de la misma en dos días consecutivos.

$$E = \text{Peso maceta día2} - \text{Peso maceta día1}$$

La transpiración es el agua que pierden las plantas por las hojas. Se calcula hallando la diferencia de peso de la maceta más la planta en días consecutivos y restando a la misma el valor de evaporación. Así mismo, la transpiración acumulada es la suma de la transpiración diaria.

$$T = (\text{Peso maceta} + \text{planta día2} - \text{Peso maceta} + \text{planta día 1}) - E$$

$$T_A = \Sigma T$$

La evapo-transpiración es la suma de lo que pierde el sustrato más lo que pierde la planta por transpiración.

$$ET = E + T$$

El uso eficiente del agua se determina como la biomasa generada durante el periodo de sequía (en gramos) dividido por la transpiración acumulada durante este periodo (en ml).

$$WUE_t = B/T_A$$

3.6.- Fluorescencia de clorofilas

La fluorescencia de clorofilas fue medida en condiciones control y tras 30 minutos de aclimatación en oscuridad en una hoja ya madura del tercio apical de cada una de las plantas. Para las medidas se usó un fluorímetro de clorofilas OS-30 (OptiSciences, Herts, UK) con una intensidad fuente de excitación de $3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La intensidad mínima de fluorescencia (F_0) en un estado de adaptación a la oscuridad fue medida en presencia de un fondo de luz roja-lejana para favorecer la oxidación rápida del sistema de transporte de electrones. Las intensidades máximas de fluorescencia en el estado de adaptación a la oscuridad (F_m) y después de la adaptación a luz actínica blanca (F_m') fueron medidas por pulsos de saturación de 0.8 s ($3000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Después de la medida de F_m' , se apagó la luz actínica ($400 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), y se aplicó luz del rojo-lejano durante 3 s con el fin de medir la intensidad mínima fluorescente en el estado de adaptación a la luz (F_0'). El rendimiento cuántico máximo del fotosistema II abierto (PSII) (F_v/F_m) se calcula como $(F_m - F_0)/F_m$ (Maxwell & Johnson, 2000).

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Se usó una versión especial de un Fluorómetro de Clorofilas Imaging-PAM (Walz IMAG-MAX/L) para investigar los cambios espacio-temporales en parámetros fotosintéticos (Schreiber, 2004). Con el Imaging-PAM fue medida continuamente la producción actual de fluorescencia (F_t). En ausencia de iluminación actínica, en conjunción con la aplicación de un pulso de saturación, fueron determinados el nivel de rendimiento de fluorescencia en oscuridad ($F_t = F_0$) y el rendimiento de fluorescencia máxima (F_m), a partir de los cuales fue calculado automáticamente el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m) por el software ImagingWin (Walz IMAG-MAX/L). Las imágenes de los parámetros de fluorescencia se muestran con ayuda de un código de falso color que va desde 0.00 (negro) a 1.00 (morado).

4.- METABOLISMO DEL CARBONO

4.1.- Determinación del contenido de azúcar intracelular

La determinación de azúcares se realizó a partir de 100 mg de material vegetal homogeneizado con nitrógeno líquido, al que se le añadieron 0,9 ml de agua. Después de la homogeneización y centrifugación durante 10 minutos a 20.000 g y 4°C, el sobrenadante se utilizó para el análisis de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa). 100 µl de extracto líquido fue homogeneizado con 50 µl de intercambiador de cationes fuertemente ácido (Dowex 50WX8-400, Sigma) y 50 µl de resina de intercambio aniónico (Dowex 1-X8-COO⁻, Biorad). Después de centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C, el sobrenadante se filtró y se inyectaron 10 µl en un sistema de cromatografía líquida de fase normal (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón),

usando acetonitrilo:agua (85/15, v/v) como fase móvil a una velocidad de flujo de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.2.- Análisis de actividades sacarolíticas

Se utilizó la metodología descrita por Balibrea et al. (2003); Balibrea et al. (1999).

a) Preparación del extracto enzimático

Inmediatamente después de la recogida de muestras, se homogeneizó el material vegetal con nitrógeno líquido y se pesaron 100 mg de tejido. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, siendo congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -20°C hasta los análisis. Una vez descongelado el material, tras añadirle 10 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 10 mg de arena de Fontainebleau, se homogeneizó en 1 ml de tampón de extracción que contenía HEPES-KOH 5 mM pH 7, MgCl_2 10 mM, Na_2EDTA 1 mM, DTT 2.6 mM, etilenglicol al 10% y Tritón X-100 al 0,02% (Pelleschi et al., 1997), con ayuda de un émbolo de vidrio esmerilado. El homogeneizado se centrifugó a 20.000 g a 0°C durante 5 min. Un volumen de 0,4 ml de sobrenadante se desalinizó pasándolo a través de columnas de Sephadex G25M (Pharmacia) de 5 ml pre-equilibradas con 4 ml de tampón de reacción (HEPES-KOH 50 mM pH 7, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM) añadiéndole DTT 2.6 mM y ABS al 0,1% (Helmerhorst & Stokes, 1980; Jeannette & Prioul, 1994). El extracto desalinizado se consideró como extracto enzimático soluble y el precipitado se utilizó para la determinación de la actividad cwInv.

b) Medida de las actividades enzimáticas

La actividad de los enzimas invertasa vacuolar (vacInv), extracelular (cwInv), citoplasmática (cytInv) y sacarosa sintasa (SS) se midió mediante un

sistema de enzimas acopladas que conducía a la formación de NADH, el cual se determinó por absorbancia a 340 nm (Bergmeyer et al., 1974). La cantidad de NADH formado es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa + D-fructosa (vacInv, cwInv, cytInv) y D-fructosa (SS) producidos por las reacciones catalizadas por los enzimas cuya actividad se pretende determinar.

La actividad vacInv se determinó en un volumen final de 110 μL que contenía tampón ácido acético-acetato $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 45 mM pH 5 y 25 μL del extracto enzimático. La reacción se inició al añadir 10 μL de sacarosa 0.6 M, se incubó durante 15 min, a 30°C y se detuvo con 50 μL de tampón fosfato $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)\text{-KOH}$ 0,5 M pH 7 (Pelleschi et al., 1997). Los blancos no se incubaron y la sacarosa se les añadió después del tampón fosfato. Tanto los blancos como las muestras se sometieron a un baño de agua en ebullición durante 3 min, para desnaturalizar los enzimas. Las hexosas (glucosa + fructosa) formadas se midieron al añadir 750 μL de un medio de reacción que contenía HEPES-KOH 50 mM pH 7, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM, ATP 1.3 mM, NAD 0.5 mM, y una mezcla enzimática desalinizada (Sephadex G-25M) con 4,2 unidades de hexokinasa, 3,5 unidades de fosfoglucosa isomerasa y 2 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esta segunda reacción se incubó durante 40 min a 30°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 20.000 g a 0°C durante 5 min para precipitar posibles partículas en suspensión y el NADH formado se midió a 340 nm en un espectrofotómetro GBC UV/VIS 916.

Para determinar la actividad cwInv, el precipitado resultante de la extracción de la fracción soluble se lavó con 150 μL de tampón acetato y se re-suspendió en 525 μL del mismo $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 30 mM pH 5. Los pHs iguales o inferiores a 5 se ajustaron con ácido acético, y con KOH para valores superiores. La actividad sacarolítica se ensayó en 175 μL de la suspensión del precipitado con el tampón acetato, añadiendo 25 μL de sacarosa 0.6 M e

incubando a 30°C durante 15 min y la reacción se detuvo con 50 µL de tampón fosfato (NaH₂PO₄)-KOH 0.5 M pH 7. La cantidad de hexosas formadas se determinó de la misma forma descrita para la vacInv.

Las actividades sacarolíticas citoplasmáticas, cytInv y SS, se analizaron de acuerdo con Pelleschi et al (1997) siguiendo la trayectoria siguiente: la actividad cytInv se midió en un volumen final de reacción de 980 µL que contiene HEPES-KOH 50 mM pH 7, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 100 mM, ATP 1 mM, NAD 0.43 mM y una mezcla desalinizada con las mismas unidades enzimáticas citadas anteriormente. Tras 5 min de estabilización a 30°C, la reacción se inició añadiendo 50 µL del extracto enzimático. La cinética de la reacción se siguió durante 6 min, monitorizando la formación de NADH a 340 nm. La actividad se calculó en la zona lineal entre absorbancia y tiempo. La actividad SS tuvo lugar en el mismo medio de reacción que la cytInv pero iniciándola al añadir 10 µL de UDP 100 mM ($V_{\text{final}} = 990 \mu\text{L}$, la actividad cytInv continuaba funcionando) y siguiendo posteriormente el mismo procedimiento. La actividad SS se calculó por la diferencia entre la mayor actividad total después de adicionar UDP (cytInv + SS) y la actividad cytInv.

Las proteínas solubles se midieron directamente en el extracto enzimático desalinizado y las insolubles se midieron en el sobrenadante resultante de solubilizar el correspondiente precipitado en 500 µL de tampón de extracción con NaCl 1M (Doehlert & Felker, 1987). Todas las proteínas se midieron utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) a una absorbancia de 595 nm, utilizando una recta de calibración de 1 a 20 µg · mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (ASB). Las actividades enzimáticas específicas se expresaron como nkat mg⁻¹ proteína y la fórmula general para calcularlas fue:

donde;

$$AE(kat \cdot mg^{-1} prot) = \frac{DDO \cdot V_t \cdot V_E \cdot 0,5 *}{t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot V_e \cdot M \cdot 1000 \cdot Pr}$$

DDO = Densidad óptica de la muestra menos la del blanco

V_t = volumen de reacción (ml)

V_E = volumen de extracción (ml)

* = se multiplica por 0,5 en el caso de las invertasas al medir un mol de glucosa y otro de fructosa por cada mol de sacarosa transformado.

t = tiempo de incubación (s)

ε = coeficiente de extinción molar para el NADH = $6310 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d = paso de luz (1 cm)

V_e = volumen del extracto enzimático (ml)

M = masa de material vegetal en gramos de peso fresco (g)

Pr = mg de proteína por gramo de peso fresco.

Tabla 2.2.- Valores específicos de los parámetros de la ecuación para el cálculo de las diferentes actividades enzimáticas ensayadas.

	V_t (ml)	V_E (ml)	t (s)	V_e (ml)	M (g)
cytInv	0,980	1	360	0,050	0,1
SS	0,990	1	360	0,050	0,1
vacInv	0,860	1	360	0,025	0,1
cytInv	1	0,525	900	0,175	0,1

4.3.- Análisis de otras enzimas del metabolismo del carbono

a) Preparación del extracto enzimático

Para la medición de todas las enzimas la preparación del extracto enzimático es el mismo. El material vegetal debe ser congelado inmediatamente después de la recogida y almacenada a -80°C hasta los análisis. El primer paso consistió en homogeneizar el material vegetal con nitrógeno líquido añadiendo una pequeña cantidad de PVPP, cuya función es unir compuestos fenólicos. Se pesó el material en tubos eppendorf de 2 ml antes de la extracción y se añadió tampón de extracción (Tabla 2.3) con una proporción de 1:2 (p/v).

Tabla 2.3.- Tampón de extracción para 200 ml.

Compuesto	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de pipeteado
Tris-HCl pH 7.6	500 mM	40 mM	16 ml
EDTA	250 mM	1 mM	0,8 ml
H ₂ O dd			182,3 ml
Los siguientes componentes deben ser añadidos directamente antes de la extracción			
PMSF	100 mM	0.1 mM	200 μl
Benzamidina	100 mM	1 mM	2 ml
β -Mercaptoetanol	14.34 M	14 mM	195 μl
NADP	10 mM	24 μM	480 μl

El homogeneizado se realizó con ayuda de una espátula y se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se mezcló con un homogeneizador suavemente y se centrifugó a 13.000-15.000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar para eliminar todas las partículas vegetales restantes. La mitad de ese sobrenadante, alrededor de 0,5 ml, se utilizó para ser dializado. Las enzimas que necesitan extracto dializado son Fructoquinasa (FK) y Hexoquinasa (HXK). Las proteínas se midieron como se describe en el anterior apartado.

Para realizar la diálisis, primero se prepararon los tubos de diálisis de 3- 4 cm aproximadamente, incubándolos en agua destilada a 4°C durante al menos 5 minutos y cerrándolos con pinzas a ambos lados. El sobrenadante a dializar se pipeteó dentro de los tubos de diálisis, manteniendo los tubos en tampón de diálisis (20 mM de tampón K-PO₄ pH 7.0) en agitación a 4°C. Dicho tampón se cambió a las 2 horas, después a las 3 horas y a continuación se mantuvo durante toda la noche en agitación.

b) Medida de las actividades enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas y demás medidas espectrofotométricas, se realizaron en un lector de placas Perkin Elmer HTS-7000 Plus. Las medidas se hicieron a una absorbancia de 340 nm a 30°C.

ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). Se determinó según el método descrito en Appeldoorn et al. (1997); Pelleschi et al. (1997) con ciertas modificaciones.

Tabla 2.4.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1M (→ 100 mM)	15 µl
EDTA	250 mM (→ 0.44 mM)	0,263 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
BSA	10 % (→ 0.1 %)	1,5 µl
ADP-Glc	50 mM (→ 2 mM)	6 µl
Na-PPi	100 mM (→ 1.5 mM)	2,25 µl
NADP	10 mM (→ 1 mM)	15 µl
3-PG	50 mM (→ 2 mM)	6 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 1,6 U)	0,2025 µl
PGM	500 U/ml (→ 0,54 U)	0,81 µl
Extracto vegetal		10 µl
H ₂ O dd		hasta 150 µl

Aldolasa. Se utilizó la metodología descrita por Schwab et al. (2001).

Tabla 2.5.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1 M (→ 50 mM)	7,5 µl
EDTA	250 mM (→ 1 mM)	0,6 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
Fruct-1,6-bisP	25 mM (→ 1 mM)	6 µl
NADH	25 mM (→ 1.5 mM)	0,9 µl
GPDH	2100 U/ml (→ 1 U)	0,375 µl
TPI	6000 U/ml (→ 0,6 U)	0,075 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

Fructoquinasa (FK). La determinación enzimática se hizo en base al método descrito en Appeldoorn et al. (1997); Petreikov et al. (2001).

Tabla 2.6.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
BISTRIS pH 8.0	100 mM (→ 50 mM)	75 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
Fructose	100 mM (→ 5 mM)	7,5 µl
NAD	50 mM (→ 1 mM)	3 µl
ATP	100 mM (→ 2.5 mM)	3,75 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 1 U)	0,1275 µl
PGI	3500 U/ml (→ 1 U)	0,2175 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Se determinó según el procedimiento explicado en Bisswanger (2004); Valenti et al. (1984).

Tabla 2.7.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 7.6	0.5 M (→ 100 mM)	30 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
Glc-6-P	100 mM (→ 1 mM)	1,5 µl
NADP	10 mM (→ 0.4 mM)	6 µl
Extracto vegetal		10 µl
H ₂ O dd		hasta 150 µl

Hexoquinasa (HXK). Las determinaciones se realizaron según el protocolo descrito en Appeldoorn et al. (1997); Petreikov et al. (2001).

Tabla 2.8.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
BISTRIS pH 8.0	100 mM (→ 50 mM)	75 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
Glucose	100 mM (→ 5 mM)	7,5 µl
NAD	50 mM (→ 1 mM)	3 µl
ATP	100 mM (→ 2.5 mM)	3,75 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 1 U)	0,1275 µl
Extracto vegetal		10 µl
H ₂ O dd		hasta 150 µl

Fosfofructoquinasa (PFK). Se utilizó la metodología descrita en Klotz et al. (2006).

Tabla 2.9.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1 M (→ 50 mM)	7,5 µl
EDTA	250 mM (→ 1 mM)	0,6 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
Fruct-6-P	100 mM (→ 1 mM)	1,5 µl
NADH	25 mM (→ 0,15 mM)	0,9 µl
ATP	100 mM (→ 0.2 mM)	0,3 µl
Aldolase	372 U/ml (→ 0,2 U)	0,45 µl
GPDH	2100 U/ml (→ 1 U)	0,375 µl
TPI	6000 U/ml (→ 0,6 U)	0,075 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

Fosfoglucosa isomerasa (PGI). Se determinó según el procedimiento descrito en Zhou and Cheng (2008).

Tabla 2.10.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1 M (→ 100 mM)	15 µl
MgCl ₂	1 M (→ 4 mM)	0,6 µl
DTT	500 mM (→ 4 mM)	1,2 µl
Fruct-6-P	100 mM (→ 2 mM)	3 µl
NAD	50 mM (→ 0.25 mM)	0,75 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 0,4 U)	0,05 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

Fosfoglucosamutasa (PGM). Las determinaciones se realizaron según el protocolo descrito en Manjunath et al. (1998).

Tabla 2.11.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1 M (→ 20 mM)	3 µl
MgCl ₂	1 M (→ 10 mM)	1,5 µl
DTT	500 mM (→ 4 mM)	1,2 µl
Glc-1,6-bisP	10 mM (→ 0.1 mM)	1,5 µl
Glc-1-P	100 mM (→ 1 mM)	1,5 µl
NAD	50 mM (→ 0.25 mM)	0,75 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 0,8 U)	0,0975 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa). Se utilizó la metodología descrita en Appeldoorn et al. (1999); Pelleschi et al. (1997).

Tabla 2.12.- Mezcla de análisis para una reacción.

Compuesto	Concentración inicial (→ Conc. Final)	Volumen de pipeteado
		150 µl reacción (lector de placas)
Tris-HCl pH 8.0	1 M (→ 100 mM)	15 µl
EDTA	250 M (→ 0.44 mM)	0,263 µl
MgCl ₂	1 M (→ 5 mM)	0,75 µl
BSA	10 % (→ 0,1 %)	1,5 µl
UDP-Gluc	100 mM (→ 2 mM)	3 µl
Na-PPi	100 mM (→ 1.5 mM)	2,25 µl
NADP	10 mM (→ 1 mM)	15 µl
3-PG	50 mM (→ 2 mM)	6 µl
G6PDH	6000 U/ml (→ 1,6 U)	0,2025 µl
PGM	500 U/ml (→ 0,54 U)	0,81 µl
Extracto vegetal	10 µl	
H ₂ O dd	hasta 150 µl	

Las actividades enzimáticas específicas se expresaron como $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína y la fórmula general para calcularlas fue:

$$AE(\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}) = \frac{\Delta\text{Abs}/s \cdot V_i \cdot V_E \cdot \text{factor}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_e \cdot M \cdot 1000 \cdot \text{Pr}}$$

donde;

ΔAbs = Densidad óptica de la muestra menos la del blanco

V_i = volumen de reacción (ml)

V_E = volumen de extracción (ml)

Factor = se multiplica por 1 en el caso de enzimas que convierten una molécula de sustrato en una molécula de producto que reduce NAD o NADH (todas menos Aldolasa + PFK); 0,5 para enzimas que convierten una molécula de sustrato en dos moléculas de producto que reducen NAD o NADH (Aldolasa, PFK)

ε = coeficiente de extinción molar para el NADH = $6310 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d = espesor de la capa del líquido en la cubeta /placa [cm]; valor numérico = 0.468 para reacciones de 150 μl en placas UV estándar (Greiner y 96)

V_e = volumen del extracto enzimático (ml)

M = masa de material vegetal en gramos de peso fresco (g)

Pr = mg de proteína por gramo de peso fresco.

4.4.- Análisis de inhibidor de invertasas

a) Preparación del extracto enzimático

Para la medida de inhibidor invertasa (*InvInh*) se preparó el extracto enzimático de la misma manera que en el apartado anterior. Para la determinación de la *cwInv* se hizo una re-extracción a partir del precipitado, mediante 3 lavados con agua destilada y re-suspensión en HEPES 200 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 15 mM, glicerol al 2%, PMSF 0.1 mM, benzamidina 1 mM y NaCl 1 M. La *vacInv* y la *cytInv* se determinaron en extracto dializado. Las proteínas se midieron como se describe en el apartado anterior.

b) Medida del inhibidor de invertasa.

Todas las determinaciones se realizaron en un lector de placas Perkin Elmer HTS-7000 Plus a una absorbancia de 595 nm a 30°C. Las actividades de *cwInv* y *vacInv* se midieron a pH 4.5, mientras que la actividad *cytInv* se realizó a pH 6.8. La cantidad de glucosa liberada se determinó mediante la adición de reactivo GOD-POD (tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7, peroxidasa 0,8 U · ml⁻¹, glucosa oxidasa 10 U · ml⁻¹ de *Aspergillus niger* y ABTS 0,8 mg ml⁻¹) en una proporción 8:1.

Para medir la inhibición se utilizó, para cada invertasa, un tester, que consistió en una muestra con actividad invertasa conocida. Para ello se mide la actividad del tester y la muestra prueba por separado, y luego juntas. El inhibidor invertasa es la diferencia entre la suma de ambas actividades por separado y la actividad de ambas juntas.

$$\text{Actividad Inhibidor (nkat mg}^{-1}\text{prot)} = (\text{Act.tester} + \text{Act.muestra}) - \text{Act tester+muestra}$$

4.5.- Microscopia electrónica de transmisión

La técnica de microscopía electrónica de transmisión se realizó en colaboración con el Prof. Dr. Thomas Roitsch, del Instituto de Biología Vegetal, Grupo de Fisiología Vegetal, perteneciente a la Universidad Karl-Franzens de Graz, en Austria.

La preparación de las muestras de hoja de tomate para microscopio electrónico constó de cuatro pasos básicos: preparación de las muestras asistido por microondas, corte, tinción y análisis de imágenes.

a) Preparación de las muestras asistido por microondas

Antes del inicio de la preparación de las muestras es necesario programar el microondas automático procesador de tejidos para Microscopia electrónica (Leica EM AMW, Leica Microsystems, Viena, Austria) con los protocolos mostrados en la Tabla 2.13.

Posteriormente se transfirieron las secciones con unas pinzas finas en las cestas designadas con una abertura de malla de aproximadamente 200 μm . Se insertaron en la cámara, teniendo cuidado de que las muestras se encuentren cubiertas por solución fijadora. Hecho esto se inició el microondas previamente programado como se indica en la Tabla 2.13 para la fijación, deshidratación e infiltración.

Recién preparadas las soluciones para las diversas fases descritas en el protocolo de preparación de la muestra, se llenaron en los viales designados de acuerdo con el protocolo programado (Tabla 2.13), cargando los viales en el carrusel, insertando el mismo a continuación en el microondas procesador de tejidos.

Tabla 2.13.- Protocolo para la preparación de muestras usando irradiación de microondas.

N° Vial	Paso	Reactivo en el vial	Duración	T° Max (°C)	Modo Microondas	Potencia Max (W)
Protocolo para fijación, deshidratación e infiltración						
1	1	3% Glutaraldehído en 60 mM tampón fosfato	2 min	37	Continuo	15
	2		2 min	20	Continuo	0
	3		2 min	37	Continuo	15
	4		2 min	20	Continuo	0
2	5	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Bajada	20
3	6	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Pulso	15
4	7	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Bajada	20
5	8	1% Tetróxido de Osmio en 60 mM tampón fosfato	12 min	37	Continuo	15
6	9	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Continuo	15
7	10	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Continuo	15
8	11	60 mM tampón fosfato	1 min	37	Continuo	15
9	12	50 % Acetona	1 min	37	Bajada	20
10	13	70 % Acetona	1 min	37	Bajada	20
11	14	90 % Acetona	1 min	37	Bajada	20
12	15	100 % Acetona	2 min	37	Bajada	20
13	16	100 % Acetona	3 min	37	Bajada	20
14	17	Resina Epoxi: 100% Acetona = 1:3	3 min	37	Continuo	10
15	18	Resina Epoxi: 100% Acetona = 1:1	3 min	40	Continuo	10
16	19	Resina Epoxi: 100% Acetona = 3:1	3 min	45	Continuo	10
17	20	Resina Epoxi 100%	3 min	50	Continuo	12
18	21	Resina Epoxi 100%	3 min	50	Continuo	12
19	22	Resina Epoxi 100%	3 min	50	Continuo	12
Protocolo para polimerización						
1	1	Resina Epoxi 100%	5 min	65	Bajada	30
	2		5 min	78	Bajada	30
	3		15 min	90	Bajada	30
	4		60 min	90	Continuo	30
Tiempo Total			136 min			

Las muestras de hojas de tomate se lavaron con agua destilada y se cortaron en secciones pequeñas de 1 mm² con una hoja de afeitar en una placa de cera de modelar en una gota de 3% de glutaraldehído (Agar Scientific Ltd., Stansted, England) en 60 mM de tampón fosfato Sørensen (pH 7.2) a temperatura ambiente.

Se preparó el Agar 100 resina epoxi (24 g Agar 100, 16 g anhídrido dodecenil succínico y 10 g anhídrido metilo Nadic) (Agar Scientific Ltd., Stansted, England) en un vaso de plástico a 40°C. Una vez preparado esto se añadió 1,2 g de bencildimetilamina. Por último se rellenó Agar 100 resina epoxi en los moldes de polimerización designados justo antes de que el protocolo de preparación de la muestra termine.

Después de terminar el protocolo, se cargaron las cestas usando unas pinzas finas en los moldes de polimerización designados y se introdujeron en el microondas para a continuación iniciar el protocolo de polimerización previamente programado (Tabla 2.13). Finalizado el protocolo, se eliminaron los moldes de polimerización de la cámara y los bloques polimerizados que contienen las muestras.

b) Corte

Para realizar el corte de la muestra se insertaron uno o más bloques en soportes para muestras por separado para el corte ultrafino con la muestra en la parte superior a 1 cm del soporte. Para el corte se utilizó un seccionador de muestra para MET (Leica Reichert Ultratrim; Leica Microsystems) que permita recortar bloques de 1 mm de largo y 200 µm de espesor. Se seccionaron por tanto las muestras con un ultramicrotomo (Reichert Leica Ultracut S; Leica Microsystems) usando una cuchilla de diamante en un ángulo de 45° (Diatome Ultra 45, Gröpl, Tulln, Austria). El espesor de la sección debe ser ajustado

alrededor de 70 a 90 nm y la velocidad de corte fue de 1mm/s. Las secciones se recogieron con una rejilla 200 cuadrada con formvar (Agar Scientific Ltd.) cubierta de cobre o de níquel.

Después se tiñeron las secciones en una rejilla con citrato de plomo (Agar Scientific Ltd.; 1,1 g de citrato de plomo disuelto en 42 ml de agua bidestilada y 8 ml de 1N NaOH) durante 5 minutos en una placa petri parcialmente llena con NaOH para crear un entorno libre de CO₂, y durante 15 minutos con acetato de uranilo al 1% (Agar Scientific Ltd.) disuelto en agua destilada a temperatura ambiente. Entre los pasos de tinción se realizaron lavados de 1 minuto con agua destilada para posteriormente dejar secar las rejillas al aire.

El último paso es examinar las secciones con un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM10 TEM, FEI, Eindhoven, The Netherlands).

c) Tinción negativa

Para realizar la tinción negativa el primer paso fue recolectar 100 mg de material vegetal y preparar la savia bruta homogeneizando el material durante 2 minutos con una hoja de afeitar en un portaobjetos en 100 µl de 60 mM tampón fosfato Sørensen (pH 7.2). A continuación se transfirió 20 µl del homogeneizado resultante en el primer pozo de un portaobjetos para microscopio recubierto de teflón con 4 o más pozos.

Se colocó una rejilla cubierta con formvar (Agar Scientific Ltd.) en la parte superior del homogeneizado con la parte cubierta hacia abajo y se incubó durante 5 minutos. Se realizaron 2 lavados durante 2 minutos cada uno mediante la colocación de la rejilla en la parte superior de dos gotas de 200µl de 60 mM tampón fosfato Sørensen (pH 7.2). Se incubó la rejilla durante 1 minuto con una solución recién preparada de ácido fosfotúngstico al 2% (Agar

Scientific Ltd.) en 60 mM tampón fosfato Sørensen (pH 6.5). Dejar secar al aire libre.

El último paso es examinar la rejilla con un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM10 TEM, FEI, Eindhoven, The Netherlands). El aumento correcto utilizado es de 21000X o mayor.

d) Análisis de imágenes

El análisis de imágenes consistió en medir la longitud y la anchura de las muestras sólo en las micrografías tomadas de las muestras con tinción negativa mediante el uso del software de análisis de imágenes Cell D (Olympus, Life and Material Science Europe GmbH, Hamburg, Germany) con la herramienta de análisis de partículas u Óptimas 6.5.1. (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland, USA).

5. METABOLISMO ANTIOXIDATIVO

5.1.- Análisis de actividades oxidativas

La determinación de las actividades oxidativas se realizó en colaboración con el Dr. José Antonio Hernández Cortés, perteneciente al Grupo de Biotecnología del Departamento de Mejora Vegetal del CEBAS-CSIC.

a) Aislamiento de la fracción apoplástica

Se siguió el método descrito por Hernández et al. (2001). Todas las operaciones se llevaron cabo a 4°C. Para la purificación de la fracción de apoplasto se emplearon 5-10 gramos de hojas de tomate. Para la obtención del apoplasto, las hojas, previamente lavadas con agua destilada fría, se trocearon

en piezas de 1 a 2 cm² sobre un embudo poroso de porcelana. Las secciones de hojas se lavaron con agua destilada fría y con tampón Tris-Acetato 50 mM pH 6.0, con el fin de minimizar contaminaciones. Posteriormente, las muestras se pasaron a un matraz y se infiltraron a vacío durante tres minutos, en golpes de un minuto, a 1.0 KPa y 4°C con el tampón de infiltración Tris-Acetato 50 mM pH 6.0, conteniendo Cl₂Ca 2 mM y KCl 0.2 M.

Para la determinación de actividad ascorbato peroxidasa (APX) se adicionó también ascorbato sódico 5 mM al tampón de infiltración. Las hojas, después de la infiltración, se secaron rápidamente y se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos a 4°C en una jeringa de 25 ml colocada dentro de un tubo de centrifuga. Para determinar las actividades enzimáticas, la fracción de apoplasto se recogió del fondo del tubo de centrifuga y se concentró aproximadamente 2 veces utilizando un concentrador Centricon YM-10 (Amicon, Millipore) y centrifugando a 4.500 g durante 30-40 minutos. Las muestras concentradas se pre-purificaron por cromatografía en columnas de Sephadex G-25 NAP (Amersham Biosciences), previamente equilibradas con el tampón de infiltración con o sin ascorbato de sodio 5 mM. Posteriormente, las muestras de apoplasto se volvieron a concentrar empleando el mismo tipo de concentradores y en las mismas condiciones descritas anteriormente.

b) Obtención del simplasto.

Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Los restos de hojas (2 g de peso fresco aproximadamente) que resultaron de la extracción de la fracción de apoplasto, se homogeneizaron utilizando un mortero, en 4 ml de tampón Tris-Acetato 50 mM pH 6.0, conteniendo ascorbato 2 mM, cisteína 3 mM, EDTA 0.1 mM, 2% polivinil polipirrolidona insoluble (PVPP) (p/v), 2% polivinil pirrolidona (PVP) (p/v), 0.1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y 0.2% Tritón X-100 (v/v), empleando una relación peso/volumen de 1/2. Para la

determinación de la actividad APX, el medio de extracción contenía ácido ascórbico 20 mM. El “simplasto” homogenado se filtró a través de dos capas de malla de nylon y se centrifugó a 14.000 g durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada Beckman JA-20, empleando un rotor JA-20.1 Los sobrenadantes obtenidos se filtraron por columnas de Sephadex G-25 NAP (GE Healthcare), equilibradas con el mismo tampón usado para la homogeneización, con o sin 2 mM ascorbato de sodio, con el fin de eliminar compuestos de bajo peso molecular de distinta naturaleza que interfieren en la determinación de las distintas actividades enzimáticas. Paralelamente, para la determinación de actividad APX las columnas se equilibraron con tampón Tris-Acetato 50 mM pH 6.0 conteniendo ascorbato sódico 2 mM.

c) Determinación de actividades enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas y demás medidas espectrofotométricas, se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1603 equipado con un accesorio de termostatación a 25°C.

Ascorbato peroxidasa (APX): Se determinó según el método de Hossain and Asada (1984), basado en la medida a 290 nm de la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía ácido ascórbico 0.2 mM disuelto en tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7.6, H₂O₂ 0.1 mM y 20-50 µl de muestra. La reacción se inició al añadir el H₂O₂, a la mezcla de reacción, siguiéndose la oxidación del ascorbato a 290 nm durante 1 minuto, frente a un blanco constituido por el tampón de reacción más una cantidad de muestra igual a la usada en la reacción problema pero sin H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado · min⁻¹ · ml⁻¹, se cálculo a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2.8 mM⁻¹ · cm⁻¹.

Peroxidasa (POX): Se empleó el método descrito por Ros Barceló (1998) basado en la medida a 593 nm de la oxidación del 4-metoxi- α -naftol. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón Tris-acetato 50 mM pH 5, H₂O₂ 0.5 mM, 4-methoxy- α -naphthol 1 mM y una cantidad de muestra que oscilaba entre 10-25 μ l. La reacción se inició por la adición de la muestra, siguiendo la oxidación del 4-methoxy- α -naphthol a 593 nm durante 2 min. El registro se efectuó midiendo frente a un blanco de tampón de reacción. La actividad enzimática, expresada como μ mol de 4-metoxi- α -naftol oxidado $\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el 4-methoxy- α -naphthol de 21600 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Superóxido dismutasa (SOD): Se empleó el método descrito por McCord and Fridovich (1969). La técnica se basa en la inhibición, por la superóxido dismutasa, de la reducción del citocromo c por los radicales libres O₂^{•-} generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml de una mezcla o cóctel de reacción que contenía citocromo c 10⁻³ M y xantina 10⁻³ M, en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.8, con EDTA 0.1 mM, al que se añaden 10-25 μ l de muestra vegetal. La reacción se inició al añadir a la mezcla problema un volumen previamente determinado, mediante una reacción control, de una suspensión de xantina oxidasa preparada en el tampón anterior (fosfato potásico 50 mM, pH 7.8). La reducción del citocromo c se siguió por registro continuo a 550 nm durante 2 minutos.

En primer lugar se efectuó una reacción control en ausencia de muestra. Para ello, una vez ajustado el cero del espectrofotómetro con 1 ml de mezcla de reacción, se adicionaron distintos volúmenes de xantina oxidasa (3-10 μ l), hasta obtener un $\Delta E_{550}/\text{min}$ comprendido entre 0.024 y 0.026. Una unidad de

actividad *SOD* se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo c en la reacción control a 25°C.

$$\% I = \frac{E550/\text{min (control)} - E550/\text{min (problema)}}{E550/\text{min (control)}} \cdot 100$$

La actividad enzimática, en $U \cdot \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir del porcentaje de inhibición producido por la muestra, según la expresión:

$$\text{Unidades SOD/ ml} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\% \cdot V} \cdot F$$

donde V es el volumen de la muestra utilizada expresada en ml, F el factor de dilución empleado y $\Delta E550$ es el incremento en la absorbancia a 550 nm.

d) Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford (1976). Para confeccionar la curva de calibrado se utilizaron diluciones seriadas con el reactivo concentrado de bio-rad (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Biorad) y albúmina de suero bovino, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se tomó 1 μl de cada una de las disoluciones de la curva patrón y de las muestras y se mezclaron con 1 ml del reactivo, midiéndose la densidad óptica a 595 nm frente a un blanco de sólo reactivo. La medida se realizó entre 5 y 10 minutos después de haber adicionado el reactivo. Con los resultados obtenidos se construyó una recta de calibración, representando en ordenadas los valores de absorbancia a 595 nm y la concentración de proteínas en abscisas ($\text{Abs}_{595}/\mu\text{g}$). La concentración de proteínas de las muestras se calculó por interpolación de su valor de absorbancia en dicha recta.

5.2.- Determinación del contenido de glutatión intracelular

La extracción para las determinaciones se realizó a partir de 200 mg de material vegetal homogeneizado con nitrógeno líquido, al que se le añadieron 3 ml de ácido clorhídrico 0.1 M refrigerado, preparado con 0,06 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), que se mantuvo en la solución de HCl durante al menos 12 horas. A continuación se centrifugó el extracto durante 10 minutos a 14.000 rpm y 4°C. Del sobrenadante obtenido se tomaron dos alícuotas distintas, una de 280 µl y la otra de 400 µl, para determinar tanto el glutatión total (*GSH* + *GSSG*) como el del glutatión oxidado (*GSSG*). Después la concentración de glutatión reducido (*GSH*) se calculó por diferencia entre los dos valores anteriores.

Para la determinación del glutatión total (*GST*), se añadieron los 280 µl de sobrenadante de la primera alícuota a una mezcla que contenía 28 µl de solución de hidróxido de sodio (1M), 280 µl de tampón tricina (200 mM, pH = 8.0) y 70 µl de DTT en un tubo de reacción en oscuridad. La reacción se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los grupos SH del extracto reducido se marcaron con 100 µl de monobromobimano (8 mM en acetonitrilo) y se incubaron durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 600 µl de MSA (0,75% de ácido metanosulfónico en agua). El extracto resultante se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 14.000 rpm. Posteriormente, se cogieron 800 µl de sobrenadante de cada muestra y se pusieron en viales marrones para ser analizados por HPLC.

Para el análisis del glutatión oxidado (*GSSG*), se transfirieron a un tubo de reacción transparente 400 µl del sobrenadante de la segunda alícuota centrifugado junto con 40 µl de la solución de hidróxido de sodio (1M), 400 µl de tampón Tricina (200 mM, pH = 8.0) y 30 µl de 50 mM de N-etilmaleimida (NEM). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con el

fin de bloquear los grupos SH libres. El exceso de NEM se eliminó mediante extracción con tolueno. Se pipeteó 500 µl de la capa inferior en un tubo de reacción en oscuridad y se añadieron 57 µl de DTT, a continuación la reacción fue incubada durante una hora a temperatura ambiente. Los grupos SH reducidos fueron marcados con 82 µl de monobromobimano e incubados durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La derivación se detiene por la adición de 491 µl de MSA. Para la sujeción al HPLC los extractos se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C y 14.000 rpm.

El glutatión total y el oxidado se analizaron en el HPLC de acuerdo al protocolo descrito en Kranner and Grill (1995).

Una vez conocidos los datos correspondientes al glutatión total y al oxidado, los contenidos de glutatión reducido (*GSH*) se calculan restando al valor del glutatión total el valor de *GSSG*.

$$GSH = \textit{Glutación total} - GSSG$$

5.3.- Determinación del contenido de α - tocoferol

La extracción para la determinación del contenido en α - tocoferol se realizó a partir de 60-80 mg de material vegetal liofilizado mezclado con una pequeña cantidad de CaCO_3 y 1 ml de mezcla de reacción a 4°C (DMSO-Etanol 2:1) durante 30 segundos con ayuda de un homogeneizador. Dicha mezcla es importante hacerla en un tubo eppendorf oscuro para proteger a la misma contra la luz. A continuación el extracto se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm y 4°C. El sobrenadante obtenido se decantó en un tubo volumétrico protegido de la luz y mantenido en hielo. El precipitado se volvió a extraer dos veces con 1 ml de mezcla de extracción a 4°C y se trató de la misma manera que se ha explicado arriba combinando los sobrenadantes.

Una vez hecha la extracción se añadió mezcla de reacción hasta completar un volumen total de 3 ml. Después se agitó el tubo volumétrico y el resultado de la extracción se pasó a dos tubos de reacción en oscuridad. El extracto se volvió a centrifugar durante 30 minutos a 4°C y se pipeteó 800 µl de sobrenadante cuidadosamente en un vial oscuro de HPLC (1,5 ml), debiendo ser sellado de inmediato y con firmeza. De esta manera las muestras ya estaban preparadas para el análisis con el HPLC.

Para analizar la cantidad de α - tocoferol se utilizó un HPLC con detector de fluorescencia siguiendo el protocolo descrito por Pfeifhofer (1989).

5.4.- Determinación de la pérdida de electrolitos

La integridad relativa de la membrana plasmática se determinó indirectamente mediante la pérdida de electrolitos con una adaptación de los métodos descritos por Prášil and Zámečník (1998) y Sánchez-Urdaneta et al. (2004). Para realizar dichas mediciones, las hojas de tomate (2 g) previamente lavadas con agua destilada, se cortaron en trozos de aproximadamente 2 cm² y se incubaron en tubos de polipropileno, con 8 ml de agua MilliQ, durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se midió la conductividad eléctrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) en el sobrenadante empleando un conductivímetro (Radiometer Analytical ionCheck 30). Este valor se conoce como valor A. Posteriormente, los tubos, previamente tapados, se calentaron a 95°C durante 25 minutos. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, se midió de nuevo la conductividad. Esto se conoce como valor B.

Los resultados se expresaron en valores relativos (%). Para calcular el porcentaje de pérdida de solutos se aplicó la siguiente fórmula (Mittler et al., 1999):

$$\% \text{ pérdida de electrolitos} = \frac{\text{valor A}}{\text{valor B}} \cdot 100$$

6.- EXTRACCIÓN HORMONAL Y ANÁLISIS

El análisis hormonal se realizó en la misma muestra que la utilizada para el análisis de actividades sacarolíticas.

Para la extracción y análisis de las diferentes hormonas vegetales (ácido abscísico -ABA-, el precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico -ACC-, la auxina ácido indol-3-acético -IAA-, ácido salicílico, ácido jasmónico, y las citoquininas *trans*-zeatina y ribósido de *trans*-zeatina se puso a punto un método analítico de altas prestaciones basado en la metodología descrita por Ivanov Dobrev and Kamínek (2002), con algunas modificaciones introducidas durante la puesta a punto de las técnicas, según se describe en Albacete et al. (2008).

6.1.- Preparación de los estándares

Se prepararon soluciones stock a 2 concentraciones diferentes ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) para cada una de las hormonas analizadas (ácido indol-3-acético, ácido abscísico, *trans*-zeatina, ribósido de *trans*-zeatina, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido salicílico y ácido jasmónico). La solución stock de $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ se utilizó como una reserva de uso rutinario a partir de la cual se prepararon los estándares que se inyectaron en el sistema HPLC-MS/MS a unas concentraciones de 0,05, 0,075, 0,1, 0,2 y $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

6.2.- Extracción hormonal

La extracción hormonal se realizó a partir de 1 gramo de material vegetal homogeneizado con nitrógeno líquido, al que se le añadieron 5 ml de tampón de extracción compuesto por una mezcla fría (-20°C) de metanol/agua (80/20 v/v, pH 2.5). Tras una agitación vigorosa, el material vegetal junto con la mezcla de extracción se mantuvieron durante toda la noche a -20°C y,

posteriormente, los sólidos presentes fueron separados mediante centrifugación a 20.000 g durante 15 min a 4°C. A continuación se procedió a una re-extracción del precipitado durante 30 min añadiendo nuevamente 5 ml de tampón de extracción y homogeneizando la mezcla. Se mezclaron los sobrenadantes de la primera y segunda extracción y se hicieron pasar a través de un cartucho Sep-Pak Plus †C18 cartridge (SepPack Plus, Waters, Millford, MA, USA) para eliminar lípidos que interfieran y algunos pigmentos vegetales presentes en la matriz de la muestra. Dicho volumen se evaporó hasta sequedad o hasta que todo el disolvente orgánico fue eliminado. El residuo resultante se disolvió en 5 ml de ácido fórmico 1 M y se dispuso sobre una columna de modo mixto Oasis MCX de intercambio catiónico y fase reversa (150 mg; Waters) pre-acondicionada con 5 ml de metanol seguido de 5 ml de ácido fórmico 1 M. Para separar las diferentes CKs (nucleótidos, bases, ribósidos, y glucósidos) de IAA y ABA, las columnas se lavan y eluyen con diferentes soluciones indicadas en Dobrev y Kaminek (2002). ABA e IAA fueron analizadas en la misma fracción. Tras pasar cada disolvente por las columnas, fueron purgadas brevemente con aire. Los solventes son evaporados el vacío a 40°C. Las muestras son después disueltas en fase móvil A, que consiste en una mezcla de agua/acetoneitrilo/ácido fórmico (94.9:5:0.1 por vol.) por análisis con for high-performance liquid chromatography (HPLC)/mass spectroscopy (MS).

6.3.- HPLC-MS/MS

El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante un sistema HPLC-MS/MS compuesto por un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un automuestreador termostatzado μ -wellplate y una bomba capilar, conectado a un espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA) compuesto por un detector de trampa de iones usando una interfaz de electrospray (ESI).

Justo antes de cada inyección, se tomaron 100 μl de la muestra y se filtraron a través de un filtro Millex de 13 mm de diámetro con una membrana de nylon de 0,22 μm de tamaño de poro (Millipore, Bedford, MA, USA). Se inyectaron 10 μl de cada muestra en una columna de HPLC Supelco Discovery C18 (5 μm , 100 \cdot 2,1 mm, Supelco, Pennsylvania, USA), termostaticada a 40°C, y usando un flujo de 0,1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Se diseñó un gradiente de concentración de la fase móvil para aumentar la separación cromatográfica de las diferentes hormonas vegetales, incluyendo una fase previa de limpieza y equilibrado de la columna. Para ello se utilizaron dos fases móviles distintas: fase móvil A compuesta por una mezcla de agua/ácido acético (99,5/0,5, v/v), y fase móvil B consistente en una mezcla de metanol/acetona/ácido acético (98,5/1/0,5, v/v/v). El programa de elución consistió en mantener inicialmente una proporción de fase móvil B del 20% durante 5 min para, posteriormente, aumentar desde el 20% al 70% de B y del 70% al 100% de B mediante un gradiente lineal que duró 5 min en ambos casos. Una proporción de 100% de fase móvil B se mantuvo constante durante los siguientes 10 min. Antes de cada inyección se equilibró la columna durante 20 min con fase móvil a una composición igual a la inicial del programa de elución (20% de B). El tiempo total de análisis para cada una de las muestras fue de 45 min. Los cromatogramas UV se registraron a 280 nm usando el módulo DAD (Agilent Technologies).

El espectrómetro de masas operó en modo positivo con un tensión del spray capilar de 3.500 V, y una velocidad de exploración de 26.000 (m/z) \cdot s^{-1} entre 50 y 500 m/z . Se estableció una presión para el gas de nebulización (He) de

30 psi, mientras que para el gas de secado (N_2) se fijó un flujo de $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a una temperatura de 350°C .

Se obtuvieron los cromatogramas y espectros de masas para cada de las muestras y los resultados fueron analizados utilizando el programa informático DataAnalysis LC/MSD Trap Versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Germany).

Para la cuantificación de *t-Z*, *rZ*, ABA, IAA, SA y JA las curvas de calibración se construyen para cada componente analizado (0.05 , 0.075 , 0.1 , 0.2 , y $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y se corrigen por standards internos $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$: [$^2\text{H}_5$] *trans*-zeatina, [$^2\text{H}_5$] ribósido de *trans*-zeatina, [$^2\text{H}_6$] *cis*, *trans*- ácido abscísico, [$^2\text{H}_5$] ácido jasmónico, [$^2\text{H}_5$] ácido salicílico (Olchemin Ltd, Olomouc, Czech Republic), y [$^{13}\text{C}_6$] ácido indol-3-acético (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA). Los porcentajes recuperados varían entre 92% y 95%.

ACC se determina después de la conversión en etileno por cromatografía de gases usando una columna activada por alumina y un detector FID (Cromatix-KNK-2000, Konik, Barcelona, Spain). ACC se extrae con 80% (v/v) de etanol y por degradación con hipoclorito alcalino en presencia de 5 mM HgCl_2 (Casas et al., 1989). Se realiza un paso de purificación preliminar pasando el extracto a través de una malla Dowex 50W-X8 y recuperada posteriormente con NH_4OH 0.1N. La eficiencia de conversión de ACC en etileno fue calculada separadamente usando una muestra réplica conteniendo 2.5 nmol de ACC como Standard interno, y usado para la corrección de los datos.

7.- APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

La aproximación proteómica se realizó en colaboración con el Dr. Roque Bru, perteneciente al Grupo de Proteómica de la Universidad de Alicante.

Los extractos de hojas de tomate fueron sometidos a un procedimiento de limpieza, utilizando el kit de limpieza (Cleanup, Bio-Rad) mediante precipitación de las proteínas. Las proteínas obtenidas fueron re-suspendidas en una solución de rehidratación Destreak™ (GE Healthcare, Madrid, España), que contiene los reactivos Destreak (GE Healthcare). A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm para clarificarlas y el sobrenadante se empleó para realizar la primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF) de la electroforesis bidimensional. IEF se realizó con muestras de 500 µg en tiras de gel de 13 cm. Previamente, las tiras de gel (ReadyStrip™ IPG Strip pH 4-7, BIO-RAD), en contacto con la muestra, se sometieron a una rehidratación activa a 50 V durante 14-16 horas. Una vez rehidratadas las tiras, se realizó la primera dimensión (IEF) cuyas condiciones de migración fueron:

- 1.- 250 V durante 20 min.
- 2.- 4000 V durante 2 h.
- 3.- 10000 V durante 2,5 h.
- 4.- 500 V hasta 9 h.

Una vez finalizada la primera dimensión se procedió a equilibrar las tiras. Para ello se pusieron en agitación suave durante 10-15 minutos con dos tampones diferentes: tampón de equilibrado I y tampón de equilibrado II. El tampón de equilibrado I contenía urea 6 M, SDS 2% (p/v), glicerol 20% (v/v), Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y DTT 0.13 M. El tampón de equilibrado II contenía los mismos reactivos que el tampón de equilibrado I excepto el DTT, que fue sustituido por Iodoacetamida 0.13 M.

A continuación las tiras se sumergieron en tampón de carrera (0.1 M Tris, 0.1 M glicina y 0.1% de SDS) y se depositaron sobre los geles de SDS-PAGE al 12% para realizar la segunda dimensión. Previamente, se adicionó agarosa 1% en la parte superior de los geles para asegurar el contacto entre la tira y el gel,

permitiendo una transferencia efectiva de la tira. Cuando la agarosa gelificó, los geles se colocaron en la cubeta de electroforesis, llenando completamente el hueco interior dejado por las dos placas y la mitad de la cubeta con tampón de carrera (0.1 M Tris, 0.1 M glicine y 0.1% SDS). Para el desarrollo electroforético, se aplicó un prerrecurso a 100V durante 15 minutos y un recorrido de 1 hora a 150V.

Transcurrida la electroforesis los geles se sometieron a la tinción con Bio-Safe™ Coomassie G-250 (Bio-Rad). Tras su tinción los geles se conservaron a 4°C en ácido acético al 1%.

Se llevaron a cabo tres repeticiones biológicas. Se adquirieron imágenes del gen de alta calidad (16-bit y 300 dpi) mediante un escáner de transmisión de luz (Image Scanner, GE Healthcare, Barcelona, España) y se analizaron con Progenesis SameSpots versión 3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido). Después se realizó una validación manual de puntos para incluir los que la identificación automática no había incluido y eliminar los artefactos que por error se consideraban puntos.

Se seleccionaron los puntos de proteínas de interés, se extrajeron del gel empleando un bisturí estéril. Las secciones de gel conteniendo proteínas, se incubaron en 500 µl de H₂O milliQ. Estas proteínas fueron eluidas del gel, sometidas a digestión con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (MS). La instrumentación para la MS está compuesta por una fuente de iones, un espectrómetro de masas y un detector iónico. Existen varios métodos de ionización de proteínas y péptidos en la fuente de iones, pero el más empleado es el método MALDI (matriz-assisted laser desorption/ionization, o Desorción/ionización mediante laser asistida por matriz). En esta técnica, los analitos co-cristalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele asociarse a un

analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time of flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. Así pues, la identificación de las proteínas se realizó usando espectros generados por espectrometrías de masas MALDI-TOF y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en las instalaciones de proteómica ProteoRed © de la Universidad de Alicante (España). En estos espectros, los fragmentos peptídicos son separados de acuerdo con su ratio masa/carga (m/z), obteniendo la denominada huella peptídica.

Para la identificación de todos los productos de espectro iónico MS/MS generado para cada muestra se realizó una búsqueda en MASCOT (www.matrixscience.com) en la base de datos NCNInr y SwissProtein de todas las secuencias *Viridiplantae* disponibles.

8.- METABOLÓMICA

La metabolómica se realizó en colaboración con el Dr. Wolfram Weckwerth, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Viena, Austria.

Los perfiles metabolómicos se realizaron mediante cromatografía de gases acoplado a un analizador de masas LECO Pegasus IV por Tiempo de Vuelo (GC-TOF-MS) (Leco Corp Inc., St. Joseph, MI, U.S.A.), de acuerdo con el protocolo descrito en Scherling et al. (2009). La extracción del material vegetal se llevó a cabo a partir de 10 mg de muestra congelada, usando una solución tampón de metanol/cloroformo/agua con una relación 5/2/1 (v/v/v) (Weckwerth et al., 2004).

Para la normalización de datos y el control de calidad se añadió 10 µl de solución de estándar interno (leucina-2,3,3-d₃, ácido aspártico-2,3,3-d₃, y D-sorbitol-¹³C₆). Después del fraccionamiento, se usó la fase polar superior para el análisis GC-MS y posterior secado en un concentrador speed-vac. El residuo se disolvió y se derivatizó durante 90 minutos a 30°C (15 µl de hidrocloreuro de metoxiamina a 40 mg ml⁻¹ en piridina seca) seguido de un tratamiento durante 30 minutos con 60 µl de N-metil-N-trifluoroacetamida a 37°C. A continuación se añadió el marcador de tiempo de retención (3 µl) (n-alcanos C10-C36, cada 200 µg · mL⁻¹ en piridina) a cada muestra para determinar el tiempo de retención (Morgenthal et al., 2005; Morgenthal et al., 2007).

El análisis GC-TOF-MS se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases HP 6890 con liners desactivados con inyectores Split/splitless (Agilent, Böblingen, Alemania). Se inyectaron volúmenes de muestra de 0,5 µl en modo splitless en inyectores a una temperatura de 230°C. La cromatografía de gases estuvo operando con una columna capilar Varian VF-5ms (30 m · 0,25 mm; y un espesor de película de 25 µm) y con una precolumna 10-m EZ-guard (Varian, Palo Alto, CA, U.S.A.) a un flujo constante de helio de 1 ml · min⁻¹. El programa de temperatura se inició con 1 minuto isocrático a 75°C seguido por una rampa de temperatura a 9°C/minuto hasta una temperatura final de 350°C, que se llevó a cabo durante 5 minutos. La velocidad de escaneo fue de 20 s⁻¹ y los rangos de masas establecidos de 71:500 masa - carga (m/z).

9.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 20 (Statistical Package for Social Sciences, 2011). Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA). Los valores medios se compararon mediante el test de Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *CIN1* DE UNA INVERTASA EXTRACELULAR SOBRE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS DE TOMATE

1.1.- Análisis de la expresión del gen *CIN1*

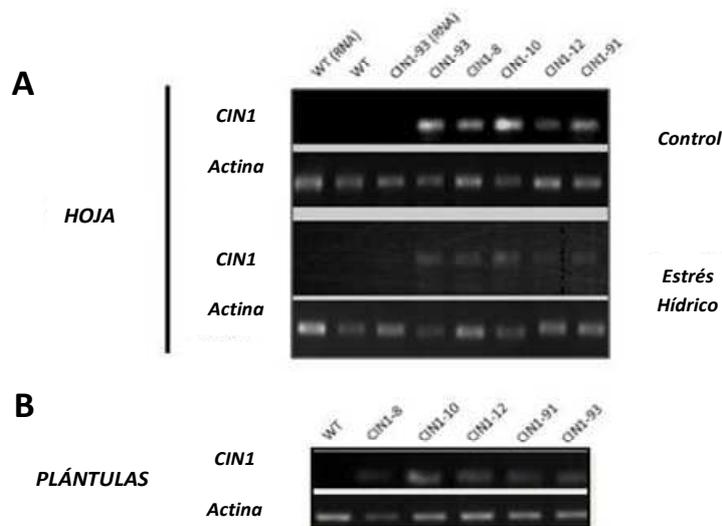


Figura 2.1.- Expresión del gen *CIN1* mediante RT-PCR y posterior electroforesis en gel de agarosa 1,5% en hojas (A) de plantas de tomate WT y 5 líneas *CIN1* en condiciones control y sometidas a estrés hídrico durante 9 días, y en plántulas (B) en condiciones control.

