



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

La Caracterización Funcional de un Mutante de  
Inserción de Tomate (*Solanum Lycopersicum*)  
Identifica un Factor de Transcripción MYB Implicado  
en el Cierre Estomático y Transporte de Na<sup>+</sup>  
en Condiciones Salinas.

D. Juan Francisco Campos Serrano

2015





**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

La caracterización funcional de un mutante de inserción de tomate (*Solanum lycopersicum*) identifica un factor de transcripción MYB implicado en el cierre estomático y transporte de Na<sup>+</sup> en condiciones salinas.

Tesis Doctoral

**D. Juan Francisco Campos Serrano**

Directores

**Dra. María del Carmen Bolarín Jiménez**

**Dr. Francisco Borja Flores Pardo**

2015



## Resumen

A pesar de la relevancia económica del tomate, los mecanismos que gobiernan la respuesta a la salinidad en esta especie hortícola no están bien caracterizados y, por consiguiente, la identificación de genes implicados en la tolerancia del tomate a la salinidad es un objetivo prioritario. Dentro del programa de mutagénesis insercional que se está desarrollando entre tres grupos de investigación (IBMCP-Valencia, Universidad Almería y CEBAS), se ha generado una colección de líneas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a partir del cv MoneyMaker). Con el fin de identificar genes implicados en la tolerancia del tomate a la salinidad, se procedió a la evaluación de diferentes líneas de esta colección y tras la identificación de algunos mutantes de interés, este trabajo se ha centrado en la caracterización del mutante *ars1* (*altered response to salt stress 1*), que muestra sensibilidad al estrés salino a lo largo del ciclo vegetativo y se manifiesta en una reducción del rendimiento en fruto del mutante, respecto al cv MoneyMaker (WT). La caracterización molecular por el grupo de la UAL ha permitido clonar el gen anulado en el mutante, un factor de transcripción MYB de tipo R1 (*ARS1*), siendo el primer gen de este tipo identificado en tomate. En este trabajo se ha demostrado que el mutante *ars1* está afectado en el estrés iónico inducido por la salinidad, reflejado en una mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en las hojas. Sin embargo, el mayor transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea del mutante parece ser una consecuencia de su mayor pérdida de agua vía transpiración, ya que el cierre estomático es mayor en el mutante *ars1* que en WT en condiciones de salinidad. Con objeto de comprobar si el principal efecto provocado por la anulación del gen *ARS1* era la mayor pérdida de agua en situaciones de estrés, se estudió la respuesta fisiológica

del WT y mutante a la deshidratación. Los resultados corroboran una mayor deshidratación del mutante frente al estrés debida a su menor capacidad para reducir la conductancia estomática y transpiración. Además, la desregulación del cierre estomático del mutante *ars1* en condiciones de estrés parece ser dependiente de ABA, ya que el mutante muestra mayor apertura estomática cuando se aplica ABA exógenamente. Finalmente, la caracterización funcional de líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen *ARS1* demuestran el papel de este gen en la regulación de la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de estrés.

## **Abstract**

Despite the economic relevance of the tomato, the mechanisms that govern the response to salinity in the horticultural species are not well characterized and therefore, the identification of genes involved in the tolerance of tomato to salinity is a priority. In the program of insertional mutagenesis developed by three research groups (IBMCP-Valencia, Almeria University and CEBAS) it has generated a collection of lines of tomato (*Solanum lycopersicum*) from cv Moneymaker. In order to identify genes involved in the tolerance of tomato to salinity, we proceeded to the evaluation of different lines of this collection and after identifying some mutants of interest, this work has focused on the characterization of mutant ARS1 (altered response to salt stress 1), showing sensitivity to salt stress along the growth cycle and manifests itself in reduced fruit yield, compared with cv Moneymaker (WT). The molecular characterization of the UAL group has allowed cloning the knock-out gene, a MYB transcription factor type R1 (ARS1), in mutant, been the first gene identified in tomato. This work has shown that the ARS1 mutant is affected in ionic stress induced by salinity reflected in a greater accumulation of Na<sup>+</sup> in the leaves. However, the increased transport of Na<sup>+</sup> to the shoot of the mutant appears to be a consequence of their higher water loss via transpiration, due to stomatal closure is greater in the ARS1 mutant than in WT in saline conditions. In order to check if the main effect caused by the knock-out of ARS1 gene was the higher water loss under stress, the physiological response of WT and mutant to dehydration was studied. The results support higher dehydration in mutant under stress due to their reduced ability to reduce stomatal conductance and transpiration. In addition, deregulation of ARS1 mutant

stomatal closure under stress appears to be ABA-dependent, as the mutant shows greater stomatal aperture when exogenously applied ABA. Finally, the functional characterization of overexpression and gene silencing lines demonstrate the role of this gene in regulating water loss via transpiration.





# Índice



**I. Índice**

<b>I. Índice.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Abreviaturas .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Clasificación taxonómica, características botánicas e importancia económica del tomate .....</b>	<b>17</b>
1.1.1. Clasificación taxonómica y características botánicas del tomate	17
1.1.2. Importancia económica del tomate .....	20
Figura 1 .....	21
Tabla 1.....	22
<b>1.2. El tomate en el contexto de la investigación científica .....</b>	<b>22</b>
1.2.1. Retos en la mejora genética del tomate .....	23
1.2.1.1. Rendimiento del tomate .....	25
1.2.1.2. La resistencia a estreses bióticos y abióticos.....	25
1.2.1.3. Tamaño y forma del fruto .....	26
1.2.1.4. La maduración y la aparición del color.....	28
1.2.1.5. Valor nutricional y calidad organoléptica.....	31
1.2.1.6. Límites de la mejora genética clásica: la era de la ingeniería genética .....	32
<b>1.3. Mutagénesis insercional. El etiquetado de genes por inserción de elementos de transposición: transposones o T-DNA.....</b>	<b>35</b>
1.3.1. Etiquetado mediante trampas génicas o <i>trapping</i> .....	37
<b>1.4. Estrés por salinidad y sequía: impacto global en la agricultura .....</b>	<b>39</b>
<b>1.5. Efectos de la sequía y salinidad en la planta y mecanismos de tolerancia a ambos estreses abióticos.....</b>	<b>44</b>
1.5.1. Efectos causados por la sequía y salinidad en la planta .....	44
1.5.2. Respuesta fisiológica al estrés osmótico inducido por la salinidad y la sequía .....	47

1.5.3. Respuesta fisiológica al estrés iónico y nutricional inducido por la salinidad .....	51
1.5.4. Respuesta fisiológica al estrés oxidativo inducido por la salinidad .....	53
1.5.5. Genes implicados en la absorción y transporte de Na <sup>+</sup> a la parte aérea de la planta .....	55
Figura 2 .....	56
Figura 3 .....	59
<b>1.6. Importancia del control de la pérdida de agua en la tolerancia a salinidad y sequía. Papel de los estomas en la adaptación de las plantas a estreses que causan alteraciones en el estatus hídrico</b>	<b>62</b>
Figura 4 .....	63
<b>1.7. Genes reguladores implicados en la respuesta de la planta al estrés abiótico: Papel de los factores de transcripción</b> .....	<b>69</b>
Figura 5 .....	72
1.7.1. Factores de transcripción bZIP.....	72
1.7.2. Factores de transcripción AP2/ERF .....	75
1.7.3. Factores de transcripción NAC .....	76
1.7.4. Factores de transcripción WRKY .....	78
1.7.5. Factores de transcripción bHLH.....	79
1.7.6. Factores de transcripción MYB .....	80
1.7.6.1. Papel de los MYB TFs en el estrés hídrico.....	81
1.7.6.2. Papel de los MYB TFs en el estrés salino .....	85
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>93</b>
<b>3. Material y Métodos</b> .....	<b>97</b>
<b>3.1. Material vegetal</b> .....	<b>97</b>
<b>3.2. Generación de líneas T-DNA de tomate con una trampa de intensificadores</b> .....	<b>97</b>
3.2.1. Multiplicación y mantenimiento <i>in vitro</i> de la colección de mutantes insercionales de T-DNA.....	99

Figura 6 .....	100
Figura 7 .....	100
<b>3.3. Medios de Cultivo utilizados.....</b>	<b>101</b>
Tabla 2.....	101
Tabla 3.....	102
3.3.1. Cultivo de semillas <i>in vitro</i> .....	102
3.3.2. Condiciones de la cámara de cultivo <i>in vitro</i> .....	102
Figura 8 .....	103
<b>3.4. Aclimatación .....</b>	<b>103</b>
<b>3.5. Obtención de progenies TG2 e identificación de líneas homocigotas TG3 para mutantes insercionales con la mutación responsable del fenotipo etiquetada por el T-DNA .....</b>	<b>104</b>
3.5.1. Test de selección <i>in vitro</i> por resistencia a kanamicina de líneas homocigotas para el inserto T-DNA.....	105
3.5.2. Test de selección <i>in vivo</i> por resistencia a kanamicina de líneas homocigotas para el inserto T-DNA.....	105
Figura 9 .....	106
<b>3.6. Cultivo de las plantas <i>in vivo</i>.....</b>	<b>106</b>
3.6.1. Cultivo de plantas en condiciones controladas .....	106
Tabla 4.....	107
Tabla 5.....	107
Figura 10.....	109
3.6.2. Cultivo en invernadero .....	109
Figura 11.....	110
Tabla 6.....	110
3.6.3. Ensayos de estrés salino .....	112
Figura 12.....	113
3.6.4. Ensayos de estrés hídrico.....	113
<b>3.7. Evaluación fenotípica y fisiológica .....</b>	<b>115</b>
3.7.1. Parámetros de desarrollo vegetativo de producción .....	115
3.7.2. Contenido de agua .....	115

3.7.3. Evolución de la pérdida de agua de folíolos escindidos .....	115
Figura 13.....	116
3.7.4. Procesamiento de las muestras para los análisis fisiológicos ...	116
3.7.5. Determinación de cationes .....	117
3.7.6. Relaciones hídricas.....	118
3.7.6.1. Potencial hídrico .....	118
Figura 14.....	119
3.7.6.2. Potencial osmótico.....	119
Figura 15.....	120
3.7.8. Análisis de clorofilas y eficacia fotosintética .....	120
3.7.9. Determinación de la conductancia estomática, tasa de transpiración y tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> o fotosintética.....	122
Figura 16.....	123
<b>3.8. Microscopía óptica para determinación densidad y grado de apertura de estomas en plantas sometidas a estrés salino y hojas tras tratamiento con ácido abscísico .....</b>	<b>123</b>
<b>3.9. Análisis espacio-temporal de la expresión del gen delator <i>uidA</i> mediante análisis histoquímico de actividad β-glucuronidasa...</b>	<b>124</b>
Figura 17.....	126
<b>3.10. Métodos de biología molecular.....</b>	<b>126</b>
3.10.1. Extracción ADN genómico .....	126
3.10.2. Cuantificación de ADN y ARN .....	127
3.10.3. Amplificación por PCR.....	127
Tabla 7.....	127
Tabla 8.....	128
Figura 18.....	128
3.10.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa .....	128
3.10.5. Extracción de DNA, RNA y síntesis de DNA complementario para análisis expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real .....	129