Análisis mediante RT-PCR mostraron expresión del gen *CIN1* en hojas de todas las líneas transgénicas estudiadas (*CIN1-8*, *CIN1-10*, *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93*) en condiciones control, si bien se observó una importante reducción de los niveles de expresión al final del período de sequía (Fig. 2.1A). Curiosamente, los niveles de expresión del gen *CIN1* son importantes en las primeras etapas del desarrollo (Fig. 2.1B).

1.2.- Biomasa y área foliar

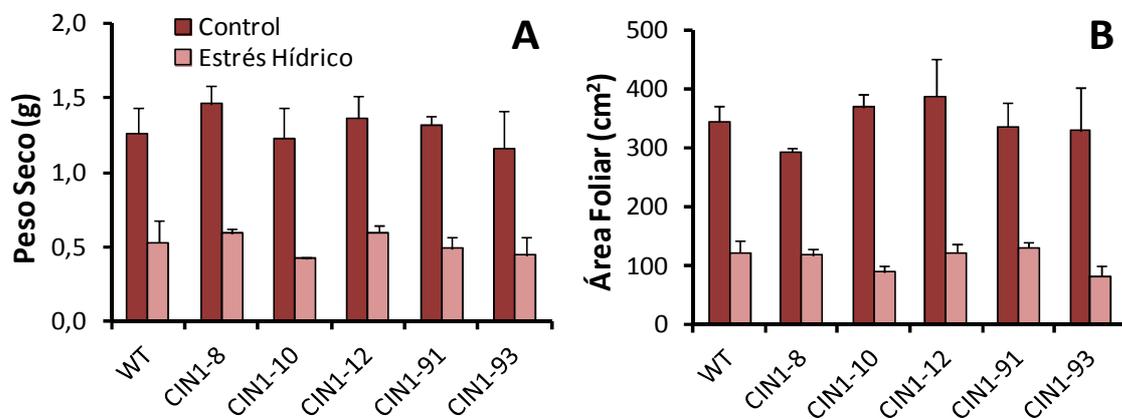


Figura 2.2.- Peso seco (A) y área foliar (B) de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

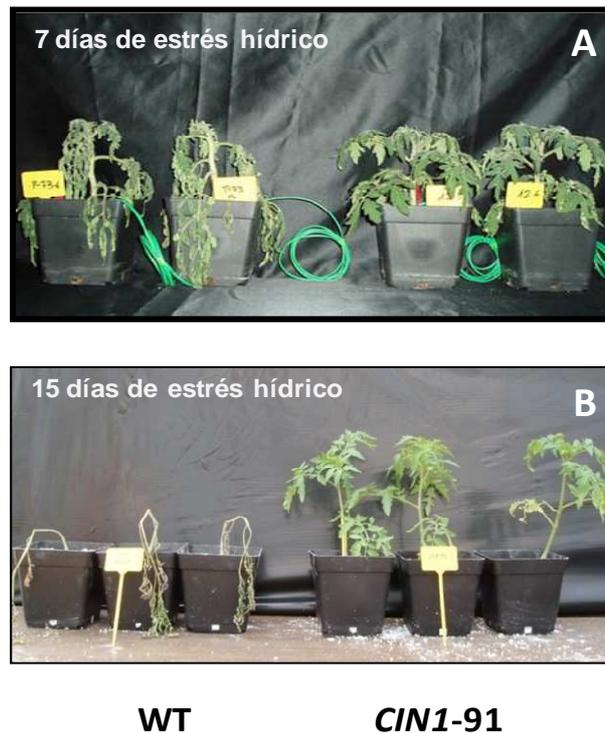


Imagen 2.1.- Fotografías de plantas de tomate WT y de la línea transgénica *CIN1-91* que muestran el aspecto de las plantas en (A) cámara de cultivo a los 7 días de estrés hídrico y en (B) invernadero a los 15 días de estrés hídrico y tras 1 día de rehidratación.

Tanto las plantas transgénicas como la WT se cultivaron en una cámara de condiciones controladas y fueron sometidas a un riego óptimo durante un periodo de 10 días. A lo largo de este periodo, en el que el potencial hídrico del sustrato se mantuvo a capacidad de campo ($\Psi_s = 0$ MPa), las plantas transgénicas no diferían en apariencia de las plantas WT, y tampoco se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea y el área foliar (Fig. 2.2A,B). Tras este periodo inicial, se cortó el riego durante nueve días alcanzándose un potencial hídrico del sustrato mínimo, al final del periodo de estrés, de $\Psi_s = -2$ MPa en las plantas WT. Se observaron diferencias muy aparentes en cuanto a turgencia entre las líneas transgénicas y la WT, como podemos comprobar en la Imagen 2.1, donde se muestra una foto comparativa entre la WT y la línea transgénica *CIN1-91* tras 7 días de estrés hídrico (Imagen 2.1A) y el caso extremo tras 15 días de estrés hídrico en invernadero en condiciones controladas (Imagen 2.1B).

1.3.- Potencial hídrico del sustrato

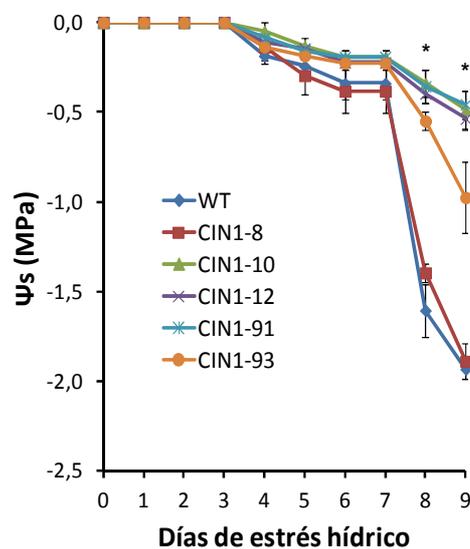


Figura 2.3.- Evolución diaria en el potencial hídrico del sustrato (Ψ_s) durante el periodo de estrés hídrico en plantas de tomate WT y cinco líneas que sobreexpresan el gen *CIN1*. Cada punto representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

A partir del cuarto día de estrés hídrico se pusieron de manifiesto diferencias en el potencial hídrico del sustrato (Ψ_s) entre líneas (Fig. 2.3), de forma que tanto la WT como la línea afenotípica *CIN1-8* secaban más rápidamente el sustrato que las otras líneas transgénicas. Las diferencias fueron significativas a partir del quinto día de parar el riego y hasta el final del experimento (día 9), alcanzando las plantas WT el valor más bajo (-1,8 MPa).

1.4.- Contenido relativo en agua

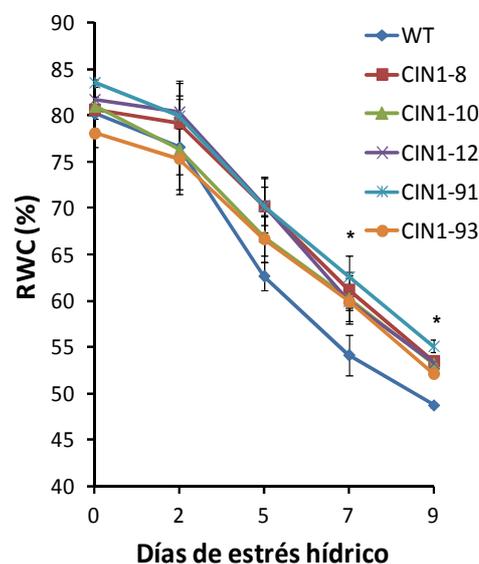


Figura 2.4.- Evolución diaria en el contenido relativo en agua (*RWC*) durante el periodo de estrés hídrico en plantas de tomate WT y cinco líneas que sobreexpresan el gen *CIN1*. Cada punto representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Al inicio del ensayo, en el momento de parar el riego, el contenido relativo en agua (*RWC*), expresado como porcentaje de agua de la hoja respecto del máximo posible, osciló entre el 75 y el 85% (Fig. 2.4). Conforme avanzaba el periodo de sequía, se observó una disminución más acusada en el *RWC* en la WT que en las plantas transgénicas, alcanzando un valor mínimo de 47%. En las plantas *CIN1* varió entre el 53% para la línea *CIN1-93* y el 56% para la línea *CIN1-91*, lo cual demuestra que las plantas transgénicas fueron superiores a las

plantas WT en el mantenimiento del *RWC* de la hoja durante el periodo de sequía, a pesar de que también presentaron síntomas de marchitez parcial.

2.- EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE *CIN1* SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y EL USO EFICIENTE DEL AGUA

2.1.- Fluorescencia de clorofilas y fotosíntesis

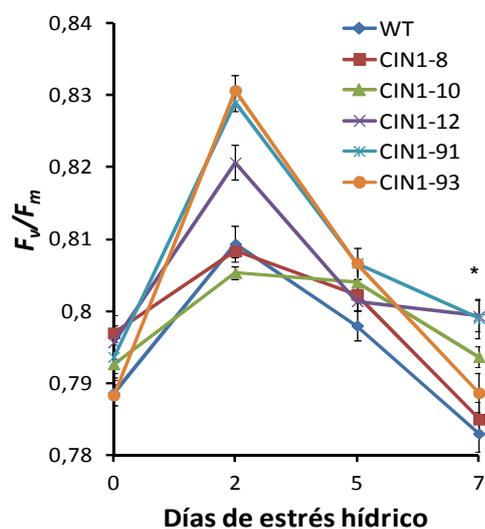


Figura 2.5.- Evolución diaria del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m) durante el periodo de estrés hídrico en hojas de plantas de tomate WT y cinco líneas que sobreexpresan el gen *CIN1*. Cada punto representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

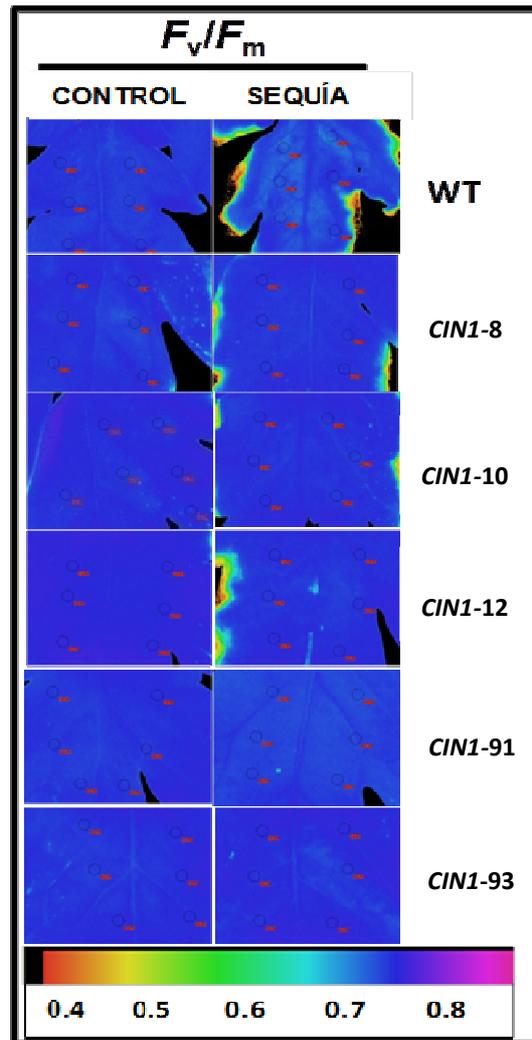


Figura 2.6.- Imagen digital de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) obtenida mediante un fluorímetro de clorofilas Imaging-PAM (Walz) durante el periodo de estrés hídrico en hojas de plantas de tomate WT y cinco líneas que sobreexpresan el gen *CIN1*. En la parte inferior se muestra la escala relativa de color.

Con objeto de estudiar el efecto de la sobreexpresión del gen *CIN1* sobre el aparato fotosintético en plantas de tomate sometidas a estrés hídrico durante el periodo vegetativo se determinó tanto la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m) como la tasa de fotosíntesis (A). La evolución del parámetro F_v/F_m durante el período de sequía, medido con un fluorímetro de clorofilas portátil OS-30p, se muestra en la Fig. 2.5. Al igual que ocurre en otro tipo de estreses abióticos, particularmente el estrés salino, inicialmente, en el momento de imposición del estrés, se observó un incremento en el valor F_v/F_m

en todas las líneas transgénicas y en la WT, aunque después disminuyó conforme iba progresando el periodo de estrés. Mientras que al inicio de la sequía no se encontraron diferencias en fluorescencia de clorofilas entre las líneas transgénicas y la WT, posteriormente, a partir del segundo día de estrés, disminuyó especialmente en la WT, siendo significativamente menor respecto de las líneas transgénicas al final del periodo de sequía.

Se estudiaron los cambios espacio-temporales del parámetro F_v/F_m a lo largo de la superficie de la hoja, utilizando un fluorímetro de clorofilas Imaging-PAM. Como se puede observar en la Fig. 2.6, donde se muestran las imágenes obtenidas en hoja madura, en condiciones control no se aprecian diferencias entre líneas transgénicas ni con la WT. Sin embargo, al final del periodo de sequía se observa cómo las plantas WT se vieron claramente afectadas por el estrés, especialmente los bordes de las hojas, mientras que las plantas *CIN1* resultaron menos afectadas.

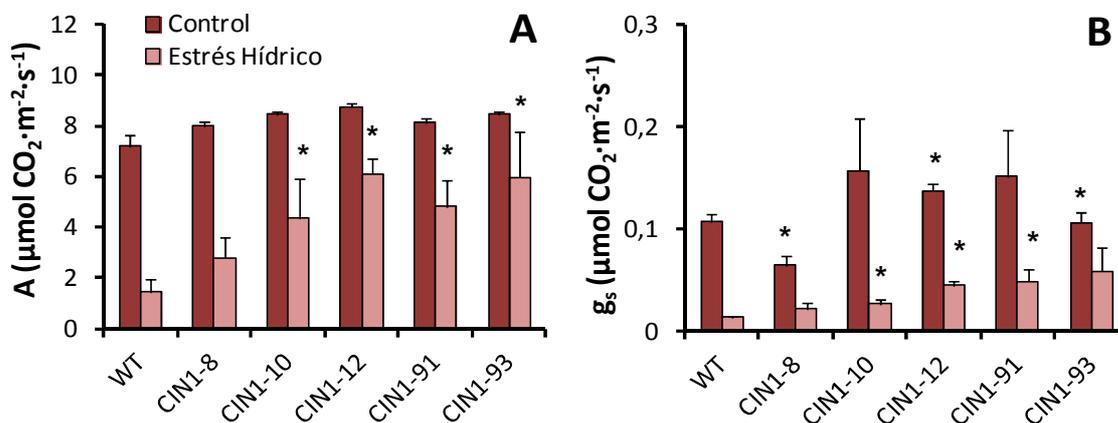


Figura 2.7.- Tasa de fotosíntesis (A) y conductividad estomática (B) en plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0.05$.

La tasa fotosintética (A) en condiciones control no varió de forma significativa entre la WT y las plantas *CIN1* (Fig. 2.7A). La supresión del riego durante un periodo de 9 días dio lugar a una reducción importante de la fotosíntesis, especialmente en la WT (75%). Sin embargo, en las plantas *CIN1* la disminución en la tasa fotosintética fue menos acusada (30%), manteniéndose significativamente superior a la WT, a excepción de la línea afenotípica *CIN1-8*, que se comportó de forma similar a la variedad silvestre.

En condiciones óptimas de riego, las líneas *CIN1-12* y *CIN1-93* presentaron valores de conductancia estomática (g_s) mayores que la WT, mientras que en la línea *CIN1-8* fueron significativamente inferiores y en las otras dos líneas estudiadas *CIN1-10* y *CIN1-91* no se observaron diferencias significativas respecto de la WT (Fig. 2.7B). El estrés hídrico provocó una reducción importante de la g_s aunque, al final del periodo de sequía, todas las líneas transgénicas presentaron valores de g_s significativamente superiores a los de la WT, especialmente en las líneas *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93* (2-3 veces mayores).

2.2.- Uso eficiente del agua

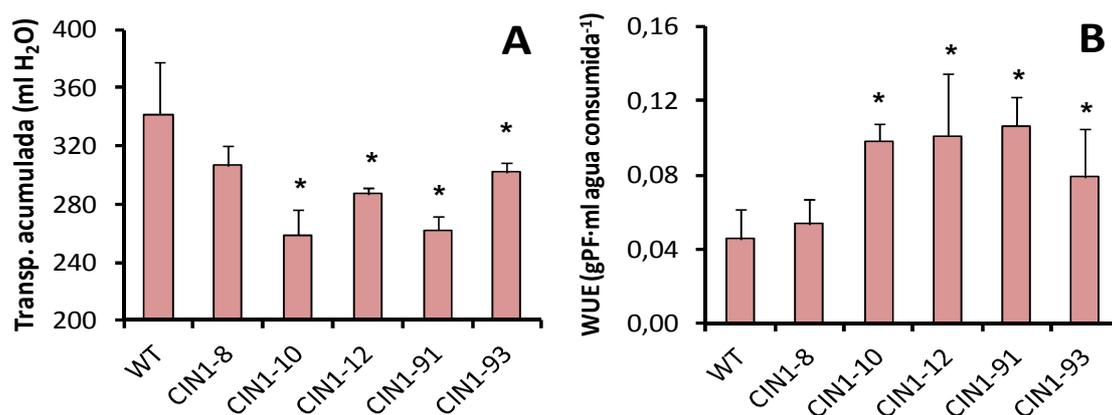


Figura 2.8.- Transpiración acumulada (A) y uso eficiente del agua (B) de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

La sobreexpresión del gen *CIN1* dio lugar a una importante reducción de la transpiración acumulada (30%) con respecto a las plantas WT (Fig. 2.8A). La disponibilidad de agua está directamente relacionada con la productividad. En este sentido, el uso eficiente del agua (*WUE*), medido como la cantidad de biomasa producida por volumen de agua consumido, incrementó significativamente (hasta el doble) en las plantas *CIN1* respecto de la WT y la línea afenotípica *CIN1-8* (Fig. 2.8B).

3.- EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *CIN1* SOBRE EL METABOLISMO DEL CARBONO

3.1.- Contenido en azúcares

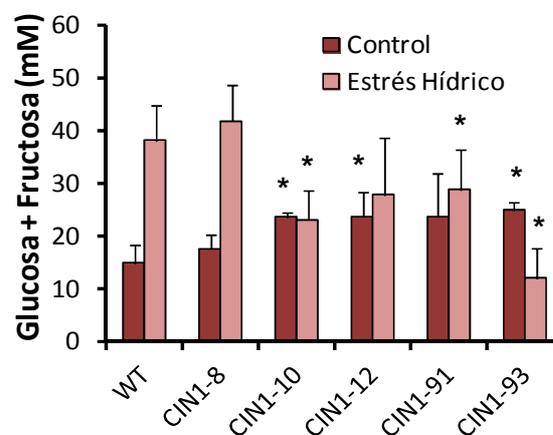


Figura 2.9.- Concentración de hexosas (fructosa y glucosa) en hoja madura de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

En condiciones control, las concentraciones de hexosas (glucosa y fructosa) en hoja de las líneas transgénicas *CIN1-10*, *CIN1-12* y *CIN1-93* fueron significativamente superiores a las de la WT (Fig. 2.9). La aplicación del estrés dio lugar a un aumento general en las concentraciones de hexosas,

especialmente en la WT y en la línea afenotípica *CIN1-8*, presentando valores significativamente superiores (2-3 veces más) que los de las otras líneas transgénicas.

3.2.- Efecto sobre la ultra-estructura de la hoja

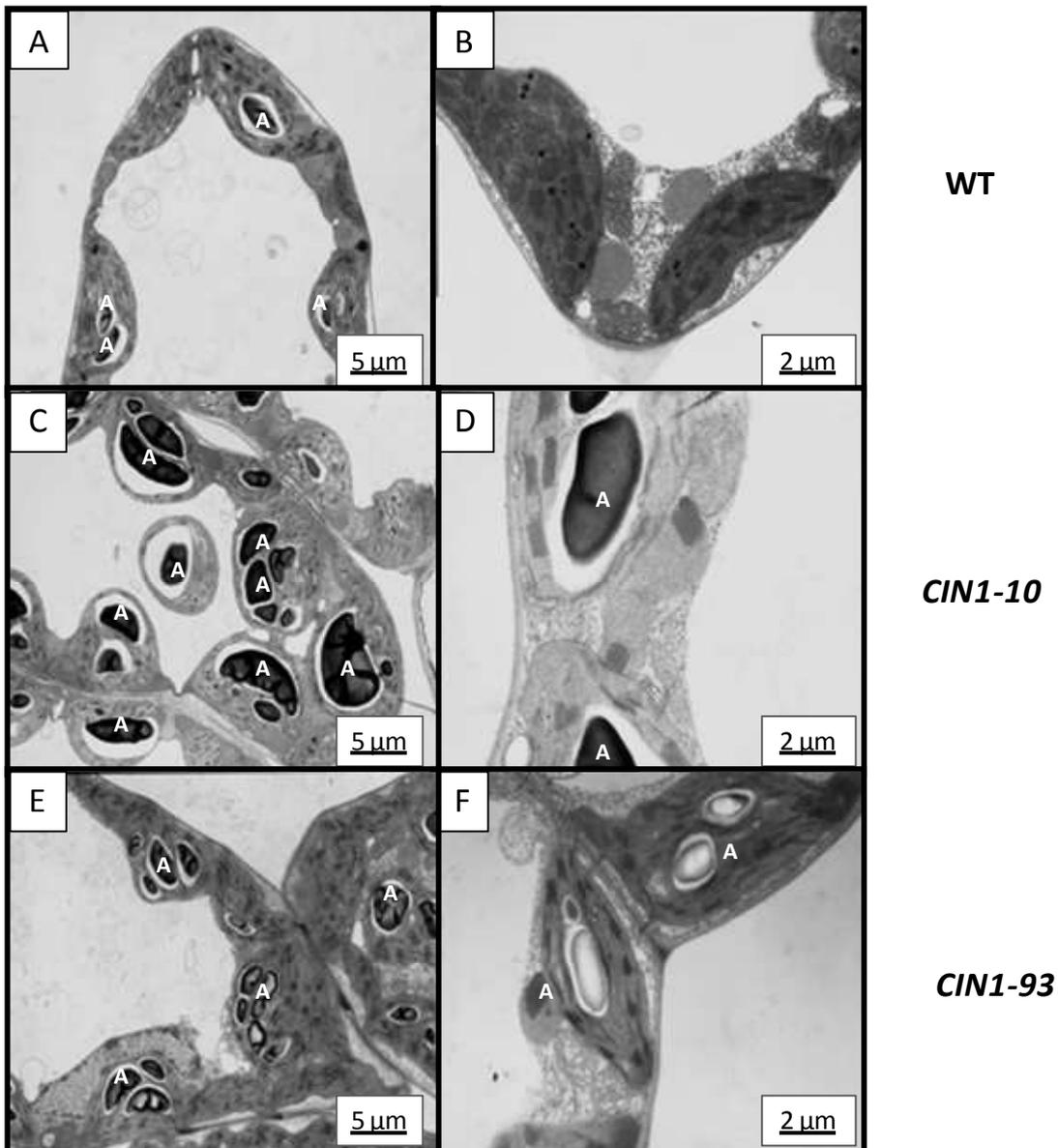


Figura 2.10.- Ultra-estructura de hojas de plantas de tomate WT (A y B), de la línea transgénica *CIN1-10* (C y D) y la línea transgénica *CIN1-93* (E y F) sometidas a 7 días de estrés hídrico.

La sobreexpresión del gen *CIN1* modificó la ultra-estructura de la hoja en plantas sometidas a estrés hídrico (Fig. 2.10). Las hojas de plantas transgénicas presentaban una ultra-estructura bien desarrollada, observándose cloroplastos con numerosos gránulos de almidón, ovalados y de gran tamaño, y granas bien formados (Fig. 2.10C-F). Por el contrario, las hojas de la línea WT presentaban cloroplastos menos desarrollados y con un menor número de gránulos de almidón, redondeados y pequeños (Fig. 2.10A-B).

3.3.- Actividades sacarolíticas

La actividad del producto del transgén, la invertasa extracelular (cwInv), así como las actividades sacarosa sintasa (SS), invertasa citoplasmática (cytInv) e invertasa vacuolar (vacInv) se analizaron en hoja madura.

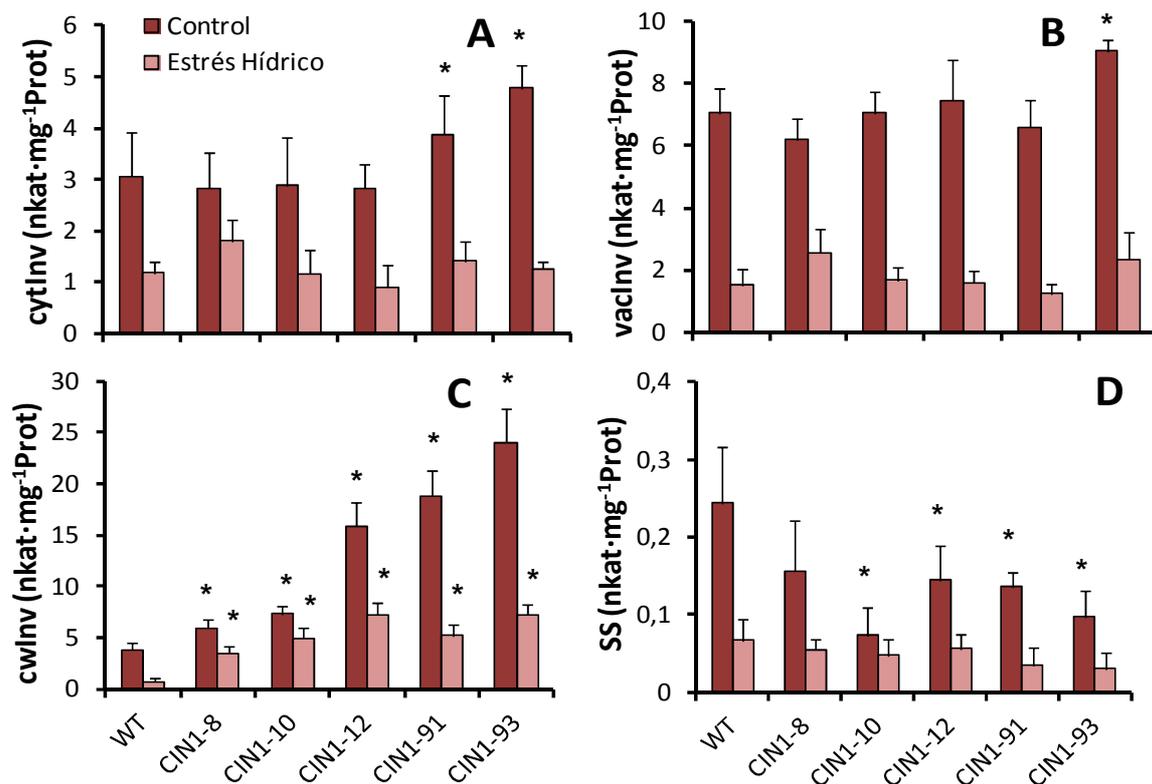


Figura 2.11.- Actividades invertasa citoplasmática (A), invertasa vacuolar (B), invertasa extracelular (C) y sacarosa sintasa (D) en hoja madura de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Dos líneas transgénicas, *CIN1-91* y *CIN1-93*, presentaron una actividad *cytInv* significativamente superior a la WT en condiciones óptimas de riego (Fig. 2.11A). La imposición del estrés dio lugar a una reducción de entre el 30 y el 80% en la actividad *cytInv*, no observándose diferencias significativas entre líneas *CIN1* y la WT (Fig. 2.11A).

La actividad *vacInv* fue muy similar en las plantas *CIN1* y en la WT en condiciones control, a excepción de la línea *CIN1-93* en la que incrementó significativamente (20%) (Fig. 2.11B). De forma similar a lo observado para las otras actividades sacarolíticas estudiadas, el estrés hídrico provocó reducción de hasta un 77% en la actividad *vacInv*, sin diferencias significativas entre líneas (Fig. 2.11B)

La sobreexpresión del gen *CIN1* provocó un fuerte incremento de la actividad *cwInv*. En condiciones control, la actividad *cwInv* incrementó de forma significativa en las plantas *CIN1*, particularmente en las líneas *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93*, con incrementos del 75%, 77% y 83%, respectivamente (Fig. 2.11C). A pesar de que la actividad *cwInv* se vio reducida como consecuencia del estrés, en las plantas transgénicas fue significativamente mayor a la WT, donde llegó a reducirse hasta en un 86% (Fig. 2.11C).

En general la actividad *SS* era baja en relación con las otras actividades sacarolíticas analizadas (Fig. 2.11D). En condiciones control, la actividad *SS* fue significativamente menor en las líneas transgénicas que en la WT, a excepción de la línea afenotípica *CIN1-8*. El estrés hídrico redujo más de la mitad la actividad *SS* de una manera generalizada, aunque, al igual que en el caso de la *cytInv*, no se observaron diferencias significativas entre líneas con la WT (Fig. 2.11D).

3.4.- Inhibidor de la invertasa

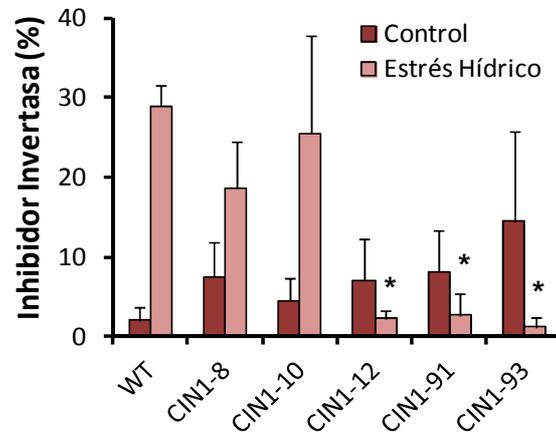


Figura 2.12.- Actividad del inhibidor de invertasas (*InvInh*), medida en porcentaje, en hoja madura de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Para estudiar el papel del inhibidor de invertasas (*InvInh*) en la regulación de las invertasas, se analizó la capacidad inhibitoria de esta pequeña proteína, en porcentaje de reducción de actividad invertasa, tanto en la WT como en las plantas *CIN1*. Se observó un mayor efecto inhibitorio en las plantas transgénicas en condiciones óptimas de riego que en la WT, aunque no resultó significativo (Fig. 2.12). El estrés hídrico provocó un fuerte incremento de la actividad del *InvInh* en la WT y en las líneas *CIN1-8* y *CIN1-10*. Sin embargo, en las líneas transgénicas *CIN1-12*, *CIN1-91* y *CIN1-93* se observó una reducción de más de la mitad de la actividad del *InvInh*, tanto con respecto a las condiciones control como con respecto a la WT (Fig. 2.12).

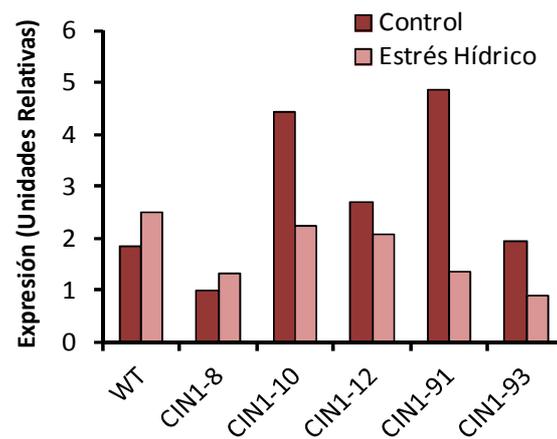


Figura 2.13.- Niveles de expresión en unidades relativas del gen del inhibidor de invertasas (*Involnh*) en plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Los datos de actividad inhibitoria se completaron con análisis de la expresión del gen del *Involnh* en tomate. En condiciones control, los niveles de expresión del gen *Involnh* en las plantas *CIN1* fue mayor que en WT, a excepción de la línea *CIN1-8* (Fig. 2.13). Los niveles de expresión no se correlacionaron con la actividad total de la proteína, debido, probablemente, a modificaciones post-transcripcionales. En condiciones de estrés hídrico, sin embargo, los niveles de expresión fueron similares o menores en líneas transgénicas que en la WT.

3.5.- Otras enzimas del metabolismo del carbono

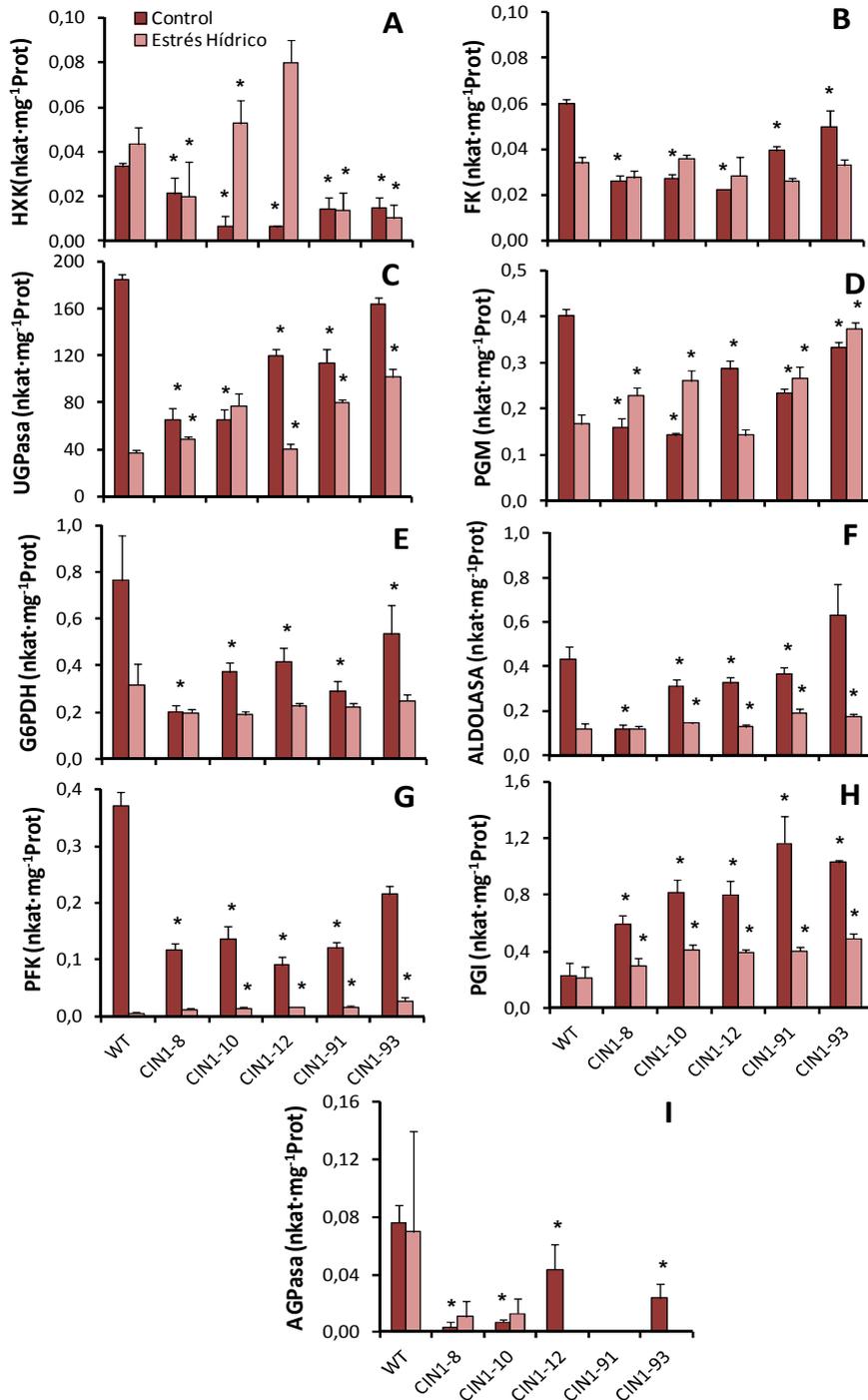


Figura 2.14.- Concentración de distintas enzimas del metabolismo del carbono: Hexoquinasa (HXK, A), Fructoquinasa (FK, B), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa, C), Fosfoglucomutasa (PGM, D), Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, E), Aldolasa (F), Fosfofructoquinasa (PFK, G), Fosfoglucosa Isomerasa (PGI, H) y ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa, I), en hoja madura de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Con objeto de profundizar en los mecanismos de aclimatación/tolerancia de las plantas *CIN1*, analizamos otras enzimas importantes del metabolismo del carbono. La actividad de las dos primeras enzimas glicolíticas que catabolizan la fosforilación de las hexosas, hexoquinasa (*HXK*) y fructoquinasa (*FK*), fue muy baja en comparación con otras enzimas analizadas. En condiciones control, la actividad *HXK* y *FK* fue significativamente menor en las plantas *CIN1* que en la WT (Fig. 2.14A,B). El estrés hídrico no redujo la actividad de estas enzimas en las líneas transgénicas, e incluso se observó un incremento en las líneas *CIN1-10* y *CIN1-12*.

UDP-glucosa pirofosforilasa (*UGPasa*), fosfoglucomutasa (*PGM*), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH*), aldolasa y Fosfofructoquinasa (*PFK*) mostraron un patrón de actividad muy similar (Fig. 2.14C-G). En condiciones de riego óptimas, la actividad de estas enzimas fue significativamente menor en las plantas *CIN1* que en la WT. Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico, se produjo una importante reducción de las actividades enzimáticas en la WT mientras que en las líneas transgénicas se mantuvieron. El estrés hídrico redujo la actividad fosfoglucoisomerasa (*PGI*) tanto en las plantas *CIN1* como en la WT, aunque era significativamente mayor en las líneas transgénicas que en la WT tanto en condiciones control como de estrés (Fig. 2.14H). La actividad ADP-glucosa pirofosforilasa (*AGPasa*) fue muy baja en todos los casos (Fig. 2.14I). La tabla 2.1. muestra un resumen de las variaciones en la actividad de las enzimas del metabolismo del carbono en las plantas *CIN1* y en la WT.

Tabla.2.1.- Comportamiento de las enzimas del metabolismo del carbono estudiadas en condiciones de estrés hídrico y control.

ENZIMA	ESTRÉS HÍDRICO	CONTROL
<i>InvInh</i>	disminuye en <i>CIN1</i> , incrementa en WT	menor actividad en WT
<i>VacInv</i>	disminución de la actividad	
<i>CwInv</i>	disminución de la actividad	menor actividad en WT
<i>CytInv</i>	disminución de la actividad	
<i>SS</i>	disminución de la actividad	mayor actividad en WT
<i>HXX</i>	incrementa en <i>CIN1</i>	mayor actividad en WT
<i>FK</i>	no cambio en <i>CIN1</i> , disminuye en WT	mayor actividad en WT
<i>UGPasa</i>	no cambio en <i>CIN1</i> , disminuye en WT	mayor actividad en WT
<i>PGM</i>	no cambio en <i>CIN1</i> , disminuye en WT	mayor actividad en WT
<i>G6PDH</i>	débil disminución en <i>CIN1</i> , fuerte disminución en WT	mayor actividad en WT
<i>Aldolasa</i>	disminución de la actividad	
<i>PFK</i>	incrementa en <i>CIN1</i> , disminuye en WT	mayor actividad en WT
<i>PGI</i>	incremento de la actividad	mayor actividad en WT
<i>AGPasa</i>	no detectable	no detectable

4.- EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN *CIN1* SOBRE EL CONTENIDO HORMONAL

Para estudiar el posible efecto de la sobreexpresión del gen *CIN1* sobre el balance hormonal, se determinaron las concentraciones del precursor del etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), de la citoquinina más activa en tomate *trans*-zeatina (*t-Z*), del ácido indol-3-acético (IAA) y del ácido abscísico (ABA) en hoja madura y se compararon con las de la WT.

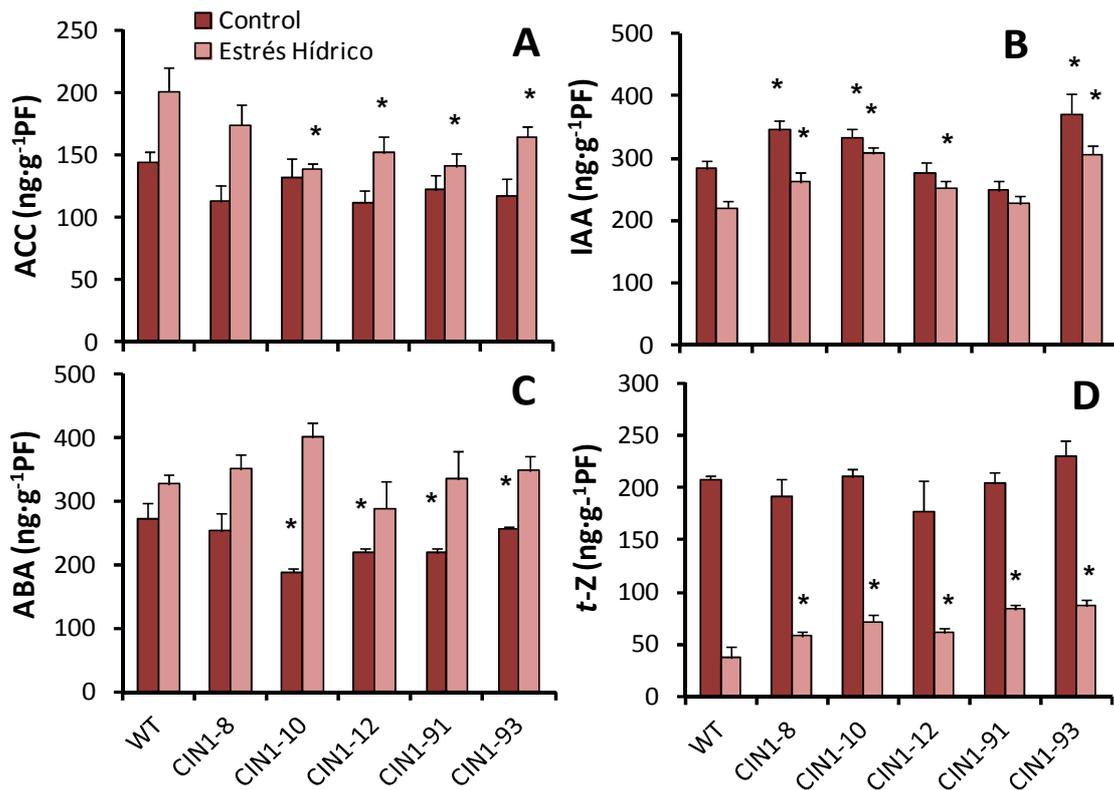


Figura 2.15.- Concentraciones de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, A), ácido indol-3-acético (IAA, B), ácido abscísico (ABA, C) y *trans*-zeatina (*t*-Z, D), y en hoja madura de plantas de tomate WT y 5 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

El estrés hídrico produjo un incremento en el precursor del etileno ACC tanto en la WT como en las plantas *CIN1* (Fig. 2.15A). Sin embargo, los niveles de ACC en las plantas transgénicas fueron significativamente más bajos (25%) que los de la WT. En cuanto a las concentraciones de IAA, el estrés hídrico redujo los niveles de esta hormona en hoja, observándose un incremento significativo en las líneas *CIN1* respecto de la WT, a excepción de la línea *CIN1*-91 (Fig. 2.15B).

Numerosos trabajos han demostrado que el incremento en la tolerancia al estrés hídrico está relacionado con una acumulación de ABA. En este estudio, la aplicación del estrés hídrico dio lugar a un incremento generalizado en las concentraciones de ABA, más acusado en las plantas transgénicas que en la WT, llegando a duplicar los niveles observados en condiciones control (Fig. 2.15C).

Por otro lado, las concentraciones de *t-Z* en las plantas *CIN1* no mostraron diferencias significativas respecto de la WT en condiciones de riego óptimas (Fig. 2.15D). El estrés hídrico provocó una fuerte reducción en las concentraciones de *t-Z* de hasta un 80%, aunque se mantuvieron en niveles significativamente superiores en las plantas transgénicas respecto de la WT.

5.- EFECTO DE *CIN1* SOBRE EL METABOLISMO ANTIOXIDATIVO

Durante el estrés, la alteración de la homeostasis celular se acompaña de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), aunque el daño inducido por el estrés puede ser atenuado por la acción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y moleculares de la célula, incluyendo el glutatión, el α -tocoferol y enzimas capaces de neutralizar ROS.

Tabla.2.2.- Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y peroxidasa medidas en fracción apoplástica y simplástica de hoja de plantas de tomate WT y 3 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada medida representa la media de 3 plantas \pm el error estándar. Entre paréntesis se indica el porcentaje de variación con respecto a las condiciones control. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

GENOTIPO	APOPLASTO		SIMPLASTO		
	SOD (U mg ⁻¹ proteína)	POX (μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	SOD (U mg ⁻¹ proteína)	POX (μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	
Control					
WT	2.5 \pm 0.1	3.4 \pm 0.1	291.9 \pm 0.3	51.08 \pm 0.4	
<i>CIN1-8</i>	1.7 \pm 0.0*	2.4 \pm 0.2*	245.3 \pm 23.9	31.03 \pm 0.7*	
<i>CIN1-10</i>	1.4 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.4*	201.5 \pm 6.4*	19.78 \pm 1.1*	
<i>CIN1-91</i>	2.4 \pm 0.0	3.3 \pm 0.0	210.1 \pm 7.9*	28.29 \pm 0.6*	
Estrés Hídrico					POX Total (% Control)
WT	1.5 \pm 0.2 (58)	2.1 \pm 0.1 (61)	232.5 \pm 4.5 (80)	29.0 \pm 2.8 (57)	57
<i>CIN1-8</i>	1.59 \pm 0.1* (94)	4.0 \pm 0.1 (170)	263.5 \pm 0.0* (107)	27.6 \pm 1.0 (89)	95
<i>CIN1-10</i>	1.7 \pm 0.1* (128)	2.6 \pm 0.2* (117)	149.4 \pm 0.2* (74)	22.3 \pm 1.2* (113)	113
<i>CIN1-91</i>	2.1 \pm 0.0 (85)	1.6 \pm 0.1* (49)	234.1 \pm 3.1 (111)	30.2 \pm 1.0 (107)	101

En la tabla 2.2. se muestran los valores de actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (*SOD*), implicada en la eliminación de H_2O_2 , y peroxidasa (*POX*), que cataliza la ruptura del $O_2^{\bullet-}$ hasta oxígeno molecular y H_2O_2 , medidas en la fracción apoplástica y simplástica de la hoja. La actividad *SOD* se redujo en un 42% en el apoplasto y en un 20% en el simplasto en la WT como consecuencia del estrés, mientras que en las plantas *CIN1* se mantuvieron o incluso aumentaron en ambos compartimentos (Tabla 2.2). La actividad *POX* tuvo un comportamiento similar a la *SOD*, reduciéndose en condiciones de estrés hídrico hasta un 50% en la WT, tanto en simplasto como en apoplasto (Tabla 2.2). Por el contrario, la actividad *POX* incrementó en la mayoría de las líneas transgénicas, especialmente en el apoplasto.

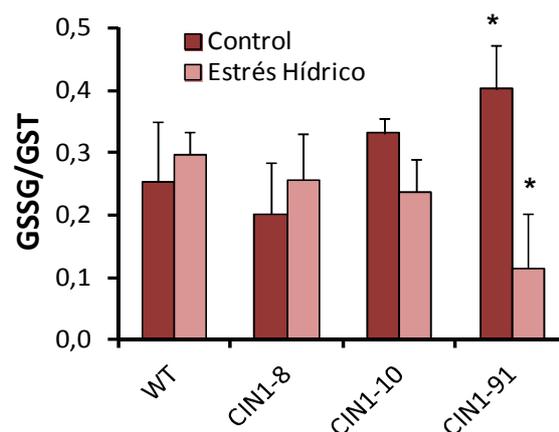


Figura 2.16.- Efecto de la expresión del gen *CIN1* en el contenido de glutatión en hoja madura de plantas de tomate WT y 3 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Los niveles de glutatión oxidado (*GSSG*) aumentaron durante el estrés hídrico en la WT y en la línea afenotípica *CIN1-8* (Fig. 2.16). Sin embargo, las otras dos líneas transgénicas analizadas (*CIN1-10* y *CIN1-91*) presentaban una reducción del *GSSG*, siendo significativa para la línea *CIN1-91*. En condiciones

de riego óptimas, los niveles del antioxidante α -tocoferol fueron similares en la WT y en las plantas transgénicas (Fig. 2.17). El estrés hídrico provocó un incremento en las concentraciones α -tocoferol, siendo significativa en la línea *CIN1-91*.

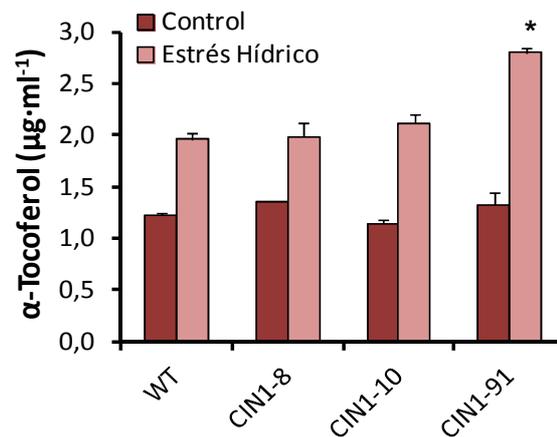


Figura 2.17.- Contenido de α -tocoferol en hoja madura de plantas de tomate WT y 3 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

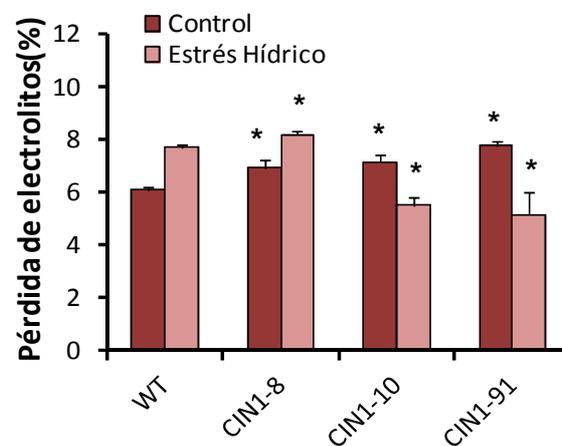


Figura 2.18.- Pérdida de electrolitos expresada en valores relativos (%) en hojas de plantas de tomate WT y 3 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm error estándar. * indica diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey, $P < 0,05$.

Con objeto de estudiar una posible disfunción de la membrana plasmática en condiciones de estrés hídrico, se determinó la pérdida de electrolitos en hojas de plantas WT y tres líneas transgénicas. El estrés hídrico provocó un incremento en la pérdida de electrolitos respecto de las condiciones control en la WT y en la línea *CIN1-8*, mientras que disminuyó en las otras líneas transgénicas estudiadas (Fig. 2.18).

6.- ANÁLISIS PROTEÓMICO EN PLANTAS *CIN1*

Se realizó un análisis proteómico a partir de extracto crudo de hojas maduras de la WT y una línea transgénica seleccionada, *CIN1-91*, en condiciones óptimas de riego y en condiciones de estrés hídrico. Tras la electroforesis bidimensional y análisis de los geles, los “spots” cuya intensidad aumentaba o disminuía de manera significativa, basándonos en un análisis de ANOVA ($P < 0,05$), fueron extraídos de los geles e identificados mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS. En total se seleccionaron 22 “spots”, pero sólo se obtuvo información para 5 de ellos (Fig. 2.19).

Los polipéptidos identificados están relacionados con la proteólisis y con la defensa de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos (Tabla 2.3). En este sentido, el análisis de los resultados muestra que la aplicación de estrés hídrico inducía la expresión de una peroxidasa (spot 618), que parece tener un importante papel en la defensa contra hongos patógenos y otros estreses, especialmente en la línea transgénica seleccionada (Fig. 2.19).

También se observó una inducción de quitinasa (spot 845) en condiciones de sequía, principalmente en *CIN1-91*, donde el nivel de inducción fue casi del doble respecto de las condiciones control (Tabla 2.3). Esta proteína está implicada una amplia variedad de condiciones de estreses, tanto bióticos como

abióticos, y está regulada por fitohormonas tales como etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico.

Dos serín-proteasas de la familia multigénica de enzimas proteolíticos del tipo subtilisina fueron inducidas en la línea transgénica *CIN1-91* especialmente en condiciones de estrés hídrico (spots 393 y 414) (Tabla 2.3). Estas enzimas juegan un papel importante en una amplia variedad de procesos fisiológicos, respuestas de defensa y estrés, y adaptación a los cambios medioambientales.

Finalmente, también pudimos identificar una glucano-endo-1,3- β -glucosidasa (punto 1183) que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,3- β -glucosil de 1,3- β -glucano (Fig. 2.19). Al contrario que con las proteínas identificadas y descritas anteriormente, en este caso observó un descenso en la expresión de esta enzima, que parece estar implicada en procesos de desarrollo y defensa de las plantas.

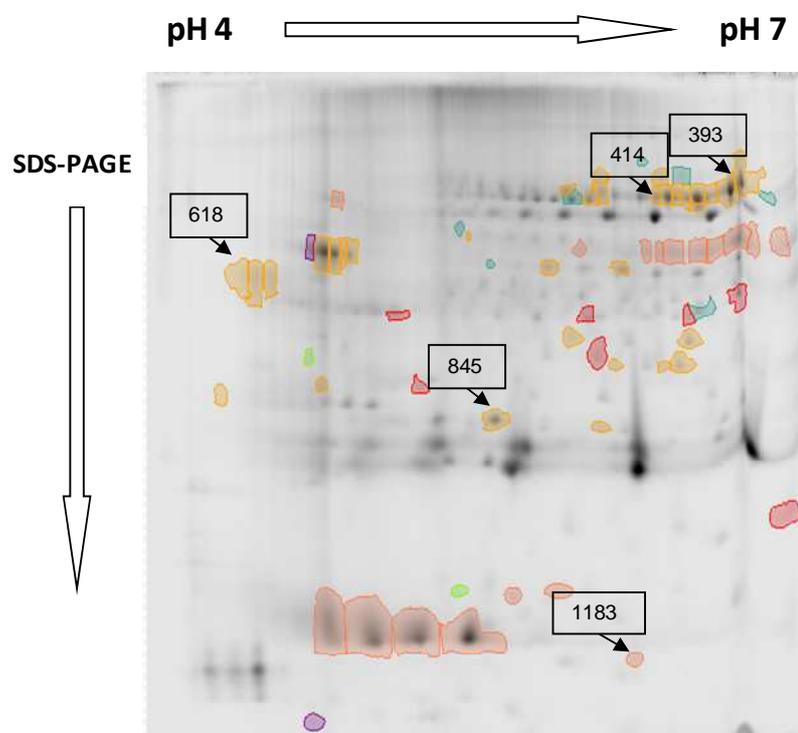


Figura 2.19.- Electroforesis bidimensional de extractos crudos de hoja madura de plantas de tomate de la línea *CIN1-91* cultivada en condiciones de estrés hídrico. Los números indican los spots analizados.

Tabla 2.3.- Inducción diferencial de proteínas en hojas maduras de tomate de la WT y la línea *CIN1-91* en condiciones control o sometidas a 9 días de estrés hídrico.

SPOT	ACC. N°	NOMBRE PROTEÍNA	Volúmenes Normalizados Spot			
			Control		Estrés Hídrico	
			WT	<i>CIN1-91</i>	WT	<i>CIN1-91</i>
618	6723685	Peroxidasa	0.536	1.33	1.239	1.521
845	31088232	Quitinasa	0.523	1.052	0.818	1.908
393	2230959	Proteasa tipo subtilisina	0.413	1.257	0.766	1.86
414	219760217	Proteasa tipo subtilisina	0.309	0.839	0.699	1.189
1183	461978	Glucano-endo-1,3- β -glucosidasa	1.995	1.05	1.169	0.638

7.- EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN *CIN1* SOBRE EL PERFIL METABOLÓMICO

Para profundizar en el mecanismo de tolerancia al estrés hídrico de las plantas *CIN1* se realizó un análisis metabolómico en hojas maduras de la WT y dos líneas transgénicas seleccionadas, *CIN1-91* y *CIN1-93*, en condiciones óptimas de riego y en condiciones de estrés hídrico. El análisis se realizó utilizando estándares internos y se identificaron aproximadamente 100 metabolitos. Se seleccionaron 50 metabolitos que presentaban diferencias significativas entre condiciones de riego óptimas y estrés hídrico, independientemente del genotipo.