3.10.6. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	130
Figura 19.....	131
<b>3.11. Tratamiento estadístico .....</b>	<b>132</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>137</b>
<b>4.1. Identificación de mutantes afectados en el desarrollo vegetativo y en la respuesta al estrés salino.....</b>	<b>137</b>
Figura 20.....	141
<b>4.2. El mutante <i>ars1</i> (<i>altered response to salt stress 1</i>) identifica un factor de transcripción MYB. ....</b>	<b>141</b>
Figura 21.....	142
Figura 22.....	145
Figura 23.....	147
Figura 24.....	149
<b>4.3. Fenotipo del mutante <i>ars1</i> en condiciones sin estrés .....</b>	<b>150</b>
Figura 25.....	151
<b>4.4. Caracterización del mutante <i>ars1</i> a la salinidad .....</b>	<b>151</b>
4.4.1 Análisis de la expresión espacial del gen <i>ARS1</i> .....	151
4.4.2. Caracterización fisiológica .....	152
Tabla 9.....	153
Figura 26.....	154
<b>4.5. Cambios fisiológicos implicados en la sensibilidad a la sal del mutante <i>ars1</i> .....</b>	<b>155</b>
4.5.1 Análisis de la expresión temporal del gen <i>ARS1</i> . ....	155
4.5.2 Cambios inducidos por la salinidad en la apertura estomática ..	156
4.5.3 Cambios inducidos por la salinidad en las concentraciones de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> . ....	156
Figura 27.....	158
Figura 28.....	159
<b>4.6. Caracterización del mutante <i>ars1</i> a estrés hídrico.....</b>	<b>160</b>
4.6.1. Pérdida de agua en folíolos escindidos .....	161
Figura 29.....	162

4.6.2. Conductancia estomática y transpiración a lo largo del ciclo de deshidratación .....	163
Figura 30.....	164
4.6.3. Efecto del ABA en la apertura estomática .....	164
<b>4.6. Análisis funcional del gen <i>ARS1</i> mediante el estudio de la respuesta a la salinidad de líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen .....</b>	<b>165</b>
Figura 31.....	167
Figura 32.....	170
Figura 33.....	172
Figura 34.....	175
<b>5. Discusión .....</b>	<b>181</b>
<b>5.1. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación y análisis funcional de genes .....</b>	<b>181</b>
<b>5.2. El mutante <i>ars1</i> ha permitido identificar el primer gen R1-MYB de tomate .....</b>	<b>185</b>
<b>5.3. La anulación del gen <i>ARS1</i> no afecta al desarrollo cuando las plantas se cultivan sin estrés pero induce sensibilidad a la salinidad .....</b>	<b>187</b>
<b>5.4. La sensibilidad del mutante <i>ars1</i> a la salinidad está relacionada con alta acumulación de Na<sup>+</sup> en sus hojas .....</b>	<b>190</b>
<b>5.5. El papel del gen <i>ARS1</i> es regular la pérdida de agua por transpiración cuando las plantas se enfrentan a salinidad y sequía .....</b>	<b>191</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>199</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>205</b>





## **Abreviaturas**



**II. Abreviaturas**

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TG1	Primera generación de plantas transgénicas
TG2	Segunda generación de plantas transgénicas
TG3	Tercera generación de plantas transgénicas
ETMM	Línea de MM con trampa de intensificadores
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro sódico
nptII	Gen de la neomicinofosfotransferasa
uidA	Gen de la glucuronidasa
X-gluc	Sustrato de la glucuronidasa
MM	Cultivar monemaker
p73	Cultivar p73
WT	Especie silvestre
<i>ars1</i>	<i>altered response to salt 1</i>

## Abreviaturas

pb	Pares de bases
ABA	Ácido abcísico
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
K <sup>+</sup>	Ion potasio
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
Mg <sup>+2</sup>	Ion magnesio
gs	Conductancia estomática
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
μm	Micro moles
m	Metros
cm	Centímetros
min	Minutos
s	Segundos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
KCl	Cloruro potásico
nm	Nanometros
kg	Kilogramos
L	Litros
mL	Mililitros

dS	Decisiemens
MPa	Milipascales
MES	Ácido 2-( <i>N</i> -morpholino)etanosulfónico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
TF	Factor de transcripción



# **Introducción**



## **1. Introducción**

### **1.1. Clasificación taxonómica, características botánicas e importancia económica del tomate**

#### **1.1.1. Clasificación taxonómica y características botánicas del tomate**

El tomate pertenece a la familia Solanaceae. Esta familia es una de las que más diversificación ha experimentado dentro del orden Solanales. Se estima que el número de especies de esta familia está en el rango de 9000-10000 especies, y en el caso particular del género *Solanum* al que pertenece el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en aproximadamente 2000 especies. Entre éstas se incluyen muchas de gran interés agronómico como la patata, el tabaco, el pimiento, la berenjena y la petunia (Knapp, 2002).

Las especies del género *Solanum* tienen una amplia distribución geográfica estando presentes en todos los continentes y zonas climáticas, y destacan por su gran diversidad morfológica, periodos de vida y nichos ecológicos que ocupan (Knapp, 2002).

El tomate es oriundo de América, en particular de la región andina de América del Sur pero casi con total seguridad su domesticación se llevó a cabo en la Mesoamérica precolombina. Los españoles introdujeron la planta en Europa en el siglo XVI, tras la conquista del Imperio Azteca por Hernán Cortés. Asumiéndose ya en esa época que el tomate estaba relacionado con el género *Solanum*, se le nombró científicamente como *Solanum pomiferum*. En 1753, Karl Linneo clasificó a los tomates dentro del género *Solanum*, nombrándolo esta vez como *Solanum lycopersicum* (Linnaeus, 1753). Debido a su estrecho parentesco con plantas venenosas del género *Solanum* como belladona y mandrágora Philip Miller propone en 1754

clasificar al tomate en el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum*, con el fin de favorecer la aceptación por la sociedad de dicha especie como comestible (Miller, 1754). Sin embargo, esta clasificación ha estado sujeta a debate durante largo tiempo, siendo así que finalmente se ha aceptado como denominación botánica definitiva del tomate la propuesta por Karl Linneo gracias al uso de las modernas herramientas moleculares a finales del siglo pasado. Éstas revelaron la suficiente información a nivel genómico para permitir la revisión de la clasificación filogenética de las Solanaceae. A partir de ese momento el género *Lycopersicum* se reintrodujo dentro del género *Solanum* en la sección de *Lycopersicon* tal y como la había clasificado Linneo 200 años antes (Asamizu y Ezura, 2009; Foolad, 2007).

La clasificación taxónomica del tomate, tanto del cultivado-domesticado como de las especies silvestres relacionadas, ha ido cambiando desde los años 40 del siglo pasado, donde las especies se separaron en dos secciones: subgénero *eulycopersicon* (*L. esculentum* y *L. pimpinellifolium*) y subgénero *eriopersicon* (*L. peruvianum*, *L. hirsutum*, *L. cheesmaniae* y *L. glandulosum*). Esta catalogación se mantuvo hasta aproximadamente 1970 cuando se propuso clasificarlos en función de la capacidad de las especies silvestres de cruzarse con el tomate domesticado. Es a partir de esta década que las 9 especies silvestres de tomate se dividieron en dos grupos, los llamados complejos *Esculentum* y *Peruvianum*, dependiendo de su capacidad de cruzamiento. Todas las especies del complejo *Esculentum* (*L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *L. chmielewskii* y *L. parviflorum*) podían hibridar con el tomate cultivado y representar una importante fuente de recursos genéticos para la introgresión de resistencias a estreses bióticos y abióticos y de otros

caracteres de desarrollo deseables desde el punto de vista agronómico en la especie domesticada. Las especies del complejo Peruvianum (*L. chilense* y *L. peruvianum*) poseen una gran diversidad morfológica y ecológica, y representan un gran potencial para la mejora del tomate, pero hasta muy recientemente su uso se encontraba muy limitado debido a la escasa capacidad de hibridación con el tomate domesticado y la necesidad de desarrollar métodos específicos de cruzamiento como el rescate de embriones (Bergougnoux, 2014).

En la actualidad la descripción del tomate es más compleja, y se basa en el uso de herramientas filogenéticas, fundamentalmente en la secuencia del gen *GBSS* (*Granule-Bound Starch Synthase*), para la organización final de la sección *Lycopersicon* del género *Solanum* (Peralta y Spooner, 2001). Con estos estudios filogenéticos se clasificó a *Solanum juglandifolium* y *Solanum ochranthum* como un grupo relativamente cercano a tomate pero fuera de él. Y se distribuyeron las especies de tomate en tres grupos: *Lycopersicon*, *Eriopersicon* y *Neolycopersicon*.

En la clasificación taxonómica hoy en día aceptada del tomate se reconocen el tomate doméstico (*Solanum lycopersicum*) y sus doce especies silvestres relacionadas, todas ellas de fruto de baya pequeña, de las que dos son endémicas de las Islas Galápagos: *Solanum galapagense* y *Solanum cheesmaniae* con fruto de color amarillo-naranja y que se pueden cruzar fácilmente con el tomate domesticado, al igual que la especie silvestre de fruto rojo *Solanum pimpinellifolium*. Las especies *Solanum chmielewski*, *Solanum habrochaites*, *Solanum neorickii*, *Solanum pennellii* y *Solanum chilense* son de fruto de color verde y más difíciles de cruzar con la

especie domesticada. La especie antes clasificada como *Lycopersicum peruvianum* (Miller) se han dividido ahora en especies del norte y del sur, en las que otros análisis moleculares más precisos identificaron cuatro especies; las del norte que son *Solanum arcanum*, *Solanum huaylasense*, *Solanum peruvianum* y *Solanum corneliomuelleri* (Peralta et al., 2005 y 2008).

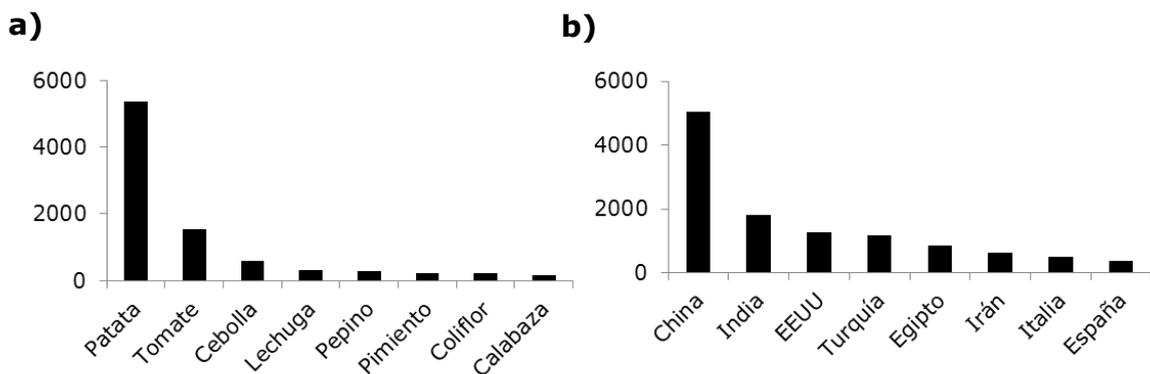
### **1.1.2. Importancia económica del tomate**

*Solanum* es probablemente el género más importante de la familia *Solanaceae* desde el punto de vista agro-alimentario y económico, formando parte de él especies de gran interés agronómico así como en la industria farmacéutica y química.

Actualmente el tomate se comercializa tanto en fresco como procesado, siendo uno de las especies hortícolas más consumidas en Europa, detrás de la patata y por delante de la cebolla (Figura 1 a)) (FAOSTAT, 2013). Siendo además, la especie preferida para huertos urbanos y agricultura doméstica. A escala mundial la producción de tomate en el año 2012 superó los 160 millones de toneladas, ocupando la décima posición (FAOSTAT, 2013). Durante las dos últimas décadas, tanto la producción como el área dedicada al cultivo se han duplicado. Hasta hace 20 años, los continentes de Europa y América del Norte han sido los productores más importantes, pero en la actualidad Asia se ha convertido en primer productor mundial, encabezando la lista de países productores China seguida por India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia y España (Figura 1 b)).

Es interesante destacar que los países donde se concentra el mayor rendimiento del cultivo de tomate son del norte de Europa, donde las condiciones climatológicas no son las más favorables e incluso el área dedicada a este cultivo es muy pequeña en comparación con los países del sur. Ello es debido en gran medida en que el cultivo en dichos países septentrionales se lleva a cabo en invernaderos bajo condiciones ambientales y agronómicas muy controladas y optimizadas.

El reciente incremento en la producción de tomate responde a un aumento de la demanda mundial, llegando a alcanzarse consumos medios mundiales de 20,5 kg/persona/año en el 2009. Desde un punto de vista global son en los países del Arco Mediterráneo y los de Oriente Próximo y Medio donde el consumo de tomate es más elevado, rondando los 40 - 100 kg/persona/año (Bergougnoux, 2014).



**Figura 1.** a) Producción europea, en miles de toneladas, de las ocho especies hortícolas de mayor interés agronómico. En la que España ocupa la segunda posición. b) Producción en miles de toneladas de tomate de los mayores productores a nivel mundial.

Fuente: FAOSTAT (<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>). Datos del año 2013.

**Tabla 1.** Producción de tomate y superficie cultivada en España, representada por comunidades autónomas. Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Datos del año 2014.

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Galicia	-	215	854	1.069	-	58.159	95.256	93.854
P. de Asturias	40	20	20	80	15.000	30.000	50.000	2.200
Cantabria	16	-	-	16	20.250	-	-	324
País Vasco	80	140	70	290	8.500	14.804	47.786	6.098
Navarra	-	1.563	62	1.625	-	75.406	68.168	122.086
La Rioja	-	149	14	163	-	63.000	80.000	10.507
Aragón	-	795	11	806	-	74.843	169.091	61.360
Cataluña	38	1.027	163	1.228	5.775	34.439	100.784	52.016
Baleares	20	130	89	239	7.000	40.000	50.160	9.804
Castilla y León	-	146	47	193	-	32.594	83.944	8.704
Madrid	-	29	20	49	-	50.000	170.000	4.850
Castilla-La Mancha	-	1.087	50	1.137	-	73.321	161.120	87.756
C. Valenciana	64	543	593	1.200	10.000	21.921	100.685	72.249
R. de Murcia	-	169	2.523	2.692	-	59.500	114.500	298.939
Extremadura	-	14.551	-	14.551	-	75.620	-	1.100.352
Andalucía	28	5.798	14.341	20.167	4.696	63.248	94.077	1.716.006
Canarias	-	73	1.045	1.118	-	60.028	116.145	125.741
España	286	26.435	19.902	46.623	9.563	68.916	97.896	3.772.846

## 1.2. El tomate en el contexto de la investigación científica

La comunidad científica ha participado activamente a lo largo de los últimos años en fomentar la idea del tomate como planta modelo en la investigación tanto fundamental como aplicada en Biología Vegetal y en Agricultura. Este hecho ha contribuido a aumentar la popularidad del tomate hasta adquirir la categoría de dicha planta modelo en todos los ámbitos de la biología vegetal. Diversas características del tomate han contribuido a que esta especie alcance esta categoría: 1) su versatilidad de cultivo en diferentes condiciones, permitiendo aumentar el conocimiento sobre su capacidad de

adaptación a diferentes estrés medioambientales; 2) su relativamente corto ciclo de vida; 3) la independencia relativa de su desarrollo reproductivo del fotoperiodo, pudiendo florecer y fructificar en cualquier estación del año; y relacionado con esto: 4) su elevado potencial reproductivo en el que hay que destacar que es una planta autógama (capaz de autopolinizarse), es fácil llevar a cabo la polinización controlada y realizar cruces intra- e interespecíficos; y finalmente 5) su elevada capacidad de propagación vegetativa por injertos e *in vitro* (Foolad, 2007; Bergougnoux, 2014; Schwarz et al., 2014).

A nivel genético es una planta diploide ( $2n=24$ ) con un genoma relativamente pequeño (0,9 pg/genoma haploide) (Giovannoni, 2004). A nivel molecular el genoma de la accesión Heinz 1706, que es la que se ha utilizado para su secuenciación, tiene aproximadamente 950 Mb (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Es de sobra es conocido que existen otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz o incluso el olmo. Sin embargo el tomate tiene la característica peculiar de estar filogenéticamente distanciado de los anteriores y además posee rasgos morfológicos que no comparte con los otros organismos modelo. A modo de ejemplo se puede destacar que tiene un crecimiento indeterminado debido a la repetición modular de la fase vegetativa y reproductiva (Bergougnoux, 2014).

### **1.2.1. Retos en la mejora genética del tomate**

La domesticación del tomate ha implicado la modificación de una amplia gama de características morfológicas y fisiológicas tanto de la planta como del fruto en comparación con su antepasado silvestre. Este proceso de

domesticación varía de una especie a otra, pero en general se centra en conseguir un hábito de crecimiento más compacto, una reducción de la capacidad de dispersión y de la dormancia de las semillas, un adelanto en el desarrollo y maduración de las partes consumibles, y un aumento en el tamaño y la diversidad morfológica de éstas. En tomate en particular los objetivos de la mejora consisten en producir nuevas variedades con mejores características agronómicas, dependiendo del mercado al que vaya dirigido el cultivar: para fresco o para procesado. Los tomates para el procesado industrial se cultivan principalmente en campo abierto, mientras que los destinados a consumo en fresco se cultivan tanto en esa condición como en invernaderos con o sin condiciones controladas de temperatura. Los retos en la mejora han evolucionado a lo largo del tiempo, adaptándose a los nuevos cultivares disponibles y a las modificaciones en los sistemas de cultivo. A pesar de que los tres retos principales son recurrentes (capacidad de adaptación al medio ambiente, resistencia a plagas y enfermedades y el rendimiento y calidad del fruto), la mejora ha pasado por cuatro fases: en los años 70 del siglo pasado se centraron los esfuerzos en el incremento del rendimiento, en los 80 en el tiempo de conservación postcosecha, en los 90 en las cualidades organolépticas como el sabor, y desde entonces en el valor nutricional del fruto (Bai y Lindhout, 2007; Foolad, 2007; Causse, 2012). Los avances en el conocimiento de las bases moleculares que determinan los caracteres de interés agronómico ha dirigido el trabajo de los mejoradores fundamentalmente hacia el desarrollo de la planta (hábito de crecimiento) y del fruto (características de su calidad), aunque de manera más reciente también hacia la interacción con el medio ambiente como la resistencia a enfermedades (Grandillo *et al.*, 2013). Este enfoque

ha llevado a la identificación de genes implicados en rasgos cualitativos y cuantitativos (QTL). La propia domesticación y los sucesivos programas de mejora en tomate han conducido a la obtención de una enorme diversidad en esta especie (van der Knaap, 2013).

#### **1.2.1.1. Rendimiento del tomate**

A pesar de que otros rasgos agronómicos sean potencialmente óptimos, si un cultivar no tiene un rendimiento superior o al menos igual que las variedades ya existentes no será considerado como adecuado en los programas de mejora. Rendimiento entendido desde el punto de vista tanto de número de frutos como de peso de los mismos por planta. La optimización de las técnicas de cultivo, en particular la nutrición con el uso de fertilizantes, ha contribuido en gran medida al aumento del rendimiento. Es obvio que el rendimiento del tomate no es un rasgo aislado ya que está fuertemente correlacionado con factores que influyen en el crecimiento global de la planta. La temperatura es uno de estos factores que influyen en el crecimiento e indirectamente el rendimiento (Bergougnoux, 2014).

#### **1.2.1.2. La resistencia a estreses bióticos y abióticos**

Uno de los aspectos más deseables en el cultivo del tomate es la resistencia a estreses bióticos para que las plantas puedan sobrevivir a plagas destructivas y enfermedades que pueden causar importantes pérdidas económicas (Bai y Lindhout, 2007). El tomate se ve afectado por más de 200 enfermedades, que se pueden controlar a través de tratamientos con productos fitosanitarios, pero que provocan múltiples efectos negativos. Entre éstos podemos destacar el desarrollo de resistencia a los productos fitoquímicos con la consiguiente necesidad de desarrollar nuevos y los

potenciales daños ocasionados al medio ambiente, al agricultor y al consumidor. Por otra parte su uso aumenta los costes de producción de los cultivos y obliga al cumplimiento de las especificaciones técnicas del producto químico, principalmente niveles y plazos de seguridad en su aplicación. Con el fin de limitar el uso de fitoquímicos en las prácticas de cultivo los mejoradores han recurrido a introducir material genético de especies silvestres relacionadas con el tomate cultivado en sus programas de mejora. De hecho la primera introgresión de rasgos agronómicos interesantes de especies silvestres al tomate cultivado fue realizada en 1967 en la que se obtuvo un tomate cultivado resistente a *Cladosporium fulvum*, un hongo responsable de la enfermedad del moho de la hoja, que se consiguió por cruces interespecíficos de tomate cultivado con *S. pimpinellifolium* (Walter, 1967).

### **1.2.1.3. Tamaño y forma del fruto**

El fruto del tomate es carnoso y se corresponde con un crecimiento hipertrofiado del ovario de la flor tras la polinización. Se compone de las siguientes partes: una epidermis, un pericarpio grueso (y sus subpartes como columela y septa), y los tejidos de la placenta que rodean y embeben las semillas en las cavidades locales. Los cambios más importantes producidos durante la domesticación del tomate fueron las cualidades intrínsecas del fruto: tamaño, forma, color, firmeza y vida útil. Las especies silvestres relacionadas con tomate tienen los frutos muy pequeños y su única finalidad es la de propagar la especie por dispersión de sus semillas, no la de alimentar a los seres humanos. Sin embargo, los tomates cultivados modernos ofrecen una gran variación en el tamaño del fruto, que van desde el tomate tipo "cherry" (menos de 20 g) al tomate tipo "beef"

(hasta 500 g). El tamaño del fruto depende en gran parte del número de células que se establecen en la etapa de pre-antesis floral pero también depende del grado y duración de la expansión celular.

Se han identificado seis QTLs como responsables del crecimiento del fruto durante la domesticación del tomate. Uno de ellos es *fruit weight 2.2* (*fw2.2*), que se le ha implicado en el aumento del tamaño del fruto hasta en un 30% durante la evolución del tomate silvestre al domesticado (Grandillo *et al.*, 1999). El análisis genético en detalle ha demostrado que la proteína FW2.2 actúa en el ciclo celular como represor negativo de la división celular con efectos en el tamaño pero no en la forma final del fruto (Frary *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2002; Tanksley, 2004; Cong y Tanksley 2006). Dos mutaciones independientes, *fasciated* y *locule-number*, llevaron a la identificación de dos QTLs responsables de los cambios de tamaño a través de la modificación del número de carpelos en la flor y en consecuencia del número de lóculos del fruto durante el desarrollo temprano del fruto (Barrero and Tanksley 2004). Hay que destacar que el desarrollo de las plantas cuyos frutos tengan un peso superior a 500 g son el resultado del efecto acumulativo de ambas mutaciones (Lippman y Tanksley, 2001). El clonaje posicional del gen *FASCIATED* reveló que codifica para un factor de transcripción tipo YABBY, que regula el tamaño de meristemo floral y se expresa muy tempranamente durante la organogénesis floral. El fenotipo de elevado número de lóculos de los cultivares modernos de tomate se debe a la inhibición de dicho gen durante el desarrollo floral. Una inserción en el primer intrón parecer ser el responsable de este cambio fenotípico (Cong *et al.*, 2008). Es interesante resaltar que ninguno de los homólogos de tomate entre los genes de *Arabidopsis thaliana* conocidos por su implicación en el

desarrollo de fruto se identificaron como responsables del fenotipo *fasciated* en el tomate (Barrero *et al.*, 2006).