La tabla 2.4 muestra aquellos metabolitos que presentaban diferencias significativas entre genotipos y tratamientos, pudiéndose englobar en 4 grupos funcionales:

- Carbohidratos y derivados
- Ácidos orgánicos y derivados
- Shikimato y ácidos fenólicos
- Aminoácidos

Tabla 2.4.- Relación entre la concentración de metabolitos en condiciones de estrés hídrico (EH) y control (C) en hojas maduras de plantas de tomate WT y 2 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1*. Los datos están presentados como medias, * $P < 0.05$, test de varianza ANOVA, $n=3$.

METABOLITOS		RELACIÓN (EH/C)		
		WT	<i>CIN1-91</i>	<i>CIN1-93</i>
Carbohidratos y derivados	Fructosa	14.21	7.05	8.13
	Glucosa	57.34	18.10*	19.01*
	Sacarosa	2.36	1.72	2.01
	Galactosa	1.78	1.30*	1.00*
	Sorbosa	1.04	2.53*	1.39*
	Altrosa	2.59	2.18*	1.67*
	Fructosa-6-fosfato	0.49	1.83*	1.38*
	Glucosa-6-fosfato	0.48	1.76*	1.30*
	Ribitol	2.33	2.08*	1.56*
Ácidos orgánicos y derivados	Ácido Cítrico	0.31	0.77*	0.83*
	Ácido Isoascórbico	13.46	18.21*	4.80*
	Ácido Treónico	1.28	2.18*	1.69*
	Ácido Galacturónico	1.53	4.81*	3.45*
Shikimato y ácidos fenólicos	Ácido Shikímico	0.37	1.44*	1.59*
	Ácido 3- <i>trans</i> - cafeoilquínico	1.61	3.21*	3.65*
	Ácido 5- <i>trans</i> - cafeoilquínico	0.90	1.65*	3.16*
	Ácido Quínico	1.02	3.75*	3.78*
Aminoácidos	Aspargina	0.67	1.75*	0.96*
	Ácido Aspártico	0.65	1.63*	1.04*
	Triptófano	2.66	1.46*	0.82*
	Leucina	2.05	0.77*	0.86*
	Tirosina	2.38	1.47*	1.16*

Las plantas *CIN1* presentaron una acumulación específica de los azúcares fosforilados glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, que son carbohidratos intermediarios del metabolismo primario. Además, también se observó un incremento significativo en los niveles de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos (Tabla 2.4). Los aminoácidos mostraron respuestas diferentes, destacando los niveles de aspargina que eran significativamente superiores en las plantas *CIN1* que en la WT.

Con el fin de determinar el grado de autocorrelación entre los distintos metabolitos analizados, se realizó un análisis de componentes principales o *PCA* (del inglés, Principal Component Analysis) considerando solamente los metabolitos que presentaban diferencias significativas entre líneas y tratamiento de acuerdo con la prueba *t* de Student ($P < 0,05$). A pesar de que, en condiciones control, las dos líneas *CIN1* analizadas estaban asociadas dentro del mismo cluster que la *WT*, al final del periodo de estrés hídrico se separaban de la *WT* en un cluster claramente diferenciado. El hecho de que las plantas *CIN1* sometidas a estrés hídrico se encontraran entre el cluster en condiciones control y el cluster de la *WT* en condiciones estresantes (Componente Principal 1, *PC1*) indicaba que dichas plantas se vieron menos afectadas por la sequía.

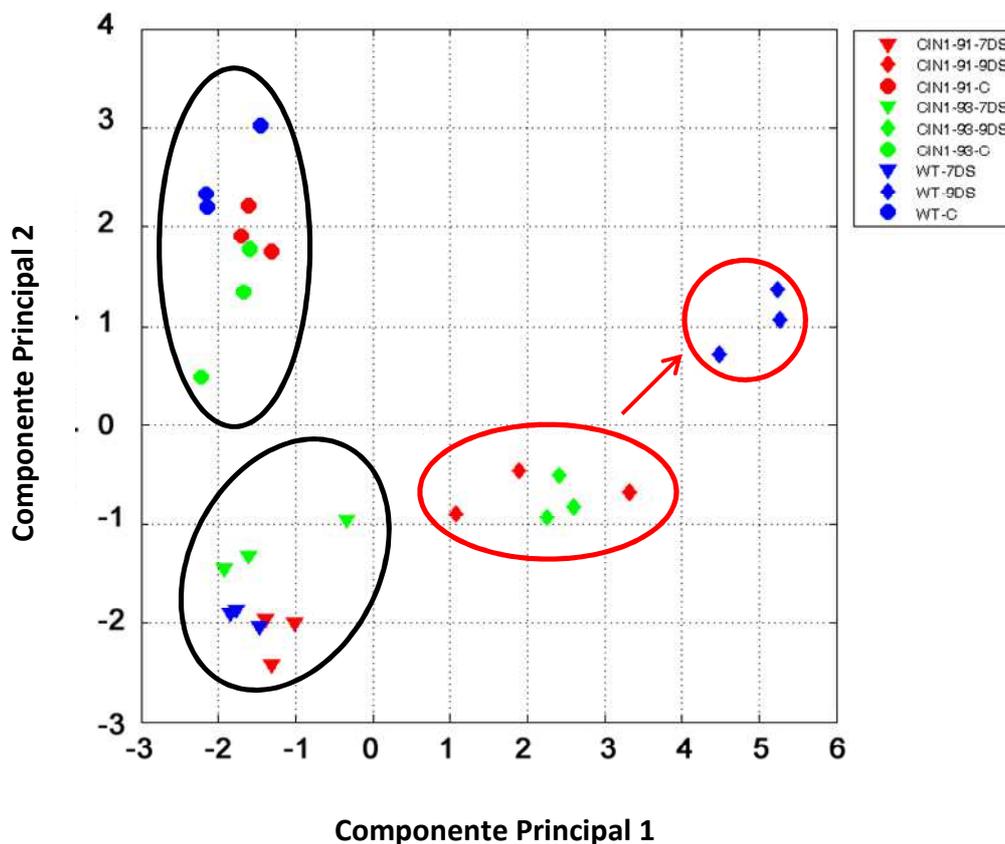


Figura 2.20.- Análisis de componentes principales (*PCA*) a partir del perfil metabolómico en hojas maduras de plantas de tomate *WT* y 2 líneas que sobreexpresan el gen *CIN1* cultivadas en condiciones control (marcadores redondos) o sometidas a 7 (marcadores triangulares) o 9 (marcadores rómbicos) días de estrés hídrico

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Este capítulo tiene como objetivo la caracterización fisiológica y bioquímica de la respuesta al estrés hídrico de plantas de tomate que sobreexpresan la invertasa extracelular *CIN1*.

1.- La sobreexpresión del gen CIN1 reduce el uso de agua, mantiene la fotosíntesis e incrementa el WUE en condiciones de estrés hídrico

La sobreexpresión del gen *CIN1* incrementó significativamente la actividad *cwInv* en hojas de plantas de tomate sometidas a estrés hídrico durante la fase de crecimiento vegetativo (Fig. 2.11C). Aunque no se observaron diferencias significativas en biomasa, las plantas transgénicas fueron capaces de mantener las relaciones hídricas y la fotosíntesis durante el periodo de sequía, aumentando significativamente el uso eficiente del agua (*WUE*), presuntamente a través de una mejor regulación estomática (Fig. 2.8).

Los estomas juegan un papel primordial en el control de la pérdida de agua y en el intercambio gaseoso en las hojas, siendo cruciales para la adaptación de las plantas a las variaciones en las condiciones medioambientales (Li et al., 2013). Un adecuado control estomático podría incrementar el uso eficiente del agua, manteniendo el crecimiento y la productividad en condiciones de estrés hídrico (Osakabe et al., 2013). En este sentido, las plantas *CIN1* fueron más eficientes en el control y mantenimiento de la conductancia estomática durante el periodo de estrés hídrico, ya que mostraron una menor transpiración acumulada y un incremento del *WUE* (Fig. 2.8). Anteriores estudios con plantas de tomate muestran una importante aclimatación al estrés hídrico mediante un incremento en el *WUE* a través de modificaciones en la

conducción estomática (Galmés et al., 2013). De acuerdo con esto, se ha demostrado que la degradación de la sacarosa juega un papel importante en la función de las células guarda estomáticas con impacto en el *WUE* (Antunes et al., 2012). Se han hecho estudios con plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan un receptor de ABA, así como aplicaciones exógenas de esta hormona y con ello disminuye la conductancia estomática y aumenta el *WUE*, incrementando con ello la tolerancia al estrés hídrico (Astacio & van Iersel, 2011; Zhao et al., 2013).

1.1.- Las plantas CIN1 son capaces de ajustar mejor las relaciones fuente-sumidero en condiciones de estrés, manteniendo la tasa fotosintética y reduciendo la senescencia foliar

Muchos estudios han demostrado que el aumento de la resistencia estomática durante el periodo de déficit hídrico es el principal factor limitante de la fotosíntesis (Chernyad'ev, 1997), y que el transporte de asimilados a través del floema es fundamental para el intercambio gaseoso (Nikinmaa et al., 2013). Se ha descrito que la acumulación de asimilados en tejidos fuente en condiciones de estrés hídrico y salino, también limitan directamente la fotosíntesis (conocido como efecto de "retro-inhibición") (Balibrea et al., 2000; Stitt, 1991). Este efecto de retro-inhibición también se ha observado en ensayos llevados a cabo en ausencia de estrés, en plantas crecidas en medios de cultivo líquidos con cantidades elevadas de asimilados (Hill et al., 2011). Esta inhibición de la fotosíntesis como consecuencia de la acumulación de carbohidratos podría tener dos causas, o bien los daños mecánicos ocasionados por los gránulos de almidón o la limitación de fósforo debido a la inhibición de la síntesis de sacarosa (Stitt, 1991). Además, la alteración de la homeostasis debida al estrés da lugar a una serie de señales de reducción-oxidación (redox) que causan

rápidos cambios en la transcripción de genes que codifican los fotosistemas I y II. Los productos finales de síntesis pueden ejercer un control a corto plazo en el metabolismo a través del reciclaje de fósforo inorgánico. Más allá de esto, la acumulación de carbohidratos en las hojas cuando hay un desequilibrio entre la fuente y el sumidero a nivel de toda la planta, puede llevar a una disminución de la expresión de genes fotosintéticos y a una senescencia acelerada de la hoja. (Paul & Foyer, 2001). Recientemente, se ha demostrado que el mecanismo de tolerancia a la sequía en tomate se refleja en los parámetros de emisión de fluorescencia de clorofilas (Mishra et al., 2012). En relación a esto, las plantas *CIN1* presentaron una mayor tasa fotosintética (Fig. 2.7A) y mayor fluorescencia de clorofilas (Fig. 2.5) que las plantas silvestres en condiciones de estrés hídrico, debido, probablemente, a una mejor coordinación del transporte de asimilados entre tejidos fuente y sumidero, donde las invertasas juegan un papel fundamental, manteniendo el crecimiento y retrasando la senescencia foliar. Asimismo, el análisis de la ultra-estructura celular en las hojas de las plantas *CIN1* puso de manifiesto la presencia de gránulos de almidón más grandes y bien diferenciados que en las plantas silvestres (Fig. 2.10), lo que sugiere que una adecuada regulación del ciclo de síntesis y degradación del almidón podría ser una manera de modular las respuestas al estrés en las plantas transgénicas (Sulpice et al., 2009), maximizando la eficiencia en el uso del carbono y evitando problemas de retro-inhibición fotosintética al insolubilizar el exceso de azúcares ante una posible disminución del transporte hacia los sumideros.

2.- La sobreexpresión del gen CIN1 altera los flujos metabólicos en la hoja

Como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente, incrementar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico requiere una utilización óptima de los hidratos de carbono disponibles y un mantenimiento de los flujos metabólicos

para el crecimiento y desarrollo. La sobreexpresión del gen *CIN1* dio lugar a un fuerte aumento de la actividad *cwInv* tanto en condiciones de riego normal como en condiciones de estrés hídrico en todas las plantas transgénicas con respecto a las plantas control no transformadas (Fig. 2.11C). Sin embargo, las actividades *cytInv* y *vacInv* así como *SS* no variaron significativamente (Fig. 2.11A, B y D), por lo que no parece que exista un efecto compensatorio sobre otras actividades sacarolíticas. Curiosamente, a pesar de la mayor actividad *cwInv*, los contenidos de glucosa y fructosa en hojas de plantas *CIN1* fueron menores que en plantas silvestres (Fig. 2.9), como ya se había observado anteriormente en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban el gen *CIN1* bajo el control de un promotor inducible por senescencia (Lara et al., 2004). Este hecho apoya el incremento de síntesis de almidón y su posible papel regulador en el control del exceso de asimilados y retraso de photoinhibición.

2.1.- En condiciones de estrés hídrico se produce una de-represión de la actividad invertasa extracelular en plantas CIN1

Debido al papel clave de las invertasas, sus actividades deben ser estrictamente reguladas para asegurar un adecuado desarrollo así como una respuesta apropiada a señales internas y externas (Ruan et al., 2010). La regulación post-transcripcional por los inhibidores de las invertasas (*InvInh*) es particularmente relevante en el caso de la *cwInv* ya que esta proteína es intrínsecamente estable, debido a que es una proteína glicosilada. Sin embargo, sólo recientemente se ha demostrado la funcionalidad *in vivo* y la importancia fisiológica de estos inhibidores proteínicos en el crecimiento, desarrollo y las respuestas al estrés (Bonfig et al., 2010; Jin et al., 2009; Khodakovskaya et al., 2010). Los resultados del análisis de la actividad inhibitoria parecen indicar que estas pequeñas proteínas son importantes reguladores de la actividad *cwInv* en

plantas transformadas con el gen *CIN1*. En ausencia de estrés, la sobreexpresión del gen *CIN1* en hojas de tomate dio lugar a un fuerte incremento en la actividad del *InvInh* (Fig. 2.12), que contrarresta la elevada actividad en extracto de la *cwInv* (Fig. 2.11C). Por el contrario, en condiciones de estrés hídrico se produce una de-represión de la actividad *cwInv* en las plantas *CIN1*. Esta de-represión post-transcripcional también ha sido descrita en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pseudomonas syringae* (Bonfig et al., 2010), asociándose una inducción local de la fuerza sumidero con la respuesta al estrés. Además, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que codifican un gen de un *InvInh* (*At3g17225*), aplicaciones exógenas de ABA tuvieron un impacto en la estabilidad de los transcriptos del *InvInh*, lo cual sugiere que las hormonas vegetales también pueden jugar un papel importante en la regulación de los *InvInhs*, y, por tanto, en la actividad invertasa final (Koh et al., 2008). Por tanto, parece que existe una relación estrecha entre la invertasa extracelular y su inhibidor que depende de las condiciones de cultivo: un exceso de enzima en condiciones control induce su inactivación, mientras que en condiciones de estrés cuando la expresión está reprimida, disminuyen los niveles del inhibidor proteico. Conocer la naturaleza de dicha regulación resultaría de gran interés.

El mantenimiento de los flujos metabólicos en plantas *CIN1* en condiciones de estrés hídrico se asoció a un incremento en los niveles de azúcares intermediarios fosforilados (fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato) (Fig. 2.9) y a la inducción de enzimas clave del metabolismo del carbono, favoreciendo con ello un adecuado flujo de energía para procesos de crecimiento y desarrollo en condiciones limitantes (Fig. 2.14). Como ya se sabe, el estrés hídrico reduce la tasa fotosintética e induce la acumulación de carbohidratos solubles en agua. Estos cambios se acompañan por la alteración en los niveles de expresión de genes sensibles a la sequía, como *HXK* y *FK* (Xue et al., 2008). Por el contrario, en plantas transformadas con el gen *CIN1*, la

aplicación del estrés hídrico dio lugar a un aumento en la actividad de dichas enzimas en comparación con las plantas silvestres (Fig. 2.14A,B). En plantas de maíz también se ha conseguido demostrar que existe una relación entre la actividad enzimática de *HXK* con una mayor tolerancia al estrés hídrico (Zhou et al., 2013). La enzima *FK* se ha identificado como una proteína inducida por el estrés hídrico en plantas de girasol (Fulda et al., 2011) y en plantas de *Arabidopsis* (Bianchi et al., 2002), mostrando un papel protector a través de la biosíntesis de osmolitos y/o de la eliminación de ROS en dichas condiciones (Fulda et al., 2011).

Conjuntamente las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa (*UGPasa*), fosfoglucomutasa (*PGM*), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (*G6PDH*) y aldolasa mostraron un comportamiento similar (Fig. 2.14C-F), de forma que, en condiciones de estrés hídrico, las plantas *CIN1* fueron capaces de mantener los niveles de actividad de dichas enzimas respecto de las condiciones no estresantes. La enzima *UGPasa* juega un papel clave en el crecimiento y desarrollo vegetal y la biosíntesis de la pared celular secundaria (Wang et al., 2011). Ciereszko et al, (2001) observaron que el estrés abiótico afectaba a la expresión de los genes de *UGPasa* en *Arabidopsis* (Ciereszko et al., 2001), dando lugar a una rápida acumulación de azúcares (Sowokinos et al., 1997). En este sentido, la disminución de la actividad *UGPasa* en las plantas silvestres como consecuencia del estrés hídrico (Fig. 2.14C) podría estar relacionada con procesos de retro-inhibición como consecuencia de la baja utilización de los carbohidratos, mientras que las plantas *CIN1*, con un mayor flujo metabólico, fueron capaces de mantener la actividad de dicha enzima.

Tradicionalmente se asume que dentro de las células heterótropas, la glucosa-6-fosfato es transportada desde el citosol al cloroplasto (Tauberger et al., 2000). Este transporte requiere una conversión intraplastidial de glucosa-6-

fosfato a glucosa-1-fosfato mediada por la *PGM*. El estrés abiótico ocasiona una reducción de la expresión de genes de *PGM* (Wen et al., 2010). En este sentido, en las plantas transformadas con el gen *CIN1* se mantuvo la actividad *PGM* durante el período de estrés hídrico, conservándose, de esta forma, el flujo de energía de la planta (Fig. 2.14D). En estudios con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en *PGM* se ha observado una acumulación transitoria masiva de almidón y un crecimiento más lento que las plantas silvestres, subrayando la importancia del flujo del carbono fotosintético (Caspar, 1985; Malinova et al., 2011; Vriet et al., 2010). Por el contrario otros trabajos han demostrado que la deficiencia en esta enzima causaba fallos en la síntesis de almidón en hojas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana sylvestris*. Por otro lado, la mayor actividad *G6PDH* observada en plantas *CIN1* en condiciones de estrés hídrico en comparación con plantas no transformadas (Fig. 2.14E) podría deberse a una mayor disponibilidad de NADPH, como se ha sugerido en plantas de tabaco, donde la sobreexpresión de dicha enzima daba lugar a una mayor tolerancia a diferentes tipos de estreses, entre ellos a la sequía (Scharte et al., 2009).

La aldolasa es una enzima que participa en la glucólisis y, por tanto, su función es proporcionar energía. Al igual que en las otras actividades enzimáticas, la expresión de aldolasa se reduce en condiciones de sequía (Gong et al., 2010), observándose este efecto también en plantas de *Arabidopsis* (Kilian et al., 2007). Por ello, el hecho de que las plantas *CIN1* mantengan la actividad aldolasa en condiciones de estrés hídrico (Fig. 2.14F) se asocia a procesos de tolerancia ya que permite a la planta seguir obteniendo energía.

Tiene especial relevancia la actividad *PFK*, enzima reguladora clave de la glicólisis de la planta. En ausencia de estrés la actividad *PFK* fue mayor en las plantas silvestres que en las plantas transgénicas (Fig. 2.14G), mientras que la aplicación de estrés hídrico supuso una reducción importante de la actividad de

esta enzima en todas las plantas evaluadas, siendo significativamente menor en plantas transformadas con el gen *CIN1*. A pesar de la poca información que muestra la bibliografía en relación con el estrés hídrico, sí se ha visto una relación de la actividad *PFK* con procesos de tolerancia a hipoxia en plantas de *Arabidopsis* (Hwang et al., 2011).

2.2.- Las plantas *CIN1* acumulan solutos compatibles que contribuyen al ajuste osmótico en condiciones de estrés hídrico

Las plantas sometidas a estrés hídrico acumulan solutos compatibles que contribuyen al ajuste osmótico, como ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, azúcares, azúcares-alcohol y aminoácidos libres (Akıncı & Lösel, 2012). El perfil metabolómico (Tabla 2.4) reveló que las plantas *CIN1* acumularon ácidos orgánicos durante el periodo de estrés, principalmente ácido cítrico, treónico y galacturónico. Recientemente también se han descrito incrementos en ácidos orgánicos en condiciones de estrés hídrico en plantas de tabaco transformadas con el gen *IPT*, que codifica la enzima clave en la biosíntesis de CKs isopentenil-transferasa, y que mostraron una mayor tolerancia asociada a un incremento en los niveles de CKs (Merewitz et al., 2012). Además, las plantas *CIN1* también presentaron incrementos significativos en ácido shikímico y compuestos fenólicos al final del período de sequía, que podrían estar asociados a una mayor tolerancia. De hecho, en plantas de tomate cherry muy sensibles al estrés hídrico se ha descrito una inhibición de la ruta metabólica del shikimato así como una reducción de ácido cafeoilquínico y otros compuestos fenólicos derivados (Thauer, 1988).

Aunque el estrés hídrico se ha asociado a una pérdida neta de proteínas en hoja, acumulándose aminoácidos libres (Bauer et al., 1997), en el caso de las

plantas *CIN1*, el incremento en los niveles de aminoácidos debe ser considerado como una respuesta activa frente al estrés, y no como una consecuencia de la des-regulación metabólica.

3.- La sobreexpresión del gen CIN1 da lugar a la activación de mecanismos enzimáticos antioxidativos en condiciones de estrés hídrico

Uno de los cambios metabólicos inducidos en situaciones de estrés hídrico, pero también como consecuencia de otros tipos de estrés tanto biótico como abiótico, es la imposición de un estrés oxidativo (Faize et al., 2011; Hernandez et al., 1993; Hernández et al., 2004; Karpinski et al., 1999; Moran et al., 1994). La generación de ROS en cloroplastos de plantas sometidas a un déficit hídrico está relacionado con el cierre de estomas, disminuyendo por lo tanto la concentración de CO₂ e inhibiendo la cadena de transporte de electrones y, por tanto, no regenerando aceptores electrónicos finales (NADP⁺ y ADP), lo que favorece la cesión de electrones al O₂, produciendo O₂^{•-} y H₂O₂. Estas especies son algunas de las moléculas más dañinas en las plantas, capaces de inducir grandes perjuicios a nivel celular, dando lugar a daño en la membrana, oxidación de proteínas, y alteración del ADN (Halliwell, 2000). Para hacer frente a la toxicidad de ROS, las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes eficientes. Entre ellos nos encontramos defensas enzimáticas que incluyen la superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidasa total (POX) (Asada, 1999; Faize et al., 2011; Noctor & Foyer, 1998). Los cloroplastos son especialmente sensibles al daño por ROS, porque los electrones que escapan de la cadena de transporte de electrones fotosintético son capaces de reaccionar con concentraciones relativamente altas de O₂ en este orgánulo (Foyer, 1994), lo cual disminuye la tasa de fotosíntesis, afectando al crecimiento de la planta.

En las plantas silvestres, el estrés hídrico provocó una reducción en la actividad *SOD* del 42% en el apoplasto y del 20% en simplasto, mientras que en las líneas transformadas con el gen *CIN1* se observó una tendencia generalizada al mantenimiento de la actividad enzimática en ambos compartimentos, especialmente en *SOD* apoplástica (Tabla 2.2), lo cual se relaciona con la acumulación de *SOD* en condiciones de estrés salino en este compartimento (Hernández et al., 2001). De forma similar, la sobreexpresión de *SOD* citosólica de espinaca en plantas de tabaco (Faize et al., 2011) y *SOD* de tomate en plantas de pimiento (Chatzidimitriadou et al., 2009) se han relacionado con un menor daño oxidativo en condiciones de estrés hídrico, incrementando la tasa fotosintética y el *WUE*.

Por otro lado, tanto los análisis enzimáticos como el estudio proteómico revelaron que la aplicación de estrés hídrico inducía la expresión de *POX*, especialmente en las líneas transgénicas seleccionadas, lo cual parece estar relacionado con su mayor capacidad para eliminar el exceso de *ROS* (Ahsan et al., 2007). De hecho, *POX* desempeña un doble papel dentro de las plantas en condiciones de estrés hídrico, regulando la homeostasis del H_2O_2 y la transducción de la señal del H_2O_2 en las células que median el control estomático en respuesta al estrés por sequía (Meinhard et al., 2002). En plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *POX* se ha demostrado una mayor resistencia al estrés hídrico que las plantas silvestres no transformadas, asociada a un mayor control de la transpiración foliar (Miao et al., 2006).

3.1.- Frente al estrés hídrico, las plantas CIN1 mantienen un elevado estado reducido del glutatión así como los niveles de α -tocoferol, que son mecanismos no enzimáticos de protección antioxidativa

En la defensa de las plantas frente al estrés oxidativo también participan mecanismos no enzimáticos como el glutatión y el α -tocoferol (Hernández et al., 2000). Los niveles de glutatión reducido (*GSH*) en condiciones de estrés hídrico fueron mayores en las plantas *CIN1* que en las plantas silvestres (Fig. 2.16). Al igual que en nuestro ensayo, un estudio reciente ha descrito que plantas de tomate pre-tratadas con arginina eran más tolerantes al estrés hídrico, observándose de forma paralela un aumento del *GSH* (Nasibi et al., 2011). Por tanto, es posible que en las plantas silvestres no se produzca una regeneración adecuada de la *GSH* porque la actividad glutatión reductasa (*GR*) disminuye o porque disminuye la biosíntesis de *GSH*, y esto se traduce en un incremento del glutatión oxidado.

Las rutas de biosíntesis de compuestos isoprenoides también responden al déficit hídrico (Abbasi, 2007). El α -tocoferol es un importante agente antioxidante que posee la propiedad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y otras estructuras celulares de la peroxidación lipídica (Abbasi, 2007). La aplicación de estrés hídrico condujo a un aumento en la concentración de α -tocoferol en hojas de tomate, especialmente en la línea *CIN1-91*, poniendo de manifiesto una mayor protección frente a daños oxidativos (Fig. 2.17). Se sabe que el aumento de los niveles de α -tocoferol es una respuesta común en plantas resistentes a la sequía (Lushchak & Semchuk, 2012). En un estudio comparativo entre *Solanum lycopersicum* y otra especie de tomate silvestre resistente al estrés hídrico, *Solanum chilense* se ha visto que el estrés hídrico conducía a un importante incremento de α -tocoferol en la especie silvestre (Loyola et al., 2012).

Por otro lado, la pérdida de electrolitos es un buen indicador de lesiones en las membranas. Este efecto de daño en membranas se ha observado en diferentes especies sometidas a estrés por sequía como en *Populus* (Xiao, 2009) y en plantas de tabaco (Faize et al., 2011). Otros estreses abióticos, como el salino y el estrés por altas temperaturas, también ocasionan cambios en la pérdida de electrolitos en hojas de tomate, aumentando de forma proporcional e a las concentraciones de NaCl (Manaa et al., 2011) y a la temperatura (Kang et al., 2009; Yang et al., 2009). Nuestro estudio mostró que, si bien el estrés hídrico provocó un aumento general en la pérdida de electrolitos, dicho aumento fue significativamente menor en plantas transformadas con el gen *CIN1* (Fig. 2.18), lo cual indica una mayor capacidad para mantener la integridad de las membranas celulares en condiciones de estrés hídrico.

Una posible relación entre el metabolismo antioxidativo y el metabolismo de los hidratos de carbono podría ser la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es esencial para el mantenimiento del equilibrio redox celular y tiene un papel importante en las respuestas de las plantas al estrés hídrico y salino (Dal Santo et al., 2012). Debido probablemente al mecanismo de regulación post-traduccional, implicado en la activación de esta enzima, las actividades medidas no reflejan la situación in vivo.

4.- El estrés hídrico provocó una inducción de proteínas asociadas con procesos de tolerancia en plantas CIN1

El análisis proteómico puede ayudar en el esclarecimiento de importantes procesos en las plantas en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (Hakeem et al., 2012). Una de las estrategias utilizadas para aumentar la tolerancia al estrés abiótico de las plantas es sobreexpresar genes que son inducidos después

de dicho estrés, tales como quitinasas y glucanasas (Alexander et al., 1993; JK & BK., 2006). El estudio proteómico reveló una fuerte inducción de quitinasa en plantas que sobreexpresan el gen *CIN1* (Tabla 2.3). La inducción de la expresión de quitinasa se ha visto previamente en las especies *Lycopersicum chilense* and *L. esculentum* sometidas a estrés hídrico (Yu et al., 1998). Además, se ha encontrado una correlación entre la expresión del gen de la quitinasa y el potencial hídrico foliar durante el estrés por sequía (Yu et al., 1998). Diversos estudios han demostrado que las serín proteasas de la familia de enzimas proteolíticas del tipo subtilisina de *Arabidopsis thaliana* incrementan después de un tratamiento con jasmonato y cadmio, sugiriendo que estas proteasas son responsables de la tolerancia al estrés (Golldack et al., 2003). En relación a esto, en plantas *CIN1* se observó una inducción de las serín proteasas tipo subtilisina en presencia de estrés hídrico. Estas proteínas también están relacionadas con la tolerancia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* (Liu et al., 2007).

Por lo tanto, en nuestro caso confirma una alta expresión de una isoforma *POX* en plantas *CIN1* y otras proteínas relacionadas con la respuesta de defensa de las plantas: quitinasa y proteasas tipo subtilisina. Esto podría estar relacionado con el rendimiento de las diferentes líneas *CIN1* y la pérdida de electrolitos (estabilidad de la membrana) durante el periodo de sequía. En este sentido, el daño de la membrana celular en condiciones de sequía fue más severa en plantas silvestres y en el fenotipo *CIN1-8* que en las otras líneas *CIN1* analizadas.

5.- La expresión del gen CIN1 modifica el perfil hormonal de la hoja

Las respuestas al medio ambiente y la regulación de los patrones de crecimiento implican extensas interacciones entre el metabolismo de los carbohidratos, la utilización de las reservas, y el balance hormonal de las plantas (Gibson, 2004; Wingler & Roitsch, 2008). Estreses abióticos como la sequía provocan cambios metabólicos que van, desde la síntesis de cantidades limitadas de metabolitos especializados, a grandes cambios en la composición de metabolitos primarios, así como muchas otras respuestas fisiológicas (Verslues & Juenger, 2011). Dado que el déficit hídrico da lugar a un agotamiento de productos fotosintéticos, la interacción entre las hormonas vegetales y el metabolismo de los carbohidratos puede ser considerada como un factor clave en la respuesta de las plantas a los estreses abióticos. De hecho, las invertasas parecen estar estrechamente reguladas por fitohormonas como parte de un mecanismo integrado y coordinado para controlar el crecimiento y el desarrollo en condiciones de estrés (Roitsch, 1999). En consecuencia, cambios en la concentración de fitohormonas pueden ser responsable de la reducción de las actividades sacarolíticas en condiciones de estrés o *viceversa*, conocido como un efecto de retro-inhibición, y, especialmente, parece existir un antagonismo entre las CKs y el etileno (Albacete et al., 2008; Roitsch et al., 2003).

5.1.- La t-Z parece ser una señal positiva en el retraso de la senescencia foliar en plantas CIN1 sometidas a estrés hídrico

Varios mecanismos fisiológicos parecen estar implicados en la regulación de la distribución de asimilados en condiciones de estrés abiótico (Cramer et al., 2011), mientras que la disminución en la concentración de CKs en raíz, asociada a cambios en la actividad cwInv han sido implicados previamente

(Albacete et al., 2008). Por lo general, los estreses abióticos disminuyen las concentraciones de ciertas CKs que estimulan el crecimiento expansivo y previenen el envejecimiento prematuro de las hojas (Pérez-Alfocea et al., 2011). Se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *CIN1* bajo el control del promotor asociado a la senescencia *SAG12*, incrementaba la fuerza de los tejidos fuente y retrasaba la senescencia natural en hojas de tabaco, e identificó la *cwInv* como un componente esencial del retraso de la senescencia mediado por CKs (Lara et al., 2004). En este sentido, el retraso de la senescencia foliar observada en plantas transformadas con el gen *CIN1* en condiciones de sequía, podría ser explicado por los elevados niveles de *t-Z* en hojas, la CK más activa en plantas de tomate (Fig. 2.15). De hecho, la tolerancia a la sequía observada en plantas de tabaco que sobreexpresaban el gen *IPT*, que codifica una enzima clave en la ruta de biosíntesis de CKs, isopentenil transferasa, se asoció con el retraso de la senescencia debido a mayores niveles de CKs (Rivero et al., 2007). Además, plantas de arroz que sobreexpresan el gen *IPT* bajo el promotor *SARK*, un promotor inducido por el estrés y por la maduración, mostraron mayor tolerancia al estrés hídrico y mayor rendimiento debido a modificaciones fuente-sumidero mediadas por CKs (Peleg et al., 2011).

5.2.- El precursor del etileno ACC parece ser una señal negativa para el crecimiento y la tolerancia al estrés hídrico

El etileno ha sido considerado durante mucho tiempo una hormona relacionada con el estrés que interviene en la senescencia foliar en condiciones de déficit hídrico (Munné-Bosch & Alegre, 2004), probablemente por inhibición de la actividad *cwInv* (Ghanem et al., 2008). Se ha observado una activación de la biosíntesis de etileno en plantas de tomate sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico como la sequía (Aroca et al., 2012; Liang, 2003; Sozzi et al.,

2000). Las plantas *CIN1* presentaron una disminución general del precursor de etileno ACC en comparación con las plantas silvestres al final del periodo de estrés hídrico (Fig. 2.15). Dado que *cwInv* parece activar el metabolismo del carbono (Lara et al., 2004), lo cual reprime la biosíntesis de etileno (Mayak & Adam, 1984), la senescencia foliar podía ser retrasada además por la reducción en los niveles de etileno.

Tanto el IAA como el ABA son otras dos importantes hormonas que parecen tener un papel en la regulación de la actividad *cwInv* en condiciones de estrés abiótico (Albacete et al., 2008; Yang et al., 2004). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que ABA e IAA no parecen ser los principales factores hormonales desencadenantes de la respuesta de las plantas *CIN1* al estrés hídrico.

Los resultados de este estudio muestran que, aunque el promotor utilizado debería proporcionar expresión predominante en el desarrollo de los frutos de tomate, ya en la fase vegetativa las plantas de tomate *CIN1* mostraban una mayor tolerancia a las condiciones de estrés abiótico. Probablemente, una débil expresión vegetativa de *CIN1* era suficiente para conferir este importante rasgo. Es importante destacar que el aumento de la tolerancia a la sequía no estaba acompañado con una reducción del estado físico de la planta en condiciones óptimas de crecimiento. El hallazgo de que el uso eficiente del agua puede ser mejorado en plantas de tomate sometidas a estrés hídrico mediante la sobreexpresión del gen *CIN1*, indica que la *cwInv* juega un papel fundamental en la tolerancia al estrés hídrico. Las plantas podrían adaptarse a las condiciones de déficit de hídrico a través de una reducción de disipación de energía, aumentando con ello la provisión de ATP y reduciendo el daño oxidativo. Los resultados presentados en este estudio son muy alentadores ya que la mejora del uso eficiente del agua en condiciones hídricas limitantes,

podría contribuir al desarrollo de nuevas variedades de tomate sin pérdidas significativas de rendimiento en áreas hortícolas de gran importancia económica, como es el Sureste español, donde la cantidad y calidad del agua de riego es, por lo general, muy baja.

CAPÍTULO III

***IDENTIFICACIÓN Y EXPLOTACIÓN
DE LA VARIABILIDAD NATURAL
EN CARACTERES HÍDRICOS Y
HORMONALES PARA MEJORAR EL
USO EFICIENTE DEL AGUA EN
TOMATE***

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La Agricultura supone más del 70% del consumo de recursos hídricos, y, en muchas partes del mundo, los niveles de utilización agrícola son incluso mayores, llegando al 80%. Esto junto con el rápido crecimiento poblacional que se está experimentando durante estos últimos años, el deterioro de muchas tierras de cultivo debido a prácticas insostenibles, y los efectos del cambio climático hacen que, ahora más que nunca, sea crucial desarrollar y mejorar la eficiencia y sostenibilidad en el uso del agua.

Debido al gran problema que supone para la Agricultura la escasez de recursos hídricos, la mejora convencional y/o biotecnológica de los cultivos mediante selección de caracteres relacionados con la tolerancia a la sequía y el uso eficiente del agua (*WUE*), es cada vez más necesaria. En nuestro país, el cultivo del tomate destaca tanto por su importancia económica como por representar un elevado consumo de recursos hídricos, de manera que cualquier mejora en el *WUE* tendría un gran impacto socioeconómico y medioambiental. Aunque el cultivo de tomate en invernadero reduce en un 70% el consumo de agua con respecto al cultivo al aire libre, las pérdidas de agua por transpiración son muy elevadas en relación a la cantidad de biomasa producida, de manera que en el mejor de los casos tan sólo se producen unos 25 g de fruto por litro de agua consumido (Reina-Sánchez et al., 2005; Soria & Cuartero, 1997). Se estima que un incremento de un 10% en el *WUE* en este cultivo podría suponer, en la Región de Murcia, un ahorro de más de 1,1 hm³ de agua de riego, cantidad equivalente a los requerimientos anuales de una población de 20.000 habitantes (WWF-ADENA, 2005). Algunos estudios se han enfocado en el incremento del *WUE* en el cultivo de tomate, a través del control del déficit hídrico ambiental

para reducir las tasas de transpiración (Romero-Aranda & Longuenesse, 1995; Romero-Aranda et al., 2002). Desde un punto de vista agronómico, la disminución de la evaporación del suelo es un factor crucial en los esfuerzos para mejorar el *WUE* en condiciones mediterráneas, de forma que un ciclo de cultivo corto parece ser un factor muy relevante (Tambussi et al., 2007). Sin embargo, aún sigue sin explotarse la elevada variabilidad genética que existe en las especies silvestres de tomate (Foolad, 2007). De ahí el interés en seguir profundizando en los mecanismos fisiológicos implicados en el *WUE*, tanto en la raíz como en la parte aérea, así como en la búsqueda de alternativas más directas e inmediatas, como puede ser el uso de los portainjertos, para mejorar el *WUE* en tomate.

La utilización de portainjertos permite explotar directamente la variabilidad genética existente en especies silvestres para mejorar variedades comerciales de alto interés. En el caso del *WUE*, la comunicación hidráulica, nutricional y hormonal de la raíz con la parte aérea permitiría alterar procesos fisiológicos con influencia directa en *WUE*, tales como área foliar, fotosíntesis, conductancia estomática y producción de fruto. En este capítulo se pretende estudiar y validar esta posibilidad mediante la identificación y explotación de variabilidad genética existente en una población de líneas recombinantes entre el tomate cultivado y una especie silvestre.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo tres experimentos dentro del ensayo de mejora del uso eficiente del agua en plantas de tomate, la primera realizada en cámara de cultivo con condiciones controladas (**Ensayo 1**), y las dos últimas realizadas en invernadero (**Ensayos 2 y 3**).

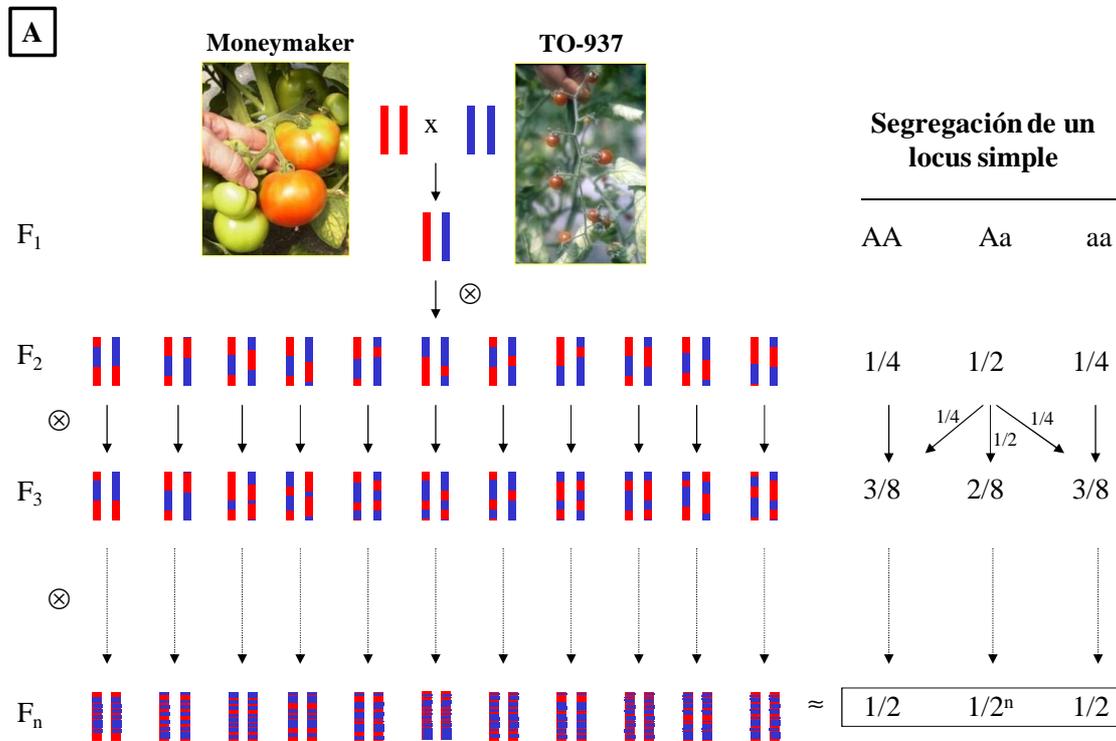
1.- ENSAYO 1: VARIACIÓN GENÉTICA DEL USO EFICIENTE DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN RECOMBINANTE DE TOMATE

1.1.- *Material vegetal*

El material genético utilizado para el Ensayo 1 fue un subconjunto de 34 líneas seleccionadas de una población F8 recombinante (RILs, del inglés Recombinant Inbred Lines) de 164 líneas en total, derivada de un cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc. TO-937) (Imagen 3.1) (Alba et al., 2009), proporcionadas por el Dr. Rafael Fernández Muñoz, del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM) perteneciente a UMA_CSIC. Las líneas seleccionadas se especifican en la Tabla 3.1. *S. pimpinellifolium* es un pariente cercano del tomate cultivado y tiene plantas esbeltas con pequeñas hojas y muy pequeños, pero comestibles, frutos.

La población de 164 líneas *RIL* se obtuvo por retrocruzamiento. Una población *RIL* permite realizar un mapeo genético de las plantas. Las poblaciones de mapeo con el mayor contenido de información son aquellas obtenidas a partir del cruzamiento entre dos individuos homocigotos contrastantes. En las plantas F1 obtenidas, el desequilibrio de ligamiento es máximo, y las poblaciones derivadas a partir de estas plantas F1 procuran

explorar este desequilibrio. Por tanto este tipo de población permite mezclar los genes (y por lo tanto, los rasgos) de los dos parentales dejando a la mayoría de ellos en homocigosis. La enorme variabilidad genética lograda puede ser útil tanto para la vinculación genética, como también para estudios fisiológicos. En nuestro caso, siempre con las plantas que presentan variadas combinaciones de rasgos relacionados con el uso del agua como la biomasa, el área foliar y, posiblemente, las bases hormonales de estas características.



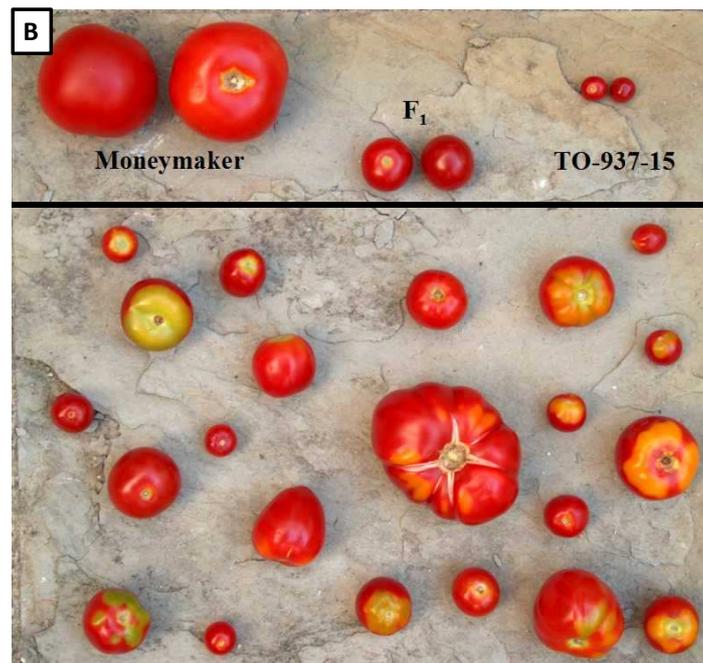


Imagen 3.1.- A. Construcción de la población RIL (164 líneas en F₈) obtenida del cruzamiento interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (cv. Money maker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc. TO-937). B. Fotografía tomada de los parentales, generación F₁ y generación F₈. Por cortesía del Dr. Rafael Fernández Muñoz perteneciente al IHSM La Mayora UMA_CSIC.

Las líneas seleccionadas fueron aquellas que presentaban los valores más altos y más bajos de parámetros relacionados con (i) el vigor de la planta como la biomasa, la altura, la superficie foliar y el calibre del tallo, y con (ii) el estado hídrico como el contenido relativo de agua en hoja y la conductancia estomática.

Tabla 3.1.- Cuadro de las líneas RIL seleccionadas.

PARENTALES F ₁	RIL F ₈			
<i>Solanum lycopersicum</i> (cv. Money maker)	2	59	91	124
	9	65	92	143
	12	66	94	151
	14	68	98	161
	17	70	109	164
<i>Solanum pimpinellifolium</i> (acc. TO-937)	20	73	111	175
	30	77	112	179
	38	85	120	
	45	88	121	

1.2.- Diseño experimental

1.2.1.- Condiciones de crecimiento

Las 34 líneas *RIL* seleccionadas siguiendo los criterios citados anteriormente, se estudiaron en 7 cultivos independientes, llevados a cabo entre los meses de julio de 2009 y junio de 2010. Para estos cultivos se dispuso de una cámara de altas prestaciones (ARALAB modelo FITOCLIMA 23000EH). Esta es una cámara-habitación con control preciso e independiente de la radiación, la temperatura, la humedad relativa y la concentración de dióxido de carbono, que permite establecer condiciones climáticas con una evolución horaria similar a la que se puede presentar durante el día en el interior de un invernadero.

En cada cultivo se evaluaron 5 líneas *RIL*, a excepción del cultivo 7 donde se evaluaron 4 líneas *RIL*, y las dos líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO-937, con 6 réplicas cada una. Las semillas se esterilizaron y germinaron como se describió anteriormente en el ensayo de estrés hídrico con plantas *CIN1* (Capítulo II). Una vez germinadas las semillas, las plántulas se pasaron a unos pequeños soportes de lana de roca que permitió su trasplante directo al cultivo en disolución nutritiva de Hoagland diluida a la mitad con aireación continua (Hoagland & Arnon, 1950). Las plantas se dispusieron en contenedores individuales de 3 litros de capacidad. La disolución nutritiva se cambió semanalmente para asegurar una adecuada nutrición. Cada cultivo tuvo una duración de 30 días.

Al final de cada uno de los 7 periodos de cultivo se evaluaron los siguientes parámetros.

1.3 - Parámetros relacionados con el vigor de la planta

Se determinaron distintos parámetros relacionados con el vigor de la planta como la biomasa vegetativa, la altura, el diámetro del tallo, número de hojas y área foliar, esta última utilizando un integrador de superficie LI-COR mod. Li-3000A.

1.4.- Relaciones Hídricas de las plantas y Fotosíntesis

1.4.1.- Determinación del Contenido Relativo en Agua

El procedimiento a seguir fue el mismo que el descrito en el anterior experimento de estrés hídrico, perteneciente a Sharp et al. (1990).

1.4.2.- Medidas de intercambio gaseoso

Las medidas de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) se llevaron a cabo en hojas adultas recién expandidas, utilizando un equipo de análisis de gases por infrarrojos (LICOR- 6400) como se describió en el Capítulo II. Las medidas se llevaron a cabo por la mañana entre las 10:00 y las 11:00 h. Se midieron 2-3 hojas por planta. A partir de estas medidas se calculó el uso eficiente de agua instantáneo como la relación A/E .

$$WUE_i = A/E$$

1.4.3.- Consumo acumulado de agua

El consumo acumulado de agua (W) se determinó semanalmente antes de cada cambio de disolución nutritiva de los contenedores por la diferencia de peso de la solución nutritiva restante en los contenedores al cabo de una semana.

1.4.4.- Uso Eficiente del Agua Agronómico (*WUE_a*)

Para determinar el uso eficiente agua agronómico o *WUE_a* (del inglés, Vegetative Agronomic Water Use Efficiency) se obtuvo el peso fresco y seco de raíces, tallos y hojas, así como el consumo acumulado de agua como se explica en el apartado anterior.

El uso eficiente del agua agronómico se determinó como la relación entre la biomasa producida por la planta entera (en gramos) y el volumen de agua consumido durante el periodo de cultivo (en litros), corregido por la evaporación medida en contenedores sin plantas. En este primer ensayo se midió en base a la biomasa vegetativa, por ello se denomina *WUE_{av}*.

$$WUE_a = B/W$$

1.4.5.- Fluorescencia de clorofilas

Al final de cada ciclo de cultivo se midió la fluorescencia de clorofilas (F_v/F_m) como parámetro indicador de la eficacia fotoquímica del PSII y de la evolución de la senescencia natural durante el desarrollo de una hoja ya madura del tercio apical. Se utilizó un medidor portátil de fluorescencia de clorofilas OS-30 (OptiSciences, Herts, UK) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II.

1.5.- Extracción Hormonal y Análisis

El análisis hormonal se realizó en las hojas sexta y séptima, según la metodología descrita por Albacete et al. (2008) con algunas modificaciones en la extracción hormonal.

1.5.1.- Extracción hormonal

Las determinaciones analíticas se realizaron a partir de la savia o jugo celular del material vegetal. Para la obtención de este extracto los folíolos del material a analizar se introducían en puntas de pipeta de 5 ml (unos 8 g de material vegetal fresco aproximadamente), previamente se introducía una pequeña cantidad de lana de vidrio para que actuara como filtro del extracto a centrifugar.

Las puntas con el material vegetal fresco eran rápidamente congeladas en nitrógeno líquido. Posteriormente se dejaban descongelar durante 20 minutos aproximadamente, eliminando toda el agua de condensación; con este proceso de congelación-descongelación se produce la rotura de las paredes celulares. A continuación se centrifugaban las puntas a 1.000 g durante 10 min y a 4°C. El volumen de savia obtenido se separaba en varias alícuotas en tubos Eppendorf, que se volvían a centrifugar a 20.000 g durante 5 min y 4°C hasta obtener un extracto totalmente transparente y bien se analizaba inmediatamente o se congelaba a -20°C para su posterior análisis.

1.6.- Obtención de muestras y análisis de iones

En las muestras de hoja madura se analizaron los niveles de los distintos macronutrientes y micronutrientes a final de cada ciclo.

1.6.1.- Obtención de extractos para análisis

Una vez pesadas cada una de las muestras (peso fresco), los tejidos fueron lavados con agua destilada, secados en horno a 65°C durante un mínimo de 48h, pesados (peso seco) y molidos para su posterior análisis.

1.6.2.- Análisis de iones

Una vez molidas las muestras, se sometió a digestión 0,1 g de material vegetal con una mezcla de $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (5:3 en volumen) utilizando un programa en un microondas (CERM) en el que se alcanza 200°C en 20 minutos, y se mantenía esta temperatura durante 2 horas (CEM Mars Xpress, North Carolina, USA). El análisis del contenido en nutrientes se llevó a cabo en el servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. De las muestras entregadas se obtuvieron datos de los elementos mostrados en la Tabla 3.2 mediante espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), usando un equipo Thermo ICAP 6000 series (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). Las concentraciones de N y C se midieron en muestras molidas, sin digestión previa, utilizando un analizador elemental Thermo-Finnigan 1112 EA (Thermo-Finnigan, Milan, Italy).

Tabla 3.2.- Tabla de Nutrientes Esenciales.

NUTRIENTES NO MINERALES			C
NUTRIENTES MINERALES	MACRONUTRIENTES	PRIMARIOS	N
			P
			K^+
		SECUNDARIOS	S^{6+}
			Mg^{2+}
			Ca^{2+}
		MICRONUTRIENTES	B^{3+}
			Cu^{2+}
			Fe^{3+}
			Mn^{2+}
			Zn^{2+}
		Na^+	

2.- ENSAYO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LA RAÍZ Y LA PARTE AÉREA SOBRE EL USO EFICIENTE DEL AGUA

2.1.- Material vegetal

El material genético utilizado para el Ensayo 2 fue una selección de 4 líneas recombinantes de las 34 líneas *RIL* estudiadas en el anterior ensayo, además de los parentales *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*. La población *RIL* se seleccionó utilizando el programa estadístico SPSS 18. Para ello primero se realizó un Análisis de Componentes Principales o *PCA* (del inglés, Principal Component Analysis) con las 34 líneas para agrupar las variables en torno al consumo de agua y a la biomasa. A partir del análisis de componentes principales se generó un gráfico de regresión de las puntuaciones de los factores (Biplot), representando los residuos de la regresión entre biomasa y el consumo de agua (Imagen 3.2).

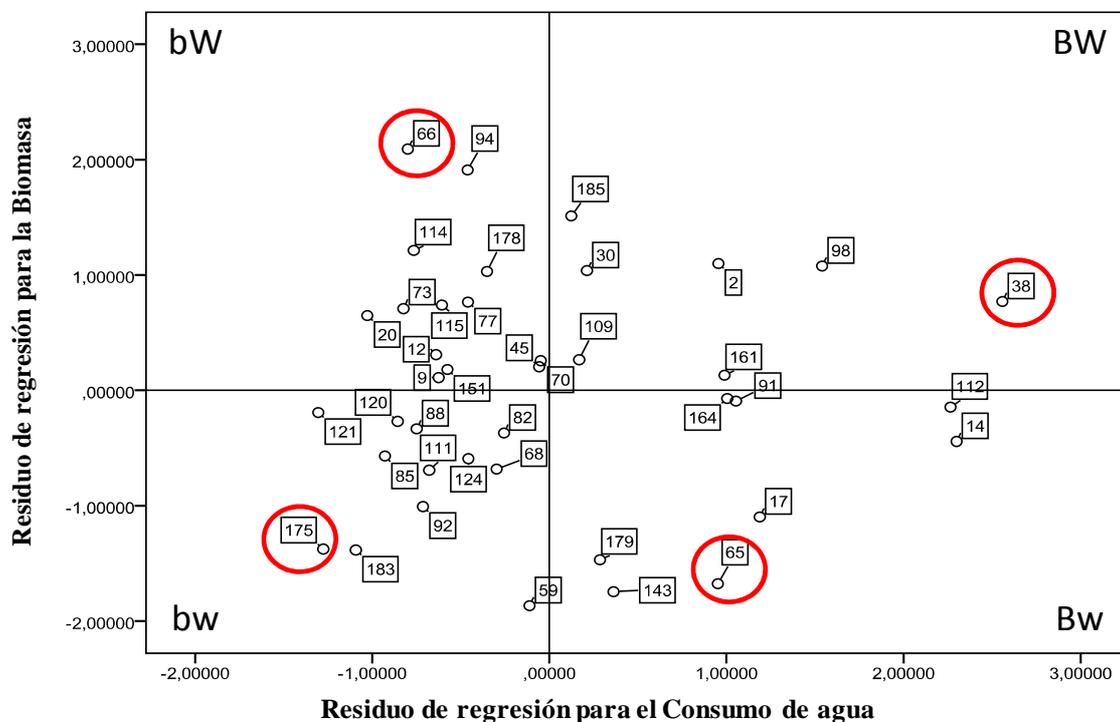


Imagen 3.2.- Gráfico de Regresión de las puntuaciones de los factores (Biplot).