En la actualidad se considera que menos de diez QTL son los responsables de la mayoría de las modificaciones en el tamaño y la forma del tomate cultivado (Tanksley, 2004). Tras 75 años de trabajo los investigadores han demostrado que el tomate en forma de pera y el ovalado son dos fenotipos debidos al gen *OVATE* (Ku *et al.*, 1999). Este gen se expresa durante el desarrollo temprano de la flor y las dos primeras semanas después de antesis. Curiosamente la mutación *ovate* conduce a una morfología diferente según el fondo genético en la que se expresa, lo que sugiere que el gen *OVATE* interactúa con un locus desconocido (Tanksley, 2004). Otros dos loci importantes en el control de la forma del fruto son *sun* y *fs8.1*. El locus *fs8.1* es responsable del tomate "cuadrado", que es el resultado de la adaptación del tomate para la cosecha mecánica (Grandillo *et al.*, 1996). La mutación *sun* induce un aumento en la longitud del fruto pero en este caso el alargamiento se produce en ambas direcciones longitudinales, lo que le confiere una simetría bilateral (van der Knaap y Tanksley, 2001). Además, mientras que *OVATE* se expresa durante el desarrollo temprano de la flor *SUN* se expresa solamente durante la fase de la división celular. Estos datos demuestran que aunque las dos mutaciones confieren fenotipos similares, casi con toda seguridad tienen diferentes bases genéticas (Tanksley, 2004).

### **1.2.1.4. La maduración y la aparición del color**

La maduración es el proceso fisiológico por el que el fruto completamente desarrollado vira de color verde a rojo. Durante la maduración se producen importantes reacciones bioquímicas, algunas son beneficiosas para el fruto

en lo que respecta a calidad tales como la adquisición de color rojo y la acumulación de azúcares y compuestos volátiles mientras otras son perjudiciales para la conservación postcosecha tales como la pérdida de firmeza debido a la desintegración de la pared celular (Klee y Giovannoni, 2011). El tomate es un fruto climatérico en el que el inicio de la maduración está precedido por un aumento de la respiración y de la producción de etileno que deviene autocatalítica (Lèlievre *et al.*, 1997). El control de la maduración se puede llevar a cabo en distintos puntos de la ruta de biosíntesis, percepción y señalización del etileno. Se han identificado diversos mutantes de tomate con alteraciones en la regulación de la maduración, entre los cuales destacan *ripening-inhibitor (rin)*, *Never-ripe (Nr)*, *non-ripening (nor)*, *high-pigment 2 (hp-2)* o *colorless non-ripening (Cnr)* cuyo análisis ha aportado valiosa información sobre la fisiología de la maduración y sus bases moleculares (Giovannoni, 2007; Osorio *et al.*, 2011). La mutación *Nr* afecta a uno de los receptores del etileno y provoca que el fruto sea insensible al etileno (Wilkinson *et al.*, 1995). La maduración climatérica es en realidad el resultado de mecanismos moleculares regulados por el etileno pero también independientes del etileno. La evidencia de una regulación independiente del etileno en la maduración de frutos climatéricos se observó en el análisis de los mutantes de tomate *rin* y *nor*, que no producen etileno de forma autocatalítica y no maduran, ni siquiera en respuesta a etileno aplicado exógenamente. La caracterización molecular de ambos mutantes permitió la identificación del gen *RIN* que codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia MADS-box, y del gen *NOR* que codifica para otro factor de transcripción pero de la familia que contiene el dominio NAC (Vrebalov *et al.*, 2002; Martel *et al.*,

2011). Si estas dos mutaciones se dan en homocigosis se inhibe el proceso de maduración, los frutos permanecen de color amarillo o naranja claro y se pueden llegar a conservar durante meses a temperatura ambiente. Cuando las mutaciones están en hemicigosis, los frutos maduran lentamente pero siguen teniendo una vida útil muy larga comparado con frutos WT (*rin/Rin* o *nor/Nor*). La mayoría de los híbridos comerciales de tomate de maduración lenta y larga vida útil se basan en la mutación *rin* en su forma heterocigótica (*rin/Rin*) (Giovannoni, 2007).

El cambio de color es el rasgo más evidente de la maduración del tomate. El color del fruto depende de su contenido en carotenoides, principalmente licopeno y en menor medida  $\beta$ -caroteno. En tomate existen varios mutantes afectados en el color: *r* (*yellow flesh*, el fruto maduro tiene la pulpa de color amarillo), *sh* (*sherry*, el fruto tiene color amarillo con tintes rojizos), *hp-1* (*high pigment 1*, fruto con elevadas concentraciones de clorofila, carotenoides y ácido ascórbico), *tg* (*tangerine*, la pulpa del fruto y los estambres de la flor son de color naranja), *B* (*beta-carotene*, con elevados contenidos en  $\beta$ -caroteno y licopeno en el fruto maduro), *at* (*apricot*, fruto con coloración amarilla-rosada), *og* (*old gold*, con cantidades elevadas de licopeno), *Del* (*delta*, el fruto cuando madura tiene color rojizo anaranjado). Gracias al análisis de estos mutantes se ha podido diseccionar la ruta de biosíntesis de los carotenoides y se han identificado los genes responsables de las mutaciones y de los fenotipos observados. El mutante *r* afecta a un gen que codifica para la fitoeno sintasa (*PSY1*), que codifica para la enzima que cataliza la primera etapa de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Hirschberg, 2001). El color naranja del mutante *tg* es debido a la acumulación de pro-licopeno y el gen mutado codifica una isomerasa de

carotenoides. El mutante *Del* afecta a un gen que codifica una licopeno  $\beta$ -ciclase, al igual que la mutación *B*, caracterizándose por la acumulación de altos niveles de  $\delta$ -caroteno y licopeno el primer mutante, y de  $\gamma$ -caroteno el segundo (Lewinsohn *et al.*, 2005).

#### **1.2.1.5. Valor nutricional y calidad organoléptica**

Si se toma en consideración sólo los contenidos en proteínas, lípidos y azúcares para describir el valor nutricional del fruto parece claro que el tomate no tiene un alto valor nutritivo. Sin embargo, los tomates representan una importante fuente de nutrientes beneficiosos para la salud como son los compuestos antioxidantes tales como licopeno, provitamina A ( $\beta$ -caroteno) y ácido ascórbico (vitamina C). El tomate representa la principal fuente de licopeno, que tiene propiedades antioxidantes y se considera que actúa en la defensa contra enfermedades cancerosas o cardiovasculares (Bramley, 2000). El cruce entre *S. lycopersicum* cv. Floradade y el pariente silvestre *S. galapense* (*L. cheesmanii* f. *minor* CH Mull), que contiene el gen *Beta* (*B*) dio lugar a tres líneas híbridas cuyos frutos poseían mayores contenidos en  $\beta$ -caroteno y por lo tanto un mayor valor nutricional (Stommel, 2001). Los tomates son también una fuente importante de ácido ascórbico aunque en comparación con las variedades de tomate cultivado actuales las distintas especies de tomates silvestres pueden llegar a tener hasta 5 veces más vitamina C. Los mejoradores han desarrollado con éxito algunos cultivares con un elevado valor nutritivo, pero la merma en el rendimiento de éstos obstaculizaron su éxito comercial (Causse *et al.*, 2006).

Los contenidos en sólidos solubles totales y ácidos orgánicos determinan el equilibrio ácido/dulce del sabor, parámetro clave que junto

con la emisión de volátiles que determina las características del aroma constituyen la base de las propiedades organolépticas de la calidad del fruto. Los sólidos insolubles, constituidos por componentes de la pared celular y proteínas, determinan la firmeza del fruto y la viscosidad de los productos derivados del procesado del tomate.

Otros dos caracteres agronómicos de gran importancia para la obtención de nuevas variedades de tomates son el hábito de crecimiento y la facilidad para la recolección de fruto. La mutación espontánea *self-pruning* (*sp*) se identificó en 1914, y su introducción en programas de mejora permitió el desarrollo de cultivares de crecimiento arbustivo, aptos para la recolección mecánica. *sp* induce la concentración de flores y por consiguiente de los frutos, contribuye a la firmeza de los frutos y a la resistencia a la sobre-maduración. Las mutaciones *jointless* (*j* y *j2*) se caracterizan por la ausencia de la zona de abscisión en el pedicelo del fruto, y su introducción en variedades de tomate ha permitido la generación de cultivares en los que es posible llevar a cabo la recolección mecánica del fruto sin el cáliz ni el pedúnculo, es decir, sin las partes "verdes" (Bergougnoux, 2014).

#### **1.2.1.6. Límites de la mejora genética clásica: la era de la ingeniería genética**

Para la obtención de nuevos cultivares que posean características agronómicas mejoradas se han tenido en cuenta tres aspectos claves: 1) las condiciones medioambientales que afectan al cultivar, 2) las prácticas de cultivo, y 3) los sistemas de recolección.

Un programa de mejora eficiente requiere de la disponibilidad de fuentes de diversidad genética en la especie además de la capacidad de

heredabilidad de los caracteres que interesan. En la mayoría de las ocasiones los programas de mejora deben enfocarse de tal forma que afecten positivamente a varios caracteres de interés, teniendo en cuenta que la mayoría de estos rasgos están controlados por diferentes genes y además lo están por factores medioambientales.

La mejora tradicional se ha realizado mediante el cruce de variedades de élite seleccionadas de la misma especie o mediante el cruce de un cultivar de élite y una especie silvestre relacionada o con especies próximas filogenéticamente. La mejora tradicional necesita de 5 a 7 años para producir un nuevo cultivar, si utilizamos los cruces adecuados de variedades de élite, y alrededor de 20 años cuando se usan especies silvestres en dichos cruces. En ambos casos la complejidad de obtención de cultivares mejorados se incrementa con la complejidad entre los parentales. Es por eso que la elección de los parentales es un paso fundamental, lo que requiere un adecuado conocimiento del material disponible en el germoplasma (Causse et al., 2006). En el caso del tomate, se han recolectado y catalogado más de 83.000 accesiones que han sido cuidadosamente conservadas en bancos de semillas repartidos por todo el mundo (Causse, 2012). Este trabajo de identificación, obtención, catalogación y conservación de variedades, entradas y accesiones tanto del tomate domesticado como de las especies silvestres relacionadas ha posicionado al tomate como la primera especie en cuanto a número de variedades y especies relacionadas conservadas con semillas. Los principales bancos de germoplasma se encuentran en Estados Unidos de América y en Taiwan (Schwarz et al., 2014).

Todas las especies silvestres de tomate se pueden llegar a cruzar con el tomate cultivado (*S. lycopersicum*) con mayor o menos eficiencia y siempre y cuando el tomate domesticado se utilice como receptor de polen (Bedinger et al., 2011). En el caso de dos especies que no se puedan cruzar o resulte muy difícil se utilizan técnicas *in vitro*, entre las que destacan la fusión celular y regeneración a partir de tejidos o células individuales, o el rescate de embriones; estas técnicas son necesarias en el tomate en el caso de cruces con *S. peruvianum* (Bedinger et al., 2011). Como ejemplos de la mejora del tomate cultivado mediante la introgresión de rasgos procedentes de especies silvestres relacionadas tenemos la mejora de la tolerancia al frío gracias a la introgresión de material genético de *S. habrochaites*, de la tolerancia a la sequía utilizando *S. chilense* para la introgresión, y de la tolerancia a la salinidad utilizado *S. cheesmaniae* como donador de material genético (Hobson y Grierson, 1993). Recientemente con el objetivo de incrementar el contenido en compuestos metabólicos como los flavonoides que poseen un impacto positivo para la salud se han realizado cruces con *S. pennellii*. El resultado ha sido el aumento de quercitina en el fruto y la acumulación de licopeno y ácido ascórbico de casi dos veces superior a los cultivares tradicionales de tomate (Willits et al., 2005).

El desarrollo de la biología molecular y la genómica ha ofrecido a los mejoradores una nueva y eficaz herramienta para la mejora genética basada en la selección asistida por marcadores moleculares. El desarrollo de los marcadores moleculares ha permitido la construcción de mapas genéticos de alta densidad en el genoma del tomate, facilitando la disección de los caracteres cuantitativos en QTLs y abriendo el camino al mapeo físico y al clonaje molecular de los factores genéticos responsables de dichos

caracteres (Causse, 2006 y 2012). Finalmente la secuenciación completa del genoma del tomate, aún en fase de anotación, ha permitido un gran avance en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares que regulan el crecimiento y desarrollo, la maduración del fruto, y las respuestas del tomate al entorno medioambiental (estreses bióticos y abióticos) (Consortium, 2012).

Por otro lado la ingeniería genética ha permitido superar la barrera de la capacidad de entrecruzamiento interespecífico, de forma que un gen de una especie no relacionada se puede introducir en el genoma de una especie de interés agronómico, lo que no sería posible en mejora clásica debido a la incompatibilidad interespecífica. A día de hoy un carácter específico puede introducirse fácilmente en un cultivar de interés mediante la transformación vegetal y la regeneración *in vitro* del transformante, en unos periodos de tiempo tan breves que no puede conseguirse con la mejora clásica (Bergougnoux, 2014).

### **1.3. Mutagénesis insercional. El etiquetado de genes por inserción de elementos de transposición: transposones o T-DNA**

Una de las herramientas de genómica funcional utilizada con más éxito para identificar genes implicados en diferentes procesos biológicos en plantas es el análisis de mutantes. Dada la relativa escasez de mutantes naturales y espontáneos una alternativa para conseguir dicho material y además en un elevado número es aplicar diversas tecnologías de mutagénesis con el fin de generar colecciones de mutantes que analizar (Emmanuel y Levy, 2002).

El uso de la mutagénesis insercional proporciona una vía rápida y efectiva para generar una colección de mutantes, y además facilita grandemente la clonación del gen mutado pues éste queda etiquetado por

el elemento de transposición, de secuencia conocida. Los elementos de transposición que son capaces de insertarse en el genoma, tales como transposones (Sundaresan *et al.*, 1995; Martienssen, 1998) o T-DNA (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997), se pueden utilizar como mutágenos para generar mutaciones por transformación. La generación de mutantes usando mutagénesis insercional con T-DNA representa en la actualidad una de las alternativas más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de genes que regulan tanto el desarrollo como la tolerancia a diferentes estreses abióticos (salinidad, sequía, estrés oxidativo, etc.) en las plantas (Fu *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2014). La mutagénesis insercional es una herramienta biotecnológica en la que se asocian el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular con el objetivo de identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado (O'Malley y Ecker, 2010).

En síntesis de lo que se trata es de inducir la anulación o la alteración de la expresión de genes por la inserción de una secuencia de ADN invasor en regiones codificantes de un gen o en regiones reguladoras próximas. La utilización de la mutagénesis insercional proporciona un método rápido para etiquetar genes, lo que facilita enormemente su aislamiento y clonaje. El T-DNA se utiliza como agente mutagénico para la generación de líneas de pérdida o alteración de función en plantas. Como la secuencia del elemento insertado es conocida se puede clonar fácilmente el gen afectado por la inserción mediante estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (O'Malley y Ecker, 2010). La integración de un T-DNA en la secuencia codificante o en cualquier elemento de control de un gen endógeno puede ocasionar la anulación de función o la alteración del nivel

de expresión de dicho gen generando un fenotipo mutante. La caracterización del mutante de inserción proporciona una valiosa información sobre la función del gen mutado y además, como el gen queda etiquetado por el T-DNA, su aislamiento se facilita grandemente (Radhamony *et al.*, 2005).

Hay diversas estrategias de aplicación de la mutagénesis insercional. Una de ellas es el etiquetado por activación en donde la construcción genética de transformación es un T-DNA que contiene múltiples copias del promotor constitutivo *35SCaMV* del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV*). La integración de la construcción en la vecindad de un gen endógeno, lo suficientemente cerca como para ejercer su influencia, induce de forma significativa el nivel de expresión de ese gen, con potenciales consecuencias en el fenotipo que manifiesta el mutante resultante. En tomate esta estrategia de mutagénesis insercional se ha utilizado con éxito y ha permitido identificar y clonar el gen *ANT1*, que codifica para un factor de transcripción MYB implicado en la regulación de la biosíntesis, conjugación mediante glicosilación y transporte a vacuolas de antocianos (Mathews *et al.*, 2003).

### **1.3.1. Etiquetado mediante trampas génicas o *trapping***

Otra estrategia de mutagénesis insercional que está proporcionando resultados muy eficientes consiste en el uso de 'trampas génicas' o *trapping*, y se basa en construcciones que contienen la secuencia codificante de un gen delator. Cada trampa está diseñada con un propósito específico, pero en cualquier caso la ventaja estriba en su naturaleza dual: como cualquier otro T-DNA o transposón las trampas generan mutaciones de inserción pero además, si se insertan en la orientación correcta, el gen

delator queda bajo control de los elementos de regulación del gen endógeno. De esta forma, no sólo se puede inferir la función del gen a través de la caracterización fenotípica del mutante, sino que además el análisis de la expresión del delator puede dar una idea del patrón de expresión espacio-temporal del gen etiquetado (Springer, 2000). Mediante esta estrategia de mutagénesis insercional en el año 2000 se generó una colección de alrededor de 19000 líneas de arroz que portaban diferentes inserciones del mismo T-DNA. Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de callos embriogénicos y posteriormente regenerarlos en plántulas portadoras del T-DNA. La construcción genética contenía como gen delator *uidA* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), cuya actividad es detectable mediante análisis histoquímico, sin promotor alguno y en su lugar disponía de un sistema recombinante consistente en el promotor *35SCaMV* unido a un gen selector que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Jeon *et al.*, 2000).

La estrategia del *trapping* permite la identificación de genes funcionalmente redundantes, los cuales se expresan en diversas fases del desarrollo (provocando confusión durante el análisis fenotípico), genes cuya disrupción es responsable de letalidad prematura y genes cuya disrupción afecta tan sutilmente al fenotipo que no puede detectarse (es en este caso en el que la expresión del gen delator puede aportar ciertas pistas para ayudarnos a la identificación del fenotipo durante el trabajo de evaluación). Por lo tanto la identificación génica es independiente de su nivel de expresión evitando el riesgo de no detectar genes de baja expresión que, sin embargo, pueden tener un gran efecto sobre el fenotipo (Pineda, 2010). En resumen, se considera que esta estrategia es muy adecuada para

identificar genes que se activan o reprimen en respuesta a estímulos medioambientales externos o situaciones de estreses bióticos o abióticos (Krysan *et al.*, 1999).

Utilizando una trampa de intensificadores, Atarés *et al.* (2011) han generado más de 2800 líneas T-DNA de dos accesiones de la especie silvestre de tomate *Solanum pennellii* (20146 y PE47). El vector elegido para la transformación, pD991, contiene un promotor mínimo unido a la secuencia codificante del gen delator *uidA*; una secuencia truncada del promotor *35SCaMV* con una caja TATA y un sitio de iniciación de la transcripción que por sí solo no es capaz de estimular la expresión del delator *uidA* pero sí con el auxilio de elementos reguladores como intensificadores endógenos del genoma del mutante (Springer, 2000). Después de la integración en el genoma de la planta, los elementos intensificadores cercanos al lugar de inserción del T-DNA actúan induciendo un incremento en la transcripción de *uidA* a partir del promotor mínimo *35SCaMV*, pudiéndose observar dicho patrón de expresión del delator vía la actividad GUS que se puede determinar mediante una reacción histoquímica (Campisi *et al.*, 1999).

#### **1.4. Estrés por salinidad y sequía: impacto global en la agricultura**

La seguridad alimentaria se ha convertido en un punto clave en la agenda política de los Estados y Organizaciones Internacionales y se considera un objetivo clave para promover el desarrollo económico mundial y la estabilidad social y política a nivel global. La importancia de dicho punto se ha incrementado de manera significativa debido a dos factores: demografía y cambio climático. Se estima que la población mundial va a incrementarse de los actuales 7.100 millones a más de 9.500 millones para el año 2050

(ONU, 2012), lo que significa que la humanidad tiene que enfrentarse con un marcado aumento de la demanda de producción de alimentos. Debido a tal aumento la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) señala que es necesario un incremento en la producción global de alimentos en torno al 70% en los próximos 40 años para asegurar cubrir semejante demanda alimentaria debido a ese aumento demográfico (FAO, 2010).

El cambio climático por su parte está constituyendo una amenaza creciente en la producción de alimentos. Se estima en todas las proyecciones de evolución del clima que la temperatura de la superficie del planeta va a aumentar en todos los escenarios considerados de evaluación del incremento de la emisión de gases de efecto invernadero como CO<sub>2</sub> del siglo pasado. En el aspecto particular de la producción agrícola se ha hecho la proyección que el cambio climático va a afectar negativamente a la producción en especies de interés agronómico para incrementos de temperatura superiores a 2°C desde el siglo pasado, si no se consigue que dichas especies se adapten con éxito a estas condiciones medioambientales. Íntimamente ligado a esta proyección del cambio climático se sitúa la previsión de la marcada disminución de los recursos hídricos, tanto de la superficie como del subsuelo (IPCC, 2014). En concreto, en la producción agrícola en zonas áridas y semiáridas, que representan aproximadamente un tercio de la superficie del planeta y están pobladas por aproximadamente 400 millones de habitantes (Williams, 1999), el escenario de cambio climático arriba descrito se reflejara en crecientes tasas de evaporación, que conducirá a una cada vez mayor escasez de agua y de acumulación de sales en el suelo y va a devenir una amenaza cada vez mayor para la

agricultura. Se espera que las especies de interés agronómico que se cultiven en dichas áreas vayan a experimentar estrés por altas temperaturas, sequía y salinidad, estreses que menoscabaran el rendimiento y afectaran negativamente a la calidad final del producto agrícola. En dichas áreas solo es económicamente viable la agricultura por irrigación (Perry *et al.*, 2009). El uso de aguas de baja calidad y elevada conductividad para dichos fines agrava el problema de la salinización secundario del suelo (Tuteja, 2007).

La salinización del suelo, primaria debido a causas naturales pero sobre todo secundaria debido a las diversas actividades del hombre, es un problema creciente que se está agravando con el transcurso del tiempo y que afecta negativamente a la productividad agrícola a nivel mundial. De los 1500 millones de hectáreas de tierra de secano de uso agrícola, se estima que 32 millones (un 2%) están afectados por la salinidad secundaria en diferentes grados (deforestación, mala gestión de los recursos hídricos, riego con agua de baja calidad y elevada conductividad eléctrica, malas prácticas de cultivo, drenaje restringido, etc.). Igual se puede decir del cultivo por regadío; de los actuales 230 millones de hectáreas dedicadas a este tipo de cultivo se estima que 45 millones (un 20%) también están afectadas por procesos de salinización secundaria (Munns y Tester, 2008). Se estima en un 20% la potencial pérdida en producción agrícola a escala global debido a este proceso de salinización del suelo (Ashraf *et al.*, 2008). Se espera que el aumento de la salinización de las tierras cultivables va a tener efectos muy negativos a nivel global, llegando a provocar la pérdida del 30% de la tierra de cultivo en los próximos 25 años, y hasta el 50% para el año 2050 (Wang *et al.*, 2003).

El incremento en las concentraciones salinas del suelo produce dos tipos de efectos en las plantas. Por un lado disminuye la capacidad de las plantas para extraer agua y, por otro, la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la planta provoca efectos tóxicos. Las sales en el suelo alrededor de las raíces tienen un efecto negativo inmediato en el crecimiento de la planta y en el metabolismo asociado, mientras que la acumulación de dichas sales en la planta que tiene lugar más adelante provoca a largo plazo efectos citotóxicos que se traducen al final en la activación de la senescencia (Munns y Tester, 2008).