En cada cuadrante se seleccionaron las líneas más alejadas de los ejes y de la intersección entre ellos. Estas líneas representan las cuatro combinaciones posibles entre biomasa y consumo de agua.

- ✓ Baja biomasa/Bajo consumo de agua (bw)= Línea 175
- ✓ Alta biomasa/bajo consumo de agua (Bw) = Línea 65
- ✓ Baja biomasa/alto consumo de agua (bW)= Línea 66
- ✓ Alta biomasa/alto consumo de agua (BW)= Línea 38

Abajo se muestra un cuadro resumen de las 4 líneas utilizadas para el ensayo (Tabla 3.3).

Tabla 3.3.- Cuadro de las líneas *RIL* seleccionadas.

BIOMASA	CONSUMO DE AGUA	RIL F₈
Alta (B)	Alto (W)	38 (BW)
	Bajo (w)	65 (Bw)
Baja (b)	Alto (W)	66 (bW)
	Bajo (w)	175 (bw)

2.2.- Diseño experimental

2.2.1.- Obtención de las plantas injertadas

Se desarrollaron injertos recíprocos con las 4 líneas *RIL* mencionadas en el apartado anterior, combinando las líneas con baja biomasa y bajo consumo de agua (bw) con líneas con alta biomasa y alto consumo de agua (BW) y al revés combinando líneas con alta biomasa y bajo consumo de agua (Bw) con líneas de baja biomasa y elevado consumo de agua (bW). Además el ensayo incluía las líneas sin injertar y autoinjertadas, las cuales se utilizaron como controles.

Por lo tanto, durante el ensayo se evaluaron las 12 combinaciones posibles entre las 4 líneas *RIL*, 4 líneas autoinjertadas y las 4 *RIL* más las dos líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO-937 sin injertar. En total fueron 22 combinaciones con 6 réplicas cada una.

El protocolo llevado a cabo para realizar los injertos fue el descrito previamente por Santa-Cruz et al. (2002). Los injertos se hicieron cuando las plántulas tenían totalmente desarrolladas las 2-3 hojas verdaderas, aproximadamente cuatro semanas después de la siembra. La técnica de injerto utilizada fue la de aproximación, en la cual al juntar las plantas se fusionan los cambium. Se forma una quimera de células entre el portainjertos y la variedad que se está injertando.

En las bandejas de vermiculita utilizadas para la germinación, se realizó un corte oblicuo en el tallo con un bisturí, por encima de los cotiledones, en el genotipo que se iba a utilizar como portainjerto, y por debajo del ápice en el que se iba a utilizar como esqueje (Imagen 3.3). Los injertos se realizaron inmediatamente después de cortar ambas plantas. El corte oblicuo nos proporcionaba una mayor superficie de contacto entre ambas partes, las cuales permanecían estrechamente unidas sujetándolas con unas pinzas adecuadas para ello. Inmediatamente después, las plantas injertadas se cubrieron con una tapa de plástico transparente para mantener una humedad próxima al 100% y facilitar así la formación del injerto y además se mantuvieron 24 horas en oscuridad. Tras este periodo, la intensidad de luz se iba aumentando progresivamente y disminuyendo la humedad relativa, hasta recuperar las condiciones ambientales que tenían las plántulas inicialmente, justo antes de injertarlas. Este periodo de adaptación duró 6 días.

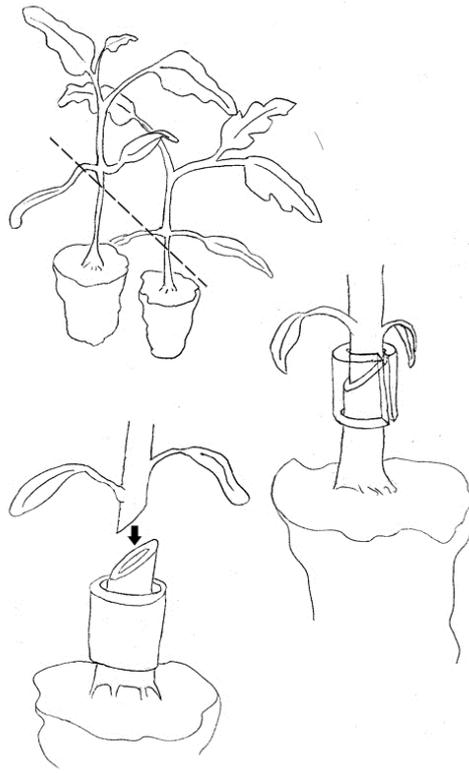


Imagen 3.3.-Imagen de la técnica de injerto por aproximación.

2.2.2.- Condiciones de crecimiento

Las condiciones ambientales de la cámara de cultivo para el crecimiento vegetal (de 8 días después de la siembra hasta el final del experimento) fueron seleccionados para simular los cambios naturales en la temperatura diurna y la irradiación de crecimiento de las plantas: 25-18°C, 70-90% de humedad relativa (en condiciones de luz y oscuridad, respectivamente), y 16 horas de luz con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos a nivel de planta de 245/81 $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (400-700 nm). Estas condiciones ambientales se mantuvieron durante el injerto, a excepción de la intensidad y fotoperiodo de luz, después del primer día, en el que las plantas injertadas se mantuvieron en oscuridad, el periodo de luz y la intensidad de luz se incrementaron cada día, hasta alcanzar los valores normales para la planta en crecimiento.

Transcurridos 70 días tras la germinación de las plántulas fueron trasplantadas a un invernadero de polietileno utilizando bidones con un volumen útil aproximado de 33,5 litros. Las plantas se distribuyeron en un marco de plantación de 2 m entre hileras y 0,5 m entre plantas dentro de las filas, cultivado con un solo tallo, eliminando todas las yemas axilares (Imagen 3.4). El cultivo se llevó a cabo entre los meses de marzo a junio de 2011, durante un periodo de tiempo de 8 semanas, en un invernadero tipo túnel con cubierta de policarbonato, con una superficie de 1.000 m² y dotado de un sistema de refrigeración del tipo “Cooling-system” que se conectaba cuando la temperatura sobrepasaba los 25-30°C según la época. Las condiciones ambientales del invernadero fueron las siguientes: temperatura diurna entre 20-30°C, y temperatura nocturna nunca inferior a los 15°C. Además, el invernadero tiene pantallas térmicas que permitían controlar el exceso de radiación y temperatura, un sistema de calefacción que mantenía la temperatura por encima de los 15°C en invierno, y un sistema de nebulización para mantener la humedad relativa apropiada para el buen desarrollo del cultivo (65%) con posibilidad de aplicaciones fitosanitarias. El invernadero incluye también un sistema de sensores para el control ambiental, que recogen periódicamente datos climáticos dentro y fuera del invernadero y los registra en una base de datos.

La fertilización aplicada fue la estándar para el tomate:

- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) : 0,136g/l
- Sulfato de Magnesio (MgSO₄) : 0,225 g/l
- Nitrato de Calcio (Ca(NO₃)₂) : 0,8704 g/l
- Nitrato de Potasio (KNO₃) : 0,611 g/l
- Micronutrientes quelatados (incluyendo Fe) : 0,016 g/l

El pH de la disolución nutritiva de los bidones fue aproximadamente de 7 y la conductividad eléctrica de 2 mS. Dicha solución se cambió cada dos semanas. El agua de riego procedía del Transvase Tajo-Segura.



Imagen 3.4.-Fotografía tomada en el invernadero tras una semana del trasplante.

2.3.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta

Se evaluaron parámetros de tipo morfológico (diámetro del tallo y biomasa vegetativa) al final del ensayo tras 8 semanas en el invernadero.

2.4.- Relaciones Hídricas de las plantas y Fotosíntesis

2.4.1.- Determinación del Contenido Relativo en Agua

El procedimiento a seguir fue el mismo que el descrito en el Capítulo II perteneciente a Sharp et al. (1990). Los cálculos se hicieron en el foliolo apical lateral de una hoja madura trascurridos 7 semanas de ensayo. Además se midió el contenido de agua de la hoja como la diferencia entre el peso fresco y el peso seco. Esta última medida se tomó en hoja joven, intermedia y madura.

2.4.2.- Medidas de intercambio de gaseoso

Las medidas de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) se llevaron a cabo en hojas adultas recién expandidas, utilizando un equipo de análisis de gases por infrarrojos (LICOR- 6400) como se describió en el anterior ensayo. Se midieron 2-3 hojas por planta. A partir de estas medidas se calculó el WUE_i como la relación A/E y como la relación A/g_s .

2.4.3.- Consumo acumulado de agua

El consumo acumulado de agua (W) se determinó cada dos semanas antes de cada cambio de disolución nutritiva de los bidones por la diferencia de peso de la solución nutritiva restante en los contenedores al cabo de dos semanas.

2.4.4.- Uso Eficiente del Agua Agronómico (WUE_a)

Ese parámetro se determinó como se explica en el anterior ensayo, en base a biomasa vegetativa, nombrándose por ello WUE_{av} .

2.4.5.- *Potencial hídrico foliar*

El potencial hídrico foliar (Ψ_w) se determinó con una cámara de presión tipo Scholander (PMS Instrument, Corvallis, OR), de acuerdo con la técnica seguida por Scholander et al. (1965). Las medidas se realizaron en dos folíolos basales de una hoja intermedia de la planta.

2.4.6.- *Fluorescencia de clorofilas*

Se hicieron dos medidas de la fluorescencia de clorofilas (F_v/F_m) a lo largo del experimento en una hoja intermedia de la planta. Se utilizó un medidor portátil de fluorescencia de clorofilas OS-30 (OptiSciences, Herts, UK) siguiendo el protocolo descrito en el ensayo anterior.

2.4.7. - *Índice de clorofilas*

En la misma hoja utilizada para la medida de fluorescencia de clorofilas, se midió el índice de clorofilas (IC). Las medidas se hicieron al final del ensayo con un medidor portátil de contenido de clorofila CCM-200 Plus (Opti-Sciences, USA), mediante un análisis óptico, no invasivo. Para realizar las medidas, el medidor de clorofila utiliza LEDs que emiten longitudes de onda específicas en las gamas de color rojo e infrarrojo. El detector analiza la relación de las dos longitudes de onda para determinar el índice de concentración de clorofila.

2.5.- *Extracción Hormonal y Análisis*

El análisis hormonal se realizó en savia xilemática de hoja madura extraída con una cámara Scholander de acuerdo con el método descrito en Albacete et al. (2008). La hoja entera se colocó en una cámara de presión

Scholander, y las muestras se obtuvieron mediante aplicación de una presión de nitrógeno similar al potencial hídrico de la hoja (-0,5 MPa para plantas en condiciones control y alrededor de -0,9 MPa para plantas estresadas) con la finalidad de mantener el flujo de savia tan cerca como sea posible a la tasa de transpiración de la planta entera.

2.6.- Obtención de muestras y análisis de iones

El protocolo a seguir es el mismo que el explicado en el Capítulo II.

3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS RIL SELECCIONADAS

3.1.- Material vegetal

El material genético utilizado para el Ensayo 3 fueron las cuatro líneas seleccionadas en el anterior ensayo más otras 6 líneas con caracteres muy dispares en relación con el *WUE*, pero similares a las del ensayo anterior (Tabla 3.4). Dichas líneas se seleccionaron utilizando el programa estadístico SPSS 18, mediante un Análisis de Componentes Principales (*PCA*) y un gráfico de regresión de las puntuaciones de los factores (*Biplot*), al igual que se hizo en el ensayo 2 (Imagen 3.5).

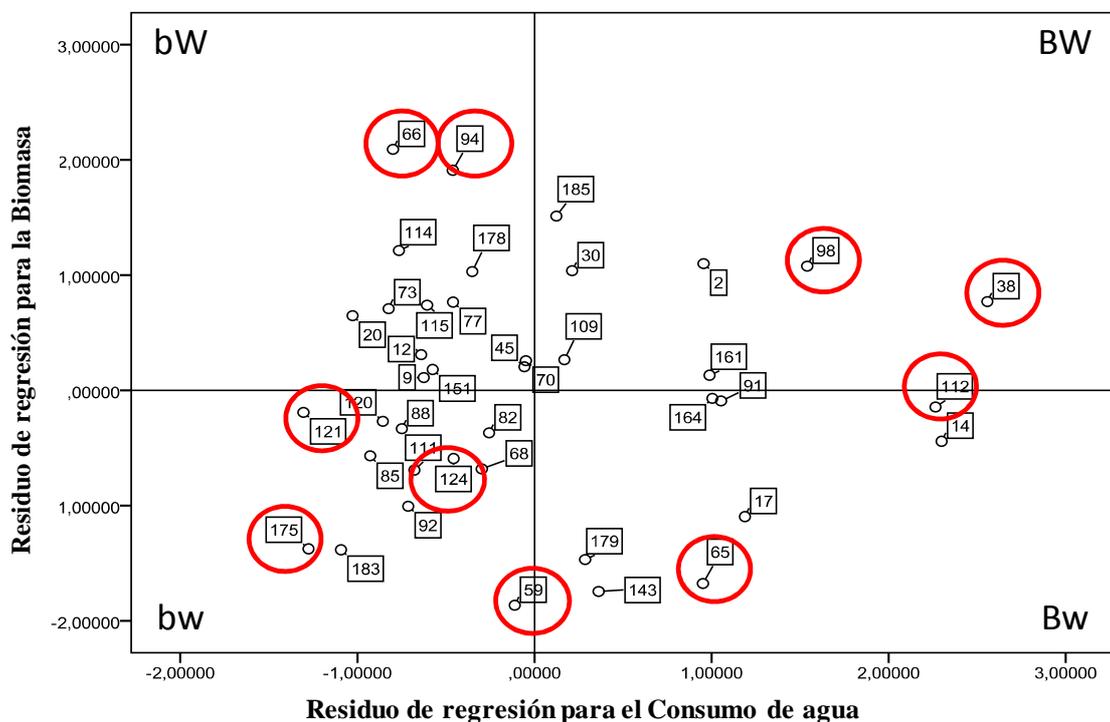


Imagen 3.5.- Gráfico de Regresión de las puntuaciones de los factores (Biplot).

Tabla 3.4.- Cuadro de las líneas RIL seleccionadas.

BIOMASA	CONSUMO DE AGUA	RIL F ₈
Alta (B)	Alto (W)	38 (BW)
		98 (BW)
		112 (BW)
	Bajo (w)	65 (Bw)
		94 (Bw)
Baja (b)	Alto (W)	66 (bW)
		59 (bW)
	Bajo (w)	121 (bw)
		124 (bw)
		175 (bw)

3.2.- Diseño experimental

3.2.1.- Obtención de las plantas injertadas

Se desarrollaron injertos con las 10 líneas RIL mencionadas en el apartado anterior como portainjertos de la variedad comercial TT-115 (Unigenia Bioscience). Además, como referencia, se utilizaron portainjertos comerciales de diferente vigor: Maxifort (*L. esculentum* x *L. hirsutum*) de alto vigor, Beaufort de vigor intermedio, y Spirit (*L. esculentum* x *L. pimpinellifolium*) de bajo vigor.

Por lo tanto, durante el ensayo se evaluaron un total de 15 combinaciones, incluyendo los 13 portainjertos y el cultivar comercial sin injertar y autoinjertado, con 6 réplicas cada una.

El protocolo llevado a cabo para realizar los injertos fue el descrito previamente por Santa-Cruz et al., 2002 del mismo modo y utilizando las mismas condiciones que se describen en el anterior ensayo (Imagen 3.6).



Imagen 3.6.- Fotografía de las plantas injertadas.

3.2.2.- *Condiciones de crecimiento*

El cultivo se llevó a cabo entre los meses de enero de 2011 y julio de 2011, en un invernadero de plástico cubierto con polietileno térmico de 200 μm de espesor, y provisto de sistema de fertirrigación automático y registro continuo de la radiación, temperatura y humedad relativa (Imagen 3.7). El trasplante se realizó el 6 de abril del 2011. Las plantas se cultivaron con un sistema semi-hidropónico abierto sobre un sustrato de arena de sílice en macetas individuales de 18 litros de capacidad. La solución nutritiva Hoagland se suministró mediante un sistema de goteros (1 por planta) que suministran un caudal de 2,2 l/h. Se aplicó un nivel de riego óptimo que se fue ajustando en volumen y frecuencia a lo largo del ciclo de cultivo en función del desarrollo de las plantas y de las condiciones climáticas.



Imagen 3.7.- Fotografía tomada en el invernadero del IHSM “La Mayora” UMA_CSIC.

3.3.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta

Desde el establecimiento de todos los frutos del segundo racimo, se marcó la hoja inmediatamente inferior que lo alimentaba. El 17 de mayo, cuando la mitad aproximadamente de los frutos del racimo terminaron de crecer (detectado como cambio en color que indica comienzo de maduración), se recolectó dicha hoja, a la que se determinó el peso fresco y seco. Asimismo al final del ensayo se registró la biomasa foliar de la planta y el peso seco de las raíces. El peso seco de las raíces se midió después de secar las mismas durante 3 días a 70°C. Todos estos parámetros se determinaron en 6 plantas por combinación.

3.4.- Relaciones Hídricas de las plantas

3.4.1.- Determinación del Contenido Relativo en Agua

El procedimiento a seguir fue el mismo que el descrito en el anterior ensayo, perteneciente a Sharp et al. (1990). Se utilizaron hojas jóvenes situadas entre la séptima y novena posición, contada desde el ápice de la planta. Se muestrearon 2 folíolos por planta, en 6 plantas por combinación de variedad/portainjerto.

3.4.2.- Consumo acumulado de agua

Estas medidas se realizaron semanalmente durante todo el tiempo de cultivo, por diferencia entre el volumen de riego aportado durante un periodo de 24 horas y el drenaje recogido durante el mismo tiempo. Estos datos permitieron determinar posibles diferencias de consumo durante las fases de crecimiento vegetativo y de fructificación, así como el cálculo del consumo acumulado total, necesario para determinar el *WUE* agronómico al final del ensayo.

*3.4.3.- Uso Eficiente del Agua Agronómico (*WUEa*)*

Ese parámetro se determinó como se explica en el anterior ensayo. Sin embargo en este tercer ensayo se midió en base a fruto, denominándose en este caso *WUEa_Y* (del inglés, yield).

3.5.- Parámetros de producción de cosecha

Se hizo una recogida semanal durante todo el periodo de cosecha, es decir, durante 2 meses. En cada recogida se anotó el número de frutos por planta y por racimo, y el peso fresco de los mismos.

3.6.- Extracción Hormonal y Análisis

El análisis hormonal se realizó en savia xilemática de hoja del 4^o racimo extraída con una cámara Scholander de acuerdo con el método descrito en Pérez-Alfocea y col., 2000. Para la extracción de savia xilemática de hoja se sigue la metodología descrita en el Ensayo 2.

3.6.1.- Estudio comparativo entre las hormonas medidas en jugo celular de hoja obtenido por centrifugación y savia xilemática de hoja extraído con cámara Scholander

Se realizó un estudio comparativo mediante correlaciones entre las concentraciones hormonales en savia de xilema de hoja (recolectado mediante separación de la hoja, colocación en la cámara de presión Scholander, y aplicación de presión) y jugo celular de hoja (obtenido mediante centrifugación) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Ailsa Craig) auto-injertadas e injertadas sobre dos genotipos de tomate que sobreexpresan el gen *NCED* que codifica una enzima fundamental en la biosíntesis de ABA (Thompson et al., 2007) (portainjertos SP5 y SP12), crecidas hidropónicamente en una cámara de cultivo controlado en condiciones óptimas de crecimiento, con 3 repeticiones de cada línea.

Las concentraciones hormonales se midieron de acuerdo con el protocolo Albacete et al. (2008); Albacete et al. (2009), utilizando un sistema U-HPLC-MS.

4.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 18 (Statistical Package for Social Sciences, 2002). Los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA). Los valores medios se compararon mediante el test Tukey al nivel de probabilidad del 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- ENSAYO 1: VARIACIÓN GENÉTICA DEL USO EFICIENTE DEL AGUA EN UNA POBLACIÓN RECOMBINANTE DE TOMATE

En este primer ensayo se estudió la variación genética de parámetros fisiológicos y estructurales que podían estar implicados en el uso eficiente del agua en una población de líneas puras recombinantes (*RIL*) de tomate. Se evaluaron un conjunto de 34 *RILs* obtenidas a partir de un cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc. TO-937), así como ambos parentales, a lo largo de siete ciclos experimentales consecutivos. Para el estudio fisiológico y hormonal se tomaron muestras de las hojas sexta y séptima de cada planta, al final de cada uno de los siete periodos de ensayo.

1.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta

1.1.1.- Biomasa Vegetativa

En general existe una gran variabilidad en cuanto a la biomasa de las *RILs* con respecto a los parentales.

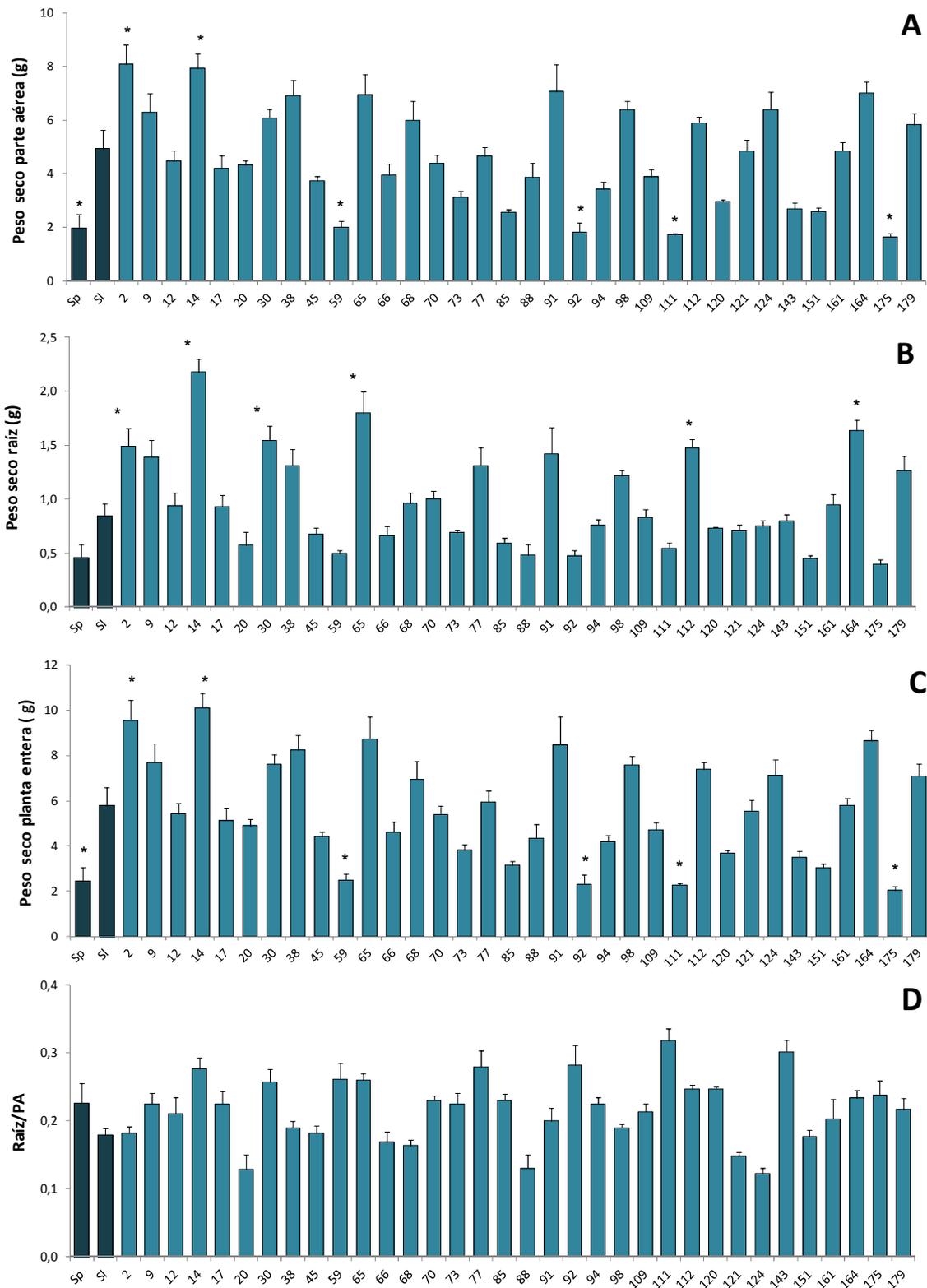


Figura 3.1.- Peso seco de la parte aérea (A), peso seco de la raíz (B), peso seco de la planta entera (C) y relación raíz/parte aérea (D), de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

Trece líneas presentaron un mayor peso seco de la parte aérea que la variedad cultivada *S. lycopersicum* (Fig. 3.1A), siendo significativo para las líneas 2 y 14 (63 y 60%, respectivamente), mientras que 22 líneas presentaron un menor peso respecto al parental cultivado siendo significativo para las líneas *S. pimpinellifolium*, 59, 92, 111 y 175, con una reducción aproximada de la mitad. Con respecto a la raíz, la mitad de población *RIL* estudiada presentó un incremento en el peso seco de la raíz con respecto a *S. lycopersicum* (Fig. 3.1B), siendo estadísticamente significativo en las líneas 2 y 112 (75%), en la línea 30 (81%), en las líneas 65 y 14 (2 y 3 veces más que el parental cultivado, respectivamente) y en la 164 (91%). Catorce líneas *RIL* mostraron mayor biomasa total que *S. lycopersicum* (Fig. 3.1C), siendo estadísticamente significativo para las líneas 2 (65%) y 14 (75%), mostrando además 5 líneas un peso significativamente inferior a dicho parental: el parental *S. pimpinellifolium*, y las líneas 59, 92, 111 y 175. No se observaron diferencias significativas en la relación raíz/parte aérea (Fig. 3.1D).

1.1.2.- Altura

Ambos parentales mostraron una altura similar, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 3.2).

Más de la mitad de las líneas *RIL* registraron mayor altura que los parentales, con diferencias significativas para las líneas 2 y 12 (54-58%), las líneas 14, 17, 20, 30, 38 y 65 (41-47%), las líneas 66, 124 y 161 (33-37%), las líneas 98 y 164 (74%) y la línea 179 (41%) (Fig. 3.2).

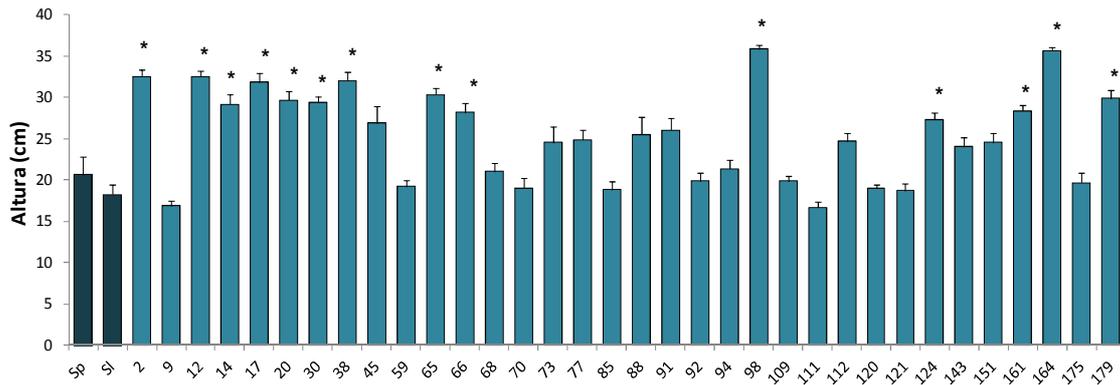


Figura 3.2.- Altura de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.1.3.- Diámetro del tallo

Dado que el diámetro del tallo está considerado un parámetro relacionado con el vigor de la planta, se observa una variabilidad importante de este parámetro respecto al parental cultivado. De hecho 26 líneas presentan un diámetro significativamente menor respecto a *S. lycopersicum*: el parental *S. pimpinellifolium* y las líneas RIL 2, 9, 12, 17, 20, 30, 45, 59, 65, 70, 73, 77, 85, 92, 94, 98, 109, 111, 112, 120, 121, 143, 151, 161 y 175. Por otra parte solamente dos líneas (14 y 91) presentan mayor calibre que el parental *S. lycopersicum*, no siendo significativo en ningún caso (Fig. 3.3).

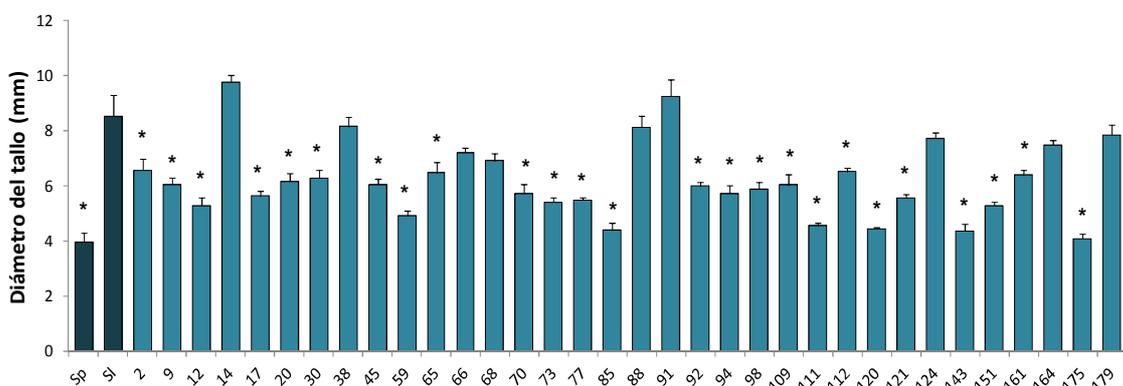


Figura 3.3.- Diámetro del tallo de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.1.4.- Número de hojas

Más de la mitad de la población *RIL* presentó un incremento en número de hojas en relación a ambos parentales, siendo significativo para la línea 2 (36%), las líneas 12 y 14 (24-25%), las líneas 38 y 65 (34-35%), la línea 124 (23%) y las líneas 164 y 179 (32-35%) respecto al parental cultivado (Fig. 3.4).

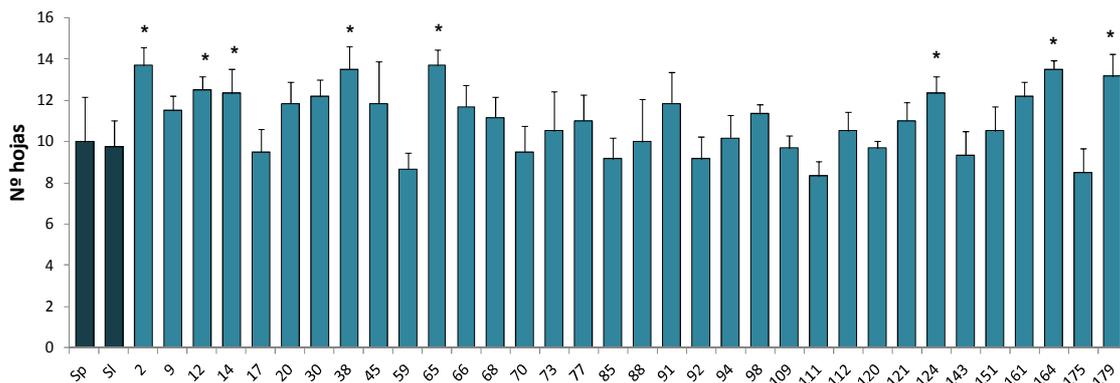


Figura 3.4.- Número de hojas de la población F8 recombinante (*RIL*) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (S1) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.1.5.- Área foliar

Existe una variabilidad notable en cuanto al área foliar de las líneas recombinantes con respecto a ambas líneas parentales, así como las parentales entre sí, mostrando *S. lycopersicum* más del doble de área foliar que *S. pimpinellifolium* (Fig. 3.5). Catorce líneas *RIL* registraron una mayor área foliar que el parental cultivado, siendo estadísticamente significativo para la línea 2 (54%), la línea 14 con casi el doble de área foliar y las líneas 38, 65, 91 y 164 (50-55%). Hay que destacar 3 líneas *RIL* con un área foliar significativamente menor que *S. lycopersicum*, las líneas 73, 111 y 175 con menos de la mitad área foliar.

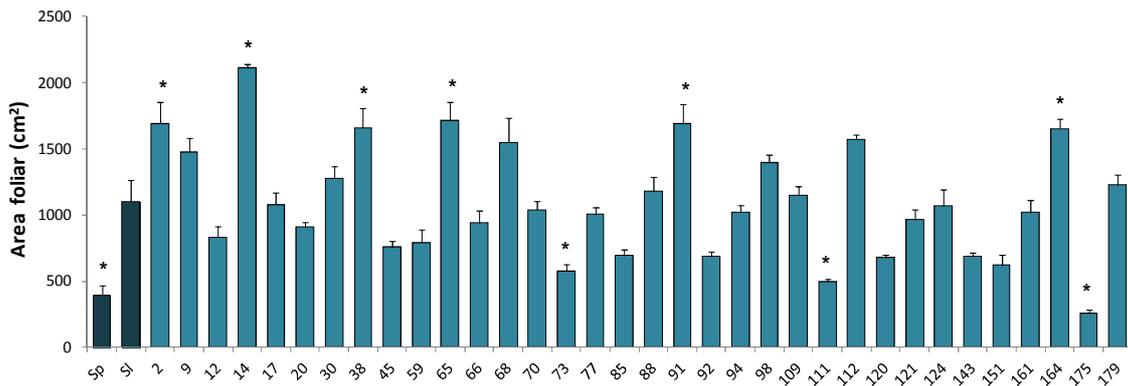


Figura 3.5.- Área foliar de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (S1) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.2.- Relaciones Hídricas y Fotosíntesis

1.2.1.- Contenido relativo en en agua

El contenido relativo de agua (RWC) es un indicador del grado de hidratación de los tejidos. A mediodía, cuando el estrés ambiental es máximo, el RWC en las hojas varió de unas líneas a otras entre el 78 y el 89% (Fig. 3.6). Once líneas RIL mostraron valores ligeramente superiores a los de ambos parentales, sin embargo estas diferencias no fueron significativas en ningún caso. Por otra parte sí se observaron disminuciones significativas en las líneas RIL 2 y 30 respecto al parental cultivado *S. lycopersicum*.

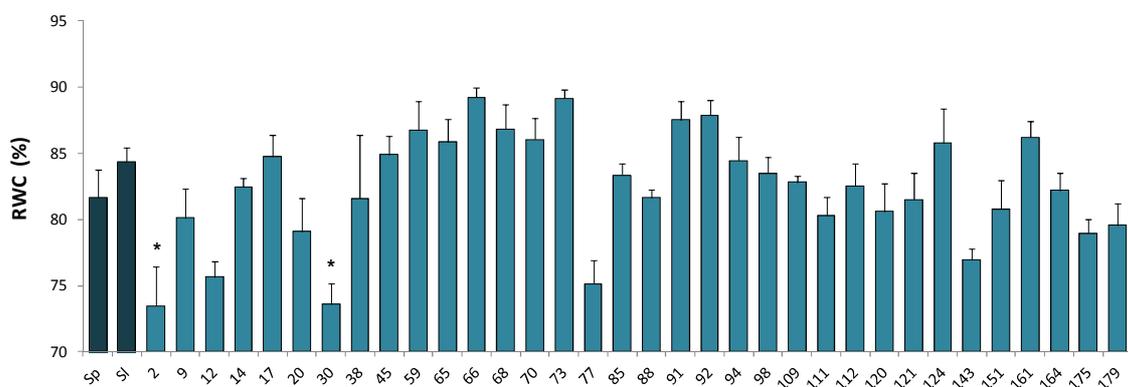


Figura 3.6.- Contenido relativo de agua de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (S1) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.2.2.- Medidas de intercambio gaseoso: tasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración

Al final de cada ciclo se realizó una medida de los parámetros de intercambio gaseoso, observándose que los valores de tasa fotosintética (A) fueron similares en ambos parentales y para la mayoría de líneas recombinantes (Fig. 3.7A).

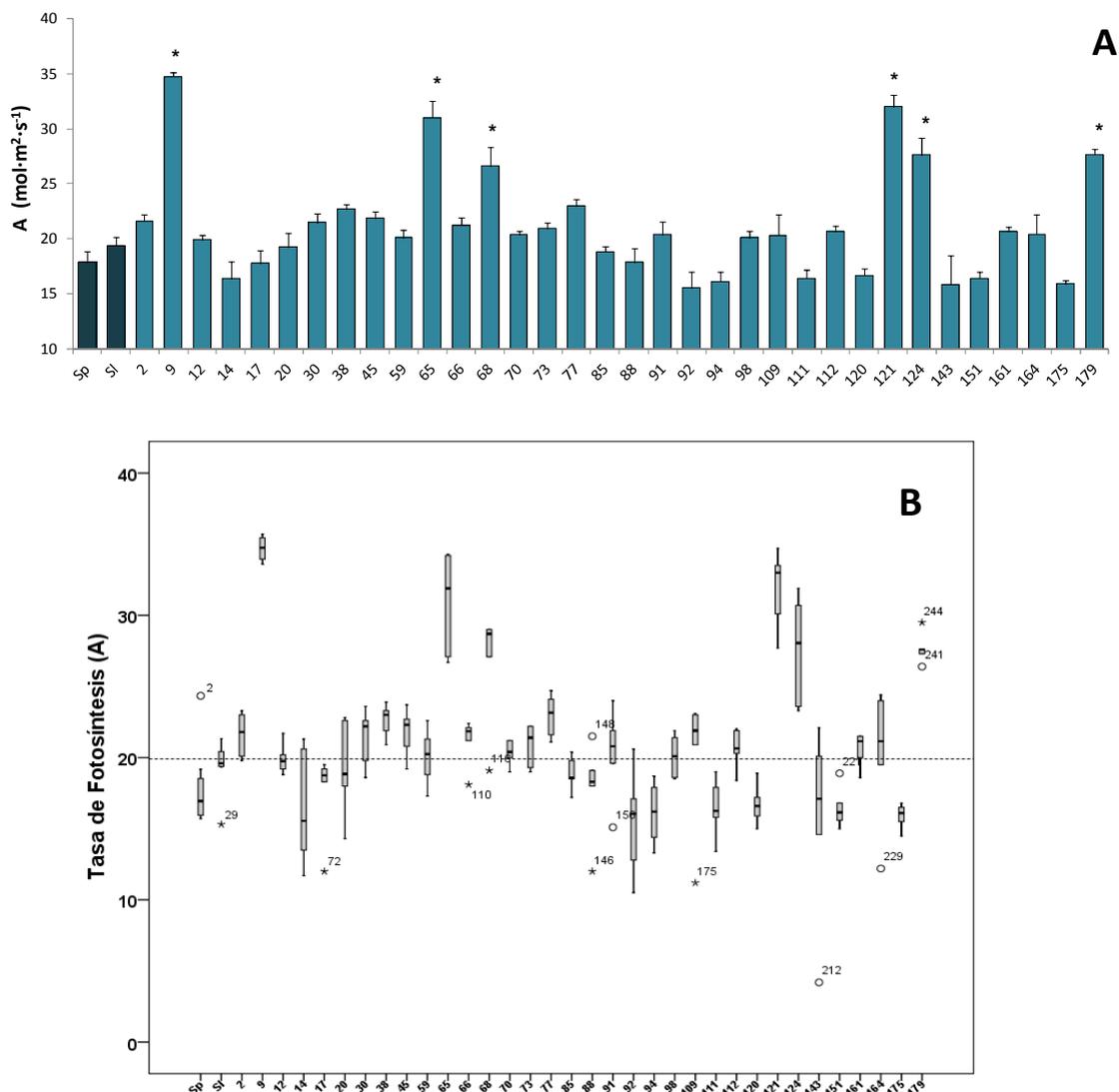


Figura 3.7.- Tasa de fotosíntesis (A) representada como gráfico de barras (A) y como diagrama de cajas (B), de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker (Sl) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

No obstante, seis líneas *RIL* presentaron incrementos estadísticamente significativos: línea 9 (78%), línea 65 (60%), línea 68 (37%), línea 121 (65%) y líneas 124 y 179 (42%). Mediante un diagrama de cajas representamos la variabilidad en la tasa fotosintética tanto entre líneas con el parental como intralínea (Fig. 3.7B). En términos generales, se observó poca dispersión dentro de cada línea, a excepción de las líneas 14, 65 y 124.

En relación a la conductancia estomática (g_s) únicamente se observaron diferencias significativas por debajo, mostrando las líneas 65, 92 y 94 menos de la mitad conductancia estomática que el parental cultivado (Fig. 3.8). Por otra parte a pesar de que 12 líneas *RIL* presentaron un ligero aumento en este parámetro, estas diferencias no fueron significativas.

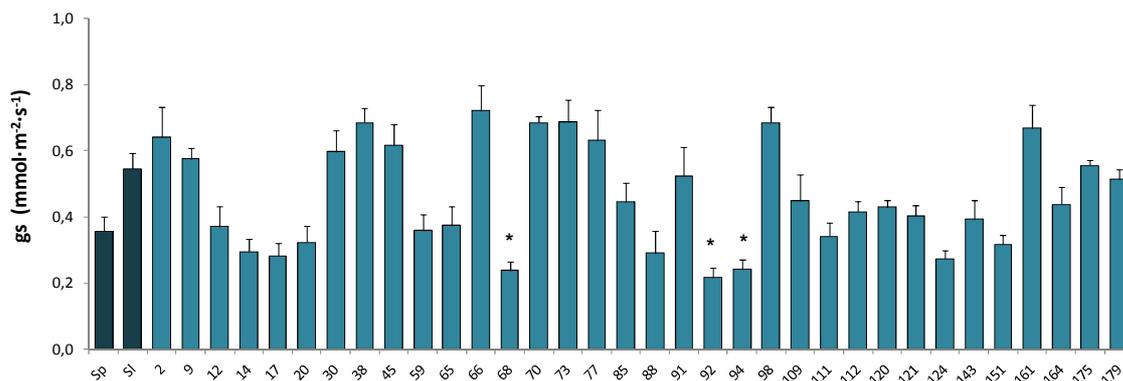


Figura 3.8.- Conductancia estomática (g_s) de la población F8 recombinante (*RIL*) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (S1) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

La tasa de transpiración (E) siguió un patrón muy similar a la conductancia estomática. Se observaron ligeros incrementos en las mismas doce líneas *RIL*, aunque dichos incrementos no fueron estadísticamente significativos (Fig. 3.9). Seis líneas mostraron disminuciones significativas respecto a *S. lycopersicum*, siendo estas líneas la 14, 68, 88, 92, 94 y la línea 124.

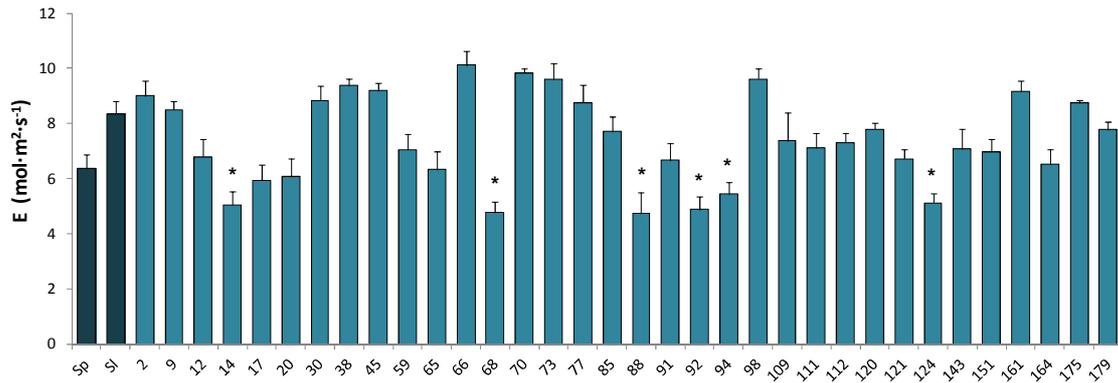


Figura 3.9.- Tasa de transpiración (E) de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.2.3.- Consumo acumulado de agua

A nivel general, se observó una gran variabilidad en el consumo acumulado de agua (W) (Fig. 3.10). El parental cultivado consumió casi el doble de agua que el parental silvestre, mientras que 15 de las líneas recombinantes superaron en W a *S. lycopersicum*. De ellas, siete mostraron incrementos estadísticamente significativos: 2 (62%), la línea 14 con casi el doble de W que el parental cultivado, 38 (55%), 65 y 91 (44%), 112 (35%) y 161 (38%). Por otra parte se midieron menores W en algunas líneas, siendo las diferencias significativas respecto a *S. lycopersicum* en las líneas 85, 92, 94, 111, 120, 151 y 175 con reducciones que oscilan entre 38 % y 48%.

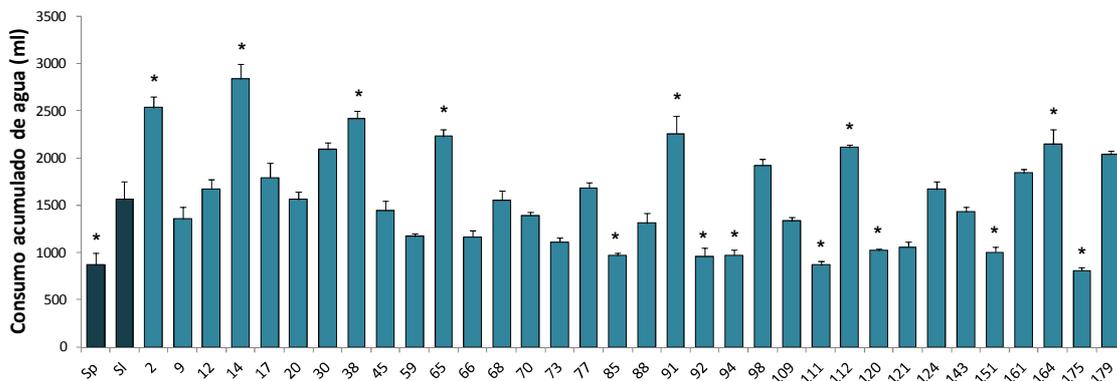


Figura 3.10.- Consumo acumulado de agua de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.2.4.- Uso eficiente del agua (WUE)

El uso eficiente del agua es un parámetro que toma especial relevancia en este estudio. Es un parámetro relativo que se calcula a partir de otros parámetros directos. En este estudio se han distinguido entre el uso eficiente del agua agronómico (*WUE_{av}*) medido como cantidad de biomasa vegetativa producida por volumen de agua consumida, y el uso eficiente del agua instantáneo (*WUE_i*) que es la relación entre la tasa de fotosíntesis neta y la transpiración.

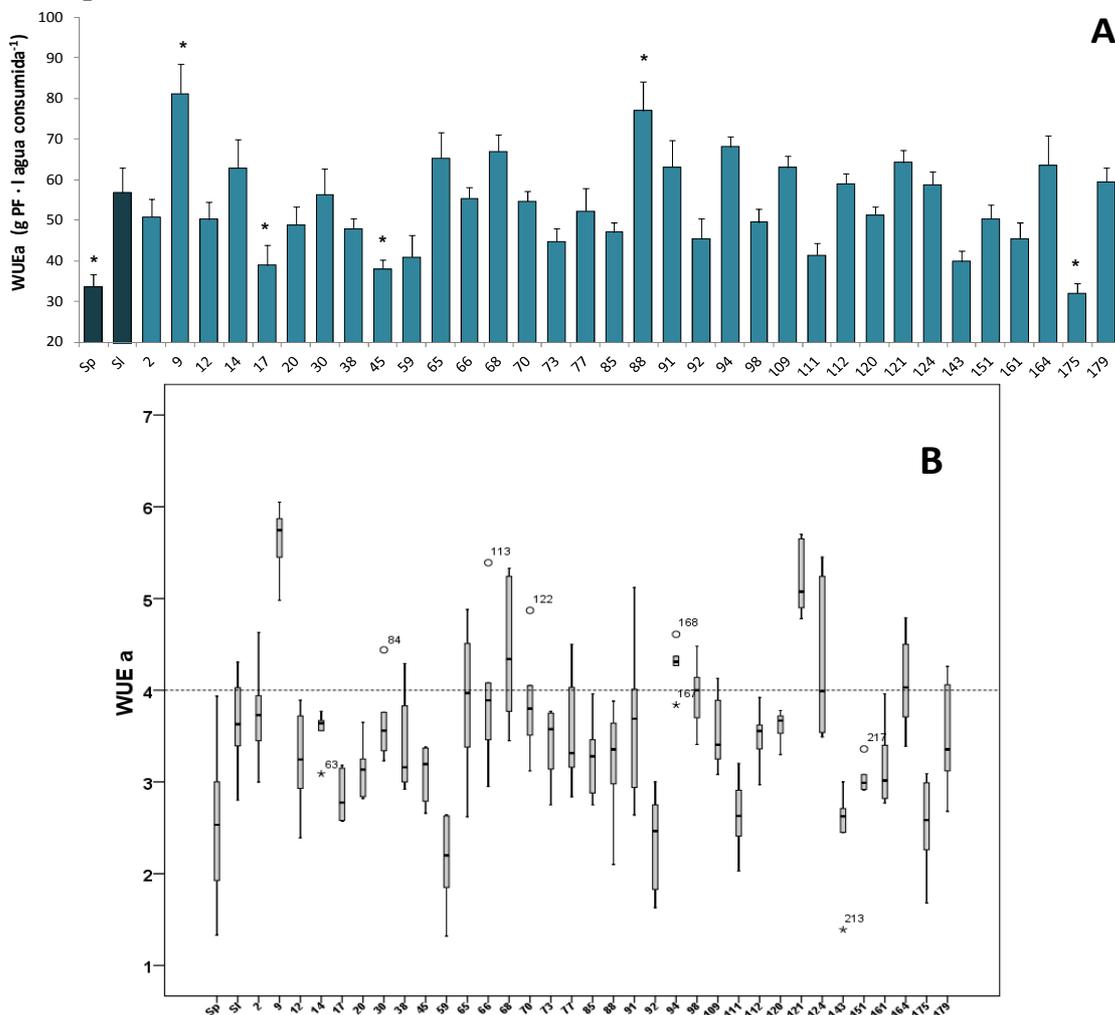


Figura 3.11.- Uso eficiente del agua agronómico, representado como gráfico de barras (A) y como diagrama de cajas (B), de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

A pesar de la variabilidad observada en el WUE_{av} (Fig. 3.11A), sólo las líneas 9 y 88 mostraron incrementos significativos respecto de los parentales con incrementos de aproximadamente el 50%. Por otra parte, las líneas *RIL* 17, 45 y 175 presentaron reducciones significativas de entre 31 y 44%. El diagrama de cajas confirmó la variabilidad en el WUE_{av} así como pequeñas dispersiones intralínea (Fig. 3.11B).

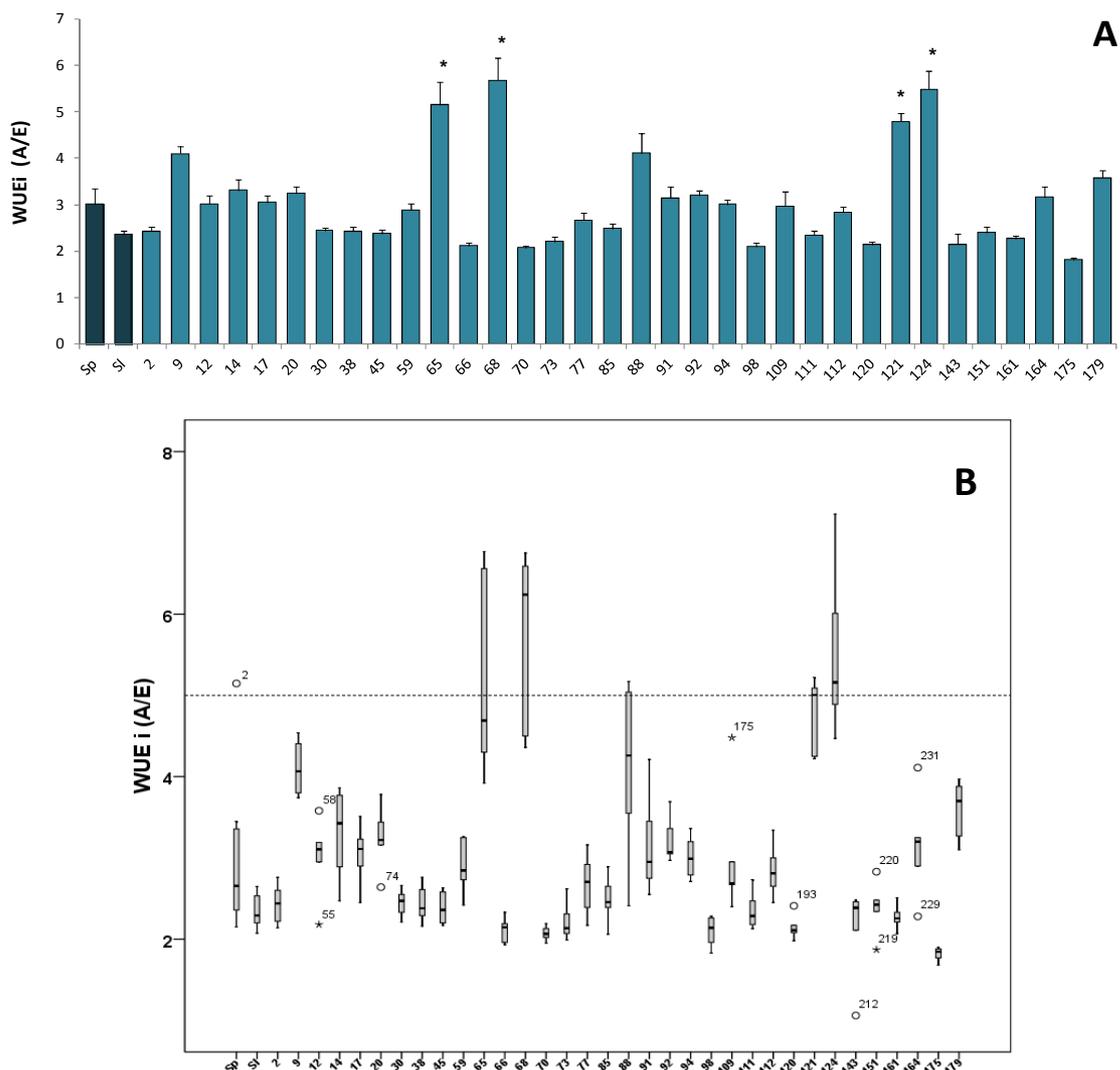


Figura 3.12.- Uso eficiente del agua instantáneo ($WUE_i = A/E$), representado como gráfico de barras (A) y como diagrama de cajas (B), de la población F8 recombinante (*RIL*) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

En cuanto al WUE_i , también se observó una importante variabilidad en la población *RIL* estudiada, mostrando cuatro líneas *RIL* incrementos significativos respecto de los parentales: líneas 65 (71%), 68 (90%), 121 (60%), 124 (82%) (Fig. 3.12A). Al igual que en el caso anterior, el diagrama de cajas confirmó tendencia de variabilidad, donde las líneas 65 y 68 mostraron una mayor separación respecto del parental cultivado (Fig. 3.12B).