Otro problema acuciante en dichas regiones áridas y semiáridas del planeta, más grave si cabe para la agricultura, lo constituye la sequía debido a la reducción creciente de la disponibilidad de agua para el cultivo. Se estima que la sequía es responsable de un 45% de las pérdidas en producción agrícola a nivel global (Foolad, 2007). Más de 800 millones de hectáreas de tierra en todo el mundo se encuentran en zonas áridas o semiáridas. Esto equivale a más del 6% de la superficie terrestre. Aproximadamente un tercio de la población mundial vive en países con riesgo de sequía, y se vaticina que este número se incrementará hasta los 5.000 millones de afectados en el año 2025. (FAO, 2013) La sequía produce mermas graves en los rendimientos agrícolas, alteraciones en la producción y calidad del producto y todo ello repercute en una creciente inseguridad alimentaria. El impacto de la sequía se estima que afecta a las posibilidades de alimentación de 800 millones de personas en el mundo. Las tierras de regadío corresponden al 15% del total del terreno utilizado para cultivo agrícola y tienen un rendimiento productivo el doble que las tierras de secano (Munns and Tester 2008). El incremento de tierras de regadío es en

parte responsable del consumo global de agua, que se ha triplicado en los últimos 50 años según United Nation Water Development Report, y hay que destacar que más de dos tercios del agua consumida en el mundo se usa con fines agrícolas (Fang y Xiong, 2014).

La sequía se puede definir como disminución del contenido hídrico del suelo que provoca una limitación en la disponibilidad de agua para la planta. Debido a ello el estatus hídrico de la planta se ve negativamente afectado por una disminución de la absorción de agua (Verslues *et al.*, 2006). Este hecho afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas en un sistema natural, y a la producción y calidad del producto en plantas de interés agronómico en un sistema agrícola, y la gravedad de estos efectos viene en función del grado de reducción del nivel de agua disponible y del tiempo a que está sometida a dicha situación. Así, en el caso de maíz y trigo el déficit hídrico provoca una reducción en la altura de la planta, en el número de espigas y en el peso del grano, y en el caso particular de las flores afecta fundamentalmente al desarrollo del pistilo (Westgate, 1994; Prasad *et al.*, 2011). En el campo, la sequía se puede producir o intensificar por diferentes tipos de estreses abióticos, como las altas temperaturas e intensidad luminosa que inducen un aumento de la transpiración, y deficiencias nutricionales que afectan a la absorción radicular. En todos los casos, el componente estresante común es la disminución de la disponibilidad de agua en el suelo. Esta escasa disponibilidad de agua se puede cuantificar como una disminución del potencial hídrico del suelo (Verslues *et al.*, 2006).

## **1.5. Efectos de la sequía y salinidad en la planta y mecanismos de tolerancia a ambos estreses abióticos**

### **1.5.1. Efectos causados por la sequía y salinidad en la planta**

El estrés osmótico y el de toxicidad iónica son los dos efectos deletéreos de mayor importancia causados por las altas concentraciones de sales sobre las plantas. El efecto osmótico tiene lugar fuera de la planta, es decir antes de que los iones salinos sean absorbidos por las raíces. Las sales disueltas disminuyen el potencial hídrico del suelo, lo que reduce la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes por la raíz, produciendo un efecto similar al provocado por el estrés hídrico. De hecho, este efecto osmótico es común al estrés por sequía y salinidad, y provoca una reducción casi inmediata y significativa del crecimiento y desarrollo de la planta. El efecto iónico es el provocado por la sal en el interior de la planta y es específico de la salinidad: los iones salinos transportados por el flujo de la transpiración desde la raíz hasta las hojas pueden llegar a acumularse en los espacios intercelulares y provocar la deshidratación celular, o bien en el citoplasma e inhibir numerosas actividades enzimáticas claves en el metabolismo, llegando a producir la muerte celular y la senescencia de las hojas (Munns y Tester, 2008).

Podemos clasificar en tres los tipos de mecanismos que determinan la tolerancia a la salinidad; uno dirigido a contrarrestar el estrés osmótico y los otros dos la toxicidad iónica. Por un lado, la tolerancia debida al estrés osmótico que induce a nivel celular una reducción de la expansión celular, tanto en hojas jóvenes como en los extremos de las raíces, y el cierre de los estomas para disminuir la pérdida de agua por transpiración. Por otro, los mecanismos para contrarrestar la toxicidad iónica mediante la exclusión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de las hojas impidiendo su acumulación hasta alcanzar

concentraciones tóxicas en la parte aérea de la planta, y la compartimentalización del dichos iones en determinados tejidos y células especializadas o bien en compartimentos subcelulares como vacuolas para evitar que se alcancen las concentraciones tóxicas en el citoplasma (Munns y Tester, 2008).

Como consecuencia de los dos efectos arriba mencionados que provoca la salinidad, el primero de ellos común a la sequía, se ha propuesto que la respuesta a la salinidad de las plantas tiene dos fases: La primera sería la fase osmótica determinada por el efecto osmótico, y la segunda vendría determinada por el daño provocado por la acumulación de los iones salinos, la toxicidad iónica (Munns, 2002). Por consiguiente, la mayor tolerancia a la salinidad puede deberse a un incremento en la tolerancia osmótica, en la iónica o a ambas. El tiempo requerido para detectar diferencias entre genotipos puede depender del grado de tolerancia a la sal del genotipo, del nivel de estrés aplicado y del periodo de aplicación (Cuartero *et al.*, 2006). Así, la segunda fase empezará a manifestarse antes en las plantas que tengan baja capacidad de exclusión de iones salinos y/o cuando se apliquen altos niveles de estrés, aunque es posible que los efectos osmóticos persistan durante la segunda fase y que la toxicidad iónica tenga cierta incidencia durante la primera (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008).

Por si fuera poco, a la complejidad *per se* de la salinidad debido a los dos anteriores efectos, el primero común a la sequía, hay que sumarle otros dos: el estrés oxidativo secundario y el efecto nutricional, efectos que también se dan en el estrés hídrico.

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés 'Reactive Oxygen Species') altamente cito-toxicas para la planta como consecuencia de los anteriores estreses abióticos provoca en la planta un estrés oxidativo secundario (Türkan y Demiral, 2009; Shanker *et al.*, 2014). Cuando la planta se expone a un estrés hídrico o salino, disminuye la disponibilidad y fijación de CO<sub>2</sub> y la producción de ATP en la fase oscura de la fotosíntesis y esto provoca una disminución de la concentración de NADP, aceptor final de electrones en la fase luminosa, produciéndose un exceso de energía de excitación en los fotosistemas. Si no se disipa esta energía al final se acumula en la cadena de transporte de electrones y se transfieren al oxígeno, generándose los ROS, como el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (HO·). La generación de ROS provoca daño oxidativo, puede ocasionar la muerte celular debido principalmente a la inactivación de los centros de reacción del fotosistema II dando lugar a la fotoinhibición, estimulando la peroxidación de los lípidos de membrana, dañando la integridad de las membranas celulares, y finalmente son responsables de alteraciones en las proteínas o los ácidos nucleicos (Hernández *et al.*, 2001). Para hacer frente a este estrés oxidativo las plantas disponen una serie de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para eliminar los ROS (Miller *et al.*, 2010; Pineda ,2010).

La salinidad y la sequía alteran la absorción radicular de nutrientes minerales esenciales por parte de la planta. En el caso de la salinidad debido a la competencia en la absorción por parte de la planta entre los iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en exceso en el suelo y otros que son necesarios para la planta como el K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Maathuis, 2014). En el caso de la sequía la escasez de agua en el suelo altera la capacidad de absorción

radicular y el transporte de dichos nutriente minerales en la planta (Hu y Schmidhalter, 2005). El impacto de este efecto nutricional puede tener lugar incluso a niveles moderados de sal (Maathuis, 2014). En particular, la acumulación de  $\text{Na}^+$  induce un estrés nutricional debido a que se altera la absorción de  $\text{K}^+$ , con el que es tan afín químicamente, siendo la regulación de la absorción de  $\text{K}^+$  un requerimiento crítico en el crecimiento vegetal (Shabala y Cuin, 2008). Igualmente el  $\text{K}^+$  juega un papel fundamental en el mantenimiento del turgor en el estrés hídrico (Ma *et al.*, 2004).

### **1.5.2. Respuesta fisiológica al estrés osmótico inducido por la salinidad y la sequía**

En condiciones estresantes provocadas por la salinidad o la sequía, la planta necesita acumular solutos, en un proceso conocido como ajuste osmótico, para mantener el volumen celular y la turgencia; es decir, necesita mantener la actividad fisiológica al disminuir el potencial hídrico de la hoja (Zhu, 2002). Este ajuste osmótico causa un impacto negativo en el crecimiento, además de una serie de cambios metabólicos comunes tanto al estrés salino como al hídrico. En una revisión sobre la fisiología de los estreses hídrico y salino, Munns (2002) indicaba que todos los procesos, excepto los efectos específicos provocados por la acumulación de iones salinos, son similares en ambos estreses.

El ajuste osmótico en condiciones salinas puede tener lugar de dos formas; mediante los iones absorbidos por las raíces y que se encuentran en exceso en el suelo, que se transportan a la parte aérea, y mediante la biosíntesis endógena de solutos orgánicos (Alarcon *et al.*, 1993). La ventaja de estos últimos tipos de solutos es que incluso a elevadas concentraciones no provocan daños a nivel celular ni alteran las actividades enzimáticas,

razón, por lo que se denominan solutos compatibles. Los principales solutos orgánicos en la mayor parte de las plantas glicofitas son los ácidos orgánicos y los azúcares, en este último caso sacarosa y sobre todo las hexosas fructosa y glucosa. Existen otros compuestos metabólicos a los que también se les ha asignado el papel de osmolitos, tales como polioles lineales (manitol), cíclicos (inositol), aminoácidos (prolina) y derivados (glicinbetaína) y otros compuestos (trehalosa). Pero además conviene resaltar que los solutos orgánicos protegen a la célula contra el efecto tóxico de ciertos iones y las condiciones de desecación, además de intervenir en la eliminación de ROS que se producen y acumulan bajo condiciones de estrés salino e hídrico (estrés oxidativo secundario). Por tanto, no está claro que la tolerancia inducida por la acumulación de osmolitos se deba, como en principio cabría esperar, solamente a un mejor ajuste osmótico, sino quizás a una acción de tipo osmoprotector. Los recientes avances en genética molecular y transformación genética abren nuevas vías en el conocimiento de las implicaciones metabólicas que conlleva la acumulación de osmolitos en plantas (Sickler *et al.*, 2007).

Respecto al coste energético que implica la utilización de uno u otro tipo de solutos para realizar dicho ajuste osmótico, la acumulación de iones salinos requiere un coste energético relativamente pequeño en comparación con lo que se necesita para sintetizar solutos orgánicos (Yeo, 1983; Raven, 1985). Según Munns (2002), el número de moles de ATP necesarios para usar un mol de NaCl como osmolito es aproximadamente cuatro en las células de la raíz y siete en las de las hojas, mientras que el número de moles requerido para sintetizar un compuesto orgánico es significativamente mayor. Ravens (1985) establecía 3,5 moles de ATP para

$\text{Na}^+$ , 34 para manitol, 41 para prolina, 50 para glicinbetaína y alrededor de 52 para sacarosa. Por tanto, desde el punto de vista de desarrollo de la planta, es mucho más rentable utilizar solutos inorgánicos que orgánicos para mantener el balance osmótico en una situación de estrés osmótico.

En este contexto y por lo que respecta a tomate, la componente osmótica adquiere una importancia relevante. Por ejemplo, la tolerancia a la salinidad de tomate no siempre se ha correlacionado con una menor concentración de  $\text{Na}^+$  en hoja. En este sentido, se ha descrito la existencia de una relación positiva entre producción de fruto y mayor concentración de iones salinos en hojas de plantas de tomate cultivadas en condiciones de salinidad moderada (Estañ *et al.*, 2005; Muñoz-Mayor *et al.*, 2008) también obtuvieron evidencias de la importancia de la componente osmótica en la tolerancia a la salinidad de tomate tras evaluar líneas transgénicas de tomate portadoras de *HAL1*, un gen implicado en la regulación del  $\text{Na}^+$ . Concretamente los autores observaron que la producción de fruto de una línea homocigótica que exhibía un elevado nivel de expresión de *HAL1* era menor que la que se obtenía en la línea acigótica, todo ello a pesar de que la línea homocigótica restringía la entrada y transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea a lo largo del tiempo (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008). Una exhaustiva caracterización fisiológica reveló que la mayor capacidad de exclusión de  $\text{Na}^+$  de la línea homocigótica obligaba a la planta homocigótica a llevar a cabo un incremento de la síntesis de solutos orgánicos para mantener el balance osmótico, lo que conllevaba una penalización del crecimiento que revertía negativamente en una menor producción de fruto. Estos resultados evidencian la importancia de la componente osmótica en la tolerancia al estrés salino de tomate.