1.2.5. - Fluorescencia de clorofilas

Para evaluar la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, se midió la fluorescencia de clorofilas (F_v/F_m) en una hoja madura. Se pudo constatar una importante variabilidad entre las líneas *RIL* evaluadas y entre éstas y los parentales (Fig. 3.13). Nueve líneas presentaron mayor F_v/F_m que los parentales, mientras que otras tantas presentaron valores menores, siendo estas reducciones significativas en las líneas 30, 120 y especialmente en la línea 175.

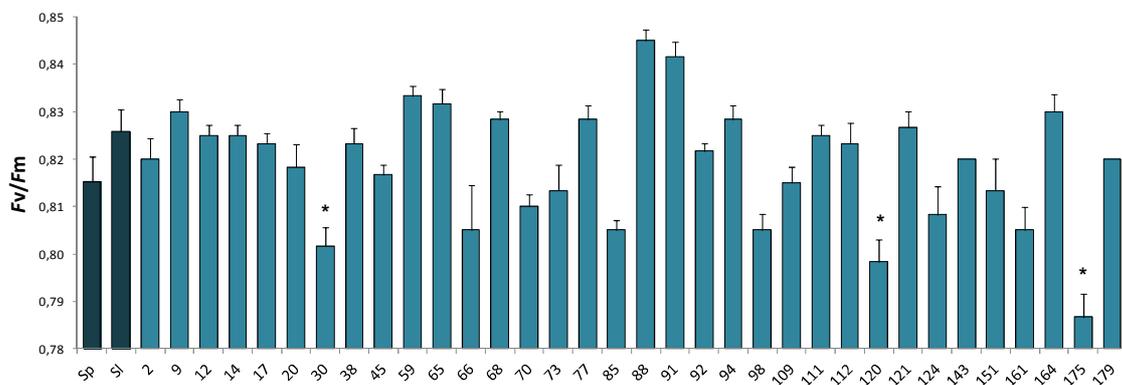


Figura 3.13.- Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) de la población F8 recombinante (*RIL*) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

1.3.- Niveles hormonales

Los valores medios de concentración de cada una de las hormonas analizadas, así como las relaciones entre ellas, se muestran en la tabla 3.1. Al igual que para los parámetros anteriores, existe una gran variabilidad en la población *RIL* para las hormonas analizadas.

La concentración foliar de *t-Z*, así como las CKs totales (*t-Z* + *rZ*) incrementaron de forma significativa en las líneas 92, 112 y 143 respecto del parental cultivado. El contenido de IAA varió de forma desigual en la población *RIL*, observándose una disminución significativa respecto de *S. lycopersicum* en las líneas 94, 111 y 151, mientras que aumentó en la línea 88. Además, las relaciones IAA/CK de la línea 111 y CK/ACC de las líneas 88 y 143 incrementaron de forma significativa respecto de los parentales.

La concentración de ABA mostró un fuerte incremento en la población *RIL* estudiada respecto del parental cultivado, siendo significativo para las líneas 2, 9, 12, 20, 30, 65, 68, 77, 91, 121 y 124. Respecto al contenido foliar de ACC el valor más elevado significativamente correspondió a la línea 98, duplicando los niveles observados en el parental silvestre. Otras 13 líneas superaron al parental, aunque dichas diferencias no fueron significativas.

La concentración foliar de SA de las líneas *RIL* 2 y 12 aumentó significativamente respecto de *S. pimpinellifolium*, mientras que JA fue significativamente mayor en las líneas 30, 77, 112 y 143.

Tabla 3.1.- Concentración de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), *trans*-zeatina (*t*-Z), ribo-zeatina (rZ), suma de citoquininas (CK), ácido indol-3-acético (IAA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y las relaciones ACC/ABA, CK/ACC y IAA/CK de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada medida representa la media de 3 plantas ± el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al P<0.05.

GENOTIPO	Concentración (ng · ml ⁻¹)								Relaciones hormonales		
	ACC	<i>t</i> -Z	rZ	CK	IAA	ABA	JA	SA	ACC/ABA	CK/ACC	IAA/CK
<i>Sp</i>	91.98±17.32	83.66±63.84	25.70±9.94	104.78±62.55	17.79±3.73	61.23±12.82	46.90±15.03	109.59±14.70	2.37±0.68	1.42±0.54	0.61±0.22
<i>SI</i>	77.40±18.45	89.94±59.77	19.04±7.21	108.98±59.37	21.36±4.68	66.82±16.43	69.99±26.60	101.78±25.98	2.12±0.66	2.42±1.00	0.76±0.25
2	48.65±7.91	7.50±2.04	29.54±4.91	37.04±5.57	22.70±3.26	198.19±20.86*	115.59±10.54	281.81±28.41*	0.26±0.06	0.88±0.19	0.75±0.21
9	22.76±1.72	26.34±3.03	46.64±6.37	72.98±6.09	10.78±1.40	180.43±14.32*	89.07±13.37	92.71±6.40	0.13±0.01	3.27±0.28	0.15±0.02
12	34.28±9.68	5.21±0.84	29.22±4.98	34.44±4.99	24.33±4.14	190.73±20.14*	143.46±17.68	260.02±35.21*	0.19±0.06	1.37±0.33	0.79±0.20
14	38.38±2.62	160.87±36.31	68.34±10.38*	229.21±36.15	33.40±2.14	69.54±9.05	43.85±4.57	125.32±25.61	0.61±0.09	6.13±1.02	0.17±0.03
17	81.97±4.70	189.20±90.82	7.26±0.96	196.46±91.61	8.09±0.84	26.58±2.72	40.71±12.15	118.36±8.73	3.19±0.31	2.66±1.44	0.07±0.02
20	36.66±3.18	7.13±1.10	40.68±5.90	47.80±6.75	18.33±2.45	153.72±9.61*	117.30±13.25	196.41±13.42	0.24±0.03	1.38±0.29	0.45±0.12
30	34.72±2.99	6.05±1.07	41.71±4.26	47.76±4.87	16.28±1.82	155.64±10.44*	163.53±8.33*	177.97±26.06	0.22±0.02	1.42±0.17	0.37±0.07
38	119.58±13.97	35.99±5.52	2.68±0.43	38.67±5.90	23.30±2.55	63.74±13.32	24.87±3.11	84.88±5.48	2.41±0.67	0.33±0.04	0.70±0.16
45	152.51±24.46	20.08±1.12	4.34±0.75	24.42±1.23	15.05±1.21	30.21±2.03	18.86±3.02	81.06±3.29	5.20±1.03	0.17±0.02	0.63±0.07
59	128.78±14.81	294.60±85.05	8.36±1.01	302.96±85.05	7.77±0.47	25.70±1.29	68.32±15.47	111.24±30.06	5.00±0.47	2.45±0.74	0.03±0.01
65	27.39±1.37	4.41±0.71	36.24±4.94	40.65±5.05	14.39±0.78	173.48±10.49*	41.01±2.30	128.11±18.74	0.16±0.01	1.50±0.20	0.39±0.06
66	104.78±9.52	15.37±1.66	3.11±0.73	18.48±1.83	19.99±1.93	23.46±2.56	22.39±3.52	80.20±4.66	4.63±0.50	0.19±0.03	1.17±0.21
68	12.10±0.94	11.42±2.71	38.97±7.60	50.40±9.90	17.76±0.84	151.34±16.26*	40.21±2.89	171.50±13.46	0.08±0.01	4.21±0.82	0.28±0.06
70	35.07±1.53	33.94±5.95	14.51±2.05	48.44±7.01	15.04±1.55	26.53±2.32	87.11±17.01	71.49±7.58	1.39±0.17	1.40±0.24	0.36±0.08
73	118.43±6.02	12.29±1.55	3.29±0.73	15.57±2.15	16.48±1.70	25.24±4.63	20.58±1.91	91.19±3.47	5.35±0.76	0.13±0.02	1.23±0.28
77	34.92±3.28	4.75±0.85	24.51±3.12	29.25±3.20	22.73±1.32	154.16±6.96*	158.76±12.48*	195.75±15.84	0.23±0.03	0.84±0.06	0.82±0.10
85	25.73±1.38	46.88±5.35	9.82±2.15	56.70±7.09	7.49±0.69	23.23±3.11	80.50±15.04	85.67±2.03	1.20±0.15	2.28±0.34	0.15±0.03
88	41.71±12.29	132.05±18.44	73.10±6.43*	205.15±18.33	38.31±3.26*	87.44±12.87	53.12±12.31	132.88±9.21	0.55±0.19	10.25±4.16*	0.19±0.01

Continuación...

GENOTIPO	Concentración (ng · ml ⁻¹)								Relaciones hormonales		
	ACC	t-Z	rZ	CK	IAA	ABA	JA	SA	ACC/ABA	CK/ACC	IAA/CK
91	46.57±4.77	91.45±17.74	69.27±11.03*	160.72±18.08	21.50±2.02	138.97±10.66*	43.31±3.87	75.69±5.43	0.35±0.05	3.65±0.50	0.14±0.02
92	168.07±8.46	626.38±260.68*	19.09±5.02	647.79±264.54*	7.70±0.64	23.32±3.27	79.94±14.87	60.38±4.04	7.70±2.66*	8.97±5.64	0.12±0.09
94	160.27±119.47	5.27±5.76	3.21±3.24	8.48±2.51	4.40±0.63*	99.88±31.19	12.86±5.24	51.43±36.24	1.68±0.39	0.06±0.02	0.89±0.35
98	223.97±91.23*	14.73±1.88	4.24±1.14	18.98±2.76	12.36±0.91	28.75±4.21	26.70±3.81	84.77±3.34	8.47±3.60*	0.12±0.03	0.74±0.13
109	154.95±26.77	364.98±80.26	6.18±0.38	371.17±80.27	6.21±0.51	18.96±1.62	133.77±22.00	71.29±14.55	6.72±1.99*	23.70±3.20	0.06±0.03
111	175.90±43.81	1.31±0.61	1.36±0.25	2.66±0.84	4.70±0.53*	119.88±22.53	7.30±0.56	210.61±78.31	1.71±0.37	0.02±0.00	2.56±0.62*
112	133.44±9.72	344.51±171.68*	10.22±1.91	755.79±171.05*	7.44±0.61	23.64±2.08	80.68±28.51*	90.32±12.14	3.75±0.73	41.26±34.88	0.03±0.01
120	27.16±2.85	22.07±2.41	7.08±1.36	29.15±3.53	12.63±1.11	35.37±6.72	55.60±8.60	86.65±8.86	0.85±0.13	1.18±0.21	0.49±0.12
121	16.13±2.66	8.36±0.66	29.97±2.46	21.92±1.74	13.71±3.03	151.18±14.50*	115.58±11.38	113.99±3.69	3.22±0.68	0.15±0.02	0.38±0.03
124	11.45±1.04	6.41±1.29	51.00±6.71	57.42±6.28	10.35±1.35	142.26±13.97*	28.91±3.30	154.95±20.98	0.09±0.01	5.12±0.50	0.18±0.01
143	133.44±3.67	344.51±31.27*	10.22±0.74	930.04±239.96*	7.44±0.06	23.64±0.91	80.68±2.30*	90.32±9.76	3.81±0.87	28.82±18.59*	0.03±0.01
151	142.20±24.03	13.66±2.72	11.59±1.94	25.25±11.36	5.06±0.93*	78.84±18.38	19.73±2.94	106.33±33.67	1.79±0.08	0.21±0.10	0.44±0.12
161	66.08±0.49	79.00±6.67	21.57±2.89	21.92±1.74	9.84±0.55	86.26±6.67	60.10±1.93	110.45±3.26	0.19±0.07	2.70±0.20	7.01±0.86
164	21.80±2.33	34.42±2.67	45.48±6.92	79.90±9.87	24.90±1.80	94.27±2.67	41.45±5.07	92.58±21.55	0.23±0.03	3.83±0.75	0.33±0.06
175	21.62±4.87	24.25±5.06	13.36±17.38	37.61±7.55	10.32±0.91	53.50±5.06	88.55±27.51	99.89±11.50	0.57±0.18	2.41±0.68	0.35±0.08
179	8.58±0.56	4.28±0.81	49.49±14.49	53.76±7.28	6.96±0.39	121.79±0.81	32.22±4.62	157.73±16.58	0.08±0.01	6.28±0.80	0.14±0.03

1.4.- Concentración de iones

Las concentraciones de los micronutrientes Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , P y Zn^{2+} y el macronutriente N no variaron significativamente con respecto a ambos parentales. Sólo se observaron diferencias significativas respecto de los parentales en las concentraciones de B^{3+} de las líneas 30 y 112, de Ca^{2+} de la línea 14, de Cu^{2+} de las líneas 91 y 164, y de S de las líneas 12, 68 y 20. Las concentraciones de iones en todas las líneas se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Contenido de los distintos nutrientes minerales de la población F8 recombinante (RIL) y de sus líneas parentales *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker y *Solanum pimpinellifolium* acc. TO 937. Cada medida representa la media de 3 plantas ± el error estándar. * indica que las diferencias son significativas respecto al parental doméstico *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker (SI) de acuerdo con el test de Tukey al P<0.05.

NUTRIENTES MINERALES (mg/l)													
GENOTIPO	C	MACRONUTRIENTES						MICRONUTRIENTES					
		PRIMARIOS			SECUNDARIOS			B ³⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Na ⁺
		N	P	K ⁺	S	Mg ²⁺	Ca ²⁺						
<i>Sp</i>	41,53±0,38	6,08±0,14	21,23±1,43	141,53±3,27	29,22±1,98	17,23±1,06	118,64±8,32	0,18±0,01	0,10±0,01	0,91±0,14	1,02±0,09	0,20±0,01	3,25±0,43
<i>Sl</i>	40,41±0,52	5,72±0,13	23,40±1,06	157,03±6,78	29,50±2,16	20,76±1,37	144,86±11,57	0,26±0,02	0,07±0,01	0,63±0,02	0,67±0,02	0,13±0,01	2,53±0,15
2	39,98±0,70	6,24±0,06	22,46±0,88	166,58±18,90	30,77±4,13	19,36±0,61	135,30±4,23	0,31±0,01	0,09±0,01	0,78±0,04	0,52±0,05	0,19±0,01	2,11±0,15
9	39,47±0,19	5,99±0,05	19,37±0,33	167,28±9,94	34,35±1,21	19,97±0,91	148,30±7,26	0,19±0,01	0,08±0,01	0,66±0,09	0,82±0,03	0,11±0,01	2,56±0,16
12	40,57±0,19	6,79±0,06	22,23±0,63	177,91±0,82	45,75±2,31*	15,22±0,20	119,37±5,66	0,29±0,01	0,12±0,01	0,90±0,04	0,81±0,01	0,21±0,01	2,58±0,38
14	38,12±0,64	6,04±0,35	24,20±2,77	192,05±25,34	32,55±1,87	23,07±1,94	258,50±57,18*	0,22±0,01	0,10±0,01	0,51±0,01	1,10±0,26	0,13±0,01	4,09±0,80
17	40,01±0,47	5,86±0,02	21,92±1,07	188,42±7,65	25,93±0,95	21,75±0,86	159,81±5,30	0,20±0,01	0,06±0,01	0,66±0,01	0,91±0,12	0,10±0,01	2,79±0,20
20	39,38±0,39	5,86±0,05	25,06±0,61	138,68±1,98	51,37±3,47*	21,51±1,01	159,63±4,68	0,36±0,02	0,09±0,01	0,63±0,02	0,67±0,03	0,17±0,01	2,58±0,42
30	39,80±0,29	6,00±0,25	19,82±0,58	129,03±0,83	38,99±0,21	21,06±0,30	172,40±0,99	0,49±0,01*	0,10±0,01	0,84±0,01	0,79±0,02	0,17±0,01	3,04±0,16
38	40,38±0,64	5,53±0,21	22,13±0,71	157,81±12,17	29,63±1,55	21,02±0,96	163,56±3,96	0,24±0,02	0,08±0,01	0,72±0,09	0,72±0,02	0,18±0,01	4,38±0,88
45	41,38±0,06	5,97±0,21	19,57±0,96	159,09±10,01	34,36±2,11	17,76±0,54	141,64±4,51	0,24±0,02	0,08±0,01	0,63±0,04	1,01±0,11	0,15±0,01	2,48±0,18
59	39,53±0,31	6,60±0,11	27,11±0,45	175,07±5,49	36,32±0,91	20,72±1,85	140,70±5,36	0,20±0,01	0,09±0,01	0,98±0,14	0,67±0,03	0,17±0,01	2,94±0,08
65	36,34±0,41*	5,70±0,01	27,55±2,93	137,34±11,91	40,62±2,76	22,48±0,70	242,83±7,62	0,32±0,01	0,10±0,01	0,88±0,10	1,49±0,15	0,17±0,01	4,36±0,25
66	41,33±0,28	6,13±0,04	22,28±0,82	146,53±4,81	20,35±1,38	20,27±1,31	144,39±3,15	0,20±0,01	0,08±0,01	0,53±0,04	1,03±0,07	0,19±0,01	2,89±0,16
68	38,17±0,97	6,13±0,08	28,70±2,67	171,15±7,05	49,93±4,15*	19,66±1,90	171,71±12,57	0,29±0,01	0,09±0,01	0,73±0,04	0,66±0,04	0,14±0,02	4,86±0,79
70	41,43±0,61	6,52±0,13	22,82±1,36	159,91±8,08	30,29±1,84	20,48±0,95	133,09±5,30	0,28±0,02	0,09±0,01	1,06±0,16	1,21±0,02	0,17±0,01	2,01±0,08
73	42,03±0,32	6,06±0,05	21,32±0,72	134,56±2,91	39,79±2,35	16,39±0,66	139,27±2,55	0,29±0,02	0,10±0,01	0,62±0,07	0,89±0,03	0,16±0,01	2,86±0,11
77	38,82±0,28	6,48±0,04	22,51±1,74	134,89±3,38	38,55±2,22	22,55±0,86	166,54±2,17	0,31±0,04	0,11±0,01	0,59±0,03	0,90±0,05	0,18±0,01	2,80±0,18
85	40,30±0,35	5,84±0,31	26,94±0,49	162,38±4,71	28,59±1,14	21,04±2,44	131,56±11,74	0,31±0,01	0,07±0,01	0,84±0,07	0,93±0,19	0,17±0,02	3,96±0,34
88	38,03±0,37	6,48±0,09	22,58±0,48	187,23±7,76	39,59±3,58	20,51±0,55	246,03±45,43	0,19±0,03	0,15±0,01	0,62±0,04	1,47±0,35	0,15±0,01	3,63±0,29

Continuación...

NUTRIENTES MINERALES (mg/l)													
GENOTIPO	C	MACRONUTRIENTES						MICRONUTRIENTES					Na ⁺
		PRIMARIOS			SECUNDARIOS			B ³⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	
		N	P	K ⁺	S	Mg ²⁺	Ca ²⁺						
91	38,02±0,48	6,18±0,11	24,39±0,96	184,47±5,89	41,13±2,21	24,93±1,47	240,33±43,78	0,25±0,02	0,17±0,01*	0,75±0,08	1,39±0,02	0,11±0,01	3,58±0,20
92	40,69±0,28	6,45±0,08	24,12±0,51	143,50±7,22	23,46±0,69	19,86±0,28	158,20±1,10	0,25±0,01	0,08±0,01	0,68±0,04	0,54±0,01	0,14±0,01	2,90±0,27
94	40,76±0,60	6,43±0,15	20,09±1,07	151,10±3,19	23,90±0,81	15,96±1,15	124,23±8,24	0,22±0,01	0,10±0,01	0,78±0,03	0,72±0,09	0,19±0,02	2,37±0,16
98	40,68±0,24	5,88±0,03	17,98±0,52	180,97±0,54	32,42±1,17	20,12±0,45	133,64±4,72	0,23±0,01	0,08±0,01	0,70±0,03	0,96±0,10	0,13±0,01	2,50±0,15
109	41,10±0,94	6,53±0,19	22,17±2,25	150,51±6,25	29,91±3,70	18,36±1,13	150,19±14,74	0,25±0,01	0,08±0,01	0,83±0,02	0,74±0,12	0,13±0,02	3,26±0,39
111	40,28±0,17	6,17±0,13	20,67±0,17	147,84±1,29	27,73±1,26	16,57±0,41	135,03±3,17	0,22±0,01	0,07±0,01	0,65±0,02	1,00±0,12	0,17±0,01	3,38±0,27
112	38,97±0,54	6,15±0,19	25,37±0,62	145,68±4,15	28,51±1,24	24,76±0,68	190,32±10,63	0,40±0,02*	0,07±0,01	0,81±0,04	0,86±0,02	0,16±0,01	3,45±0,24
120	40,58±0,01	6,36±0,03	22,14±0,21	186,79±0,83	34,98±0,45	17,07±0,11	113,76±0,96	0,28±0,01	0,10±0,01	0,88±0,03	0,90±0,03	0,20±0,01	2,78±0,11
121	41,15±0,13	6,19±0,04	19,56±0,26	175,20±2,05	38,71±0,97	16,91±0,21	117,98±1,32	0,20±0,01	0,10±0,01	0,92±0,08	0,75±0,06	0,12±0,01	2,75±0,11
124	39,70±0,45	5,83±0,05	22,92±1,05	184,06±8,71	29,16±2,58	16,58±0,11	126,43±5,31	0,18±0,01	0,10±0,01	1,09±0,07	0,69±0,12	0,13±0,01	3,12±0,25
143	40,30±0,18	6,36±0,12	23,17±1,24	160,24±11,28	39,54±1,08	20,07±0,31	155,45±6,48	0,32±0,02	0,10±0,01	0,80±0,11	1,07±0,06	0,16±0,01	3,31±0,08
151	40,13±0,60	6,09±0,10	23,37±2,99	158,16±5,77	27,72±1,14	19,61±1,82	124,74±5,63	0,21±0,02	0,08±0,01	0,84±0,04	0,84±0,06	0,18±0,03	1,94±0,11
161	40,59±0,17	6,06±0,06	24,39±0,63	184,15±3,89	33,55±3,25	16,19±0,34	134,29±1,38	0,26±0,02	0,08±0,01	0,53±0,01	1,21±0,08	0,15±0,01	2,48±0,09
164	40,24±0,44	6,13±0,14	21,76±0,56	161,07±2,97	32,26±1,11	19,28±0,59	135,13±0,62	0,20±0,01	0,19±0,01*	0,63±0,02	0,74±0,05	0,13±0,01	2,22±0,10
175	41,42±0,31	5,98±0,07	24,83±0,57	155,30±3,49	33,73±1,98	16,80±0,96	118,54±3,56	0,24±0,01	0,09±0,01	1,03±0,07	0,93±0,10	0,17±0,02	3,72±0,31
179	38,66±0,37	5,60±0,39	27,75±0,32	182,44±5,43	35,24±0,77	18,49±0,28	157,82±7,04	0,35±0,01	0,12±0,01	1,26±0,04	0,90±0,04	0,17±0,01	5,00±0,03

1.5.- Análisis de componentes principales

Para estudiar la contribución real de los parámetros fisiológicos, hídricos y hormonales analizados a la variabilidad total de la población y en relación a la productividad y uso eficiente del agua, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 3.14).

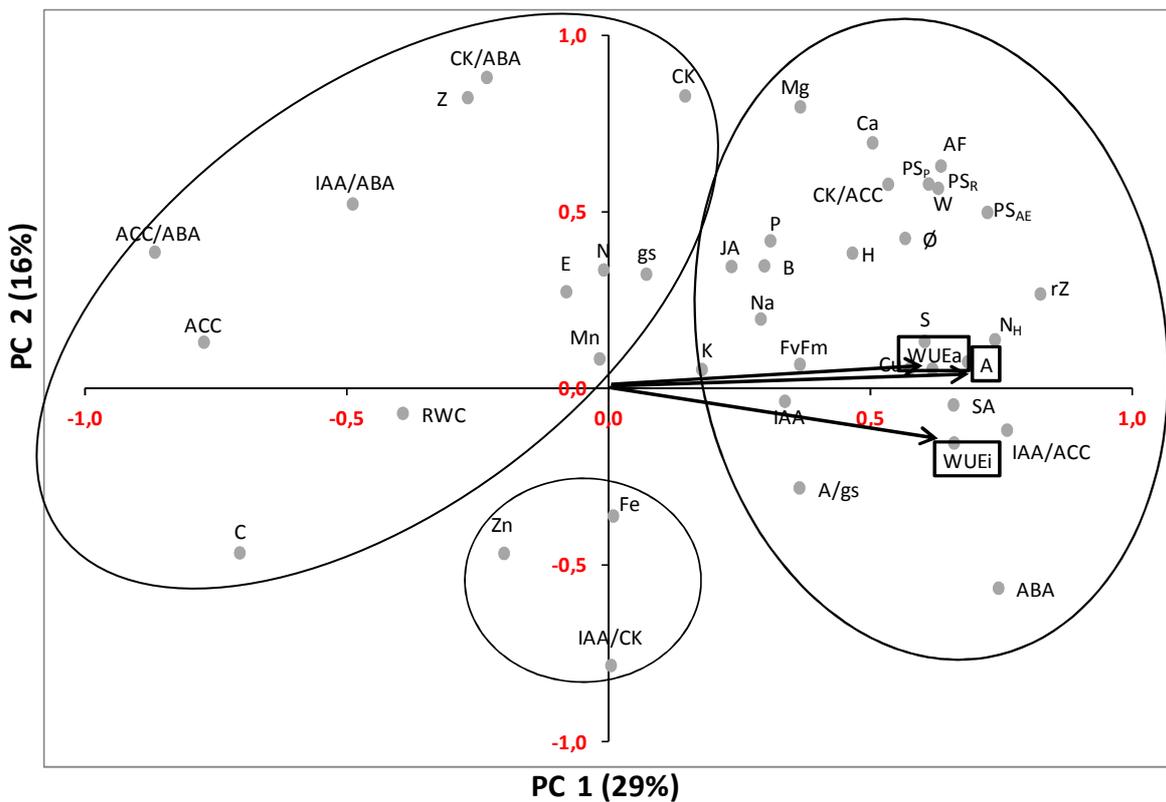


Figura 3.14.- Análisis de componentes principales (PCA, del inglés Principal Component Analysis) donde se muestra la posición relativa de los distintos parámetros agronómicos y fisiológicos estudiados en la población RIL y en las líneas parentales. Las flechas indican vectores propios que representan la fuerza (dada por la longitud del vector) y la dirección de la variable en relación con los dos primeros componentes principales (PC1, PC2). Los círculos (cluster) encierran aquellas variables fisiológicas altamente relacionadas. (Factores hormonales: Z, ACC, ABA, rZ, SA, IAA, JA; Relaciones hormonales: ACC/ABA, IAA/ABA, CK/ABA, CK, IAA/CK, IAA/ACC; CK/ACC; Factores iónicos: C, N, Mn, Fe, Zn, Mg, Ca, P, B, Na, K, Cu, S; Parámetros vegetativos: AF = área foliar; PS_R = peso seco raíz; PS_{AE} = peso seco parte aérea; PS_P = peso seco planta entera; H = altura; N_H = n° de hojas; Ø = calibre tallo; Parámetros hídricos y fotosintéticos: W = consumo de agua; WUE_a = uso eficiente del agua agronómico; WUE_i = uso eficiente del agua instantáneo; A = tasa fotosintética; E = tasa de transpiración; g_s = conductancia estomática; FvFm = eficiencia del PSII; A/g_s)

Los dos componentes principales (PCs) representan un 45% de la variabilidad total de la población, representando un 29% de variabilidad el

componente 1 y un 16 % el componente 2. Tanto la fotosíntesis neta como los parámetros de uso eficiente del agua agronómico e instantáneo se asociaron al PC1. Además, la mayoría de los parámetros de crecimiento, algunos nutricionales (Cu, S, K, B, P, Ca, P y Mg), e importantes factores hormonales (IAA, ABA, rZ y las relaciones IAA/ACC y CK/ACC) covariaban dentro del mismo cluster. En un segundo cluster se asociaron aquéllos parámetros que covariaban en sentido inverso (negativo) a los parámetros de productividad y uso eficiente del agua. Cabe destacar el precursor del etileno ACC, así como las relaciones hormonales ACC/ABA e IAA/ABA.

A pesar de agruparse en el mismo cluster (Figura 3.14), WUE_{av} (en base a biomasa vegetativa) y W no se correlacionaban significativamente ($r=0,157$, $n=200$), aunque si se correlacionaba significativamente el WUE_{av} con parámetros vegetativos como AF ($r=0,512^{**}$, $n=200$) y PS_P ($r=0,605^{**}$, $n=200$). Al igual que ocurre con WUE_{av} , el WUE_i tampoco se correlacionó significativamente con el W ($r=0,120$, $n=200$), existiendo sin embargo una relación significativa con el PS_P ($r=0,278^{**}$, $n=200$).

Como hemos comentado en el primer párrafo, los parámetros fotosintéticos también covariaban con el WUE_{av} y el WUE_i . De hecho A se asociaba al componente 1 junto con WUE_{av} ($r=0,536^{**}$, $n=200$), mostrando además una correlación significativa con parámetros de biomasa vegetativa como PS_P ($r=0,380^{**}$, $n=200$) y AF ($r=0,310^{**}$, $n=200$) y con parámetros de consumo de agua W ($r=0,185^{**}$, $n=200$). F_v/F_m también se asociaba al componente 1 covariando con parámetros vegetativos como PS_P ($r=0,200^{**}$, $n=200$).

Los parámetros de intercambio gaseoso se encontraban agrupados en un cluster diferente a los parámetros vegetativos y fotosintéticos (Figura 3.14). Lllaman la atención las correlaciones negativas y significativas entre F_v/F_m y g_s

($r = -0.284^{**}$, $n = 200$) y por supuesto entre F_v/F_m y E ($r = -0.367^{**}$, $n = 200$). Respecto a los parámetros hormonales, existe una significativa correlación entre la $r-Z$ y el F_v/F_m ($r = 0,396^{**}$, $n=197$).

Dado que WUE_i se define como el cociente entre A y E , era de esperar que covariara con A ($r=0,642^{**}$, $n=200$), y que se encontrara en un cluster diferente a E ($r = -0,548^{**}$, $n=200$), así como a g_s ($r = -0,533^{**}$, $n=200$).

Con respecto a los factores hormonales, tanto SA como la citoquinina rZ , el IAA, JA, ABA, así como las relaciones IAA/ACC y CK/ACC se asociaron en el mismo cluster que los factores de crecimiento, la fotosíntesis, el WUE_{av} y el WUE_i (Figura 3.14). Destaca la estrecha correlación positiva que existe entre SA y WUE_{av} ($r = 0,381^{**}$, $n=200$) y la ausencia de correlación significativa entre JA y WUE_{av} ($r = 0,035$, $n=200$). Por otra parte, en el extremo opuesto del PCA, en un cluster diferente a los parámetros de crecimiento, fotosíntesis y hormonas como ABA, se encuentra el precursor del etileno ACC, así como la relación ACC/ABA, estando por ello asociados negativamente con el tamaño de hoja ($r = -0,332^{**}$, $n=200$) y el WUE_{av} ($r = -0,231^{**}$, $n=200$).

La mayoría de parámetros nutricionales se encuentran agrupados en el mismo cluster que los parámetros vegetativos e hídricos (Figura 3.14). Cu^{2+} es un parámetro importante ya que se encuentra asociado al componente 1 del PCA y además presenta una fuerte relación con parámetros fotosintéticos como A ($r = 0,331^{**}$, $n=200$) y F_v/F_m ($r = 0,249^{**}$, $n=200$) y con parámetros de crecimiento como N_H ($r = 0,261^{**}$, $n=200$) y H ($r = 0,256^{**}$, $n=200$). A pesar de encontrarse más alejado en el cluster, destaca la correlación que existe entre el Mg^{2+} y el desarrollo radicular ($r = 0,408^{**}$, $n=200$) y crecimiento vegetativo ($r = 0,384^{**}$, $n=200$), así como entre el Ca^{2+} y el PS_P ($r = 0,475^{**}$, $n=200$). F_v/F_m también se encuentra correlacionado con el B^{3+} ($r = 0,215^{**}$, $n=200$) y con el Na^+ ($r = 0,287^{**}$, $n=200$).

1.6.- Selección de líneas

Con los datos obtenidos en este ensayo realizamos un análisis preliminar exploratorio de las dispersiones entre ciclos. Para corregir dichas dispersiones calculamos para cada ciclo y para cada variable las variaciones de los valores medidos con respecto al registrado en el parental cultivado. Después de hacer esto y generar un fichero de medias, tipificamos las variables.

Para la selección de líneas se hizo un *PCA* agrupando las variables en torno al consumo de agua y la biomasa vegetativa (Imagen 3.5. de material y métodos). A partir del *PCA* se generó un gráfico de regresión de las puntuaciones de los factores (Biplot). Esto viene a representar los residuos de la regresión entre la biomasa y consumo de agua.

En cada cuadrante se seleccionaron las líneas más alejadas de los ejes y de la intersección entre ellos (Imagen 3.5. de material y métodos). Estas líneas representan las cuatro combinaciones posibles entre consumo de agua y biomasa y se utilizarán en el ENSAYO 2:

Baja biomasa/Bajo consumo de agua = Líneas 175 y 121 (*bw*)

Alta biomasa/bajo consumo de agua = Líneas 65 y 59 (*Bw*)

Baja biomasa/alto consumo de agua = Líneas 66 y 94 (*bW*)

Alta biomasa/alto consumo de agua = Líneas 38 y 112 (*BW*)

2.- ENSAYO 2: ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LA RAÍZ Y LA PARTE AÉREA SOBRE EL USO EFICIENTE DEL AGUA

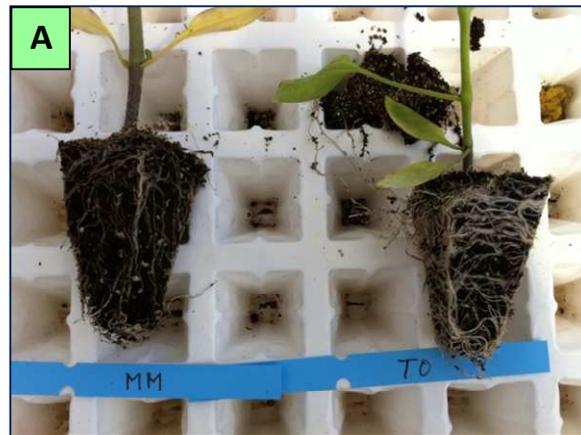
Con objeto de determinar la influencia relativa de las características de la raíz y de la parte aérea sobre el *WUE*, se llevó a cabo un ensayo con injertos recíprocos con cuatro de las líneas seleccionadas en el ensayo anterior teniendo en cuenta la correlación entre biomasa (*B*) y consumo de agua (*W*): líneas 38 (*BW*), 65 (*Bw*), 66 (*bW*) y 175 (*bw*). El ensayo se prolongó durante 7 semanas en ausencia de estrés en un invernadero de condiciones controladas.

2.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta

2.1.1.- Biomasa vegetativa

Durante la fase de semillero, y justo antes de proceder al trasplante en invernadero, ya se observaron diferencias entre líneas. En la Imagen 3.1A se muestra una comparativa de las raíces de ambos parentales, destacando el mayor número de raíces del parental silvestre. En la fotografía inferior podemos ver el predominio que tenía la parte aérea frente a la raíz en ambas combinaciones mostradas (Imagen 3.1B), destacando la mayor biomasa de la línea 65-*Bw* sin injertar y de la combinación 65/66 donde la línea 65-*Bw* actuaba como parte aérea, frente a la menor biomasa de la línea 66-*bW* y la combinación 66/65 en la que la línea 66-*bW* intervenía como parte aérea. Al final del ensayo estas diferencias son mucho más llamativas, resaltando aun más el predominio que tenía la parte aérea frente a la raíz en las distintas combinaciones de injertos recíprocos (Imagen 3.2). Esta fotografía muestra claramente el mayor tamaño de raíz de la línea 65-*Bw* (línea seleccionada por su mayor vigor) y de la

combinación 65/175, donde la línea 65-*Bw* ejercía como parte aérea (Imagen 3.2B).



S. lycopersicum *S. pimpinellifolium*



65/66 65 66 66/65

Imagen. 3.1.- Fotografías de (A) las raíces de los parentales *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc. TO-937) y (B) de las líneas RIL 65 y 66 y los injertos recíprocos 65/66 y 66/65 antes de realizar el en el momento del trasplante a invernadero.

Por tanto, de forma global, y en lo que se refiere a los parámetros de biomasa, se confirma que las líneas 38-*BW* y 65-*Bw* seleccionadas de alto vigor en el ensayo anterior mantienen su peso fresco en este ensayo. Lo mismo ocurre con las líneas seleccionadas de bajo vigor 175-*bw* y 66-*bW*. La línea 38-*BW* fue la más vigorosa, con mayor biomasa de raíz y parte aérea, tanto sin injertar como

autoinjertada o usada como parte aérea en injertos recíprocos con las otras líneas *RIL* seleccionadas (Fig. 3.15A-C). La línea que presentó una menor biomasa tanto de raíz como de parte aérea fue la 175-*bw*. Además, todas las combinaciones que utilizaban la línea 175-*bw* como parte aérea presentaban una reducción significativa de biomasa (Fig. 3.15A-C) No se observaron diferencias significativas en ningún caso para la relación parte aérea/raíz (Fig. 3.15D).



Imagen. 3.2.- (A) Vista general de las raíces de todas las plantas utilizadas y (B) detalle de las raíces de las líneas *RIL* 65 y 175 y de las combinaciones 175/65 y 65/175 al final del período de ensayo.

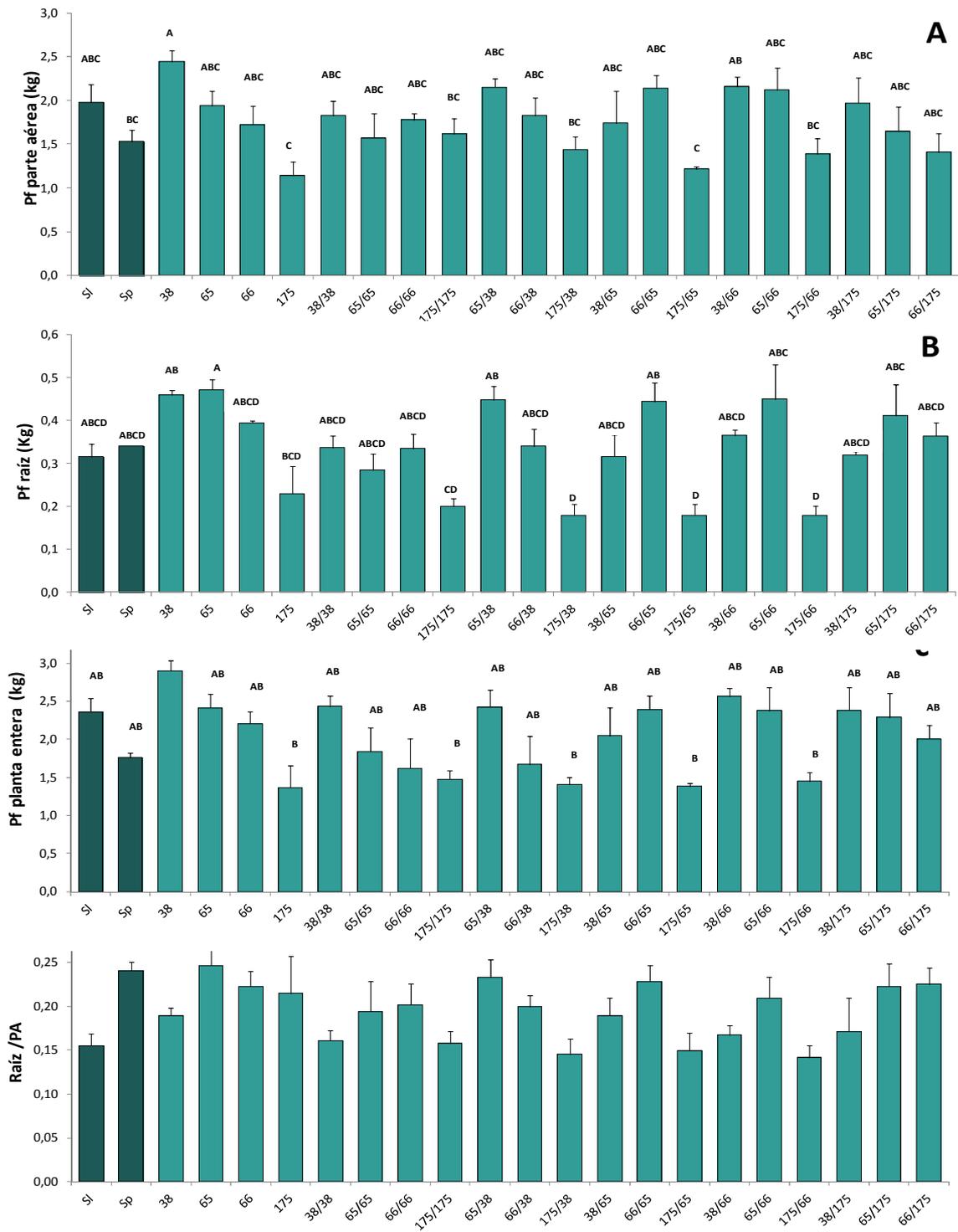


Figura 3.15.- Peso fresco de la parte aérea (A), peso fresco de la raíz (B), peso fresco de la planta entera (C) y relación raíz/parte aérea (D) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

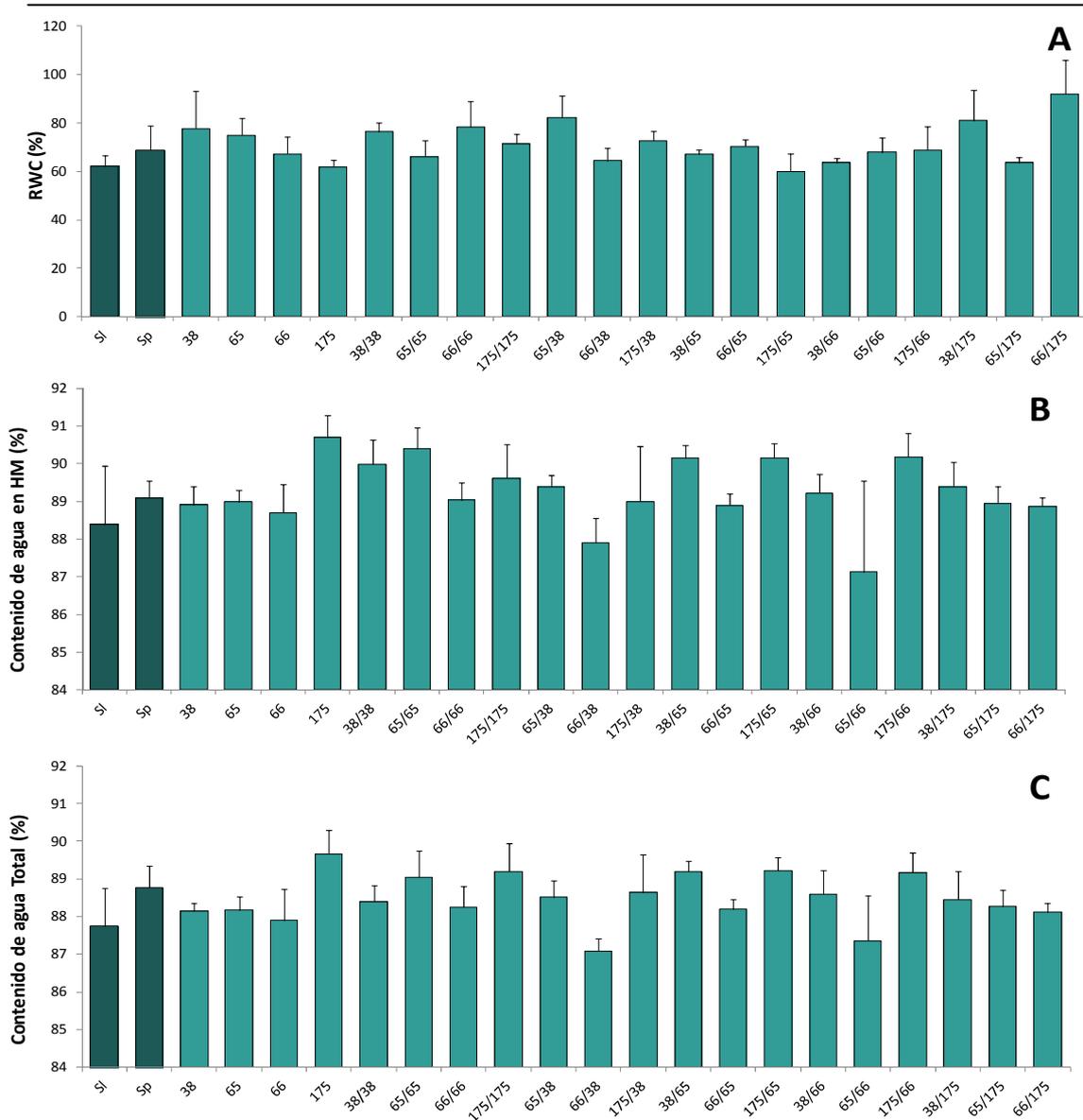


Figura 3.17.- Contenido relativo de agua (A), contenido de agua de hoja madura (B) y contenido de agua total (C), de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. MoneyMaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.2.2.- Medidas de intercambio gaseoso: tasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración

Las medidas de tasa de fotosíntesis (A) (Fig. 3.18) revelaron una gran variabilidad en las distintas líneas y combinaciones utilizadas, sin ser

significativas dichas diferencias. La línea 38-BW, de alto vigor, presentaba una mayor tasa de fotosíntesis sin injertar, auto-injertada o como parte aérea de las líneas RIL 65-BW y 175-bw. Por el contrario, la línea 175-bw, con una menor biomasa, redujo la tasa fotosintética de las combinaciones en las que actuaba como parte aérea.

No se observaron diferencias significativas para la conductancia estomática (g_s) (Fig. 3.19) ni para la tasa de transpiración (Fig. 3.20) entre las distintas líneas RIL ni en las combinaciones de injertos recíprocos.

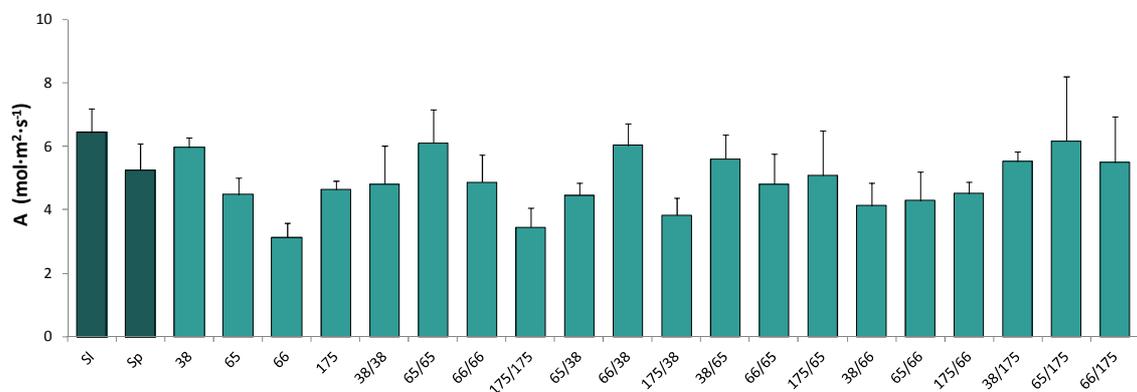


Figura 3.18.- Tasa de fotosíntesis de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

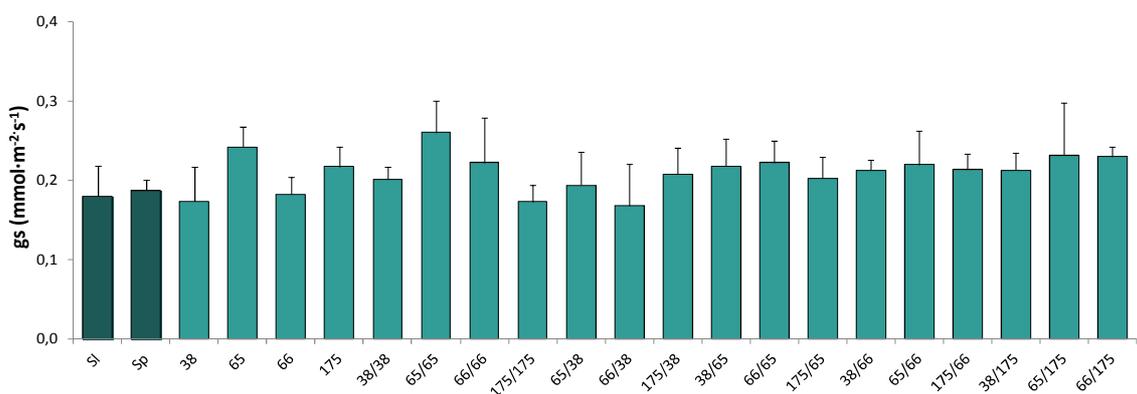


Figura 3.19.- Conductancia estomática de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

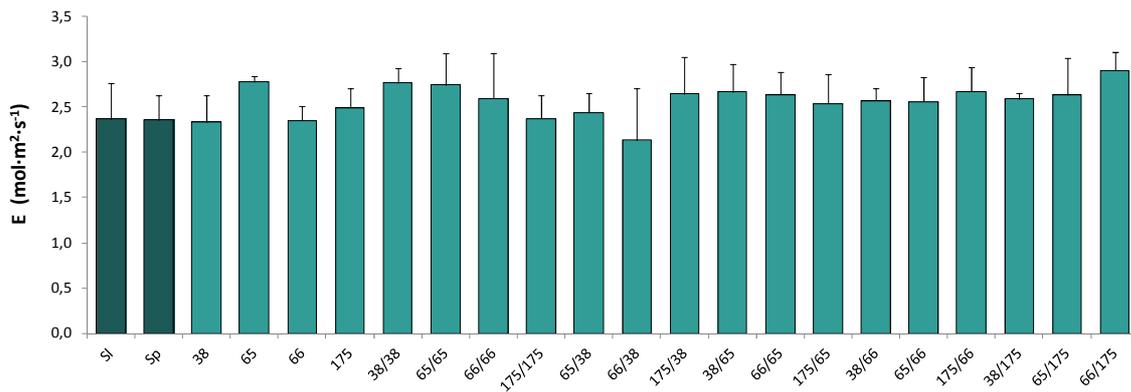


Figura 3.20.- Tasa de transpiración de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas ± el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.2.3.- Consumo acumulado de agua

Globalmente se observó variabilidad en el consumo acumulado de agua. La línea 38-BW, tanto sin injertar como usada como parte aérea, consumió un 30% más de agua que ambos parentales (Fig. 3.21), mientras que en la línea 175-bw se observó una disminución significativa del consumo de agua de hasta un 25% sin injertar y un 20% cuando actuaba como parte aérea.

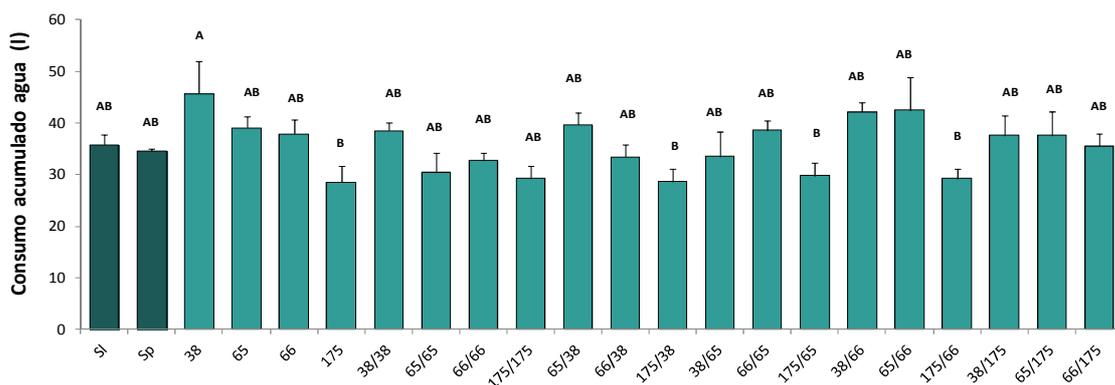


Figura 3.21.- Consumo acumulado de agua de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas ± el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.2.4.- Uso eficiente del agua

Se observó una importante variabilidad entre las distintas líneas y combinaciones en cuanto al WUE_{av} (en base vegetativa), destacando el papel predominante de la parte aérea en los injertos recíprocos (Fig. 3.22). En particular la línea 175-*bw*, sin injertar o utilizada como parte aérea del resto de líneas *RIL* dio lugar a una disminución significativa en el WUE_{av} de hasta en un 40% en comparación con las combinaciones de mayor WUE_{av} .

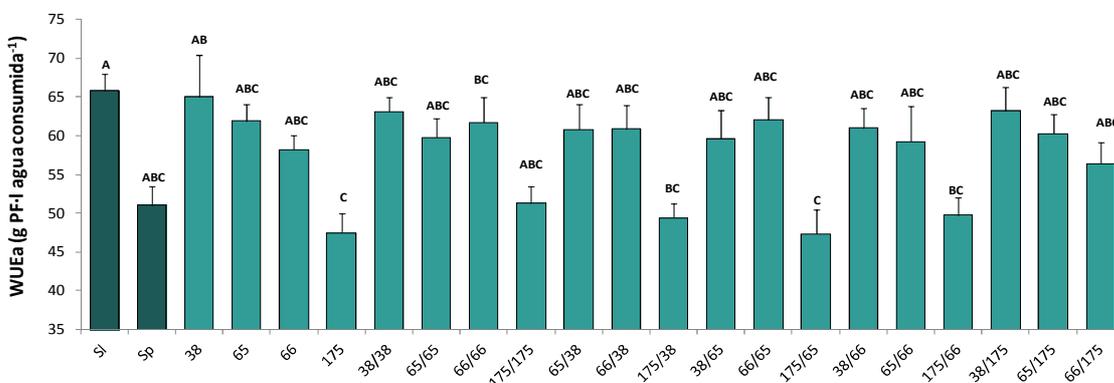


Figura 3.22.- Uso Eficiente del Agua Agronómico de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas *RIL* seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el WUE_i (Fig. 3.23), destacando únicamente la combinación 66/38, que duplicó el valor del parental registrado por ambos parentales.

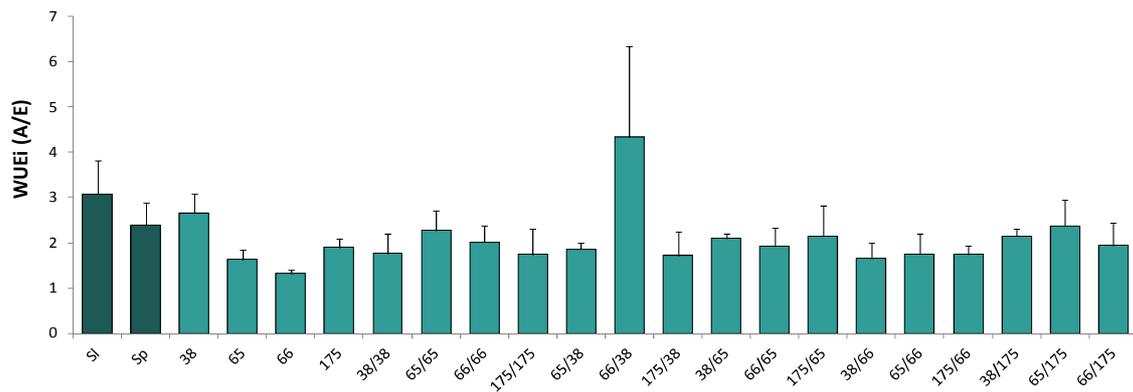


Figura 3.23.- Uso Eficiente del Agua Instantáneo de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.2.5. - Potencial hídrico foliar

En general, el potencial hídrico foliar tendió a disminuir en algunas de las combinaciones estudiadas respecto del parental cultivado, sin embargo no se observaron diferencias significativas en ningún caso (Fig. 3.24).