En condiciones de sequía, se reduce el movimiento de agua hacia el medio intracelular y, por consiguiente, su potencial osmótico disminuye debido a un simple efecto de concentración de solutos. Sin embargo, si durante el curso de la pérdida de agua celular los solutos son activamente acumulados, la reducción de potencial osmótico será mayor que la debida al mero efecto de concentración (Blum, 1988). El ajuste osmótico ante una situación de restricción hídrica se produce de la misma manera que en el estrés salino, mediante la acumulación activa de solutos.

Los solutos que contribuyen al ajuste osmótico en plantas sometidas a estrés hídrico son mayoritariamente los ácidos orgánicos y los azúcares, principalmente fructosa y glucosa. En el caso de los ácidos orgánicos el malato es un ácido orgánico que se ha relacionado con la osmorregulación y con el cierre estomático (Florido Bacallao y Bao Fundora, 2014). El oxalato, otro ácido orgánico, es el principal osmolito orgánico de diversas especies del género *Atriplex* y de la familia *Chenopodiaceae* (Osmond, 1976). También se ha comprobado que otras sustancias pueden realizar esta función, como ocurre para la salinidad: polioles lineales (glicerol, manitol o sorbitol), polioles cíclicos (inositol o pinitol y otros derivados mono- y dimetilados del inositol), aminoácidos (glutamato y prolina), compuestos de amonio cuaternario (glicinbetaina o alaninbetaina) y otros compuestos (trehalosa, rafinosa, fructanos,...).

### **1.5.3. Respuesta fisiológica al estrés iónico y nutricional inducido por la salinidad**

En suelos altamente salinos, sobre todo en aquellos con elevados contenidos en NaCl, se produce una perturbación del contenido iónico de la planta, no sólo en lo que respecta al Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> sino también en las concentraciones de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Hasegawa *et al.*, 2000). Por tanto, la supervivencia de la planta y su capacidad de desarrollo dependerán de su capacidad para restablecer la homeostasis iónica después de la imposición del estrés, lo que implica adaptar el metabolismo con el fin de mantener las condiciones homeostáticas que le permitan reanudar el crecimiento y completar el ciclo vegetativo en el nuevo medio (Munns y Tester, 2008; Pardo, 2010). La tolerancia a la sal de las especies cultivadas se ha correlacionado con mecanismos eficientes de exclusión de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> que permitan mantener una adecuada concentración de K<sup>+</sup> en hoja. En muchos de los estudios sobre salinidad no se ha podido determinar si los efectos tóxicos observados se deben al Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> o a la contribución de ambos. En tomate, no obstante, sí que se ha encontrado una relación entre producción de fruto y concentración de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en hoja, lo cual sugiere que el efecto tóxico podría ser debido, al menos a largo plazo, a la contribución de ambos iones (Estañ *et al.*, 2005). Con todo, y a pesar de los numerosos artículos publicados, los mecanismos que gobiernan la tolerancia a la salinidad en tomate no están bien caracterizados. Hasta la fecha, se han identificado muy pocos genes de tomate que desempeñen un papel clave en el transporte de iones salinos (Foolad, 2007; Cuartero, 2009). En este sentido, nada se sabe sobre transportadores de Cl<sup>-</sup> y tan sólo algunos trabajos informan de avances importantes en los procesos relacionados con el

transporte de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Nieves-Cordones *et al.*, 2008; Olías *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2012).

Según Plett *et al.* (2010) la tolerancia a la salinidad en plantas deriva de la contribución de tres componentes: la tolerancia al estrés osmótico que impone la salinidad, la exclusión de Na<sup>+</sup> de la parte aérea y la tolerancia tisular del Na<sup>+</sup> acumulado a través de la compartimentación vacuolar o la tolerancia citoplasmática. Es probable, por tanto, que los tres componentes operen de forma simultánea e interactúen en mayor o menor grado para proporcionar mayor tolerancia a salinidad. Los mecanismos de tolerancia osmótica, a los que no se les ha prestado la misma atención que a los relacionados con la exclusión de Na<sup>+</sup>, podrían ser cruciales en aras de proporcionar tolerancia a salinidad en tomate, influyendo en los otros dos mecanismos para contrarrestar el efecto de toxicidad iónica. En este contexto, se ha observado que cuando se emplean concentraciones moderadas de sal en el medio de irrigación, a la hora de conseguir tolerancia es más efectivo el transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea y su acumulación en hoja que activar el mecanismo de exclusión iónica. De esa forma se evita la penalización energética que conlleva la síntesis de solutos compatibles utilizando para el ajuste osmótico el propio Na<sup>+</sup> (Estañ *et al.*, 2005; Cuartero *et al.*, 2006)

Sin embargo conviene tener en cuenta que la anterior estrategia sólo es válida hasta un cierto nivel de salinidad pero no cuando los límites de la tolerancia citoplasmática al Na<sup>+</sup> se ven excedidos. En este contexto, se ha encontrado una correlación entre la exclusión de sales y la tolerancia a la sal en muchas especies (Tester y Davenport, 2003), incluido el tomate (Cuartero, 2009). Algunos de los mecanismos de exclusión podrían ser la

exportación de  $\text{Na}^+$  desde las hojas al floema o la localización en algunas zonas concretas de la parte aérea como son las hojas adultas, que ayudarían a mantener bajas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en las hojas jóvenes. Así pues, las plantas de tomate disponen de mecanismos para prevenir que el  $\text{Na}^+$  alcance los tejidos fotosintéticamente activos, reteniéndolo en las hojas basales o en el tallo, o bien redistribuyéndolo desde las hojas jóvenes a las hojas más adultas (Cuartero *et al.*, 2006). En relación con este aspecto, se ha publicado que el gen *SISOS1* está relacionado con la distribución de  $\text{Na}^+$  antes mencionada en tomate (Olías *et al.*, 2009). Con todo, y particularmente por lo que respecta a tomate, son necesarios más estudios que permitan avanzar en el conocimiento de los procesos de transporte de iones en condiciones de estrés salino.

#### **1.5.4. Respuesta fisiológica al estrés oxidativo inducido por la salinidad**

Otro de los efectos ya mencionados de la salinidad es la generación de ROS. El cierre estomático, que tiene lugar como una de las respuestas primarias a la salinidad del medio para evitar pérdidas de agua por transpiración y que tiene lugar debido al efecto osmótico, aumenta la relación  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  en las hojas e inhibe la fijación de  $\text{CO}_2$ , y tiene como consecuencia la disminución de la concentración de NADP, aceptor final de electrones en la fotosíntesis, produciéndose un exceso de energía de excitación en los fotosistemas. Si no se disipa esta energía al final se acumula en la cadena de transporte de electrones y se transfieren al oxígeno, generándose los ROS. Según Murata *et al.* (2007) la inhibición del fotosistema II en condiciones de estrés medioambiental se produce como consecuencia de la

inhibición de los mecanismos relacionados con la reparación del daño celular provocado por el estrés oxidativo secundario.

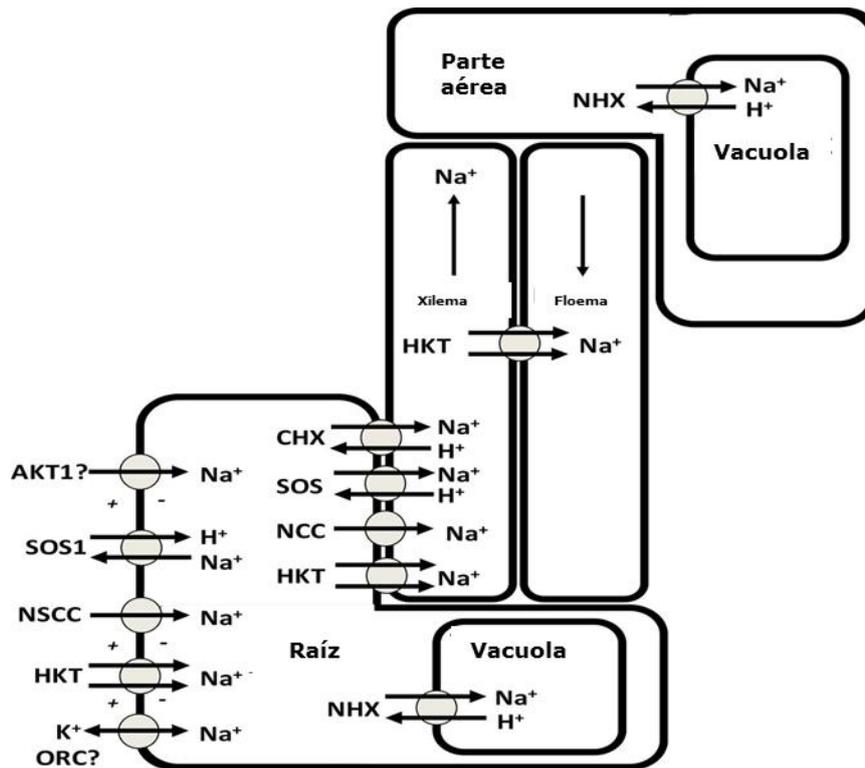
Para protegerse de los posibles efectos citotóxicos de los ROS, las plantas despliegan diferentes mecanismos para su eliminación, como estimular la actividad y/o la expresión génica de los sistemas antioxidantes (Hernández *et al.*, 2000; Mittova *et al.*, 2002). Los sistemas que previenen contra la oxidación en las plantas consisten en enzimas que pueden eliminar estos ROS, tales como superóxido dismutasas (SODs), peroxidasas, catalasas y glutatión reductasa. Las SODs son componentes esenciales de los sistemas de protección oxidativa de la mayor parte de las plantas y catalizan la dismutación de dos radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Cuando los SODs eliminan los radicales superóxido, el peróxido que se genera es eliminado por las peroxidasas y catalasas (Hong y Kao, 2008). Los sistemas de defensa antioxidante incluyen además otros compuestos no enzimáticos como carotenoides, ascorbato, glutatión y tocoferoles.

Algunos autores han sugerido que la función de determinados solutos compatibles como azúcares, polioles, glicinbetaína y posiblemente prolina podría ser la protección celular contra radicales hidroxilo (Molinari *et al.*, 2007). Los resultados más elocuentes en cuanto a esta posible función fisiológica de los osmolitos se han obtenido con polioles lineales tales como el manitol, polioles metilados, el aminoácido ectoína y la glicinbetaína (Sickler *et al.*, 2007). En todo caso y basándose en estudios comparativos entre especies silvestres relacionada y la cultivada, se ha correlacionado la capacidad antioxidante con la mayor tolerancia a la salinidad en tomate (Shalata *et al.*, 2001; Mittova *et al.*, 2002; Zushi y Matsuzoe, 2009).

Pero aparte hay que destacar que también los ROS desempeñan un papel clave como moléculas de transducción de señal implicadas en las respuestas de adaptación de las plantas a estreses de tipo abiótico (Boursiac *et al.* 2008; Miller *et al.*, 2010). En este sentido, se ha postulado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría modular la actividad de muchos componentes que contribuyen a la señalización celular, incluyendo los canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Weinl y Kudla, 2009).