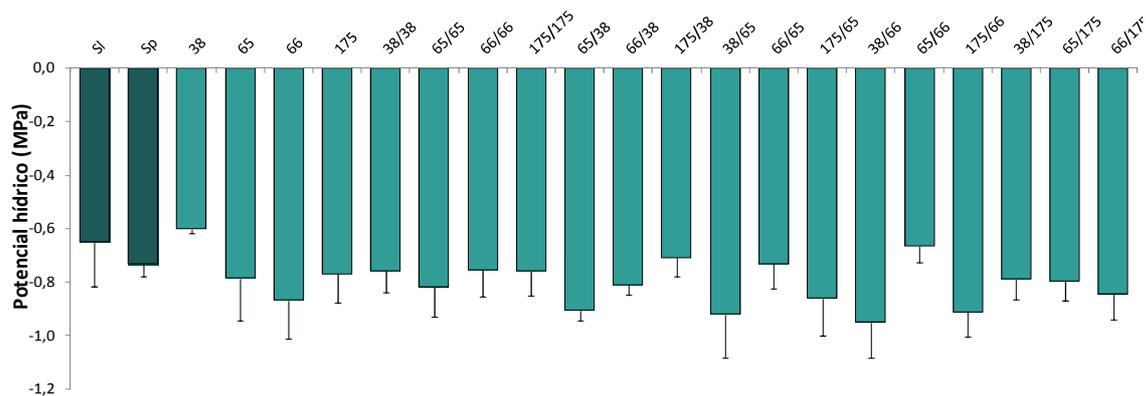


Figura 3.24.- Potencial hídrico foliar de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.2.6. - Fluorescencia e índice de clorofilas

Tanto la eficiencia del fotosistema II en hojas adaptadas a la oscuridad, F_v/F_m (Fig. 3.25A), como el índice de clorofilas (IC) (Fig. 3.25B), relacionado con la integridad de este pigmento fotosintético, fueron menores en las combinaciones donde la línea 66-*bW* actuaba como parte aérea, así como en la línea 66-*bW* sin injertar, resultando significativo en el caso del IC. Para el resto de líneas e injertos recíprocos no se observaron diferencias significativas.

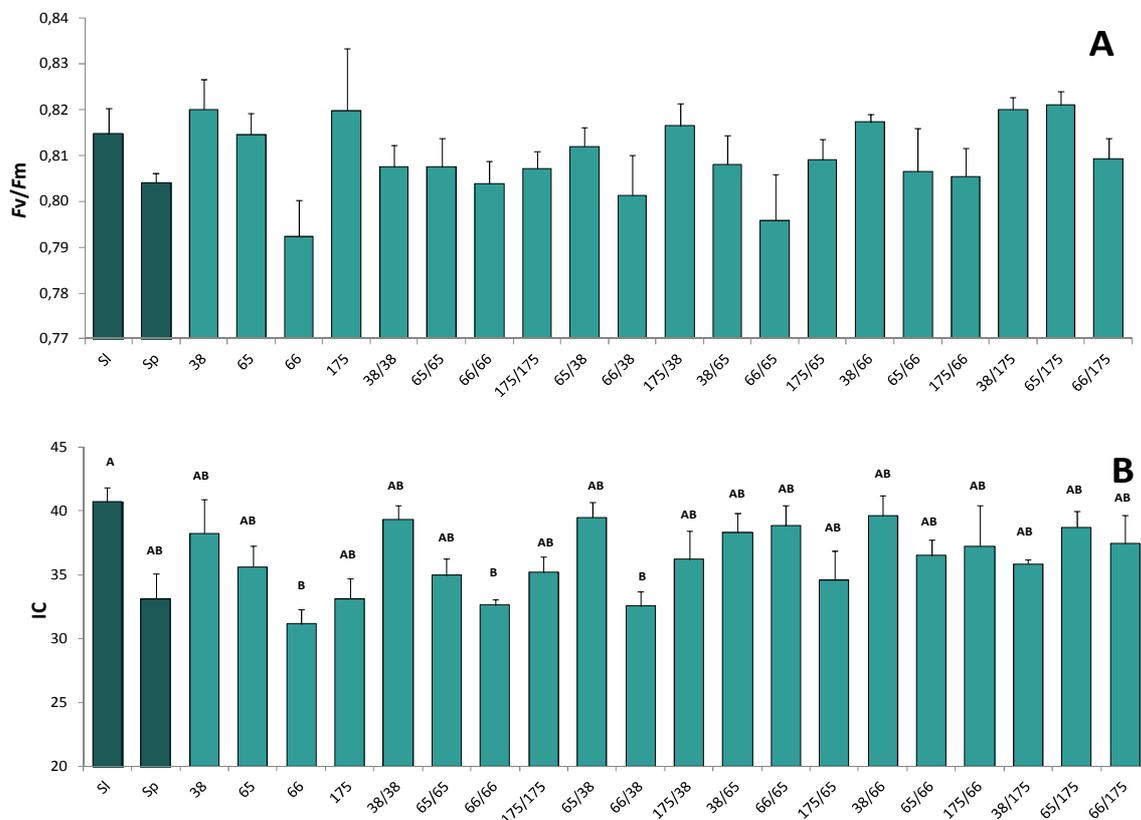


Figura 3.25.- Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) (A) e índice de clorofilas (B) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.3.- Niveles hormonales

2.3.1.- Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

En general se observaron diferencias en la concentración del precursor del etileno ACC entre las distintas líneas y combinaciones estudiadas. Específicamente, para la línea 175-*bw* se observó una disminución significativa de la concentración de ACC en xilema de las plantas sin injertar y auto-injertadas, así como cuando era utilizada como parte aérea de las otras RIL (Fig. 3.26).

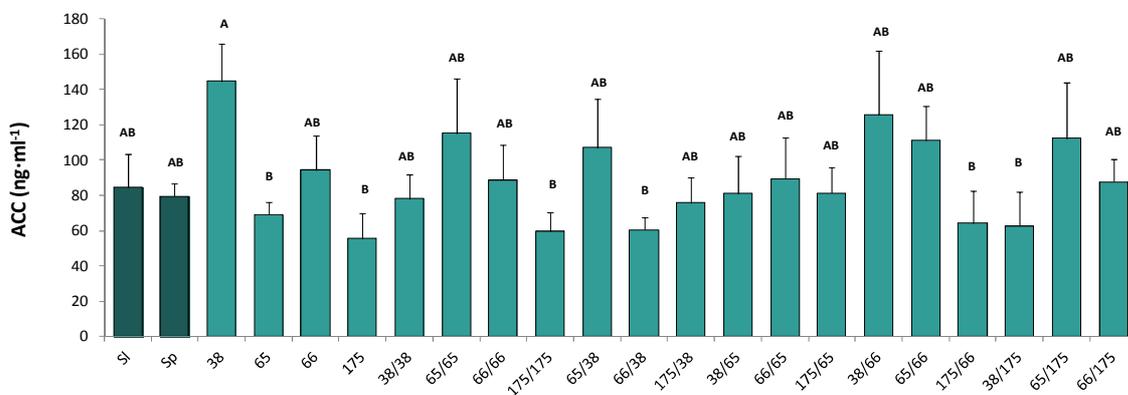


Figura 3.26.- Concentración de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.3.2.- Citoquininas

El contenido de la CK más activa en tomate, *t-Z*, se redujo significativamente a la mitad ($\sim 6 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) de forma generalizada en todas las líneas y combinaciones estudiadas en comparación con el parental cultivado (Fig. 3.27A). Este descenso en las concentraciones de *t-Z* fue todavía más acusado en la línea 65-*Bw*, que presentó los niveles más bajos tanto en plantas sin injertar y auto-injertadas, así como en combinaciones donde actuaba como

parte aérea. La concentración de rZ, no mostró diferencias significativas en ninguna de las líneas e injertos recíprocos utilizados (Fig. 3.27B). Únicamente la línea 66-*bW*, que tanto sin injertar como auto-injertada o utilizada como parte aérea de las otras líneas *RIL*, mostró un incremento de hasta 2 veces respecto del parental cultivado. Los niveles de CKs totales medidos (*t-Z* + rZ) mostraron un comportamiento similar a la *t-Z*, destacando la línea *RIL* 65-*Bw* sin injertar, auto-injertada y utilizada por parte aérea (Fig. 3.27C).

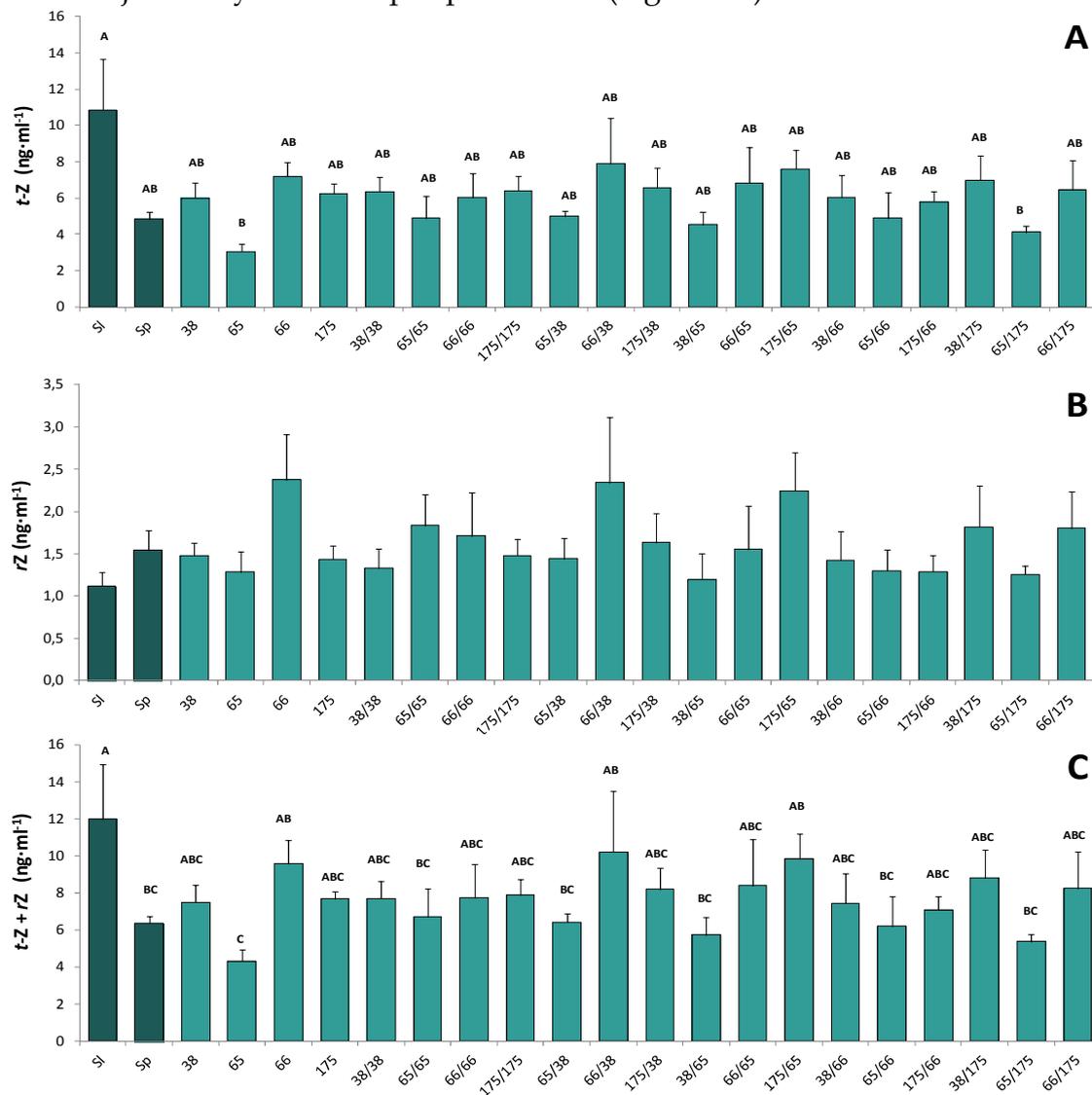


Figura 3.27.- Concentración de *trans*-zeatina (*t-Z*) (A), ribo-zeatina (*rZ*) (B) y la suma de citoquininas (CK) (C) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas *RIL* seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas ± el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$

2.3.3.- Ácido indolacético

Como se puede observar en la figura 3.28, existe una tendencia generalizada para todas las líneas y combinaciones de una disminución significativa de los niveles de IAA en relación al parental cultivado, a excepción de la línea 66-*bW* sin injertar y las combinaciones con dicha línea actuando como parte aérea.

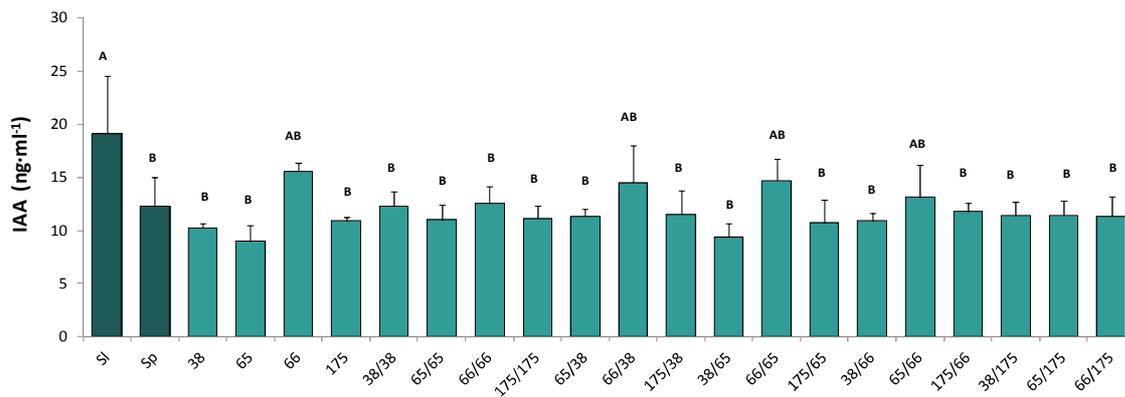


Figura 3.28.- Concentración de ácido indol-3-acético (IAA) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

2.3.4.- Ácido abscísico

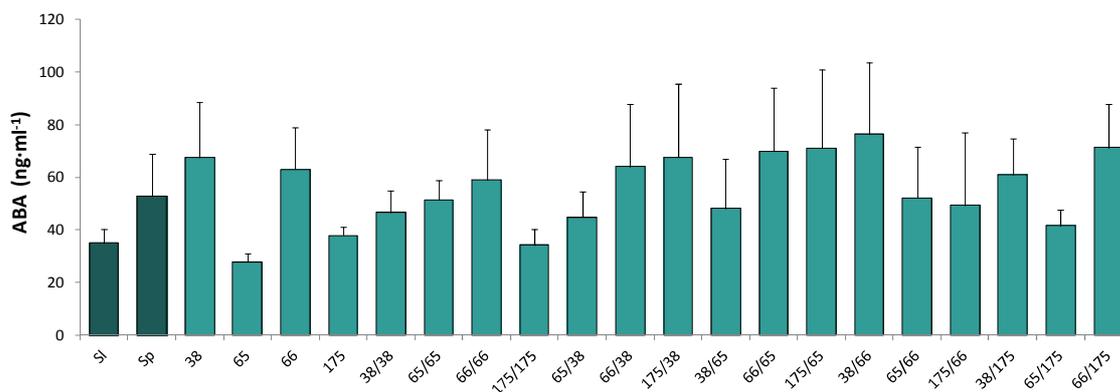


Figura 3.29.- Concentración de ácido abscísico (ABA) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

Se observó un incremento en las concentraciones de ABA en las líneas 38-*BW* y 66-*bW*, especialmente en las plantas sin injertar o cuando eran utilizadas como parte aérea en injertos recíprocos con otras *RILs*, aunque las diferencias no fueron significativas en ningún caso (Fig. 3.29).

2.3.5.- Ácido jasmónico

Las concentraciones de JA mostraron una importante variabilidad. Por un lado la línea 65-*Bw*, que tanto sin injertar como cuando era injertada sobre sí misma o sobre las otras líneas *RIL*, mostró un incremento significativo en las concentraciones de JA respecto de ambos parentales (Fig. 3.30). Por otro lado la línea 38-*BW*, que usada como parte aérea de sí misma o de las otras líneas seleccionadas, provocó una disminución significativa en las concentraciones de JA (hasta un 80%) respecto de *S. pimpinellifolium*.

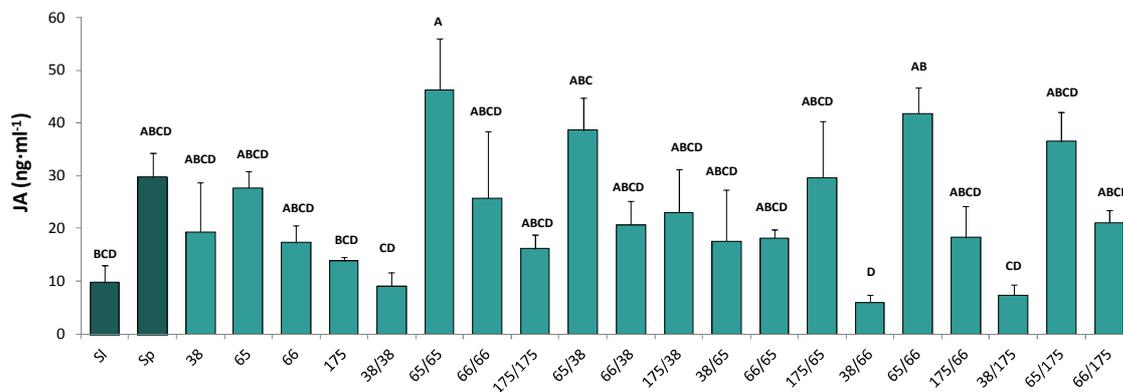


Figura 3.30.- Concentración de ácido jasmónico (JA) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas *RIL* seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

2.3.6.- Ácido salicílico

Las concentraciones de SA variaron de forma significativa entre las distintas líneas y combinaciones de injertos. Destaca el incremento en los niveles de SA observado en la línea 175-*bw*, sobre todo en la combinación auto-injertada y en la que actúa como parte aérea de la línea RIL 66- *bW* (Fig. 3.31). Las líneas 65-*Bw* y 66-*bW*, por el contrario, tendieron a disminuir las concentraciones de SA tanto en plantas sin injertar y auto-injertadas, como cuando eran usadas como parte aérea en injertos recíprocos (Fig. 3.31).

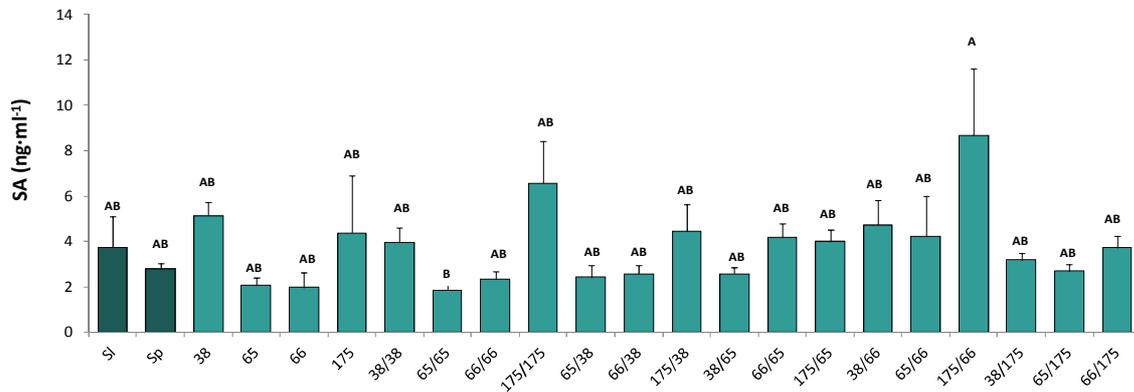


Figura 3.31.- Concentración de ácido salicílico (SA) de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

2.4.- Concentración de iones

En general, las concentraciones de iones en hoja madura no variaron de forma llamativa ni entre líneas ni entre las distintas combinaciones de injertos recíprocos (Tabla 3.4). A pesar de ello, algunas líneas y combinaciones presentaron variaciones significativas en los niveles de algunos iones, como la línea 175-*bw*, de baja biomasa, que tenía una concentración de carbono significativamente menor a las otras líneas y combinaciones. Además, cuando la línea 175-*bw* era utilizada como parte aérea de otras líneas *RIL*, se observaba una reducción en las concentraciones de C, aunque no era significativa (Tabla 3.4). Las concentraciones de N, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ y Na⁺ aumentaron significativamente de forma generalizada en todas las líneas y combinaciones estudiadas en comparación con el parental cultivado, especialmente en la línea 65-*Bw* cuando era utilizada como parte aérea de otras *RILs* en injertos recíprocos. En cuanto a las concentraciones de K⁺ y P, la línea 175-*bw* sin injertar y usada como parte aérea de sí misma y de las otras líneas *RIL* mostró una concentración significativamente superior en comparación con el parental cultivado. Por otro lado, los niveles de B³⁺ en la línea 38-*BW* y de Cu²⁺ en la línea 175-*bw* descendieron de forma significativa, tanto en plantas sin injertar como auto-injertadas y en combinación con otras *RILs* como parte aérea.

Tabla 3.4.- Contenido de los distintos nutrientes minerales de los genotipos parentales *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc.TO-937), 4 líneas RIL seleccionadas sin injertar y auto-injertadas, y 12 combinaciones de injertos recíprocos. Cada valor representa la media de 6 plantas ± el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

GENOTIPO	NUTRIENTES MINERALES (mg/l)												
	MACRONUTRIENTES						MICRONUTRIENTES						Na ⁺
	PRIMARIOS			SECUNDARIOS			B ³⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺		
C	N	P	K ⁺	S	Mg ²⁺	Ca ²⁺	B ³⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Na ⁺	
<i>Sp</i>	42,71±0,99 (a)	4,78±0,22 (c)	20,44±0,45 (abc)	144,70±10,66 (bc)	32,81±1,91 (bc)	15,97±0,82 (b)	55,47±1,61 (c)	0,10±0,01 (ab)	0,10±0,01 (bc)	0,31±0,03	0,25±0,02 (d)	0,14±0,02	1,24±0,09 (f)
<i>Sl</i>	40,56±0,75 (abc)	6,06±0,26 (abc)	19,92±1,31 (bc)	179,75±17,73 (abc)	39,47±4,01 (abc)	24,10±1,41 (a)	92,19±4,04 (abcde)	0,12±0,01 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,40±0,02	0,42±0,02 (abcd)	0,16±0,01	4,10±0,63 (ab)
38	41,99±0,51 (ab)	5,52±0,14 (abc)	18,70±1,20 (c)	138,67±2,02 (bc)	30,91±1,50 (c)	17,77±0,40 (ab)	70,85±2,87 (cde)	0,08±0,01 (b)	0,09±0,01 (bc)	0,37±0,07	0,27±0,03 (cd)	0,13±0,01	2,23±0,31 (bcdefg)
65	40,90±0,15 (abc)	6,28±0,26 (a)	20,28±1,74 (abc)	147,16±7,51 (bc)	43,32±2,34 (abc)	22,08±0,46 (ab)	110,71±3,32 (abc)	0,09±0,01 (ab)	0,10±0,01 (bc)	0,45±0,02	0,36±0,02 (abcd)	0,19±0,01	4,33±0,51 (a)
66	41,58±0,67 (abc)	5,92±0,18 (abc)	24,62±1,49 (abc)	147,53±7,68 (bc)	51,18±0,63 (a)	22,55±1,48 (ab)	82,31±6,54 (bcde)	0,13±0,01 (ab)	0,14±0,01 (a)	0,34±0,02	0,40±0,01 (abcd)	0,18±0,01	2,12±0,13 (cdefg)
175	38,73±1,14 (c)	4,91±0,12 (bc)	30,33±3,34 (ab)	217,57±20,07 (a)	35,77±2,16 (bc)	20,77±1,30 (ab)	69,49±2,31 (de)	0,12±0,01 (ab)	0,08±0,01 (c)	0,32±0,02	0,43±0,02 (abcd)	0,14±0,01	3,98±0,56 (abc)
38/38	41,88±0,25 (ab)	5,94±0,18 (abc)	24,19±3,31 (abc)	151,75±5,06 (bc)	35,40±1,42 (bc)	18,79±1,32 (ab)	74,05±2,44 (cde)	0,09±0,01 (b)	0,11±0,01 (abc)	0,44±0,03	0,40±0,07 (abcd)	0,17±0,01	1,80±0,12 (fg)
65/65	39,56±0,41 (bc)	6,33±0,14 (a)	23,52±2,00 (abc)	170,08±11,09 (abc)	44,13±4,74 (abc)	23,63±3,51 (ab)	124,79±23,61 (a)	0,12±0,01 (ab)	0,12±0,01 (ab)	0,42±0,03	0,57±0,07 (a)	0,21±0,02	4,09±0,80 (ab)
66/66	40,80±0,49 (abc)	5,78±0,18 (abc)	22,88±1,14 (abc)	158,98±11,19 (abc)	51,07±2,90 (a)	24,72±0,93 (a)	88,45±5,10 (abcde)	0,13±0,01 (ab)	0,13±0,01 (ab)	0,31±0,01	0,42±0,03 (abcd)	0,17±0,01	2,52±0,27 (abcdefg)
175/175	40,49±0,36 (abc)	6,06±0,10 (abc)	30,12±1,59 (ab)	189,96±7,29 (ab)	37,65±1,55 (abc)	21,96±0,44 (ab)	77,90±5,70 (bcde)	0,14±0,01 (a)	0,10±0,01 (abc)	0,44±0,05	0,53±0,05 (ab)	0,16±0,01	3,06±0,19 (abcdefg)
65/38	40,67±0,52 (abc)	6,18±0,22 (ab)	18,23±0,89 (c)	160,46±10,94 (abc)	46,52±3,67 (ab)	21,74±1,78 (ab)	110,82±8,62 (abc)	0,09±0,01 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,41±0,01	0,34±0,01 (abcd)	0,16±0,01	3,93±0,45 (abcd)
66/38	42,15±0,48 (ab)	5,78±0,18 (abc)	23,26±1,39 (abc)	136,66±8,52 (bc)	35,68±1,72 (bc)	19,28±1,40 (ab)	85,00±6,49 (abcde)	0,12±0,01 (ab)	0,12±0,01 (abc)	0,37±0,03	0,36±0,03 (abcd)	0,17±0,01	2,04±0,14 (defg)
175/38	41,24±0,46 (abc)	6,09±0,20 (abc)	27,24±2,53 (abc)	170,98±19,67 (abc)	36,84±1,44 (bc)	20,80±1,48 (ab)	86,69±3,73 (abcde)	0,12±0,01 (ab)	0,13±0,01 (ab)	0,43±0,02	0,51±0,04 (ab)	0,17±0,02	2,28±0,33 (bcdefg)
38/65	41,99±0,46 (ab)	6,27±0,31 (ab)	26,49±3,51 (abc)	165,06±10,64 (abc)	33,99±1,01 (bc)	18,13±1,02 (ab)	70,89±4,82 (cde)	0,09±0,01 (ab)	0,10±0,01 (abc)	0,39±0,05	0,39±0,06 (abcd)	0,19±0,03	2,34±0,16 (bcdefg)
66/65	42,16±0,37 (ab)	6,23±0,12 (ab)	22,26±1,38 (abc)	125,56±9,09 (c)	35,45±2,06 (bc)	18,94±1,62 (ab)	80,51±9,37 (bcde)	0,09±0,01 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,38±0,02	0,31±0,03 (bcd)	0,15±0,02	2,36±0,41 (bcdefg)

Continuación...

NUTRIENTES MINERALES (mg/l)													
GENOTIPO	MACRONUTRIENTES							MICRONUTRIENTES					
	C	N	P	K ⁺	S	Mg ²⁺	Ca ²⁺	B ³⁺	Cu ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Na ⁺
65/66	40,58±0,54 (abc)	6,24±0,32 (ab)	20,63±1,30 (abc)	157,50±14,48 (abc)	44,36±2,63 (abc)	22,93±1,17 (ab)	109,06±9,51 (abcd)	0,10±0,02 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,41±0,05	0,40±0,04 (abcd)	0,17±0,02	3,77±0,28 (abcde)
175/66	41,28±0,63 (abc)	6,45±0,26 (a)	31,24±2,97 (a)	189,36±21,34 (ab)	37,85±2,55 (abc)	19,37±1,83 (ab)	67,27±4,36 (c)	0,12±0,01 (ab)	0,09±0,01 (bc)	0,39±0,04	0,50±0,05 (abc)	0,14±0,02	2,72±0,62 (abcdefg)
38/175	42,18±0,63 (ab)	5,99±0,43 (abc)	24,60±2,69 (abc)	150,25±8,34 (bc)	35,53±1,46 (bc)	19,15±1,16 (ab)	62,19±4,23 (c)	0,10±0,01 (ab)	0,12±0,01 (abc)	0,42±0,04	0,35±0,03 (abcd)	0,18±0,01	1,75±0,14 (fg)
65/175	39,78±0,43 (abc)	5,95±0,44 (abc)	19,68±1,03 (bc)	153,94±3,01 (bc)	43,09±4,31 (abc)	21,92±2,77 (ab)	115,10±11,77 (ab)	0,10±0,01 (ab)	0,10±0,01 (bc)	0,43±0,02	0,43±0,05 (abcd)	0,19±0,01	3,60±0,28 (abcdef)
66/175	41,75±0,28 (abc)	5,85±0,15 (abc)	22,76±1,85 (abc)	146,08±3,44 (bc)	43,88±3,31 (abc)	21,91±0,84 (ab)	93,22±2,69 (abcde)	0,12±0,01 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,36±0,03	0,40±0,03 (abcd)	0,18±0,02	2,48±0,14 (abcdefg)
175/65	40,98±0,60 (abc)	5,88±0,27 (abc)	24,06±2,08 (abc)	165,40±11,67 (abc)	34,06±2,33 (bc)	19,91±1,21 (ab)	84,05±5,86 (abcde)	0,11±0,01 (ab)	0,11±0,01 (abc)	0,36±0,02	0,49±0,06 (abcd)	0,14±0,02	3,10±0,17 (abcdefg)
38/66	42,62±0,50 (ab)	5,95±0,37 (abc)	21,44±1,19 (abc)	155,65±5,36 (abc)	36,55±1,97 (bc)	19,80±0,99 (ab)	71,59±6,99 (cde)	0,09±0,01 (b)	0,12±0,01 (abc)	0,38±0,02	0,32±0,01 (bcd)	0,16±0,01	1,95±0,14 (efg)

3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS *RIL* SELECCIONADAS: PRUEBA DE CONCEPTO

En este ensayo se pretende explotar directamente caracteres de la raíz asociados al *WUE*, usando líneas *RIL* portadoras de dichos caracteres como portainjertos de una variedad de interés comercial. Se evaluaron las líneas seleccionadas en el anterior ensayo más otras 6 líneas *RIL* con caracteres muy dispares en relación con el *WUE* y 3 portainjertos usados comúnmente en la producción comercial de tomate.

3.1.- Parámetros relacionados con el vigor de la planta

3.1.1.- Biomasa Vegetativa

En general, se observó un incremento en el peso fresco de la parte aérea de la variedad comercial TT-115 injertada sobre la mayoría de las líneas *RIL* respecto de la línea autoinjertada, a excepción de las líneas de baja biomasa 66-*bW*, 121-*bw* y 175-*bw* (Fig. 3.32A). Sin embargo, destaca el portainjerto de baja biomasa 94-*bW* con un incremento significativo de biomasa foliar de un 45% respecto a la variedad comercial autoinjertada.

El peso seco de la raíz no presentó diferencias significativas para ninguna de las líneas *RIL* y portainjertos comerciales respecto de la variedad TT-115 autoinjertada y sin injertar, a excepción de la línea de bajo vigor 66-*bW*, donde disminuyó un 50% (Fig. 3.32B).

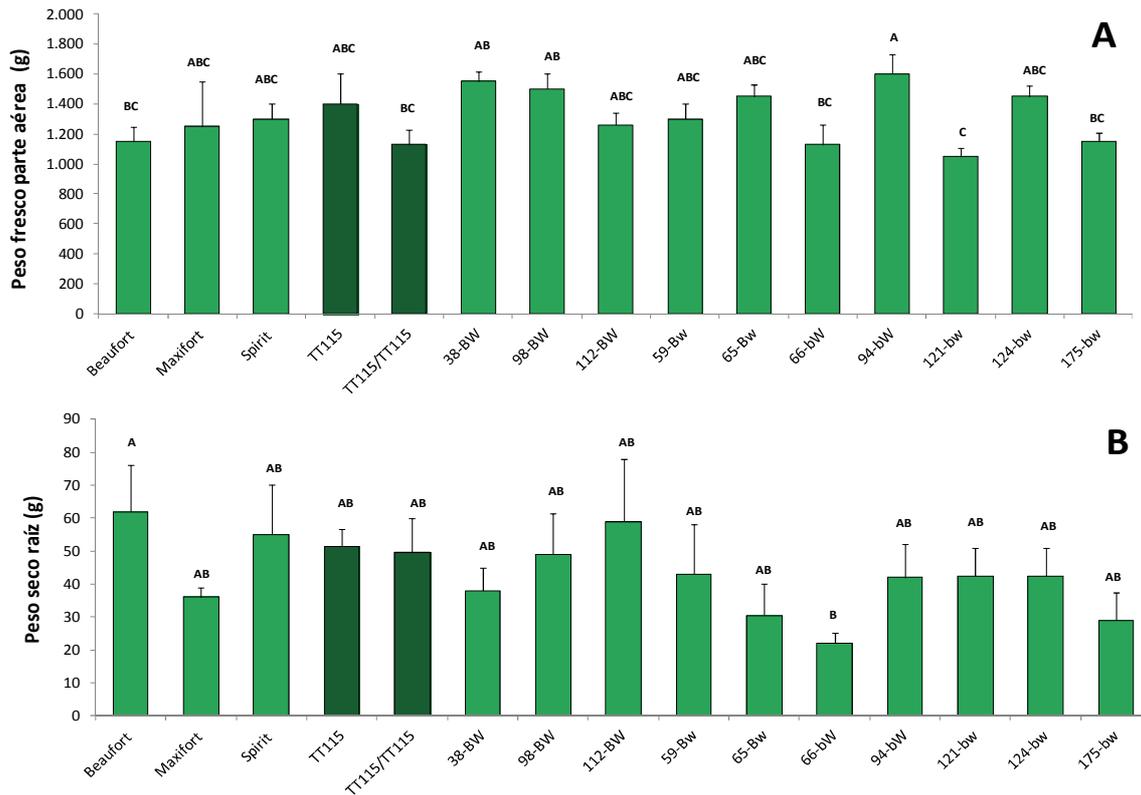


Figura 3.32.- Peso fresco de las hojas (A) y peso seco de la raíz (B) de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 sin injertar, autoinjertada, e injertada sobre tres portainjertos comerciales, Beaufort, Maxifort y Spirit, y 10 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

3.2.- Relaciones hídricas

3.2.1.- Contenido relativo en agua

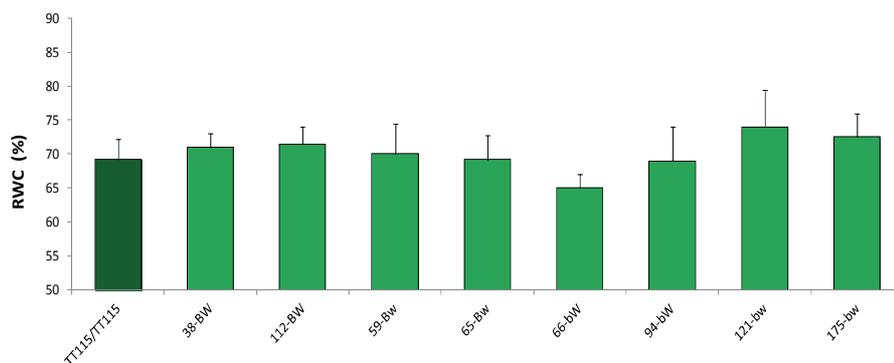


Figura 3.33.- Contenido relativo de agua de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 autoinjertada, e injertada sobre 8 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

No se observaron diferencias significativas en el *RWC* de plantas injertadas sobre distintas líneas *RIL* (Fig. 3.33). Únicamente se observó una reducción del 4% del *RWC* de las plantas injertadas en la línea de bajo vigor 66-*bW*.

3.2.2.- Consumo de agua

Independientemente de las fluctuaciones del estrés ambiental, el consumo acumulado de agua varió según el genotipo del portainjerto empleado, de manera que las plantas injertadas sobre las líneas *RIL* 112-*BW*, 121-*bw*, y 175-*bw* presentaron un menor consumo de agua a lo largo de todo el periodo de ensayo, mientras que el mayor consumo se registró en las plantas injertadas sobre las líneas de alto vigor 38-*BW* y 65-*Bw*, coincidiendo con lo observado en planta entera (Ensayo 1, Fig. 3.10) a excepción de la línea 112-*BW* (Fig. 3.34). No obstante las diferencias en el consumo de agua acumulado entre las líneas *RIL* fueron menores en las primeras semanas de ensayo en ausencia de estrés. Estas diferencias se empiezan a marcar a partir de la semana 18 del ensayo, y fueron máximas en la semana 21 coincidiendo con el final del ensayo y con el incremento del estrés ambiental.

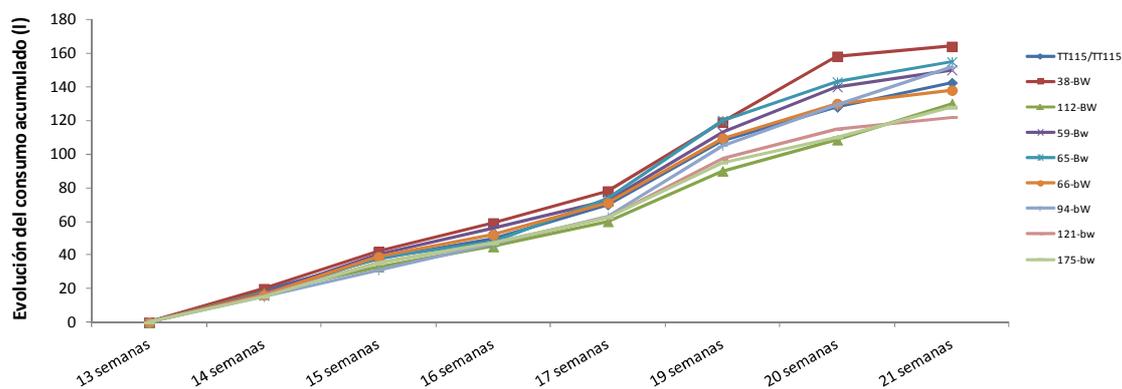


Figura 3.34.- Evolución del consumo acumulado de agua durante el periodo de ensayo de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 autoinjertada, e injertada sobre 8 líneas *RIL* seleccionadas. Cada punto representa la media de 6 plantas.

El consumo acumulado durante todo el periodo de ensayo mostró diferencias entre líneas de más de 30 litros por planta, siendo significativamente superior en las plantas injertadas sobre la línea *RIL* de alto vigor y consumo de agua 38-*BW* y significativamente inferior, de aproximadamente un 15%, en las plantas injertadas sobre las líneas de bajo vigor y consumo de agua 121-*bw* y 175-*bw* respecto a la variedad comercial autoinjertada TT-115 (Fig. 3.35).

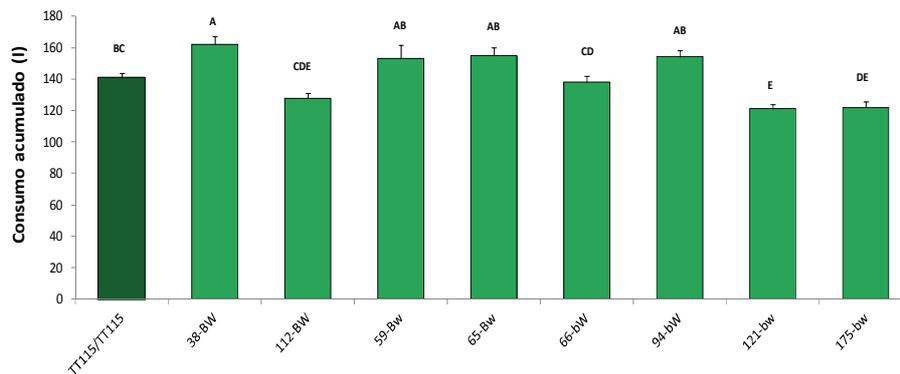


Figura 3.35.- Consumo acumulado de agua a final del ensayo de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 autoinjertada, e injertada sobre 8 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

Al final del periodo de ensayo, cuando el estrés ambiental era más elevado, se registraron diferencias de consumo diario de agua entre combinaciones de injertos de más de 1,5 litros por planta (Fig. 3.36). Sin embargo, las diferencias entre líneas no fueron significativas.

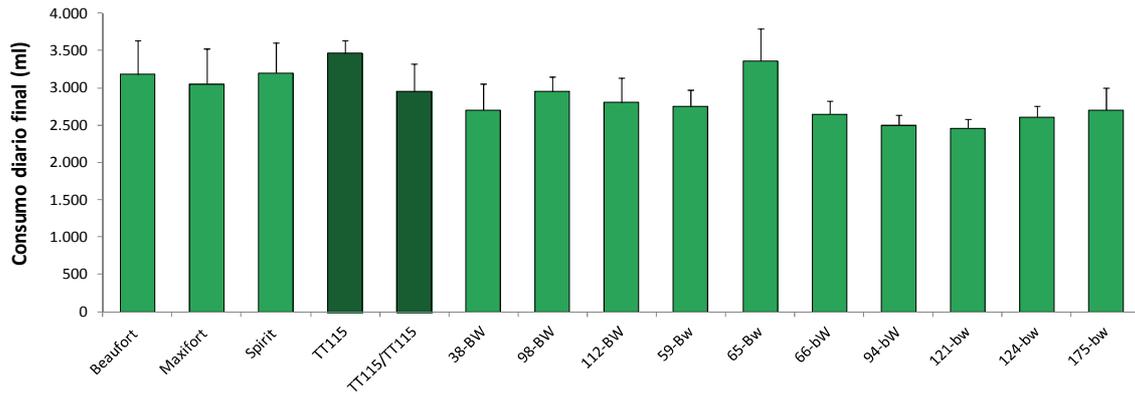


Figura 3.36.- Consumo diario al final del periodo de cosecha de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 sin injertar, autoinjertada, e injertada sobre tres portainjertos comerciales, Beaufort, Maxifort y Spirit, y 10 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

3.2.3.- Uso eficiente del agua

Se observó una tendencia generalizada a aumentar el WUE_{aY} en términos de cosecha en comparación con la variedad comercial autoinjertada TT-115, oscilando entre los 33 g de fruto por litro de agua consumida que presentaron las plantas injertadas sobre la línea 94-bw, y los 43 g de fruto por litro de agua consumida que produjeron las plantas injertadas sobre la línea 175-bw, mostrando esta última línea *RIL* junto con la línea 121-bw un WUE_{aY} significativamente superior a la variedad comercial autoinjertada de más de un 30% (Fig. 3.37).

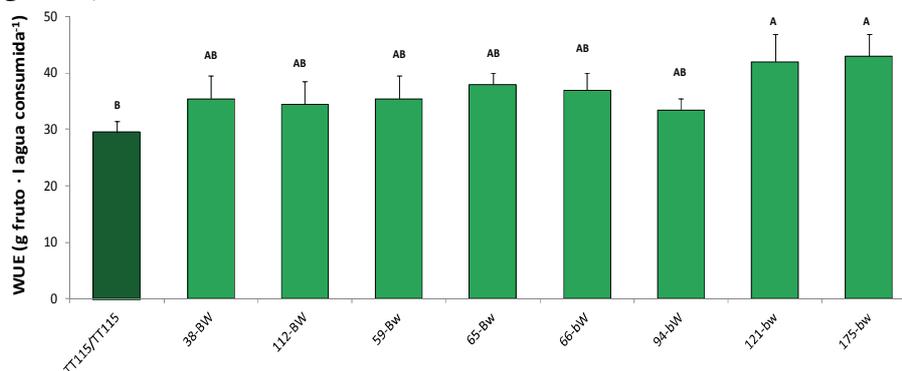


Figura 3.37.- Uso Eficiente del Agua Agronómico de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 autoinjertada, e injertada sobre 8 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

3.3.- Parámetros de cosecha

El peso de fruto en el primer racimo es significativamente superior en las plantas injertadas sobre la línea 38-BW respecto a la variedad comercial autoinjertada TT-115 (Fig. 3.38A). En el tercer racimo el peso medio de los frutos presentó cierta variabilidad según la línea RIL utilizada como portainjerto, siendo los frutos más grandes los recolectados en las plantas injertadas sobre las líneas 38-BW y 65-Bw , si bien estas diferencias no fueron significativas (Fig. 3.38A). Conforme avanzó el experimento (cuarto, quinto y sexto racimo), el peso medio de los frutos se redujo hasta 50 g respecto de su máximo valor en el tercer racimo. Esta reducción en el tamaño del fruto varió según el genotipo utilizado como portainjerto, siendo especialmente significativa en la línea 38-BW, alcanzando un peso mínimo de 58 g en el sexto racimo (Fig. 3.38B).

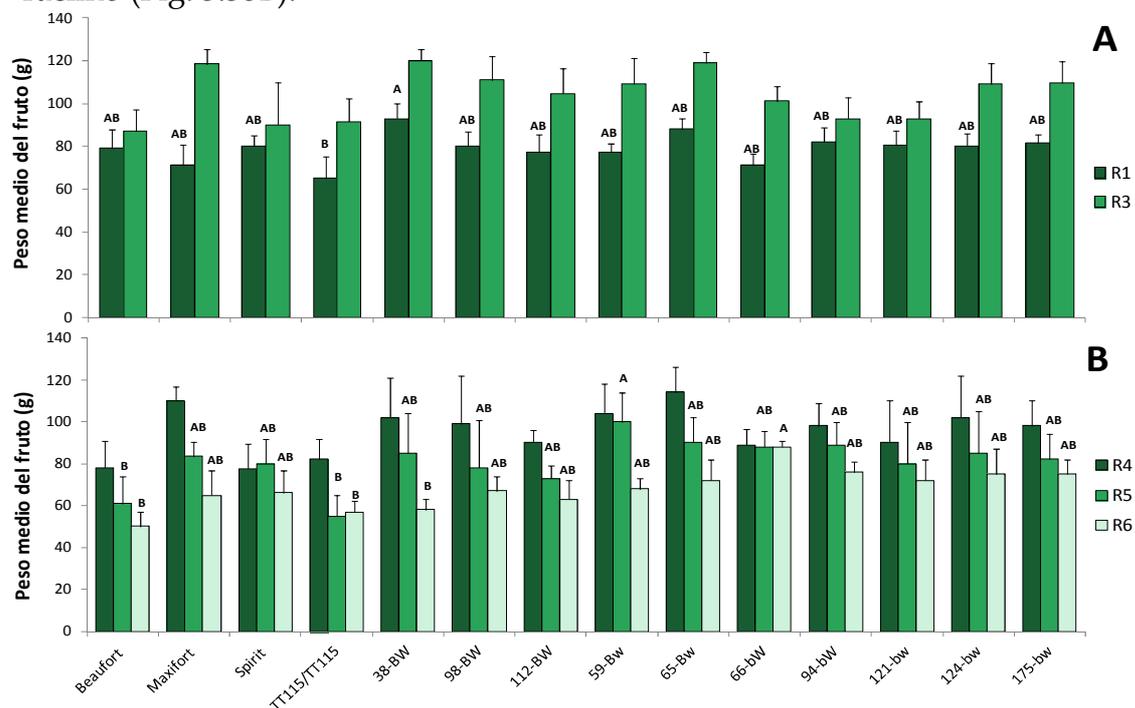


Figura 3.38.- Peso medio del fruto del racimo 1 y racimo 3 (A) y racimo 4, racimo 5 y racimo 6 (B) de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 sin injertar, autoinjertada, e injertada sobre tres portainjertos comerciales, Beaufort, Maxifort y Spirit, y 10 líneas RIL seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

Con respecto a la cosecha total acumulada hasta el sexto racimo, se observó una importante variabilidad en función del portainjerto utilizado, oscilando entre 4600 g en plantas injertadas sobre la línea 112-BW y 5853 g en plantas injertadas sobre la línea 38-BW (Fig. 3.39). La mayoría de las plantas injertadas sobre líneas *RIL* superaron a la producción obtenida con los portainjertos comerciales Spirit y Beaufort, y las mejores igualaron a Maxifort.

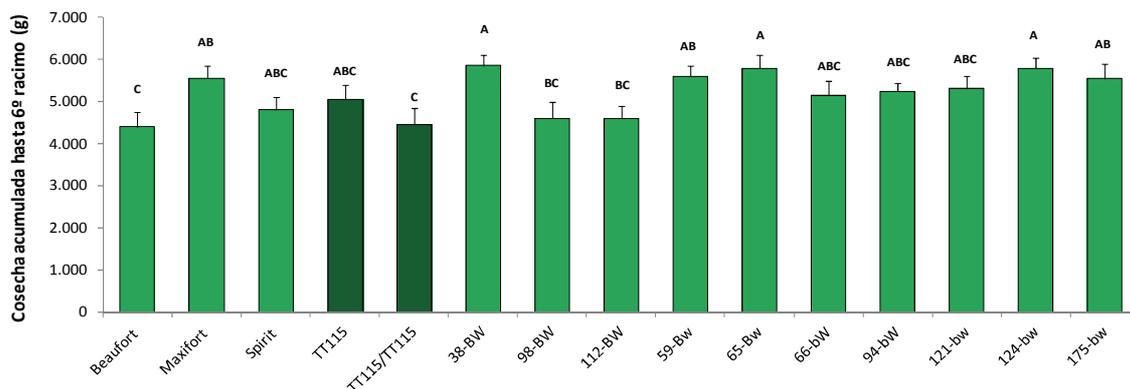


Figura 3.39.- Cosecha acumulada de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 sin injertar, autoinjertada, e injertada sobre tres portainjertos comerciales, Beaufort, Maxifort y Spirit, y 10 líneas *RIL* seleccionadas. Cada barra representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

3.4.- Regresiones lineales

Se observó una correlación positiva y significativa entre la biomasa foliar y el consumo diario de agua ($r = 0,5416$, $P \leq 0,01$) (Fig. 3.40A), al igual que se observaba en el ensayo 1 con la planta entera (Fig. 3.14). De hecho, el consumo diario de agua estuvo condicionado por el desarrollo foliar. Sin embargo, este consumo no estaba relacionado con la carga de frutos, ya que no se encontró ninguna relación entre la cosecha acumulada y el consumo diario final de la planta (Fig. 3.40B). En relación a esto, el consumo diario registrado en distintas fechas durante el periodo de cosecha (una vez despuntadas las plantas) varió según la demanda evaporativa del día, no registrándose cambios significativos conforme se iban recolectando los frutos. Por tanto, plantas con igual o similar

producción en fruto presentaron grandes diferencias (hasta 1000 ml) en consumo de agua (Fig. 3.40).

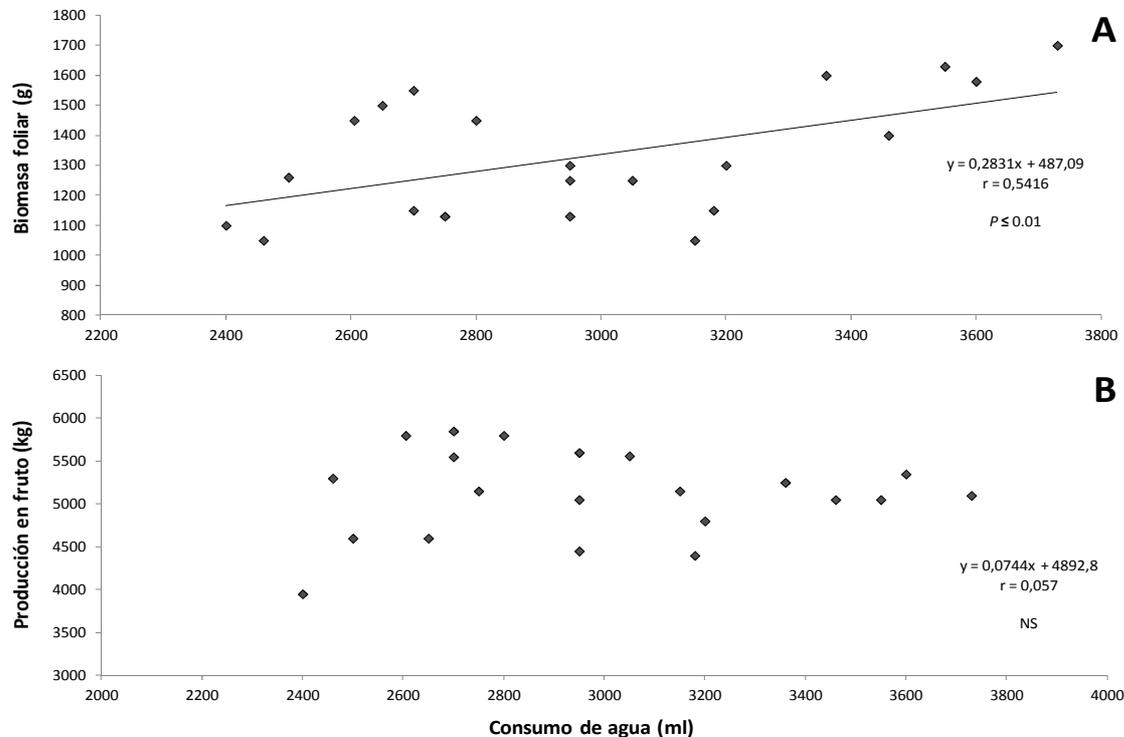


Figura 3.40.- Correlación lineal entre biomasa foliar y consumo de agua (A) y entre producción en fruto y consumo de agua (B), de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 sin injertar, autoinjertada, e injertada sobre tres portainjertos comerciales, Beaufort, Maxifort y Spirit, y 10 líneas *RIL* seleccionadas.

Con la finalidad de comprobar si existe correlación entre el vigor de las líneas *RIL* utilizadas como planta entera en el primer ensayo y las mismas líneas *RIL* utilizadas como portainjerto en este ensayo, se realizó un análisis de correlación (Fig. 3.41). Se observó una correlación positiva y significativa entre el peso seco de la parte aérea de la planta entera (1^{er} ensayo) y el peso fresco de la parte aérea de la planta utilizada como portainjerto (3^{er} ensayo) ($r = 0,48$, $P \leq 0,01$).

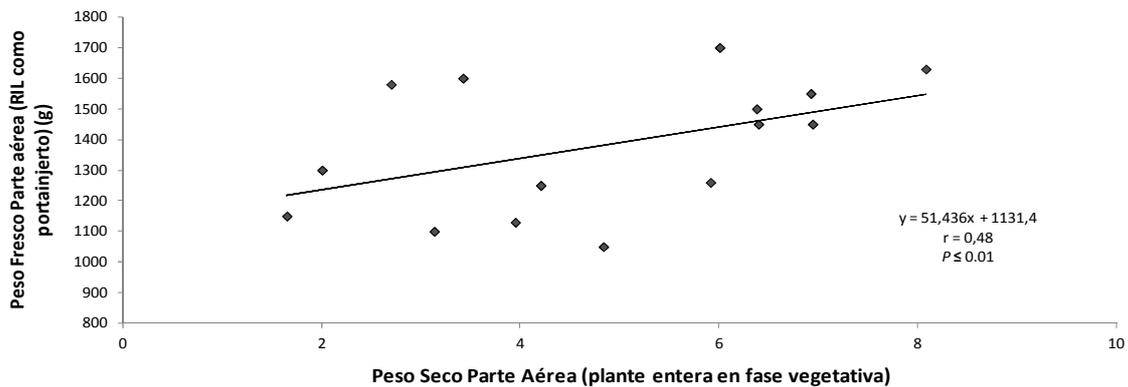


Figura 3.41.- Correlación lineal entre biomasa foliar de las 10 líneas *RIL* utilizadas como portainjerto en el tercer ensayo y biomasa foliar de esas mismas líneas *RIL* utilizadas como planta entera en el primer ensayo.

3.5.- Hormonas vegetales

3.5.1.- Niveles hormonales

Dada la relación entre biomasa foliar y consumo de agua (Fig. 3.40A), así como con el comportamiento del portainjerto cuando se estudió como planta entera (ensayo 1; Fig. 3.41), con la finalidad de evaluar el papel de las hormonas vegetales en el *WUE* de una variedad comercial de tomate injertada sobre distintas líneas *RIL*, se determinó la concentración de siete hormonas vegetales en la savia xilemática de la hoja (Tabla 3.5). Teniendo en cuenta las diferentes edades de las plantas y los métodos de obtención de las muestras, por simplificación, la figura 3.42 representa una comparativa de las distintas concentraciones y relaciones hormonales, expresadas ambas en unidades relativas, de plantas de tomate injertadas sobre las líneas seleccionadas de carácter extremo, es decir, de alto vigor y alto consumo de agua (*BW*) frente a las líneas de bajo vigor y bajo consumo de agua (*bw*).

Tabla 3.5.- Concentración de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), *trans*-zeatina (*t*-Z), ribo-zeatina (*r*Z), suma de citoquininas (CK), ácido indol-3-acético (IAA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y las relaciones ACC/ABA, CK/ACC y IAA/CK de plantas de tomate de la variedad comercial TT-115 autoinjertada, e injertada sobre 8 líneas *RIL* seleccionadas. Cada valor representa la media de 6 plantas \pm el error estándar. Diferentes letras indican que las diferencias son significativas de acuerdo con el test de Tukey al $P < 0.05$.

GENOTIPO	Concentración (ng · ml ⁻¹)							
	ACC	SA	IAA	JA	<i>t</i> -Z	ABA	<i>r</i> Z	CK
Beaufort	269.39 \pm 56,2	36.16 \pm 3,2 (a)	72.78 \pm 11,9 (ab)	67.79 \pm 5,3	20.12 \pm 0,2	218.05 \pm 58,7 (a)	2.06 \pm 0,8	22,17 \pm 0.3
Maxifort	202.90 \pm 112,1	35.58 \pm 14,8 (a)	104.21 \pm 22,3 (a)	67.33 \pm 7,7	30.25 \pm 6,6	210.65 \pm 33,1 (ab)	2.54 \pm 0,6	32,80 \pm 1.2
Spirit	174,72 \pm 5,2	18,43 \pm 6,0 (ab)	74,34 \pm 15,0 (ab)	68,14 \pm 2,7	23,37 \pm 1,6	208,24 \pm 4,5 (ab)	1,64 \pm 0,1	25,01\pm5.2
TT115	56,21 \pm 15,0	22,44 \pm 2,0 (ab)	79,89 \pm 5,3 (ab)	58,56 \pm 7,0	27,08 \pm 4,2	235,16 \pm 18,6 (a)	2,82 \pm 0,8	32,46 \pm 1.6
TT115/TT115	176,09 \pm 78,1	28,24 \pm 4,7 (ab)	95,18 \pm 21,2 (ab)	54,39 \pm 4,1	29,15 \pm 6,5	159,21 \pm 15,8 (abc)	3,31 \pm 1,2	29,90\pm0.9
38-BW	173,11 \pm 63,2	19,82 \pm 4,2 (ab)	64,04 \pm 9,4 (ab)	48,41 \pm 7,0	25,58 \pm 6,2	196,73 \pm 12,0 (abc)	2,21 \pm 0,6	27,78 \pm 1.5
59-Bw	99,38 \pm 18,6	14,53 \pm 4,6 (b)	59,28 \pm 4,9 (ab)	66,87 \pm 17,4	18,09 \pm 1,7	118,62 \pm 22,4 (bc)	1,85 \pm 0,3	19,94 \pm 2.3
65-Bw	85,94 \pm 22,9	21,33 \pm 1,7 (ab)	83,54 \pm 5,2 (ab)	66,70 \pm 4,4	21,86 \pm 2,3	194,68 \pm 6,2 (abc)	2,22 \pm 0,3	24,09 \pm 5.7
66-bW	130,51 \pm 38,4	21,14 \pm 4,4 (ab)	65,19 \pm 9,6 (ab)	52,05 \pm 1,8	16,05 \pm 2,8	158,97 \pm 14,9 (abc)	2,01 \pm 0,2	18,06 \pm 2.6
94-bW	146,17 \pm 62,4	17,50 \pm 1,0 (ab)	56,47 \pm 4,4 (ab)	53,17 \pm 7,9	16,66 \pm 3,2	180,18 \pm 27,4 (abc)	2,34 \pm 0,7	19,00 \pm 0.9
98-BW	287,33 \pm 97,4	22,42 \pm 3,5 (ab)	47,24 \pm 4,8 (b)	44,07 \pm 2,8	15,23 \pm 1,5	118,72 \pm 12,4 (bc)	0,99 \pm 0,1	16,22 \pm 1.2
112-BW	148,32 \pm 42,7	16,22 \pm 3,0 (b)	67,83 \pm 8,2 (ab)	49,06 \pm 3,2	24,90 \pm 5,7	154,91 \pm 20,6 (abc)	2,10 \pm 0,4	27,00 \pm 2.5
121- bw	164,10 \pm 61,4	15,45 \pm 0,2 (b)	57,26 \pm 5,6 (ab)	46,94 \pm 4,0	17,52 \pm 3,7	109,44 \pm 1,5 (b)	1,72 \pm 0,3	19,25 \pm 2.7
124-bw	174,87 \pm 111,5	26,74 \pm 5,7 (ab)	93,07 \pm 29,8 (ab)	47,57 \pm 4,4	24,65 \pm 8,2	149,22 \pm 29,2 (abc)	1,97 \pm 0,3	26.62 \pm 1.4
175-bw	212,57 \pm 90,4	18,28 \pm 1,2 (ab)	59,67 \pm 5,6 (ab)	35,00 \pm 9,4	18,68 \pm 2,6	169,72 \pm 21,2 (abc)	1,97 \pm 0,2	20.65 \pm 0.9

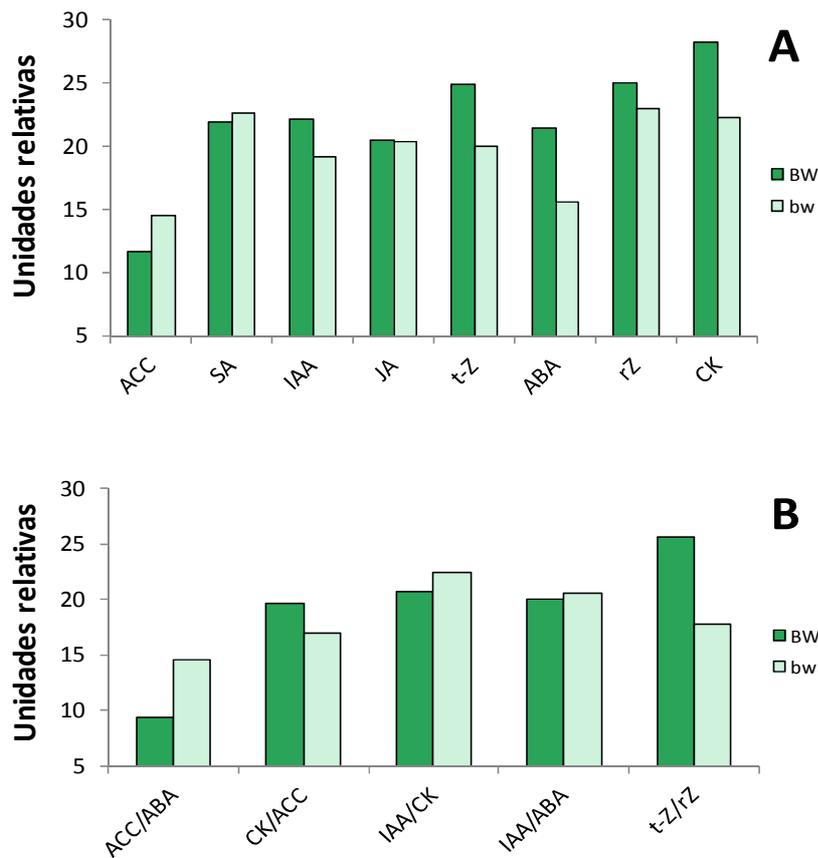


Figura 3.42- Concentración de 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ácido salicílico (SA), ácido indol-3-acético (IAA), ácido jasmónico (JA), *trans*-zeatina (*t*-Z), ácido abscísico (ABA), ribo-zeatina (*r*Z), suma de citoquininas (CK) (A) y las relaciones ACC/ABA, CK/ACC, IAA/CK y *t*-Z/*r*Z (B) medidas en unidades relativas, de líneas con alto vigor y alto consumo de agua (*BW*) frente a líneas con bajo vigor y bajo consumo de agua (*bw*). Cada barra representa la media de tres líneas de cada combinación.

De todas las hormonas analizadas, las concentraciones de ACC, IAA, *t*-Z, *r*Z y ABA fueron las que presentaron las mayores diferencias entre líneas *BW* y *bw* (Fig. 3.42A). En concreto, los niveles del precursor del etileno ACC fueron mayores en plantas injertadas sobre líneas *bw* respecto de aquellas injertadas sobre líneas *BW*. Sin embargo, en el caso de ABA, IAA, *t*-Z y *r*Z se observó una relación positiva entre las concentraciones de dichas hormonas y la biomasa, ya que en las plantas injertadas sobre líneas *BW* presentaron niveles superiores (Fig. 3.42).

Respecto a las relaciones hormonales, 3 de ellas presentan unas diferencias entre líneas más acentuadas, la relación ACC/ABA, CK/ACC y *t-Z/rZ* (Fig. 3.42B). En las plantas injertadas sobre líneas *RIL* de mayor vigor *BW*, la relación ACC/ABA disminuyó, mientras que, por el contrario, la relación CK/ACC aumentó en dichas combinaciones. Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos en el primer ensayo, donde las líneas *RIL* eran usadas como planta entera. Analizando el *PCA* de los distintos parámetros del primer ensayo (Fig. 3.14) se observa una correlación negativa significativa entre el peso seco de la planta entera y la relación ACC/ABA ($r = -0,210^{**}$, $n=200$). Por otra parte la relación CK/ACC covaría con los parámetros vegetativos, asociándose por tanto en el mismo cluster (Fig. 3.14). La relación entre la CK más activa del tomate *t-Z* y su ribósido *rZ* fue superior en las líneas de alta biomasa, pudiendo ser dicha relación un parámetro importante en relación con el vigor de la planta (Fig. 3.42B). Por lo tanto, en líneas generales, se repiten las relaciones entre los distintos parámetros hormonales, vegetativos e hídricos en las líneas *RIL* usadas como portainjertos (Ensayo 1) y como planta entera (Ensayo 3).

3.5.2.- Análisis de correlación entre parámetros hormonales

Para comprobar si parámetros hormonales que influenciaban caracteres hídricos y el *WUE* de una población *RIL* utilizada como planta entera (Ensayo 1) se correlacionaban con factores hormonales en líneas seleccionadas de esa población *RIL* utilizadas como portainjertos (Ensayo 3), realizamos un análisis de correlación (Tabla 3.6) y una regresión lineal (Fig.3.43).

Se observó una correlación positiva y significativa entre los niveles hormonales foliares de las líneas *RIL* usadas como planta entera y los niveles de las líneas *RIL* usadas como portainjerto ($r = 0,537^{***}$, $n=67$) (Fig. 3.43). Asimismo

el análisis de correlación puso de manifiesto una asociación positiva entre las concentraciones del precursor del etileno ACC entre líneas *RIL* utilizadas como planta entera y como portainjerto, con una alta significación estadística, con un valor de $r = 0,896^{**}$, $P \leq 0,01$, $n=60$ (Tabla 3.6). De forma similar, las concentraciones de ABA mostraron una correlación positiva y significativa entre planta entera y portainjerto ($r= 0,698^*$, $P \leq 0,05$, $n=60$). A pesar de que las concentraciones de SA, IAA y las citoquininas *t-Z* y *rZ* de las líneas *RIL* como planta entera se relacionaron positivamente con las observadas en líneas *RIL* utilizadas como portainjerto, dichas correlaciones no fueron significativas.

El coeficiente de correlación de los ratios ACC/ABA y CK/ACC también fue positivo y significativo ($r = 0,763^*$ y $r = 0,681^*$, respectivamente, $P \leq 0,05$, $n=60$). El resto de relaciones hormonales, IAA/CK, IAA/ABA, *t-Z/rZ*, así como las CKs totales, *t-Z + rZ*, mostraron una correlación positiva pero no significativa.

Tabla 3.6.- Valores del coeficiente de correlación lineal *r* de Pearson entre las concentraciones de ACC, SA, IAA, JA, *t-Z*, ABA, *rZ*, CK y las relaciones ACC/ABA, CK/ACC, IAA/CK y *Z/rZ* en hoja de las líneas *RIL* usadas como planta entera y como portainjertos. * = $P \leq 0,05$ y ** $P \leq 0,01$ (bilateral).

HORMONAS INDIVIDUALES								
	ACC	<i>t-Z</i>	<i>rZ</i>	CK	IAA	ABA	JA	SA
Coef. de correlación	0,896**	0,575	0,269	0,578	0,106	0,698*	-0,034	0,461
n	60	60	60	60	60	60	60	60

RELACIONES HORMONALES					
	ACC/ABA	CK/ACC	IAA/CK	IAA/ABA	<i>t-Z/rZ</i>
Coef. de correlación	0,763*	0,681*	0,138	0,040	0,264
n	60	60	60	60	60

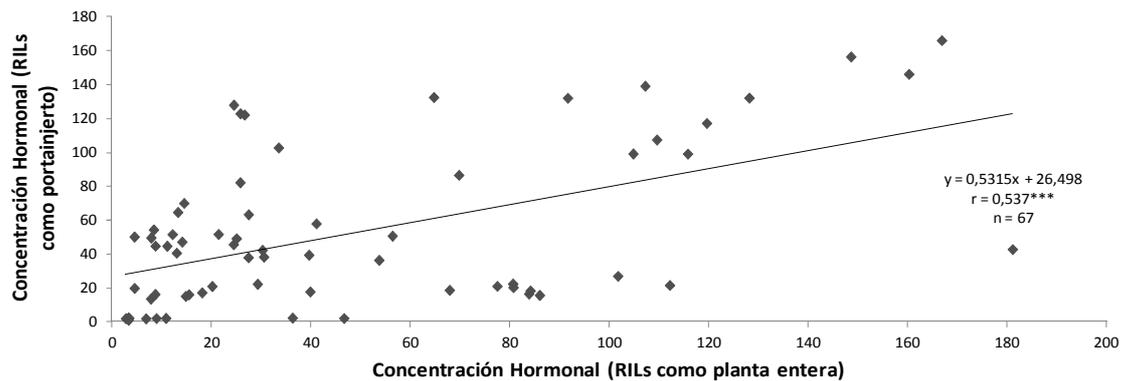


Figura 3.43.- Correlación lineal entre las concentraciones hormonales de hoja de las líneas *RIL* utilizadas como planta entera y esas mismas líneas *RIL* utilizadas como portainjerto.

3.5.3. - Estudio comparativo entre las hormonas medidas en extracto de hoja y xilema de raíz

Dado que la obtención de las muestras para el análisis hormonal se realizó mediante dos métodos en este capítulo: obtención de jugo celular de hoja mediante centrifugación (Ensayo 1) y obtención de savia xilemática de hoja mediante cámara de presión Scholander (Ensayo 2 y 3), se realizó un estudio comparativo para validar las correlaciones entre las hormonas medidas con ambas metodologías.

Se realizó un análisis de regresión lineal entre hormonas extraídas de jugo celular de hoja (mediante centrifugación a 1.000 g durante 10 min y a 4°C, como se hizo en el Ensayo 1) y hormonas extraídas de xilema foliar (mediante presión neumática, como se hizo en el Ensayo 2 y en el Ensayo 3).

Se observó una correlación positiva y significativa entre la concentración total de hormonas extraídas del jugo celular con la extraída de savia xilemática de hoja ($r = 0,5408^{***}$, $P \leq 0,001$) (Fig. 3.44).

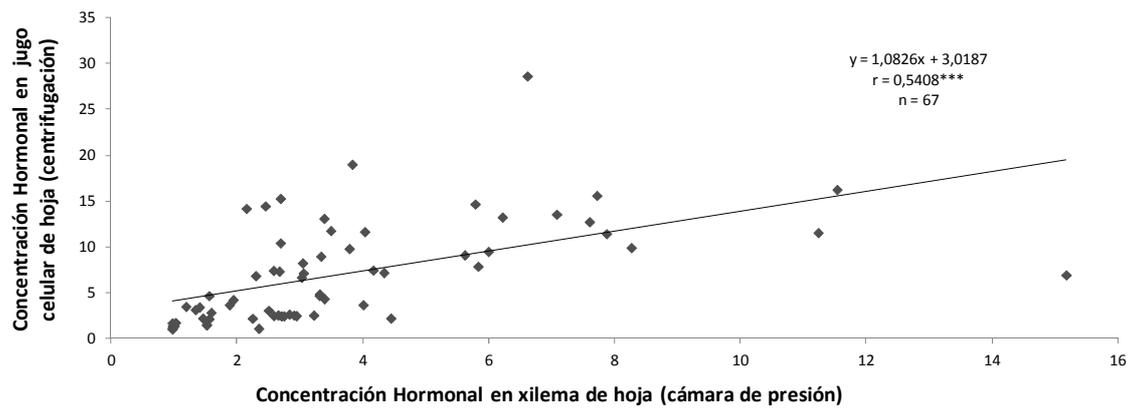


Figura 3.44.- Correlación lineal entre concentración hormonal en jugo de hoja (obtenido por centrifugación) y concentración hormonal en xilema de hoja (obtenido por cámara de presión Scholander) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Ailsa Craig) auto-injertadas e injertadas sobre dos genotipos de tomate que sobreexpresan ABA (portainjertos SP5 y SP12).

Globalmente, los resultados anteriores ponen de manifiesto la existencia de una correlación cuantitativa entre las hormonas analizadas cuando se utilizan dos métodos de obtención distintos de la savia foliar (xilema por presión *vs* centrifugación), apoyando las conclusiones obtenidas en este estudio.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- ENSAYO 1: EXISTE VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL USO EFICIENTE DEL AGUA Y PARÁMETROS RELACIONADOS EN LA POBLACIÓN *RIL* DURANTE EL DESARROLLO VEGETATIVO

Existe variabilidad genética dentro de la especie *Solanum* respecto a la tolerancia al estrés hídrico, siendo mayor en las especies silvestres que en el tomate cultivado (Foolad, 2007; Martin et al., 1989). Esta variabilidad genética afecta a parámetros hídricos, vegetativos, nutricionales y hormonales. La identificación de esta variabilidad servirá para identificar los factores más relevantes en el uso eficiente del agua (*WUE*), así como para su explotación.

El WUE_{av} y el WUE_i están más correlacionados con la biomasa vegetativa que con el consumo de agua

A pesar de la covariación entre el WUE_{av} (en base vegetativa) y el consumo de agua (W) (Fig. 3.14), la correlación entre ambos parámetros no era significativa. Por otra parte tanto el área foliar (AF) como el peso seco de la planta entera (PS_P) sí mostraron una correlación significativa con dicho parámetro. Al igual que ocurre con WUE_{av} , el WUE_i en la población *RIL*, calculada en relación a la tasa de transpiración, tampoco se correlacionó significativamente con el W , existiendo, sin embargo, una relación significativa con la biomasa. Esto sugiere, por un lado, que una mayor biomasa foliar condiciona un mayor WUE_{av} y un mayor WUE_i , manteniéndose un W y, por otro lado, que el peso seco es un importante parámetro indicador de la capacidad de absorción de agua del sistema radicular (Reina-Sánchez et al., 2005).

La mayor productividad vegetativa de la población RIL se correlaciona con un mayor tamaño de hoja y capacidad fotosintética

Dado que la tasa fotosintética aporta carbono y energía para el crecimiento vegetal (Galmés et al., 2011), era de esperar que covariara en el PCA (Fig. 3.14) con parámetros de biomasa, correlacionándose significativamente con los datos de biomasa vegetativa de la planta entera (PS_P) y además asociándose al componente 1 del PCA, lo cual muestra su importancia relativa. De hecho, el área foliar (AF) está positivamente relacionado con la A en la mayoría de las líneas RIL. Los resultados obtenidos son similares a los observados en otras investigaciones donde se evidenció una correlación positiva entre la tasa fotosintética neta y el crecimiento vegetativo en plantas de tomate (Nebauer et al., 2013).

La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (PSII), medida como F_v/F_m , mostró también una variabilidad importante en la población RIL (Fig. 3.13). Cuando una hoja se transfiere desde la oscuridad hacia la luz, los centros de reacción del PSII se cierran progresivamente. Esto da lugar a un aumento en el rendimiento de la fluorescencia de clorofilas. A raíz de esto, sin embargo, el nivel de fluorescencia empieza a caer debido a que hay un incremento en la velocidad de transporte de electrones lejos del PSII debido a la activación dependiente de luz de enzimas implicadas en el metabolismo del carbono y a la apertura estomática (Maxwell & Johnson, 2000). Por lo tanto, la fluorescencia de clorofilas está inversamente relacionada con la conductancia estomática, tal y como se observa en el PCA (Fig. 3.14), llamando especialmente la atención la línea RIL 175, con un valor F_v/F_m muy bajo respecto a la elevada g_s (Fig. 3.13). Y por supuesto, como se observa en la covariación de g_s y la tasa transpiratoria (E) (Fig. 3.14), también existe una correlación negativa significativa entre F_v/F_m y E en la población RIL. Existen muchos estudios que corroboran la reducción de la fluorescencia de clorofilas tras el cierre estomático, y por tanto la

inminente disminución de la transpiración foliar (Else et al., 2009). Estos mismos autores observaron que los cambios en los parámetros de fluorescencia ante el estrés por inundación causado en plantas de tomate nunca precedían al cierre estomático, y de hecho la reducción de F_v/F_m es tardía, sugiriendo que cualquier daño en el PSII ocurre después del cierre estomático. Por otra parte F_v/F_m se encuentra en el mismo cluster que los parámetros de biomasa (Fig. 3.14), correlacionándose positivamente con el peso seco de la planta entera en la población de líneas *RIL*, indicando que el aumento de la productividad de los cultivos se correlaciona con cambios en el crecimiento de las hojas y en la capacidad fotosintética (Albacete et al., 2009). Respecto a los parámetros hormonales, existe una significativa correlación entre la *r-Z* y el F_v/F_m debido a la implicación que tiene las CKs en la regulación de la senescencia foliar (Guo & Gan, 2007; Lara et al., 2004).

La conductancia estomática tiene un papel fundamental en el control de la pérdida de agua, y por tanto está negativamente correlacionado con WUE_i y con A

Dado que la tasa de transpiración (E) depende de la conductancia estomática (g_s) (Caird, 2007), existe una relación directa entre ambos parámetros, como podemos observar en la población *RIL* estudiada (Fig. 3.14). Además, ya que WUE_i se define como el cociente entre tasa neta de fotosíntesis (A) y E o entre A y g_s (Farquhar et al., 1986), era de esperar que este parámetro covariara en el *PCA* con A en el mismo cluster (Fig. 3.14) y que se encontrara en un cluster diferente a E y g_s . Los datos de correlación encontrados en nuestro ensayo, así como los encontrados en la bibliografía (Galmés et al., 2011) apoyan el *PCA*, observándose una correlación negativa entre el WUE_i y g_s .

El grado de hidratación de los tejidos, medido como *RWC*, también mostró una importante variabilidad en la población *RIL* estudiada (Fig. 3.6). Teniendo en cuenta que todas las plantas se cultivaron en medio hidropónico y que las condiciones ambientales fueron las mismas, las diferencias observadas en el estado hídrico de la parte aérea sugieren la existencia de diferencias en la capacidad de las raíces para abastecer la demanda de agua de la parte aérea, y/o diferencias en la cubierta foliar para evitar las pérdidas de agua por transpiración (Jurado et al., 2009; Kitaya et al., 2003; Reina-Sánchez et al., 2005). En este sentido, la regulación de la apertura estomática tiene un papel fundamental en el control de la pérdida de agua y en el intercambio gaseoso en las hojas. Un aumento en la apertura estomática da lugar a un incremento de la transpiración de la planta entera y de la tasa fotosintética neta (Sade et al., 2010), existiendo, por tanto, una estrecha conexión entre conductancia estomática y tasa fotosintética (Galmés et al., 2011; Gornall & Guy, 2007; Soolanayakanahally et al., 2009; Wong et al., 1979). Esta relación también existe en la población *RIL* estudiada ($r=0.298^{**}$, $n=200$), pero es débil, sugiriendo una alta variabilidad en la regulación de ambos parámetros, lo cual puede ser de interés para aumentar el *WUE*.

Los factores hormonales ABA, rZ, SA, IAA, JA, IAA/ACC y CK/ACC parecen ser señales positivas para la regulación del crecimiento foliar, WUEav y WUEi

El *PCA* realizado a las 34 líneas *RIL* estudiadas (Fig. 3.14) reveló un importante papel de distintos parámetros hídricos, hormonales y nutricionales en la regulación del *WUE*. En cuanto a los factores hormonales, tanto el SA como la citoquinina rZ, el IAA, JA y el ABA se relacionaron estrechamente con factores de crecimiento, la fotosíntesis y el *WUE*, encontrándose todos ellos asociados en el mismo cluster. Muy cercano a estos factores también se

asociaron las relaciones IAA/ACC y CK/ACC, algo a tener en cuenta ya que son relaciones de una hormona de crecimiento y una hormona de estrés, además se encuentran en sentido contrario a la relación ACC/ABA en el PCA. Esto pone de manifiesto la importancia de dichas hormonas en el control del WUE. La estrecha relación entre SA y WUE_{Eav} (Fig. 3.14) nos indica que este parámetro hormonal influye en los parámetros vegetativos así como en el consumo de agua. En relación a eso, se conoce que SA está implicado en las vías de señalización relacionadas con el estrés (Apel & Hirt, 2004; Fujita et al., 2006), participando en las respuestas de defensa de las plantas a enfermedades (Dong, 2008). Sin embargo no hay constancia bibliográfica de la influencia de SA en la mejora del WUE_{Eav} ni parámetros relacionados. Al igual que SA, JA se relaciona comúnmente a la tolerancia del tomate a estrés biótico, además recientemente se ha descubierto que en plantas de judía la acumulación de esta hormona aporta más resistencia contra el estrés ocasionado por la elevada radiación UV (Choudhary & Agrawal, 2014). Sin embargo, a pesar de encontrarse en el mismo cluster que WUE_{Eav} y WUE_i , JA no presenta una correlación significativa.

La relación de ABA con parámetros de crecimiento y fluorescencia de clorofilas no es nueva (Albacete et al., 2009). Dado que el ABA se sintetiza en la raíz (Dodd, 2003) y se transporta hacia la parte aérea por el sistema radicular, es un parámetro que podría ser susceptible de ser explotado más adelante en un ensayo realizado con portainjertos para mejorar el WUE. Esta conclusión se apoya en la bibliografía, dado que esta hormona favorece el cierre estomático, disminuye la tasa de transpiración, mantiene el potencial hídrico foliar (Fambrini et al., 1995; Nagel et al., 1994) y el contenido relativo de agua (Dodd, 2003), y por tanto aumenta la biomasa vegetativa y radicular (Nagel et al., 1994), incrementando con ello el área foliar (Dodd, 2003; Sharp & Lenoble, 2002).

ACC y ACC/ABA están relacionados negativamente con el WUE

En el extremo opuesto del PCA (Fig. 3.14), en posición contraria a ABA y a los parámetros de crecimiento y fotosíntesis, se encuentra el precursor del etileno ACC, así como la relación ACC/ABA, estando por ello asociados negativamente con el tamaño de hoja y con el WUE_{av} (en base vegetativa). Estas mismas relaciones se repiten cuando las plantas de tomate se cultivan en condiciones salinas (Albacete et al., 2009). Por ello, ACC se considera junto con ABA, un factor importante a tener en cuenta en posteriores experimentos, ya que el ACC es inductor de la senescencia foliar e inhibidor del crecimiento vegetativo (Ghanem et al., 2008).

¿Existe una interacción positiva entre los parámetros nutricionales Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , B^+ y Na^+ y el control del WUE_{av} ?

Se sabe que el Cu^{2+} tiene un papel importante en la función de los fotosistemas I y II (Gupta et al., 2011; Roosta & Hamidpour, 2011), como podemos constatar en el PCA por la asociación con parámetros fotosintéticos como la tasa de fotosíntesis y F_v/F_m y con parámetros de crecimiento. De hecho, una deficiencia de Cu^{2+} puede ocasionar importantes cambios metabólicos y una inhibición del crecimiento vegetal (Jason et al., 2009).

Estudios realizados en remolacha muestran que la deficiencia de Mg^{2+} en el medio da lugar a una inhibición drástica en el crecimiento de la raíz, incluso antes de causar ningún cambio obvio en el crecimiento de la parte aérea y en la concentración de clorofila (Hermans et al., 2005). Por ello, existe una clara relación entre el Mg^{2+} y el desarrollo radicular, y entre el Mg^{2+} y el crecimiento vegetativo (Fig. 3.14). Por otra parte el Ca^{2+} actúa como componente estructural de macromoléculas, proporcionando ligamientos intermoleculares, principalmente en las paredes celulares y en las membranas plasmáticas.

(Tewari et al., 2010; Tisdale et al., 1985), explicando su covariación con parámetros de crecimiento.

Cerca del centro del *PCA* (Fig. 3.14) asociado con el F_v/F_m nos encontramos con los micronutrientes B^+ y Na^+ . De hecho se han hecho estudios con plantas de tomate cultivadas en medio hidropónico que demuestran que una elevada concentración de Na^+ en el agua de riego ejerce un efecto protector contra la toxicidad de B^+ , retrasando con ello la senescencia (Guidi et al., 2011). Sin embargo, dada la posición en el *PCA*, la influencia de ambos iones en nuestro ensayo no es muy importante.

La disponibilidad de una colección de líneas recombinantes con una gran varianza genotípica en un fondo genético común, es un material muy adecuado para el estudio de caracteres de herencia cuantitativa como el *WUE* y los parámetros hidráulicos, iónicos y hormonales que lo condicionan, así como para la obtención de líneas con un mayor uso eficiente del agua mediante mejora genética.

2.- ENSAYO 2: LA PARTE AÉREA TIENE UN EFECTO PREDOMINANTE EN EL WUE Y PARAMETROS RELACIONADOS DURANTE EL DESARROLLO VEGETATIVO EN CONDICIONES ÓPTIMAS

¿Los parámetros hormonales y nutricionales relacionados con el WUE son susceptibles de ser modificados por el sistema radicular?

Del análisis del PCA del ensayo anterior (Fig. 3.14) se extrae que diferentes factores hormonales (SA, ACC, ABA, IAA, CK, IAA/ACC y ACC/ABA) y nutricionales (Cu^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , B^{+} y Na^{+}) parecen influir de forma significativa en la variabilidad de la población RIL estudiada. Dichos factores podrían ser susceptibles de ser modificados por la raíz cuando dicha población RIL es utilizada como portainjerto para conseguir una mejora en el WUEa.

El anterior ensayo muestra que la población RIL derivada de un cruce interespecífico entre *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker) y *Solanum pimpinellifolium* (acc. TO-937) presenta variación genética en el uso eficiente del agua y en algunos parámetros que condicionan el consumo de agua y el estado hídrico de la planta.

Si bien el papel de la parte aérea parece ser predominante, diversos estudios han mostrado que el efecto de la raíz es suficiente para modificar significativamente el comportamiento de la parte aérea de la planta, condicionando la acumulación en hoja de diversos osmolitos, nutrientes y hormonas, y modificando el potencial hídrico foliar y la superficie y senescencia foliar (Ruíz et al, 2005; Estañ et al, 2005; Albacete et al, 2009; Ghanem et al, 2011). Por tanto, la tecnología del injerto constituye una herramienta fundamental para explorar y explotar la importancia relativa de la raíz y/o

parte aérea y su comunicación para mejorar el *WUE* en tomate, aprovechando la variabilidad genética aportada por las especies silvestres.

El genotipo de la raíz no altera ni la biomasa ni el WUE de la parte aérea durante el desarrollo vegetativo y en ausencia de estrés

Numerosos estudios en tomate han demostrado que los parámetros de vigor de la planta se ven alterados según el portainjerto utilizado (Abdelmageed, 2009; Albacete et al., 2009; Estévez-Caparrós et al., 2011). Sin embargo, en las condiciones de nuestro estudio, no se observó un efecto del genotipo del portainjerto sobre la parte aérea para ninguno de los injertos recíprocos, como ya se ha observado en trabajos anteriores (Martínez-Rodríguez et al., 2008). De hecho, es la parte aérea la que parece tener un efecto preponderante ya que, por ejemplo, la línea 38-BW solo inducía una mayor biomasa cuando era usada como tal (Fig. 3.15).

Dado que el crecimiento de las plantas depende también del contenido de agua y el potencial de turgor intrínseco, los diferentes cambios inducidos por el portainjerto en el crecimiento de la parte aérea también se muestra a nivel de las relaciones hídricas (Santa-Cruz et al., 2002). En este sentido, el WUE_{av} , es un buen ejemplo del poder que tiene la parte aérea respecto a la raíz en las combinaciones de injertos de la población *RIL* seleccionada (Fig. 3.22). Si nos fijamos en la combinación 175-bw/38-BW, observamos cómo el comportamiento es claramente semejante al de la línea *RIL* 175-bw sin injertar, siendo el WUE_{av} muy inferior al resto de líneas, al igual que al resto de combinaciones que poseen la línea 175-bw en la parte aérea. Sin embargo, la línea 38-BW muestra el mayor WUE_{av} de toda la población *RIL*. Esto esta acorde con el primer ensayo

(Fig. 3.11), cuando las plantas eran usadas como planta entera, mostrando la línea 175-*bw* el menor *WUE_{av}*.

Existe un efecto dominante de la parte aérea en los injertos en condiciones óptimas de cultivo

Utilizando injertos recíprocos de 4 líneas *RIL* seleccionadas pudimos comprobar cómo el injerto en sí mismo no afectaba a los parámetros fisiológicos estudiados en condiciones óptimas de cultivo. Estos resultados corroboran los datos previos obtenidos con diferentes genotipos de parte aérea de tomate (Estañ et al., 2005; Santa-Cruz et al., 2002) y los de Romero (1997) en plantas de melón injertadas, quien sugirió que el control del crecimiento de la planta reside en la parte aérea, y no en la raíz, cuando las plantas se cultivan en ausencia de sal (Martinez-Rodriguez et al., 2008). Sin embargo, cuando las condiciones son limitantes y el estrés es severo, parece ser que la raíz empieza a jugar un papel fundamental en la respuesta de la planta a dicho estrés. Estudios recientes realizados con tomates tipo cherry muestran que la realización de injertos utilizando como portainjerto especies más adaptadas a las condiciones de estrés hídrico puede ser una herramienta útil para mejorar los cultivos frente a ese tipo de estrés (Sánchez-Rodríguez et al., 2012b). No obstante, en la bibliografía se han hecho experimentos muy semejantes pero con resultados opuestos, como por ejemplo los realizados por Sánchez- Rodríguez y col. (2012a). Estos estudios demuestran que las respuestas antioxidantes mostradas por las plantas de tomate cuando son cultivadas en condiciones de estrés hídrico reside en la parte aérea en injertos recíprocos (Sánchez-Rodríguez et al., 2012a), lo que no excluye que la raíz tenga un efecto menor pero significativo en respuesta al estrés.

Por lo tanto, de este ensayo se concluye que el genotipo del portainjerto en las líneas contrastadas no alteraba ni la biomasa ni los parámetros relacionados con el WUE_{av} de sus respectivos injertos bajo las condiciones ensayadas: estado vegetativo, cultivo hidropónico y ausencia de estrés. Todos esos parámetros dependen del genotipo de la parte aérea.

3.- ENSAYO 3: EXPLOTACIÓN DE CARACTERES APORTADOS POR LA RAÍZ A UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TOMATE INJERTADA SOBRE LÍNEAS RIL SELECCIONADAS

3.1.- El consumo diario de agua parece estar condicionado por el desarrollo foliar sin afectar significativamente al rendimiento del fruto, aunque las diferencias aparecen al final del cultivo, coincidiendo con la intensificación del estrés ambiental

La mayoría de los experimentos realizados con injertos sugieren que los cambios en la parte aérea están regulados por el portainjerto a través de un control en la captación, síntesis y traslocación de agua, minerales y hormonas vegetales (Lee & Oda, 2003). En nuestro ensayo, en el conjunto de plantas RIL injertadas, el consumo diario de agua (Fig. 3.36) estuvo condicionado por el desarrollo foliar ($r=0,661^{**}$, $n=54$, Figs. 3.32 y 3.40). Se sabe que determinados portainjertos pueden aumentar la capacidad de absorber agua y nutrientes del suelo (Romero, 1997) y transferirlos a la parte aérea, ya que tienen raíces más densas y largas (Kovalev, 1990; Ra, 1995). En este ensayo, el uso de plantas RIL como portainjertos también modificó significativamente el consumo de agua de la variedad injertada al final del periodo de ensayo, periodo en el cual la tasa de transpiración era más elevada por el incremento de temperatura. Esta modificación del consumo del agua parece estar mediado esencialmente a través del desarrollo foliar.

El peso fresco de los frutos, por su alto contenido en agua, se debe considerar como un parámetro integrador del estado hídrico experimentado por las plantas durante el periodo de crecimiento y maduración de los mismos (De Swaef & Steppe, 2011). Puesto que el volumen de riego aportado fue el mismo para todas las plantas, las diferencias de peso de fruto deben relacionarse con diferencias en el suministro de agua asociada al genotipo del portainjerto ($r=0,339^{*}$, $n=90$), teniendo en cuenta además que, en condiciones

hídricas limitantes, existe cierta competencia por la disponibilidad de agua entre los tejidos vegetativos y los tejidos reproductivos (Consoli et al., 2014). En la literatura existen muchos estudios que demuestran que la prolongada duración de la cosecha de la fruta en plantas injertadas es debido a la mejora de la absorción de agua y minerales (Gomi & Masuda, 1981; Kim & Lee, 1989; Masuda, 1989; Masuda & Gomi, 1982). Resultados previos realizados en plantas de tomate de la variedad Pear Cherry apoyan estos resultados (Estévez-Caparrós et al., 2011). Con lo cual el consumo de agua depende de la biomasa foliar, pero un mayor consumo de agua no implica un incremento de rendimiento (Fig. 3.40), sugiriendo que ni la biomasa foliar ni el consumo de agua son limitantes para la productividad en las condiciones ensayadas, en ausencia de ningún estrés impuesto (Albacete et al., 2008).

La productividad y el WUEa_γ del cultivo dependen de la biomasa foliar inducida por la línea RIL utilizada como portainjerto

El crecimiento del fruto depende de la aportación de suministros por parte de las hojas (Andriolo et al., 1998), así como del periodo de cosecha (Davis et al., 2008), por ello cuando el cultivo está en las primeras fases, el peso del fruto es menor que cuando el cultivo está más avanzado como se observó en el racimo 1 (Fig. 3.38A). Sin embargo hay que tener en cuenta que al final del ensayo el estrés hídrico ambiental se intensificó y el riego aplicado pudo no ser el óptimo y/o la demanda hídrica de las plantas se intensificó para adaptarse a esas condiciones. A mitad del experimento, en los racimos 3 y 4, el peso medio de los frutos varió según la línea RIL utilizada como portainjerto. Los frutos más grandes se recogieron en el racimo 3 de las plantas injertadas sobre las líneas seleccionadas de alta biomasa 38-BW y 65-Bw, independientemente de su

consumo de agua, corroborando la importancia de la biomasa foliar en la productividad.

La cosecha total acumulada hasta el 6^o racimo se correlacionó positivamente con el WUE_{aY} ($r=0,544^{**}$, $n=54$), como muestra la bibliografía (Öztekin & Tuzel, 2011; Öztekin et al., 2009), oscilando entre los 4600 g/planta registrados en las plantas injertadas sobre la línea de alto vigor 112-BW y los 5853 g/planta registrados en otra línea de alto vigor, 38-BW (Fig. 3.39). Además, portainjertos de alto vigor, como las líneas *RIL* 38-BW, 65-Bw y 59-Bw incrementaron el peso medio del fruto al inicio del ensayo respecto a los portainjertos comerciales (Fig. 3.38). Ya anteriores estudios demostraron que las plantas injertadas de tomate incrementaban el rendimiento medio de fruto respecto a plantas sin injertar, según el vigor del portainjerto utilizado (Davis et al., 2008). Sin embargo, a final del ensayo, con alto estrés ambiental, los portainjertos derivados de las plantas *RIL* de alto vigor, como la línea 38-BW mostraron frutos de menor peso medio, mientras que los portainjertos derivados de plantas *RIL* de bajo vigor, como 66-bW, mejoraban el rendimiento del fruto hasta un 30% (Fig. 3.38B). Esto se debe a la competencia que existe por los recursos hídricos y nutricionales de la planta entre los tejidos reproductivos y los tejidos vegetativos (Consoli et al., 2014). La mayoría de las líneas *RIL* han superando la producción a la obtenida con los portainjertos comerciales Spirit y Beaufort, no sucediendo eso con Maxifort. Los mismos resultados fueron obtenidos por Estévez-Caparros et al. (2011) cuando Beaufort y Maxifort eran injertados en un cultivo de tomate cherry Luciplús. Estudios previos muestran que plantas injertadas que dependen de las características del portainjerto en cultivos vegetales dan lugar a un aumento en el rendimiento y/o calidad del fruto (Chung et al., 1997; Flores et al., 2010; Kacja Marsic & Osvald, 2004; Khah et al., 2006; Roupheal et al., 2010), aunque depende de las condiciones de cultivo y de la variedad injertada.

El $WUEa$ proporciona un medio simple de evaluar si el rendimiento de un cultivo está limitado por el suministro de agua o por otros factores (Angus & van Herwaarden, 2001). Los resultados indican que el $WUEa_{\gamma}$ en términos de cosecha depende de las diferencias en el consumo acumulado de agua en la población *RIL* actuando como portainjerto en las condiciones de alto estrés ambiental ($r=0,453^*$, $n=54$). No es nuevo que la mejora del WUE y del rendimiento en cultivos de tomate dependa del consumo de agua (Agele et al., 2011). De hecho se han hecho estudios con cultivos de tomate "Big Red" que muestran plantas autoinjertadas e injertadas sobre la variedad "He-mans" con un 50% mayor WUE en comparación con plantas no injertadas debido a que éstas últimas consumían más agua y nutrientes (Lykas et al., 2008). Así, las plantas injertadas sobre las líneas de bajo vigor 121-*bw* y 175-*bw*, con un consumo acumulado de agua significativamente menor, de aproximadamente un 15% menos que la variedad comercial auto-injertada TT-115 (Fig. 3.35), presentaron un incremento en el $WUEa_{\gamma}$ de más de un 30% (Fig. 3.37), lo cual está relacionado con la biomasa foliar.

3.2. El precursor del etileno ACC y el ABA parecen ser señales reguladoras del crecimiento foliar principalmente al final del periodo de cultivo, cuando la tasa de transpiración era más elevada, aumentando el $WUEa_{\gamma}$ (en base a producción de fruto) a través de un control de la biomasa foliar

Cuando las líneas *RIL* se evaluaron como planta entera (Ensayo 1), la biomasa foliar se correlacionó negativamente con los niveles del precursor del etileno ACC ($r=-0,214^{**}$, $n=200$, Fig. 3.14), debido a que el ACC es inductor de la senescencia foliar e inhibidor del crecimiento vegetativo (Ghanem et al., 2008).

El precursor del etileno ACC está positivamente relacionado con la $WUE_{a\gamma}$ (en base a fruto) a través de un control negativo del área foliar

Esta correlación del ACC con la biomasa foliar se mantuvo constante cuando las líneas *RIL* seleccionadas se utilizaron como portainjertos de una variedad comercial al final del periodo de cultivo donde la demanda evaporativa era elevada ($r=-0,335^*$, $n=90$, Fig. 3.42). Además, el análisis de correlación entre los niveles de ACC en líneas *RIL* usadas como planta entera y como portainjertos reveló una estrecha asociación ($r=0,896^{**}$, $n=60$, Tabla 3.6). Estos datos demuestran el efecto que tiene el portainjerto en la comunicación raíz-parte aérea a través del precursor del etileno ACC (Dodd et al., 2009). Sin embargo el efecto negativo sobre el WUE_{av} (en base a desarrollo vegetativo) en la planta entera ($r= -0,231^{**}$, $n=200$, Fig. 3.14) se convierte en positivo cuando el $WUE_{a\gamma}$ se calcula en base a cosecha en fruto ($r= 0,371^{**}$, $n=45$, Fig. 3.37). Esto significa que una reducción de la biomasa foliar gracias al portainjerto (puede que a través del ACC) reduce el consumo de agua sin afectar al rendimiento en fruto, lo que resulta de gran interés.

ABA y la relación ACC/ABA parecen tener un papel importante en la regulación del crecimiento foliar al final del periodo de cultivo

Por otra parte, la concentración hormonal de ABA muestra un comportamiento contrario al ACC, correlacionándose positivamente con la biomasa foliar cuando las líneas *RIL* se utilizaban como planta entera ($r=0,383^{**}$, $n=200$, Fig. 3.14) y como portainjerto al final del periodo de ensayo ($0,257^*$, $n=90$, Fig. 3.42). Mediante el uso de mutantes deficientes de ABA se ha demostrado que esta hormona, en condiciones de estrés hídrico, mejora el potencial hídrico foliar (Fambrini et al., 1995; Nagel et al., 1994) y el contenido

relativo de agua (Dodd, 2003), aumenta la biomasa vegetativa y radicular (Nagel et al., 1994) e incrementa el área foliar (Dodd, 2003; Sharp & Lenoble, 2002). Asimismo, al igual que ocurre con el precursor del etileno ACC, el análisis de correlación entre los niveles de ABA en líneas *RIL* usadas como planta entera y como portainjerto de una variedad comercial mostró una cercana asociación (0,698*, n=60, Tabla 3.6). En anteriores trabajos se ha visto que un papel importante del ABA endógeno es limitar la acción inhibitoria del crecimiento del etileno, manteniendo así la producción de biomasa bajo déficit hídrico (Dodd et al., 2009; Sharp & Lenoble, 2002). Por ello tiene sentido la asociación negativa que muestra la relación ACC/ABA con la biomasa foliar en planta *RIL* entera (-0,212**, n=200, Fig. 3.14) y usada como portainjerto de una variedad comercial (-0,452*, n=90, Fig. 3.42). La relación entre el precursor del etileno ACC y ABA en el xilema parece ser una señal reguladora del crecimiento foliar cuando las líneas *RIL* seleccionadas eran usadas como planta entera y como portainjerto, haciéndose patente el efecto al final del periodo de cultivo, cuando la tasa de transpiración era más elevada (Albacete et al., 2009). En este momento es cuando se manifestaron las diferencias entre las líneas *RIL*, y su utilidad para aumentar el $WUE_{a\gamma}$ (en base a producción de fruto).

La CK t-Z y la relación t-Z/rZ parecen ser señales positivas para la regulación del crecimiento foliar a largo plazo o cuando hay alta demanda evaporativa

Se sabe que las CKs son sintetizadas principalmente en las raíces y son transportadas a la parte aérea vía xilema (Aloni et al., 2005; Gan & Amasino, 1995; Lee & Oda, 2003), estando implicadas además en varios aspectos del desarrollo de la planta, en particular en la regulación de la senescencia foliar (Gan & Amasino, 1995; Guo & Gan, 2007; Lara et al., 2004). Las CKs también están implicadas en el tamaño y la forma final de la hoja al influir en la división

y diferenciación celular (Werner, 2001; Werner et al., 2008). La *t-Z* es una de las principales formas activas de las CKs en tomate (Davey, 1976), correlacionándose en nuestro ensayo positivamente con la biomasa vegetativa (0,577*, n=90, Fig. 3.42) en condiciones de estrés ambiental. Además, la relación entre la CK más activa en tomate, *t-Z* y su ribosido rZ (*t-Z/rZ*) también se correlacionó positivamente con la biomasa foliar (0,687*, n=90), lo cual sugiere que el mantenimiento del nivel homeostático de la forma más activa podría ser una respuesta importante cuando la demanda evaporativa es elevada al final del periodo de ensayo al alcanzarse 35°C, a pesar de una disminución general en la concentración de las CKs de la planta (Albacete et al., 2008).

Por lo tanto, cuando se usa un portainjerto de menos vigor, medido como biomasa foliar, en condiciones donde la transpiración es elevada por la excesiva temperatura en la etapa final del cultivo, esa raíz poco vigorosa no tiene un efecto negativo sobre la producción, pero sí en el consumo de agua (Fig. 3.40), dando lugar a un mayor uso eficiente del agua. Ese tamaño de hoja está relacionado con parámetros hormonales que vienen de la raíz (Fig. 3.42), destacando el ACC (-0,335*, n=90), ABA (0,257*, n=90) y las CKs (0,577*, n=90), según apoyan los estudios de correlación llevados a cabo. Estos resultados confirman que la planta de tomate está genéticamente (no fisiológicamente) limitada por el sumidero (fruto) más que por la fuente (hoja) en condiciones normales (Hocking y Steer 1994). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la biomasa foliar puede ser limitante si las condiciones estresantes como la salinidad (Albacete et al., 2009) o el déficit hídrico (este estudio) perduran en el tiempo.

3.3. Los parámetros vegetativos y el WUE dependen del genotipo de la parte aérea en condiciones óptimas de riego, mientras que la influencia del genotipo de la raíz se hace más patente cuando la demanda evaporativa es elevada

En general, se concluye que el injerto es un enfoque agrícola eficaz para mejorar el *WUE* y la calidad del fruto en condiciones óptimas de riego y también en condiciones ambientales más difíciles (Flores et al., 2010; Ibrahim et al., 2014). El hecho de que el efecto positivo del injerto en el *WUE* quizás dependa de ambos genotipos, el de la parte aérea y el de la raíz, hace que la selección de un portainjerto óptimo para cada variedad y/o condición de cultivo no sea una tarea fácil. Ello se observa tras el análisis de injertos recíprocos en condiciones óptimas de riego donde el *WUEa* y la biomasa vegetal dependen del genotipo de la parte aérea y no del sistema radicular. Sin embargo, al final del ensayo en invernadero, cuando el estrés hídrico ambiental se intensifica, es el genotipo de la raíz el que ejerce una influencia significativa. En este sentido, las líneas con bajo vigor “*bw*” son genotipos muy interesantes como portainjertos, ya que mejoran el *WUEa_γ* hasta un 40% en el cultivo de tomate bajo alta demanda evaporativa. Y lo hacen a través de la reducción de la biomasa foliar y el consumo de agua, sin afectar negativamente al rendimiento en fruto, incrementando así el índice de cosecha.

Estos resultados sugieren nuevos enfoques biotecnológicos centrados en el sistema radicular, y por lo tanto en la señalización raíz-parte aérea (Dodd, 2005) con el fin de aumentar la estabilidad y sostenibilidad de los cultivos en distintas condiciones de estrés ambiental (Ghanem et al., 2011). Se estima que con una gestión adecuada de los cultivos, el uso de estos portainjertos tipo “*bw*” podría ahorrar anualmente en la Región de Murcia el equivalente del consumo anual de una población de 80.000 personas (4,4 hm³).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión del gen *CIN1* mejora la respuesta al estrés hídrico y el uso eficiente de agua en tomate al disminuir la transpiración y mantener elevada tasa fotosintética. Estos efectos parecen estar relacionados con alteraciones de los flujos metabólicos en la hoja que afectan a la regulación estomática, a la eficacia fotosintética y a la senescencia foliar.
2. El metabolismo antioxidativo de las plantas *CIN1* es más eficiente en condiciones de estrés hídrico debido al elevado estado reducido del glutatión así como los niveles de α -tocoferol, que son mecanismos no enzimáticos de protección antioxidativa, dando lugar a una mayor protección de las membranas, además de a la activación de mecanismos enzimáticos antioxidativos.
3. La concentración de la citoquinina más activa en plantas de tomate, *t-Z*, parece ser una señal positiva en el retraso de la senescencia foliar en plantas *CIN1* sometidas a estrés hídrico por modificación de la actividad fuente-sumidero. Asimismo, la reducción del precursor del etileno ACC puede influir en el retraso de senescencia foliar y en el mantenimiento de la biomasa bajo condiciones de estrés hídrico. Estos resultados apoyan una interrelación entre el metabolismo de la sacarosa y el hormonal.
4. Existe variabilidad genética para el WUE_a y algunos parámetros que condicionan la producción de biomasa y el consumo de agua de la planta en la población *RIL* estudiada, que puede ser explotable mediante su uso como portainjertos.
5. La conductancia estomática tiene un papel fundamental en el control de la pérdida de agua, correlacionándose negativamente con la capacidad fotosintética y con la biomasa foliar, y por tanto con WUE_i y con WUE_{av} (en base a biomasa vegetativa).

6. WUE_a , WUE_i , tasa fotosintética (A) y parámetros de crecimiento se correlacionaron positivamente con parámetros hormonales (ABA, rZ , SA, IAA, JA y las relaciones IAA/ACC y CK/ACC) y con parámetros nutricionales (Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , B^+ y Na^+).
7. El precursor del etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y su relación con ABA (ACC/ABA) se correlacionaron negativamente con parámetros hídricos y vegetivos, destacando WUE_i y WUE_{av} , sugiriendo un papel importante en el control del crecimiento.
8. Injertos recíprocos entre líneas contrastadas confirman que existe un efecto dominante de la parte aérea sobre la biomasa vegetal y el WUE durante el crecimiento vegetativo en condiciones óptimas de cultivo.
9. Existe una relación significativa entre el vigor de la línea *RIL* como planta entera y como portainjertos. Cuando el estrés ambiental es alto, el efecto del portainjerto se hace patentes en parámetros hídricos y de crecimiento que influyen en el $WUE_{a\gamma}$ (rendimiento de fruto/uso de agua) de una variedad comercial.,
10. En condiciones de alto estrés ambiental, los portainjertos de bajo vigor "bw" incrementan el $WUE_{a\gamma}$ (en base al fruto) hasta en un 40% disminuyendo la biomasa foliar y el uso del agua, e incrementando el índice de cosecha.
11. El precursor del etileno ACC, parámetro hormonal derivado del portainjerto que regula negativamente la biomasa foliar, está positivamente correlacionado con $WUE_{a\gamma}$ (rendimiento de fruto) pero negativamente correlacionado con WUE_{av} (biomasa vegetativa) a través de un control negativo del crecimiento foliar.
12. Los parámetros hormonales presuntamente derivados de la raíz, ABA, $t-Z$, ACC/ABA y $t-Z/rZ$, parecen ser señales positivas en la regulación del crecimiento foliar y y el WUE , haciéndose más patente a largo plazo y/o en condiciones subóptimas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, A. 2007. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*, **143**, 1720-1738.
- Abdelmageed, A.H.A. 2009. Influence of grafting on growth, development and some physiological parameters of tomatoes under controlled heat stress conditions. *European journal of horticultural science*, **74**(1), 16-20.
- Acharya, B.R., Assmann, S.M. 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*, **69**(4), 451-462.
- Agele, S.O., Iremiren, G.O., Ojeniyi, S.O. 2011. Evapotranspiration, water use efficiency and yield of rainfed and irrigated tomato. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13**(4), 469-476.
- Ahsan, N., Lee, D.-G., Lee, S.-H., Kang, K.Y., Bahk, J.D., Choi, M.S., Lee, I.-J., Renaut, J., Lee, B.-H. 2007. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum*, **131**(4), 555-570.
- Akıncı, Ş., Lösel, D.M. 2012. Plant Water-Stress Response Mechanisms in: *Water Stress*, (Ed.) E.b.P.I.M.M. Rahman, pp. 300.
- Alba, J.M., Montserrat, M., Fernández-Muñoz, R. 2009. Resistance to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) by acylsucroses of wild tomato (*Solanum pimpinellifolium*) trichomes studied in a recombinant inbred line population. *Experimental and Applied Acarology*, **47**(1), 35-47.
- Albacete, A., Ghanem, M.E., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Martínez, V., Lutts, S., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. 2008. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, **59**(15), 4119-4131.
- Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Ghanem, M.E., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Asins, M.J., Cuartero, J., Lutts, S., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F. 2009. Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence, and increased leaf area and crop productivity in salinized tomato. *Plant, Cell and Environment*, **32**(7), 928-938.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Lunt, T., Ward, E. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(15), 7327-7331.
- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., Dreieicher, E., Ullrich, C.I. 2005. Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany*, **56**(416), 1535-1544.
- Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J.A., Nicolás, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., Nicolás, C. 2009. Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, **150**(3), 1335-1344.
- Ambiente, A.E.d.M. 2012. Vol. 2012.

- Andriolo, J.L., Streck, N.A., Buriol, G.A., Ludke, L., Duarte, T.S. 1998. Growth, development and dry-matter distribution of a tomato crop as affected by environment. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **73**(1), 125-130.
- Angus, J.F., van Herwaarden, A.F. 2001. Increasing Water Use and Water Use Efficiency in Dryland Wheat. *Agron. J.*, **93**(2), 290-298.
- Antunes, W.C., Provart, N.J., Williams, T.C.R., Loureiro, M.E. 2012. Changes in stomatal function and water use efficiency in potato plants with altered sucrolytic activity. *Plant, Cell and Environment*, **35**(4), 747-759.
- Anuario de Estadística Agraria, M.d.A., Alimentación y Medio Ambiente. 2013. Superficies y producciones de cultivos.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Vol. 55, pp. 373-399.
- Appeldoorn, N.J.G., De Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld, E.A.M., Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D., Van Der Plas, L.H.W. 1999. Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato. *Plant, Cell and Environment*, **22**(9), 1085-1096.
- Appeldoorn, N.J.G., De Bruijn, S.M., Koot-Gronsveld, E.A.M., Visser, R.G.F., Vreugdenhil, D., Van der Plas, L.H.W. 1997. Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta*, **202**(2), 220-226.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., Kieber, J.J. 2009. Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell and Environment*, **32**(9), 1147-1160.
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, **63**(1), 43-57.
- Asada, K. 1988. Production, scavenging and action of active oxygen. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, **33**(16), 2659-2664.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, Vol. 50, pp. 601-639.
- Astacio, M.G., van Iersel, M.W. 2011. Determining the effects of abscisic acid drenches on evapotranspiration and leaf gas exchange of tomato. *HortScience*, **46**(11), 1512-1517.
- Bacon, M. 2004. *Water use efficiency in plant biology : Biological sciences series*.
- Bai, Y., Lindhout, P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, **100**(5), 1085-1094.
- Balibrea, M.E., Cuartero, J., Bolarín, M.C., Pérez-Alfocea, F. 2003. Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiologia Plantarum*, **118**(1), 38-46.

- Balibrea, M.E., Dell'Amico, J., Bolaín, M.C., Pérez-Alfocea, F. 2000. Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiologia Plantarum*, **110**(4), 503-511.
- Balibrea, M.E., Parra, M., Bolaín, M.C., Pérez-Alfocea, F. 1999. Cytoplasmic sucrolytic activity controls tomato fruit growth under salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**(6), 561-568.
- Barratt, D.H.P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Feil, R., Simpson, C., Maule, A.J., Smith, A.M. 2009. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(31), 13124-13129.
- Bauer, D., Biehler, K., Fock, H., Carrayol, E., Hirel, B., Migge, A., Becker, T.W. 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum*, **99**(2), 241-248.
- Bergmeyer, Bernt, Gutmann. 1974. *Methods of Enzymatic Analysis*. Chemie Academic Press N.Y., Verlag
- Bianchi, M.W., Damerval, C., Vartanian, N. 2002. Identification of proteins regulated by cross-talk between drought and hormone pathways in *Arabidopsis* wild-type and auxin-insensitive mutants, *axr1* and *axr2*. *Functional Plant Biology*, **29**(1), 55-61.
- Bisswanger, H. 2004. *Practical enzymology*.
- Blum, A. 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation*, **20**(2), 135-148.
- Bogdan, J. 2009. Alterations in sugar metabolism coincide with a transition of wheat seedlings to dehydration intolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **66**(2), 186-194.
- Bogeat-Triboulot, M.B. 2006. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, **143**(2), 876-892.
- Bolouri Moghaddam, M.R. 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS journal*, **277**(9), 2022-2037.
- Bonfig, K.B. 2010. Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response. *Molecular Plant*, **3**(6), 1037-1048.
- Bonfig, K.B., Gabler, A., Simon, U.K., Luschin-Ebengreuth, N., Hatz, M., Berger, S., Muhammad, N., Zeier, J., Sinha, A.K., Roitsch, T. 2010. Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response. *Molecular Plant*, **3**(6), 1037-1048.
- 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**(2), 101-115.

- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment (crop genetic improvement). *Science*, **218**(4571), 443-448.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2), 248-254.
- Briggs, L.J., and Shantz, H.L. 1916. Daily transpiration during the normal growth period and its correlation with the weather. *J. Agric. Res.*, **7**, 155-212.
- Broman, K.W. 2005. The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics*, **169**(2), 1133-1146.
- Broman, K.W. 2012. Genotype probabilities at intermediate generations in the construction of recombinant inbred lines. *Genetics*, **190**(2), 403-412.
- Cai, H., Tian, S., Liu, C., Dong, H. 2011. Identification of a MYB3R gene involved in drought, salt and cold stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*, **485**(2), 146-152.
- Caird, M.A. 2007. Nighttime stomatal conductance and transpiration in C3 and C4 plants. *Plant Physiology*, **143**, 4-10.
- CarreteroPaulet, L. 2006. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, **62**, 683-695.
- Casas, J.L., Del Río, J.A., Serrano, M., Acosta, M. 1989. Comparison of 4 methods for the extraction and quantification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in tomato fruits. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, **29**, 191-198.
- Caspar, T. 1985. Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology*, **79**, 11-17.
- Céspedes López, A.J., García García, M.C., Pérez Parra, J.J., Cuadrado Gómez, I.M. 2009. *Caracterización de la Explotación Hortícola Protegida de Almería*. Fundación para la Investigación Agraria en la Provincia de Almería, Almería.
- Ciereszko, I., Johansson, H., Kleczkowski, L.A. 2001. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis. *Biochemical Journal*, **354**(1), 67-72.
- Clough, S.J., Bent, A.F. 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**(6), 735-743.
- CNULD. 2013. United Nations Decade for Deserts and the Fight against Desertification.
- Consoli, S., Stagno, F., Roccuzzo, G., Cirelli, G.L., Intrigliolo, F. 2014. Sustainable management of limited water resources in a young orange orchard. *Agricultural Water Management*, **132**, 60-68.
- Cramer, G.R. 2007. Water and salinity stress in grapevines: Early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & integrative genomics*, **7**(2), 111-134.

- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, **11**.
- Croteau, R. 2000. *Natural products (secondary metabolites)*
Biochemistry and molecular biology of plants.
- Cuadrat, J.M., Pita López, M.F. 2006. Clasificación de los climas. 4ª Ed. ed. in: *Climatología*, Cátedra S.A. Madrid.
- Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R. 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, **78**(1-4), 83-125.
- Cuartero, J., Nuez, F., and Díaz, A. 1984. Catalogue of collections of *Lycopersicon* and *L. pennellii* from Northwest of Peru. *Tomato Genetics Cooperative*, **34**, 43-46.
- Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 521-547.
- Chatzidimitriadou, K., Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Perl-Treves, R., Tsaftaris, A. 2009. Expression of SOD transgene in pepper confer stress tolerance and improve shoot regeneration. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(4).
- Chaves, M.M. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**(4), 551-560.
- Chaves, M.M. 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**(3), 239-264.
- Chernyad'ev, I.I. 1997. Plant photosynthesis under conditions of water stress and the protective effect of cytokinins: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **33**(1), 1-12.
- Choudhary, K.K., Agrawal, S.B. 2014. Cultivar specificity of tropical mung bean (*Vigna radiata* L.) to elevated ultraviolet-B: Changes in antioxidative defense system, nitrogen metabolism and accumulation of jasmonic and salicylic acids. *Environmental and Experimental Botany*, **99**, 122-132.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., Müller, A. 2005. Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed arabidopsis. *Plant Physiology*, **137**(1), 209-219.
- Chung, H.D., Youn, S.J., Choi, Y.J. 1997. Effects of rootstocks on yield, quality and components of tomato fruits. *J. Korean Soc. Hortic. Sci*, **38**(6), 603-606.
- Dal Santo, S., Stampfl, H., Krasensky, J., Kempa, S., Gibon, Y., Petutschnig, E., Rozhon, W., Heuck, A., Clausen, T., Jonaka, C. 2012. Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**(8), 3380-3392.
- Darwin, C. 1880. *The Power of Movement in Plants*, London.

- Davey, J.E. 1976. Cytokinin translocation: Changes in zeatin and zeatin-riboside levels in the root exudate of tomato plants during their development. *Planta*, **130**(1), 69-72.
- Davies, W.J., Wilkinson, S., Loveys, B. 2002. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist*, **153**(3), 449-460.
- Davies, W.J., Zhang, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**(1), 55-76.
- Davis, A.R., Perkins-Veazie, P., Hassell, R., Levi, A., King, S.R., Zhang, X. 2008. Grafting effects on vegetable quality. *HortScience*, **43**(6), 1670-1672.
- Day, W., Lawlor, D.W., Day, A.T. 1987. The effect of drought on barley yield and water use in two contrasting years. *Irrigation Science*, **8**(2), 115-130.
- de Campos, M.K.F., de Carvalho, K., de Souza, F.S., Marur, C.J., Pereira, L.F.P., Filho, J.C.B., Vieira, L.G.E. 2011. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*, **72**(2), 242-250.
- de Dorlodot, S., Forster, B., Pagès, L., Price, A., Tuberosa, R., Draye, X. 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*, **12**(10), 474-481.
- De Gara, L. 2003. Ascorbate metabolism and plant growth-from germination to cell death. in: *Vitamin C: its function and biochemistry in animals and plants*, BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, pp. 83-95.
- De Swaef, T., Steppe, K. 2011. Tomato stem and fruit dynamics predicted with a whole-plant water and carbon flow model, Vol. 893, pp. 713-720.
- De Wit, C.T. 1958. Transpiration and crop yields. in: *Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen*, Vol. 64, pp. 1-87.
- Diez, M.J. 1989. La utilización de variedades o híbridos de tomate. in: *Tesis Doctoral*, Universidad de Valencia.
- Diplock, A.T. 1983. The role of vitamin E in biological membranes. *Ciba Foundation symposium*, **101**, 45-55.
- Dodd, I.C. 2003. Hormonal Interactions and Stomatal Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **22**(1), 32-46.
- Dodd, I.C. 2005. Root-to-shoot signalling: Assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in planta. *Plant and Soil*, **274**(1-2), 251-270.
- Dodd, I.C., Theobald, J.C., Richer, S.K., Davies, W.J. 2009. Partial phenotypic reversion of ABA-deficient flacca tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: Normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany*, **60**(14), 4029-4039.

- Doehlert, D.C., Felker, F.C. 1987. Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiologia Plantarum*, **70**(1), 51-57.
- Döll, P., Siebert, S. 2002. Global modeling of irrigation water requirements. *Water Resources Research*, **38**(4), 81-811.
- Dong, H. 2008. Effects of cotton rootstock on endogenous cytokinins and abscisic acid in xylem sap and leaves in relation to leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, **59**(6), 1295-1304.
- Earth Observatory, N., USA. 2003. Change in global plant productivity. USA.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D.E., Roitsch, T. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell*, **9**(10), 1825-1841.
- Ehneß, R., Roitsch, T. 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *Plant Journal*, **11**(3), 539-548.
- Eisenreich, W. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, **6**, 78-84.
- Else, M.A., Janowiak, F., Atkinson, C.J., Jackson, M.B. 2009. Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Annals of Botany*, **103**(2), 313-323.
- Epstein, E. 1983. Crops tolerant of salinity and other mineral stresses. *Better Crops for Food*(2), 61-82.
- Estañ, M.T., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T.J., Bolarin, M.C. 2005. Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *Journal of Experimental Botany*, **56**(412), 703-712.
- Estévez-Caparrós, J.M., Díaz-Pérez, M., Camacho-Ferre, F. 2011. Influence of several rootstocks on yield of cultivars of pear cherry tomato cultivated under mesh greenhouse. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, **9**(1), 364-368.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M.J., Alcobendas, R., Artlip, T., Hernandez, J.A. 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, **62**(8), 2599-2613.
- Fambrini, M., Vernieri, P., Toncelli, M.L., Rossi, V.D., Pugliesi, C. 1995. Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant: III. Phenotypic interaction in reciprocal grafts from wilted mutant and wild-type plants. *Journal of Experimental Botany*, **46**(5), 525-530.
- FAO, F.a.A.O.o.t.U.N. 2013. FAOSTAT, FAO.

- Farias Rodriguez, R. 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum*, **102**(3), 353-359.
- Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T. 1986. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 503-537.
- Farquhar, G.D., Richards, R.A. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, **11**(6), 539-552.
- Flores, F.B., P., S.-B., Estañ, M.T., Martinez-Rodriguez, M.M., Moyano, E., Morales, B., Campos, J.F., Bolarín, M.C. 2010. The effectiveness of grafting to improve tomato fruit quality. *Scientia Horticulturae*, **125**(3), 211-217.
- Foolad, M.R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, **2007**.
- Foolad, M.R., Subbiah, P., Zhang, L. 2007. Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and nonstress conditions. *International Journal of Plant Genomics*, **2007**.
- Foyer, C.H. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **92**(4), 696-717.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**(1), 21-25.
- Foyer, C.H., Rennenberg, H. 2000. Regulation of glutathione synthesis and its role in abiotic and biotic stress defec. in: *Sulfur nutrition and sulphur assimilation in higher plants*, (Ed.) Springer, pp. 127-153.
- Franco, A.C. 2006. Differential effects of drought and light levels on accumulation of citric and malic acids during CAM in *Clusia*. *Plant, Cell and Environment*, **15**, 821-829.
- Franks, P.J., Drake, P.L., Froend, R.H. 2007. Anisohydric but isohydrodynamic: Seasonally constant plant water potential gradient explained by a stomatal control mechanism incorporating variable plant hydraulic conductance. *Plant, Cell and Environment*, **30**(1), 19-30.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **247**(1), 1-11.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**(4), 436-442.
- Fulda, S., Mikkat, S., Stegmann, H., Horn, R. 2011. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biology*, **13**(4), 632-642.
- Galmés, J., Conesa, M.A.N., Ochogavía, J.M., Perdomo, J.A., Francis, D.M., Ribas-Carbó, M., Savé, R., Flexas, J., Medrano, H., Cifre, J. 2011. Physiological and morphological

- adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell and Environment*, **34**(2), 245-260.
- Galmés, J., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., Conesa, M.A. 2013. Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: Anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell and Environment*, **36**(5), 920-935.
- Gan, S., Amasino, R.M. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**(5244), 1986-1988.
- Ghanem, M.E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I.C., Lutts, S., Pérez-Alfocea, F. 2008. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **59**(11), 3039-3050.
- Ghanem, M.E., Martínez-Andujar, C., Albacete, A., Pospíšilova, H., Dodd, I.C., Pérez-Alfocea, F., Lutts, S. 2011. Nitrogen Form Alters Hormonal Balance in Salt-treated Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, **30**(2), 144-157.
- Gibson, S.I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: Navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany*, **55**(395), 253-264.
- Godt, D.E., Goetz. 2000. Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *Plant Journal*, **22**(6), 515-522.
- Goetz, M., Roitsch, T. 1999. The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. *Plant Journal*, **20**(6), 707-711.
- Golldack, D., Vera, P., Dietz, K.-J. 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum*, **118**(1), 64-73.
- Gomi, K., Masuda, M. 1981. *Studies on the characteristics of nutrient absorption of rootstock in grafting fruit vegetables. I. Magnesium deficiency of leaves of cucumber as affected by a rootstock, C. ficifolia and potassium concentration in culture solution* Faculty of Agriculture, Miyazaki Univ. (Japan).
- Gong, P., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Zhang, C., Zhang, X., Khurram, Z., Zhang, Y., Wang, T., Fei, Z., Ye, Z. 2010. Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany*, **61**(13), 3563-3575.
- Gornall, J.L., Guy, R.D. 2007. Geographic variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Canadian Journal of Botany*, **85**, 1202-1213.
- Guicherd, P. 1997. Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: Malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees*, **11**(3), 155-161.

- Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Carmassi, G., Massa, D., Pardossi, A. 2011. Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water. *Environmental and Experimental Botany*, **73**(1), 57-63.
- Guivarc'h, A. 2002. Local expression of the ipt gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *Journal of Experimental Botany*, **53**(369), 621-629.
- Guo, Y.F., Gan, S. 2007. *Genetic manipulation of leaf senescence*
- Senescence processes in plants : Annual plant reviews*.
- Gupta, U.C., Srivastava, P.C., Gupta, S.C. 2011. Role of micronutrients: Boron and molybdenum in crops and in human health and nutrition. *Current Nutrition and Food Science*, **7**(2), 126-136.
- Hakeem, K.R., Chandna, R., Ahmad, P., Iqbal, M., Ozturk, M. 2012. Relevance of Proteomic Investigations in Plant Abiotic Stress Physiology. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **16**(11), 621-635.
- Halliwell, B. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., . 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hare, P.D. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, **21**(2), 79-102.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. 1991. *Propagación de plantas*, México.
- Helmerhorst, E., Stokes, G.B. 1980. Microcentrifuge desalting: A rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein. *Analytical Biochemistry*, **104**(1), 130-135.
- Hermans, C., Bourgis, F., Faucher, M., Strasser, R., Delrot, S., Verbruggen, N. 2005. Magnesium deficiency in sugar beets alters sugar partitioning and phloem loading in young mature leaves. *Planta*, **220**(4), 541-549.
- Hernandez, J.A., Almansa, M.S., del Rio, L., Sevilla, F. 1993. Effect of salinity on metalloenzymes of oxygen metabolism in two leguminous plants. *Journal of Plant Nutrition*, **16**(12), 2539-2554.
- Hernández, J.A., Escobar, C., Creissen, G., Mullineaux, P.M. 2004. Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress. *Functional Plant Biology*, **31**(4), 359-368.
- 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**(8), 853-862.

- Hill, J.P., Germino, M.J., Alongi, D.A. 2011. Carbon-use efficiency in green sinks is increased when a blend of apoplastic fructose and glucose is available for uptake. *Journal of Experimental Botany*, **62**(6), 2013-2022.
- Hirose, T., Takano, M., Terao, T. 2002. Cell wall invertase in developing rice caryopsis: Molecular cloning of OsCIN1 and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. *Plant and Cell Physiology*, **43**(4), 452-459.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. in: *California Agricultural Experiment Station Circular*, pp. 1-32.
- Hossain, M.A., Asada, K. 1984. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant and Cell Physiology*, **25**(7), 1285-1295.
- Hsiao, T.C. 1974. Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Agricultural meteorology*, **14**(1-2), 59-84.
- Huang, L.F. 2007. Regulation of invertase: A 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Functional Plant Biology*, **34**(6), 499-507.
- Hummel, I. 2010. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: An integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology*, **154**(1), 357-372.
- Hwang, J.H., Lee, M.O., Choy, Y.H., Ha-Lee, Y.M., Hong, C.B., Lee, D.H. 2011. Expression Profile Analysis of Hypoxia Responses in Arabidopsis Roots and Shoots. *Journal of Plant Biology*, **54**(6), 373-383.
- Innes, P., Blackwell, R.D. 1981. The effect of drought on the water use and yield of two spring wheat genotypes. *The Journal of Agricultural Science*, **96**(03), 603-610.
- Intergovernmental Panel on Climate Change, I. 2007.
- Ivanov Dobrev, P., Kamínek, M. 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **950**(1-2), 21-29.
- Jason, L.B., Reynolds, K.A.G., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Pilon, M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytologist*, **182**(4), 799-816.
- Jeannette, E., Prioul, J.L. 1994. Variations of ADPglucose pyrophosphorylase activity from maize leaf during day/night cycle. *Plant and Cell Physiology*, **35**(6), 869-878.
- Jiang, Y. 2001. Osmotic adjustment and root growth associated with drought preconditioning-enhanced heat tolerance in Kentucky bluegrass. *Crop Science*, **41**(4), 1168-1173.
- Jiménez, A., Hernández, J.A., Del Río, L.A., Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, **114**(1), 275-284.

- Jin, Y., Ni, D.A., Ruan, Y.L. 2009. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose Level. *Plant Cell*, **21**(7), 2072-2089.
- JK, H., BK., H. 2006. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CACHi2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CACHi2-overexpressing Arabidopsis. *planta*, **223**(3), 433-48.
- Jones, B., Ljung, K., Gunnerås, S.A., Petersson, S.V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G. 2010. Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell*, **22**(9), 2956-2969.
- Jones, H. 2004. What is water use efficiency? in: *Water use efficiency in plant biology* (Ed.) e. MA Bacon, Blackwell Publishing. Oxford, UK, pp. 1-22.
- Jones, H.G. 1992. *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology*, Cambridge University Press, UK.
- Jones, H.G. 1981. The use of stochastic modelling to study the influence of stomatal behaviour on yield-climate relationships. in: *Mathematics and Plant Physiology*, (Eds.) D.A. Charles-Edwards, D.A. Rose. Academic Press,, London, pp. 231-244.
- Junghans, U., Polle, A., DÜchting, P., Weiler, E., Kuhlman, B., Gruber, F., Teichmann, T. 2006. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, Cell and Environment*, **29**(8), 1519-1531.
- Jurado, O., Albacete, A., Martínez-Ballesta, M.C., Carvajal, M., Pérez-Alfocea, F., Dodd, I.C., Romero-Aranda, M.R. 2009. Water relations of the *tos1* tomato mutant at contrasting evaporative demand. *Physiologia Plantarum*, **137**(1), 36-43.
- Kacj Marsic, N., Osvald, J. 2004. The influence of grafting on yield of two tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown in a plastic house. *Acta Agric. Slovenica*, **83**, 243-249.
- Kang, N.J., Kang, Y.I., Kang, K.H., Jeong, B.R. 2009. Induction of thermotolerance and activation of antioxidant enzymes in H₂O₂-Pre-applied leaves of cucumber and tomato seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **78**(3), 320-329.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., Mullineaux, P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *Science*, **284**(5414), 654-657.
- Karrer, E.E., Rodriguez, R.L. 1992. Metabolic regulation of rice α -amylase and sucrose synthase genes in planta. *Plant Journal*, **2**(4), 517-523.
- Khah, E.M., Kakava, E., Mavromatis, A., Chachalis, D., Goulas, C. 2006. Effect of grafting on growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in greenhouse and open-field. *J. App. Hortic*, **8**(1), 3-7.
- 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.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., Harter, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal*, **50**(2), 347-363.
- Kim, J.Y. 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*, **124**(1), 71-84.
- Kim, S.E., Lee, J.M. 1989. *Effect of rootstocks and fertilizers on the growth and mineral contents in cucumber (Cucumis sativus L.)*. Inst. Food Development, Kyung Hee Univ., Suwon, Korea.
- Kitaya, Y., Tsuruyama, J., Shibuya, T., Yoshida, M., Kiyota, M. 2003. Effects of air current speed on gas exchange in plant leaves and plant canopies. *Advances in Space Research*, **31**(1), 177-182.
- Klotz, K.L., Finger, F.L., Anderson, M.D. 2006. Wounding increases glycolytic but not soluble sucrolytic activities in stored sugarbeet root. *Postharvest Biology and Technology*, **41**(1), 48-55.
- Knight, H., Knight, M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: Specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, **6**(6), 262-267.
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(3), 235-246.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**(1), 509-540.
- Koh, E.J. 2008. The ABA effect on the accumulation of an invertase inhibitor transcript that is driven by the CAMV35S promoter in ARABIDOPSIS. *Molecules and Cells*, **26**(3), 236-242.
- Koh, E.J., Lee, S.J., Hong, S.W., Lee, H.S., Lee, H. 2008. The ABA effect on the accumulation of an invertase inhibitor transcript that is driven by the CAMV35S promoter in ARABIDOPSIS. *Molecules and Cells*, **26**(3), 236-242.
- Konikow, L.F., Kendy, E. 2005. Groundwater depletion: A global problem. *Hydrogeology Journal*, **13**(1), 317-320.
- Kovalev, P.A. 1990. Pleiotropic effects of the genes and YG6 and formation of the inflorescence in tomato. *Izvestiya Akademii Nauk Moldavskoi SSR. Biologicheskie I Khimicheskie Nauki*, **5**, 34-36.
- Kramer, P.J., Boyer, J.S. 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press.
- Kranner, I., Grill, D. 1995. The role of glutathione and related enzymes in seeds and poikilohydric plants during desiccation and rehydration. *Acta Pharmaceutica*, **45**(2), 157-163.

- Lara, M.E.B., Garcia, M.C.G., Fatima, T., Ehneß, R., Lee, T.K., Proels, R., Tanner, W., Roitsch, T. 2004. Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell*, **16**(5), 1276-1287.
- Lee, J.M., Oda, M. 2003. Grafting of herbaceous vegetables and ornamental crops. *Horticultural reviews*, **28**, 61-124.
- Levin, M., Lemcoff, J.H., Cohen, S., Kapulnik, Y. 2007. Low air humidity increases leaf-specific hydraulic conductance of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany*, **58**(13), 3711-3718.
- Li, C., Yan, J.M., Li, Y.Z., Zhang, Z.C., Wang, Q.L., Liang, Y. 2013. Silencing the SpMPK1, SpMPK2, and SpMPK3 genes in tomato reduces abscisic acid-mediated drought tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(11), 21983-21996.
- Li, Y., Feng, D., Zhang, D., Su, J., Zhang, Y., Li, Z., Mu, P., Liu, B., Wang, H., Wang, J. 2012. Rice MAPK phosphatase IBR5 negatively regulates drought stress tolerance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*, **188-189**(6), 10-18.
- Liang, W.S. 2003. Drought stress increases both cyanogenesis and β -cyanoalanine synthase activity in tobacco. *Plant Science*, **165**(5), 1109-1115.
- Lichtenthaler, H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 47-65.
- Linden, J.C. 1996. Ethylene regulation of apoplastic invertase expression in autotrophic cells of *Chenopodium rubrum*. *Plant Growth Regulation*, **19**(3), 219-222.
- Lindsay, D.W., Yeoman, M.M., Brown, R. 1974. An analysis of the development of the graft union in *Lycopersicon esculentum*. *Annals of Botany*, **38**(3), 639-646.
- Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. 1 st ed edn. ed. Holmiae, Stockholm, Sweden.
- Liu, F. 2004. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: Its implication in altering pod set. *Field crops research*, **86**(1), 1-13.
- Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H. 2007. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant Journal*, **51**(5), 897-909.
- Loomis, R.S., Connor, D.J. 1992. Crop ecology: productivity and management in agricultural systems. *Crop ecology: productivity and management in agricultural systems*.
- López-Ráez, J.A., Kohlen, W., Charnikhova, T., Mulder, P., Undas, A.K., Sergeant, M.J., Verstappen, F., Bugg, T.D.H., Thompson, A.J., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H. 2010. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? *New Phytologist*, **187**(2), 343-354.
- Louvet, J. 1974. *L'utilisation du greffage en culture marichere*.

- Loveys, B.R., Stol, I.M., Davies, W.J. 2004. Physiological approaches to enhance water use efficiency in agriculture: exploiting plant signalling in novel irrigation techniques. in: *Water use efficiency in plant biology*, (Ed.) e. MA Bacon, Blackwell Publishing. Oxford, UK, pp. 113-138.
- Loyola, J., Verdugo, I., González, E., Casaretto, J.A., Ruiz-Lara, S. 2012. Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: Physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biology*, **14**(1), 149-156.
- Luquet, D. 2008. Orchestration of transpiration, growth and carbohydrate dynamics in rice during a dry-down cycle. *Functional Plant Biology*, **35**(8), 689-704.
- Lushchak, V.I., Semchuk, N.M. 2012. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1-22.
- Lybbert, T.J., Bell, A. 2010. Why drought tolerance is not the new Bt. *Nature Biotechnology*, **28**(6), 553-554.
- Lykas, C., Kittas, C., Zambeka, A. 2008. Water and fertilizers use efficiency in grafted and non grafted tomato plants on soilless culture, Vol. 801 PART 2, pp. 1551-1555.
- MacRobbie, E.A.C. 2002. Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(18), 11963-11968.
- Malinova, I., Steup, M., Fettke, J. 2011. Starch-related cytosolic heteroglycans in roots from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, **168**(12), 1406-1414.
- Manaa, A., Ahmed, H.B., Smiti, S., Faurobert, M. 2011. Salt-stress induced physiological and proteomic changes in tomato (*solanum lycopersicum*) seedlings. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, **15**(11), 801-809.
- Manjunath, S., Lee, C.H.K., Vanwinkle, P., Bailey-Serres, J. 1998. Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucosyltransferase in maize: Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiology*, **117**(3), 997-1006.
- Marron, N. 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree physiology*, **23**(18), 1225-1235.
- Martin, B., Bytnerowicz, A., Thorstenson, Y.R. 1988. Effects of air pollutants on the composition of stable carbon isotopes, $\delta^{13}C$, of leaves and wood, and on leaf injury. *PLANT PHYSIOL.*, **88**(1), 218-223.
- Martin, B., Nienhuis, J., King, G., Schaefer, A. 1989. Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science*, **243**(4899), 1725-1728.
- Martin, B., Tauer, C.G., Lin, R.K. 1999. Carbon isotope discrimination as a tool to improve water-use efficiency in tomato. *Crop Science*, **39**(6), 1775-1783.
- Martinez-Rodriguez, M.M., Estañ, M.T., Moyano, E., Garcia-Abellan, J.O., Flores, F.B., Campos, J.F., Al-Azzawi, M.J., Flowers, T.J., Bolarín, M.C. 2008. The effectiveness of grafting to

- improve salt tolerance in tomato when an 'excluder' genotype is used as scion. *Environmental and Experimental Botany*, **63**(1-3), 392-401.
- Masuda, M. 1989. *Mineral concentrations in xylem exudate of tomato and cucumber plants at midday and midnight* J. Jpn. Soc. Hort. Sci.
- Masuda, M., Gomi, K. 1982. *Diurnal changes of the exudation rate and the mineral concentration in xylem sap after decapitation of grafted and non-grafted cucumber* J. Jpn. Soc. Hort. Sci.
- Maximov, N.A. 1929. *The Plant in Relation to Water*, London.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**(345), 659-668.
- Mayak, S., Adam, Z. 1984. Accelerated ethylene production by a microsomal membrane fraction from carnation petals in vitro. *Plant Science Letters*, **33**(3), 345-352.
- McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**(22), 6049-6055.
- McLaughlin, J.E., McLaughlin. 2004. Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence in aborting maize ovaries at low water potentials. *Annals of Botany*, **94**(5), 675-689.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J. 2002. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, **89**(SPEC. ISS.), 895-905.
- Meinhard, M., Rodriguez, P., Grill, E. 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, **214**(5), 775-782.
- Mercier, V. 2009. Effects of different irrigation regimes applied during the final stage of rapid growth on an early maturing peach cultivar. *Irrigation Science*, **27**(4), 297-306.
- Merewitz, E.B., Du, H., Yu, W., Liu, Y., Gianfagna, T., Huang, B. 2012. Elevated cytokinin content in ipt transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **63**(3), 1315-1328.
- Messing, S.A.J., Mario Amzel, L., Gabelli, S.B., Echeverria, I., Vogel, J.T., Guan, J.C., Tan, B.C., Klee, H.J., McCarty, D.R. 2010. Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell*, **22**(9), 2970-2980.
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Xue-Chen Wang, b.J.C., Miao, C., Song, C.-P. 2006. An Arabidopsis Glutathione Peroxidase Functions as Both a Redox Transducer and a Scavenger in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. *Plant Cell*, **18**(10), 2749-2766.
- Miguel, A. 1993. El injerto herbáceo como método alternativo de control de enfermedades telúricas y sus implicaciones agronómicas. Tesis doctoral. UPV.
- Miller, P. 1754. *The gardeners dictionary. 4th ed ed*, London, UK.

- Mishra, K.B., Iannacone, R., Petrozza, A., Mishra, A., Armentano, N., La Vecchia, G., Trtílek, M., Cellini, F., Nedbal, L. 2012. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Science*, **182**(1), 79-86.
- Mittler, R., Blumwald, E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives, Vol. 61, pp. 443-462.
- Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., Van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., Ellis, B.E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(24), 14165-14170.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9**(10), 490-498.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., Aparicio-Tejo, P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, **194**(3), 346-352.
- Morgan, J. 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. *Functional Plant Biology*, **19**, 67-76.
- Morgenthal, K., Wienkoop, S., Scholz, M., Selbig, J., Weckwerth, W. 2005. Correlative GC-TOF-MS-based metabolite profiling and LC-MS-based protein profiling reveal time-related systemic regulation of metabolite-protein networks and improve pattern recognition for multiple biomarker selection. *Metabolomics*, **1**(2), 109-121.
- Morgenthal, K., Wienkoop, S., Wolschin, F., Weckwerth, W. 2007. Integrative profiling of metabolites and proteins: improving pattern recognition and biomarker selection for systems level approaches. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **358**, 57-75.
- Mueller, L.A., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J., van Eck, J., Stack, S., Choi, D., Kim, B.D., Chen, M., Cheng, Z., Li, C., Ling, H., Xue, Y., Seymour, G., Bishop, G., Bryan, G., Sharma, R., Khurana, J., Tyagi, A., Chattopadhyay, D., Singh, N.K., Stiekema, W., Lindhout, P., Jesse, T., Lankhorst, R.K., Bouzayen, M., Shibata, D., Tabata, S., Granell, A., Botella, M.A., Giuliano, G., Frusciante, L., Causse, M., Zamir, D. 2005. The Tomato Sequencing Project, the First Cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Comparative and Functional Genomics*, **6**(3), 153-158.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., Gibon, Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany*, **62**(6), 1715-1729.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. 2004. Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, **31**(3), 203-216.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, **25**(2), 239-250.
- Munns, R. 1988. Why measure osmotic adjustment? *Australian Journal of Plant Physiology*, **15**(6), 717-726.

- Munns, R., James, R.A., Sirault, X.R.R., Furbank, R.T., Jones, H.G. 2010. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, **61**(13), 3499-3507.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance, Vol. 59, pp. 651-681.
- Nagel, O.W., Konings, H., Lambers, H. 1994. Growth rate, plant development and water relations of the ABA-deficient tomato mutant sitiens. *Physiologia Plantarum*, **92**(1), 102-108.
- Nasibi, F., Yaghoobi, M.M., Kalantari, K.M. 2011. Effect of exogenous arginine on alleviation of oxidative damage in tomato plant underwater stress. *Journal of Plant Interactions*, **6**(4), 291-296.
- Nebauer, S.G., Sánchez, M., Martínez, L., Lluch, Y., Renau-Morata, B., Molina, R.V. 2013. Differences in photosynthetic performance and its correlation with growth among tomato cultivars in response to different salts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**(0), 61-69.
- Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P. 2001. Enzymology and structure of catalases in: *ADVANCES IN INORGANIC CHEMISTRY*, Vol. 51, pp. 51-106.
- Nikinmaa, E., Hölttä, T., Hari, P., Kolari, P., Mäkelä, A., Sevanto, S., Vesala, T. 2013. Assimilate transport in phloem sets conditions for leaf gas exchange. *Plant, Cell and Environment*, **36**(3), 655-669.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control, Vol. 49, pp. 249-279.
- Oki, T., Kanae, S. 2006. Global hydrological cycles and world water resources. *Science*, **313**(5790), 1068-1072.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P. 2013. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*.
- Oztekin, G.B., Tuzel, Y. 2011. Salinity response of some tomato rootstocks at seedling stage. *African Journal of Agricultural Research*, **6**(20), 4726-4735.
- Öztekin, G.B., Tüzel, Y., Tüzel, I.H. 2009. Effect of grafting on salinity tolerance in tomato production, Vol. 807, pp. 631-636.
- Pardo, J.M., Reddy, M.P., Yang, S., Maggio, A., Hue, G.H., Matsumoto, T., Coca, M.A., Paino-D'Urzo, M., Koiwa, H., Watad, A.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 1998. Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(16), 9681-9686.
- Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. 2005. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(52), 18830-18835.

- Parker, D., Beckmann, M., Zubair, H., Enot, D.P., Caracuel-Rios, Z., Overy, D.P., Snowdon, S., Talbot, N.J., Draper, J. 2009. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant Journal*, **59**(5), 723-737.
- Passioura, J.B. 1977. Grain yield, harvest index and water use of wheat. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **43**, 117-120.
- Passioura, J.B., Angus, J.F. 2010. Improving Productivity of Crops in Water-Limited Environments. in: *ADVANCES IN AGRONOMY*, (Ed.) D.L.S. editor, Vol. 106, Burlington: Academic Press. Canberra, Australia, pp. 37-75.
- Paul, M.J., Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **52**(360), 1383-1400.
- Peleg, Z., Blumwald, E. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**(3), 290-295.
- Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H., Blumwald, E. 2011. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal*, **9**(7), 747-758.
- Pelleschi, S. 1999. *Ivr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology*, **39**(2), 373-380.
- Pelleschi, S., Leonardi, A., Rocher, J.P., Cornic, G., De Vienne, D., Thévenot, C., Prioul, J.L. 2006. Analysis of the relationships between growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism using quantitative trait loci (QTLs) in young maize plants subjected to water deprivation. *Molecular Breeding*, **17**(1), 21-39.
- Pelleschi, S., Rocher, J.P., Prioul, J.L. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment*, **20**(4), 493-503.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintam, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P. 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, **400**(6741), 256-261.
- Penman, H.L. 1948. Natural evaporation from open water, bare soil and grass. *Proceedings of the Royal Society Series A*, **193**, 120-145.
- Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., Ghanem, M.E., Dodd, I.C. 2010. Hormonal regulation of sourcesink relations to maintain crop productivity under salinity: A case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Functional Plant Biology*, **37**(7), 592-603.
- Pérez-Alfocea, F., Ghanem, M.E., Gómez-Cadenas, A., Dodd, I.C. 2011. Omics of root-to-shoot signaling under salt stress and water deficit. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, **15**(12), 893-901.
- Petreikov, M., Dai, N., Granot, D., Schaffer, A.A. 2001. Characterization of native and yeast-expressed tomato fruit fructokinase enzymes. *Phytochemistry*, **58**(6), 841-847.

- Pfeifhofer, H.W. 1989. Evidence for Chlorophyll b and Lack of Lutein in *Neottia nidus-avis* Plastids. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, **184**(1-2), 55-61.
- Prášil, I., Zámečník, J. 1998. The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, **40**(1), 1-10.
- Proels, R.K. 2006. Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase Lin7 is required for pollen development. *Functional Plant Biology*, **33**(6), 547-554.
- Proels, R.K., Roitsch, T. 2009. Extracellular invertase LIN6 of tomato: A pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany*, **60**(6), 1555-1567.
- Quick, W.P. 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell and Environment*, **15**, 25-35.
- Ra, S.A. 1995. Effect of remaining potato stems on yield of grafting plants between mini tomato and potato. *RDA- J. Agric. Sci. Hortic*, **37**(2), 390-393.
- Ramanjulu, S., Bartels, D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment*, **25**(2), 141-151.
- Ranwala, A.P. 2008. Gibberellin-mediated changes in carbohydrate metabolism during flower stalk elongation in tulips. *Plant Growth Regulation*, **55**(3), 241-248.
- Rausch, T., Greiner, S. 2004. Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1696**(2), 253-261.
- Reina-Sánchez, A., Romero-Aranda, R., Cuartero, J. 2005. Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agricultural Water Management*, **78**(1-2), 54-66.
- Ribeiro, D.M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J.T., Barros, R.S., Neill, S.J., Wilson, I.D. 2009. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant, Cell and Environment*, **32**(1), 46-57.
- Rick, C.M. 1979. Biosystematics studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. in: *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, (Ed.) A. Press. London.
- Rick, C.M. 1987. Genetic resources in *Lycopersicon*. in: *Tomato Biotechnology*, (Ed.) D.J.a.J. Eds. Nevis, R.A. Alan R. Liss. New York.
- Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Watt, M., Condon, A.G., Spielmeyer, 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**(2), 85-97.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., Blumwald, E. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(49), 19631-19636.
- RodríguezConcepción, M. 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, **130**, 1079-1089.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**(3), 198-206.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., Sinha, A.K. 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, **54**(382), 513-524.
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, **108**(1), 285-294.
- Roitsch, T., Ehneß, R. 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*, **32**(2-3), 359-367.
- Roitsch, T., Ehneß, R., Goetz, M., Hause, B., Hofmann, M., Sinha, A.K. 2000. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Functional Plant Biology*, **27**(8-9), 815-825.
- Roitsch, T., González, M.C. 2004. Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. *Trends in Plant Science*, **9**(12), 606-613.
- Romero-Aranda, R., Longuenesse, J.J. 1995. Modelling the effect of air vapour pressure deficit on leaf photosynthesis of greenhouse tomatoes: The importance of leaf conductance to CO₂. *Journal of Horticultural Science*, **70**(3), 423-432.
- Romero-Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J. 2002. Greenhouse mist improves yield of tomato plants grown under saline conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**(4), 644-648.
- Romero, L. 1997. Response of plant yield and leaf pigments to saline conditions: Effectiveness of different rootstocks in melon plants (*Cucumis melo* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, **43**(4), 855-862.
- Roosta, H.R., Hamidpour, M. 2011. Effects of foliar application of some macro- and micro-nutrients on tomato plants in aquaponic and hydroponic systems. *Scientia Horticulturae*, **129**(3), 396-402.
- Ros Barceló, A. 1998. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta*, **207**(2), 207-216.
- Roupshael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., Colla, G. 2010. Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, **127**(2), 172-179.

- Ruan, Y.L., Jin, Y., Yang, Y.J., Li, G.J., Boyer, J.S. 2010. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, **3**(6), 942-955.
- Růžička, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., Benková, E. 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell*, **19**(7), 2197-2212.
- S.E.A. 1978. Avance de los resultados con siste variedades de sandía en el Campo de Níjar. in: *Jornadas de Horticultura*. Almería.
- Sade, N., Gebretsadik, M., Seligmann, R., Schwartz, A., Wallach, R., Moshelion, M. 2010. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology*, **152**(1), 245-254.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation, Vol. 57, pp. 431-449.
- Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.d.M., Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., Ruiz, J.M. 2012a. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. *Plant Science*, **188-189**(0), 89-96.
- Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J.M., Ferreres, F., Moreno, D.A. 2012b. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry*, **134**(2), 775-782.
- Sánchez-Urdaneta, A.B., Peña-Valdivia, C.B., Aguirre, R.J.R., Trejo, C., Cárdenas, E. 2004. Effects of water potential in the root growth of seedlings of agave *Salmiana otto* ex *salm-dyck*. *Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de agave salmiana Otto ex salm-dyck*, **29**(11), 626-631+599.
- Sanguineti, M.C., Li, S., MacCafferri, M., Corneti, S., Rotondo, F., Chiari, T., Tuberosa, R. 2007. Genetic dissection of seminal root architecture in elite durum wheat germplasm. *Annals of Applied Biology*, **151**(3), 291-305.
- Santa-Cruz, A., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R., Bolarin, M.C. 2002. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. *Plant Science*, **162**(5), 825-831.
- Santner, A., Estelle, M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, **459**(7250), 1071-1078.
- Santner, A., Estelle, M. 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant Journal*, **61**(6), 1029-1040.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**(7), 995-1014.
- Scharte, J., Schön, H., Tjaden, Z., Weis, E., Von Schaewen, A. 2009. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(19), 8061-8066.
- Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D., Weckwerth, W. 2009. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**(8), 1032-1037.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, **148**(3668), 339-346.
- Schreiber, U. 2004. *Pulse-amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*.
- Schwab, W., Aharoni, A., Raab, T., Pérez, A.G., Sanz, C. 2001. Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*). *Phytochemistry*, **56**(5), 407-415.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**(3), 296-302.
- Sharp, R.E. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, **93**(4), 1337-1346.
- Sharp, R.E., Hsiao, T.C., Silk, W.K. 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, **93**(4), 1337-1346.
- Sharp, R.E., Lenoble, M.E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, **53**(366), 33-37.
- Sheen, J. 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**(5), 410-418.
- Shiklomanov, I.A. 1999. *World Freshwater Resources and Their Use*. St. Petersburg, Russia.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, **115**(2), 327-334.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**(2), 221-227.
- Sims, W. 1980. History of tomato production for industry around the world, (Ed.) A. Horticulturae, Vol. 100, pp. 25-26.
- Singh, K.B., Foley, R.C., Oñate-Sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**(5), 430-436.
- Soar, C.J., Dry, P.R., Loveys, B.R. 2006. Scion photosynthesis and leaf gas exchange in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: Mediation of rootstock effects via xylem sap ABA. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **12**(2), 82-96.

- Socias, X., Correia, M.J., Chaves, M., Medrano, H. 1997. The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *Journal of Experimental Botany*, **48**(311), 1281-1288.
- Soolanayakanahally, R.Y., Guy, R.D., Silim, S.N., Drewes, E.C., Schroeder, W.R. 2009. Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant, Cell & Environment*, **32**(12), 1821-1832.
- Soria, T., Cuartero, J. 1997. Tomato fruit yield and water consumption with saline water irrigation. *Acta Horticulturae*, **458**, 215-219.
- Sowokinos, J.R., Thomas, C., Burrell, M.M. 1997. Pyrophosphorylases in potato: V. Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. *Plant Physiology*, **113**(2), 511-517.
- Sozzi, G.O., Trincherro, G.D., Frascina, A.A. 2000. Ethylene and glycosidase promotion in GA3- and IAA-treated tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**(3), 359-368.
- Spollen, W.G., Lenoble, M.E., Samuels, T.D., Bernstein, N., Sharp, R.E. 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, **122**(3), 967-976.
- Stanhill, G. 1986. Water Use Efficiency. in: *Advances in Agronomy*, (Ed.) N.C. Brady, Vol. Volume 39, Academic Press, pp. 53-85.
- Stepanova, A.N., Alonso, J.M. 2009. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**(5), 548-555.
- Stepanova, A.N., Hoyt, J.M., Hamilton, A.A., Alonso, J.M. 2005. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in arabidopsis. *Plant Cell*, **17**(8), 2230-2242.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.M. 2008. TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development. *Cell*, **133**(1), 177-191.
- Steudle, E., Henzler, T. 1995. Water channels in plants: Do basic concepts of water transport change? *Journal of Experimental Botany*, **46**(290), 1067-1076.
- Stitt, M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell & Environment*, **14**(8), 741-762.
- Suhartanto, M.R. 2002. Chlorophyll in tomato seeds: marker for seed performance? Tesis Doctoral., Tesis Doctoral. Wageningen University. Holanda, pp. 150pp.
- Sulpice, R., Pyl, E.T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M.C., Von Korff, M., Steinhauser, M.C., Keurentjes, J.J.B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A.R., Altmann, T., Stitt, M. 2009. Starch as a

- major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(25), 10348-10353.
- Suzuki, E. 1972. *Sandía de Yamato*.
- Tambussi, E.A., Bort, J., Araus, J.L. 2007. Water use efficiency in C 3 cereals under Mediterranean conditions: A review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology*, **150**(3), 307-321.
- Tang, G.Q., Lüscher, M., Sturm, A. 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell*, **11**(2), 177-189.
- Tardieu, F., Tardieu. 1999. Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: Are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? *New Phytologist*, **143**(1), 33-43.
- Tauberger, E., Fernie, A.R., Emmermann, M., Renz, A., Kossmann, J., Willmitzer, L., Trethewey, R.N. 2000. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant Journal*, **23**(1), 43-53.
- Taylor, J.L.S., Van Staden, J. 1998. Plant-derived smoke solutions stimulate the growth of *Lycopersicon esculentum* roots in vitro. *Plant Growth Regulation*, **26**(2), 77-83.
- Tenhunen, J.D., Lange, O.L., Jahner, D. 1982. The control by atmospheric factors and water stress of midday stomatal closure in *Arbutus unedo* growing in a natural macchia. *Oecologia*, **55**(2), 165-169.
- Tester, M., Davenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, **91**(5), 503-527.
- Teulat, B. 2001. New QTLs identified for plant water status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**(1), 161-170.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N. 2010. Morphology and oxidative physiology of boron-deficient mulberry plants. *Tree physiology*, **30**(1), 68-77.
- Thauer, R.K. 1988. Citric-acid cycle, 50 years on. *European Journal of Biochemistry*, **176**(3), 497-508.
- Thompson, A.J., Andrews, J., Mulholland, B.J., McKee, J.M.T., Hilton, H.W., Horridge, J.S., Farquhar, G.D., Smeeton, R.C., Smillie, I.R.A., Black, C.R., Taylor, I.B. 2007. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology*, **143**(4), 1905-1917.
- Timpa, J.D. 1986. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiology*, **82**, 724-728.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D. 1985. *Soil Fertility and Fertilizers. 4th ed ed*, New York.

- Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, **138**(4), 414-429.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**(2), 373-378.
- Trouverie, J. 2006. Increasing leaf export and grain import capacities in maize plants under water stress. *Functional Plant Biology*, **33**(3), 209-218.
- Trouverie, J. 2004. Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta*, **219**(5), 894-905.
- Trouverie, J. 2003. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany*, **54**(390), 2177-2186.
- Tsuchisaka, A., Theologis, A. 2004. Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, **136**(2), 2982-3000.
- Turner, N. 1978. Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. *Functional Plant Biology*, **5**, 597-608.
- Tymowska Lalanne, Z., Tymowskalalanne. 1998. The Plant Invertases: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology
Incorporating Advances in Plant Pathology. *Advances in Botanical Research*, **28**(C), 71-117.
- Udayakumar, M., Sheshshayee, M.S., Nataraj, K.N., Bindu Madhava, H., Devendra, R., Aftab Hussain, I.S., Prasad, T.G. 1998. Why has breeding for water use efficiency not been successful? An analysis and alternate approach to exploit this trait for crop improvement. *Current Science*, **74**(11), 1000-1003.
- Unger, C., Hardegger, M., Lienhard, S., Sturm, A. 1994. cDNA cloning of carrot (*Daucus carota*) soluble acid beta-fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme. *Plant Physiology*, **104**(4), 1351-1357.
- Urrestarazu Gavilán, M. 2004. Cultivos en sustratos alternativos. 3ª ed. rev. y amp. ed. in: *Tratado de cultivo sin suelo*, (Ed.) Mundi-Prensa, Vol. 1, MP. Madrid, España, pp. 669-700.
- Valenti, V., Stanghellini, M.A., Pupillo, P. 1984. Glucose 6-phosphate dehydrogenase isozymes of maize leaves. *Plant Physiol.*, **75**, 521-526.
- Vargas, W.A. 2007. Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: Characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta*, **226**(6), 1535-1545.
- 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. *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 in Plant Biology*, **14**(3), 240-245.
- Vincent, D. 2005. Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, **137**(3), 949-960.
- Vriet, C., Welham, T., Brachmann, A., Marilyn, P.M., Pike, J., Perry, J., Parniske, M., Sato, S., Tabata, S., Smith, A.M., Wang, T.L. 2010. A suite of *Lotus japonicus* starch mutants reveals both conserved and novel features of starch metabolism. *Plant Physiology*, **154**(2), 643-655.
- Walker, A.S. 1997. *Deserts: Geology and Resources*. U.S. Geological Survey 2000, United States.
- Wang, L., Wang, Z., Xu, Y., Joo, S.H., Kim, S.K., Xue, Z., Xu, Z., Chong, K. 2009. OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *Plant Journal*, **57**(3), 498-510.
- Wang, Q., Zhang, X., Li, F., Hou, Y., Liu, X. 2011. Identification of a UDP-glucose pyrophosphorylase from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involved in cellulose biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, **30**(7), 1303-1312.
- Wang, W.X. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort.*, **560**, 285-292.
- Weckwerth, W., Wenzel, K., Fiehn, O. 2004. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics*, **4**(1), 78-83.
- Wen, F.p., Zhang, Z.h., Bai, T., Xu, Q., Pan, Y.h. 2010. Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA3) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *Plant Science*, **178**(2), 170-175.
- Went, F.W., Thimann, K.V. 1937. *Phytohormones*, New York.
- Werner, T. 2008. Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, **59**(10), 2659-2672.
- Werner, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(18), 10487-10492.
- Werner, T., Holst, K., Pörs, Y., Guivarc'h, A., Mustroph, A., Chriqui, D., Grimm, B., Schmölling, T. 2008. Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, **59**(10), 2659-2672.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H., Wobus, U. 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant Journal*, **33**(2), 395-411.
- Wien, H.C. 1997. *The physiology of vegetable crops*. CAB International, New York.

- Wilkinson, S. 2004. Water use efficiency and chemical signalling. in: *Water use efficiency in plant biology*, (Ed.) e. MA Bacon, Blackwell Publishing. Oxford, UK, pp. 75-107.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*, **33**(4), 510-525.
- Wingler, A., Roitsch, T. 2008. Metabolic regulation of leaf senescence: Interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology*, **10**(SUPPL. 1), 50-62.
- Wong, S.C., Cowan, I.R., Farquhar, G.D. 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature*, **282**(5737), 424-426.
- Wood, A.J. 2005. Eco-physiological adaptations to limited water environments. in: *Plant abiotic stress*, (Eds.) M.A. Jenks, P.M. Hasegawa, Blackwell Publishing. Oxford, pp. 1-13.
- Woodward, J. 1699. Some Thoughts and Experiments Concerning vegetation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **21**, 193-227.
- WWF-ADENA. 2005.
- Xiao, X. 2009. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum*, **136**(2), 150-168.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Glassop, D., Shorter, R. 2008. Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, **67**(3), 197-214.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, Vol. 57, pp. 781-803.
- Yang, J., Fu, M.r., Zhao, Y.y., Mao, L.c. 2009. Reduction of Chilling Injury and Ultrastructural Damage in Cherry Tomato Fruits After Hot Water Treatment. *Agricultural Sciences in China*, **8**(3), 304-310.
- Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Xu, G., Zhu, Q. 2004. Activities of key enzymes in sucrose-to-starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiology*, **135**(3), 1621-1629.
- Yu, L.-X., Djebrouni, M., Chamberland, H., Lafontaine, J.G., Tabaeizadeh, Z. 1998. Chitinase: Differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L. esculentum* Mill.) tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, **153**(5-6), 745-753.
- Zhang, J., Nguyen, H.T., Blum, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, **50**(332), 291-302.
- Zhang, S.W., Li, C.H., Cao, J., Zhang, Y.C., Zhang, S.Q., Xia, Y.F., Sun, D.Y., Sun, Y. 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of Indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. *Plant Physiology*, **151**(4), 1889-1901.

- Zhao, Y., Chan, Z., Xing, L., Liu, X., Hou, Y.J., Chinnusamy, V., Wang, P., Duan, C., Zhu, J.K. 2013. The unique mode of action of a divergent member of the ABA-receptor protein family in ABA and stress signaling. *Cell Research*.
- Zhou, M.L., Zhang, Q., Sun, Z.M., Chen, L.H., Liu, B.X., Zhang, K.X., Zhu, X.M., Shao, J.R., Tang, Y.X., Wu, Y.M. 2013. Trehalose Metabolism-Related Genes in Maize. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-16.
- Zhou, R., Cheng, L. 2008. Competitive inhibition of phosphoglucose isomerase of apple leaves by sorbitol 6-phosphate. *Journal of Plant Physiology*, **165**(9), 903-910.
- Zijlstra, S., Groot, S.P.C., Jansen, J. 1994. Genotypic variation of rootstocks for growth and production in cucumber; possibilities for improving the root system by plant breeding. *Scientia Horticulturae*, **56**(3), 185-196.
- Zrenner, R. 1991. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant, Cell and Environment*, **14**, 939-946.