#### **1.5.5. Genes implicados en la absorción y transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea de la planta**

La absorción y transporte de Na<sup>+</sup> en la planta se realiza mediante múltiples transportadores independientes (Tester y Davenport, 2003). Para que esto ocurra las plantas tienen que ser capaces de percibir las diferentes concentraciones de Na<sup>+</sup> pero se desconoce el receptor último que cumple con esta misión y donde se localiza, si en el apoplasto, citoplasma o en la vacuola. El Na<sup>+</sup> en concentraciones bajas es inofensivo y su absorción a través de mecanismos de alta afinidad puede ser un proceso puramente pasivo. Al parecer un número relativamente pequeño de genes codifican las proteínas que controlan la entrada, la salida e incluso la translocación de Na<sup>+</sup> desde la raíz hasta la parte aérea y viceversa (Maathuis, 2014) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Proteínas de transporte implicadas en la absorción, flujo y distribución de  $\text{Na}^+$  a lo largo de la planta y su compartimentación a nivel celular. AKT1, canal de entrada de  $\text{K}^+$ ; CHX, intercambiador de cation:H; HKT, transportador de  $\text{K}^+$  de alta afinidad; NHX, intercambiador vacuolar de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$ ; NSCC, canal no selectivo de cationes; ORC; canal de salida de  $\text{K}^+$ ; SOS1, antiporte de membrana plasmática de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$ . (Adaptado de Maathuis, 2014).

Una familia de genes implicados en estos mecanismos de transporte de iones en la planta son aquellos que codifican para los transportadores de  $\text{K}^+$  de la familia *HKT* (*High affinity  $\text{K}^+$  transporter*), pero que también transportan  $\text{Na}^+$  y juegan un papel importante en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Rus *et al.*, 2004). Estudios realizados en condiciones de cultivo normales demostraron que la absorción de  $\text{Na}^+$  por estos transportadores HKT se lleva a cabo por dos mecanismos, en base a los cuales se clasifican en dos subgrupos, dependiendo de si muestran preferencia por el uniporte de  $\text{Na}^+$  (clase 1) o por el simporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Clase 2) (Ali *et al.* 2012); (Horie *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010).

En condiciones ambientales donde se dan elevadas concentraciones de  $\text{Na}^+$  intervienen estos transportadores de tipo HKT (Garcíadeblás *et al.*, 2003), canales no selectivos de cationes (NSCC, non-selective cation channels) y, posiblemente, canales iónicos selectivos de  $\text{K}^+$  tales como AKT1 (*Arabidopsis K<sup>+</sup> transporter 1*) (Zhang *et al.*, 2010). Esto provoca que cantidades considerables de  $\text{Na}^+$  se acumulen en las células, provocando en las plantas respuestas de modulación del flujo de  $\text{Na}^+$  o alteración de la expresión de genes específicos de la salinidad. En ambos casos, esto requiere de sistemas de señalización y sensibilidad al  $\text{Na}^+$ .

Estudios más recientes muestran que factores de transcripción dependientes de ROS, tales como ERF1 (ethylene response factor 1) de arroz, cuando se activan, se unen a múltiples promotores incluidos aquellos de genes que codifican para protein-quinzas activadas por mitógenos (MAPKs, mitogen-activated protein-kinases), que forman parte de la transducción de la señal debido a un cambio en el entorno, como es el estrés salino. El aumento de expresión de *ERF1* indujo una mayor tolerancia a la salinidad en arroz (Schmidt *et al.*, 2013). Los ROS también puede tener un impacto directo en los flujos de iones como se ha observado en las raíces de *Arabidopsis* donde se activan canales que transportan el  $\text{K}^+$  al exterior (Demidchik *et al.*, 2010).

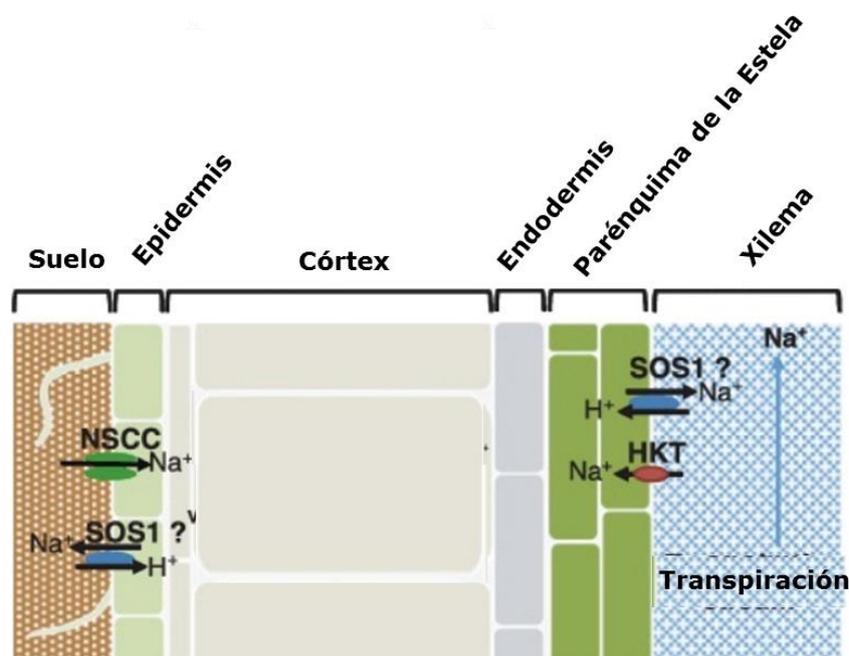
El mecanismo mejor caracterizado de respuesta a la salinidad en las plantas es la ruta SOS (de *Salt overly sensitive*), identificada y caracterizada gracias al análisis de los mutantes *sos* de *Arabidopsis* con hipersensibilidad a la componente iónica del estrés salino (Zhu, 2002 y 2003). Esta ruta está constituida por un conjunto de proteínas entre las que se encuentra SOS1, un antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizada en la membrana

plasmática (Shi *et al.*, 2000); SOS2 del tipo CIPK que es una proteinquinasa de interacción con proteínas CBL (CIPK24, CBL-interacting protein kinase) (Halfter *et al.*, 2000), y SOS3 que es una proteína tipo CBL que actúa como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (CBL4, Calcineurin B-like protein) (Ishitani *et al.*, 2000). SOS2 probablemente participa en la ruta de señalización por ROS, pues puede interactuar con la nucleósido trifosfato quinasa 2 (NDPK2), que se induce en respuesta al estrés oxidativo y se ha demostrado su importancia en la activación de MAPKs inducidas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Verslues *et al.*, 2007). *SOS1* se expresa en muchos tejidos pero particularmente en la epidermis de la raíz y alrededor del tejido vascular, y sus niveles de transcripción son elevados después de varias horas o días de aplicación del estrés salino. La actividad de *SOS1* depende directamente de la fosforilación por la quinasa CIPK24 (SOS2). CIPK24 se activa cuando se asocia con el sensor de calcio CBL4 (SOS3), y así este complejo proteinquinasa induce la actividad del antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *SOS1* que limita la acumulación de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma (Qiu *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2002). Pero además CIPK24 también puede afectar a la actividad de otros transportadores tales como HKT1 (Laurie *et al.*, 2002). Finalmente a través de la interacción con otra proteína tipo CBL, CBL10, SOS2 puede modificar la actividad del antiporter vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHX1 responsable de la compartimentalización de  $\text{Na}^+$  en la vacuola, otra estrategia diferente a la de exclusión de  $\text{Na}^+$  que aplica la planta para disminuir el nivel del catión en el citoplasma (Weinl y Kudla, 2009).

Lo anterior se refiere a los mecanismos de gestión del  $\text{Na}^+$  a nivel celular. En cuanto al transporte de dicho ion a larga distancia éste depende de los mecanismos de carga en el xilema. Si bien tales mecanismos aún no

se han determinado con exactitud, estos pueden comprender tanto la carga pasiva (mediada por canales iónicos permeables al  $\text{Na}^+$  ubicados en la zona de unión entre el xilema y el parénquima) como la carga activa mediada por intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1, que no sólo se localiza en la epidermis de la raíz sino también en el parénquima del xilema, estando implicado en la carga de  $\text{Na}^+$  en la savia del xilema durante un estrés salino moderado (Shi *et al.*, 2002) (**Figura 3**).

También el antiporter de cationes CHX21 (*Cation hydrogen exchanger*) también está implicado en el mecanismo para movilizar  $\text{Na}^+$  en el xilema. *AtCHX21* se expresa principalmente en la endodermis de la raíz y la pérdida de la función de este gen produce una reducción de los niveles de  $\text{Na}^+$  en la savia del xilema que sin embargo no afecta a las concentraciones presentes en el floema (Hall *et al.*, 2006). Según (Evans *et al.*, 2012)) su homólogo CHX23 también está involucrado en la homeostasis del  $\text{K}^+$ .



**Figura 3.** Mecanismos de absorción, compartimentación y transporte y carga al xilema de  $\text{Na}^+$  por parte de la raíz. SOS1, antiporte de membrana plasmática de  $\text{Na}^+:\text{H}^+$ ; NSCC, canal no selectivo de cationes. Adaptado de (Roy *et al.*, 2014).

Datos muy convincentes apuntan a un importante papel de los transportadores iónicos de tipo HKT en el control de los mecanismos de translocación de  $\text{Na}^+$ , a través de su recuperación del xilema (Lessani y Marschner, 1978). En *Arabidopsis*, la pérdida de función por mutaciones en el gen *AtHKT1* condujeron a la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  en los ápices de las plantas lo que provocó la hipersensibilidad hacia el  $\text{Na}^+$  (Berthomieu *et al.*, 2003; Møller *et al.*, 2009). En el arroz *OsHKT1:5* es un transportador de  $\text{Na}^+$  de membrana plasmática localizado en las células del parénquima del xilema que recupera  $\text{Na}^+$  de la savia del xilema (Ren *et al.*, 2005). En trigo los HKTs *NAX1* y *NAX2* desempeñan funciones similares (Lindsay *et al.*, 2004).

Las señales de  $\text{Ca}^{+2}$ , la regulación transcripcional e incluso las relaciones  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pueden estar involucradas en la regulación del  $\text{Na}^+$  que se transporta desde la raíz a la parte aérea y/o en la regulación de las proporciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  presentes en los flujos de la transpiración. Como ya hemos mencionado el  $\text{Na}^+$  puede acumularse fácilmente llegando a niveles tóxicos en el citosol de la célula en una situación de estrés salino. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para evitar esto y uno de los mencionados es la compartimentación del  $\text{Na}^+$  en la vacuola, que probablemente se produce en todos los tejidos y es la principal estrategia para disminuir la toxicidad del  $\text{Na}^+$  al tiempo que permite conservar su contribución como osmolito "barato" para reducir el potencial hídrico (Hasegawa, 2013, Maathuis, 2014). La familia de transportadores *NHX*, se identificó desde el principio como proteínas antiporter intercambiadoras de  $\text{H}^+$  por  $\text{Na}^+$  en el tonoplasto de la vacuola es un elemento clave en esta estrategia (Apse *et al.*, 1999; Brini *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007) (**Figura**

**2).** La sobreexpresión de *AtNHX1* mejoró significativamente la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis* (Apse *et al.*, 1999) y cuando se evaluó la expresión heteróloga de dicho gen en otras especies como trigo (Xue *et al.*, 2004), arroz (Fukuda *et al.*, 2004) y tomate (Zhang y Blumwald, 2001) se observó el papel fundamental que juega la proteína NHX1 en la tolerancia a la salinidad.

En condiciones de crecimiento normal, con bajo contenido de  $\text{Na}^+$ , los transportadores NHX intercambian principalmente  $\text{K}^+$  por  $\text{H}^+$  en lugar de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  (Barragán *et al.*, 2012, Zhang y Blumwald, 2001). Esta doble selectividad significa que la función exacta del HNX durante el estrés salino es a veces difícil de discernir debido a la dependencia de estas proteínas tienen de los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en el citoplasma y de la actividad de los estomas (Barragán *et al.*, 2012), que puede afectar indirectamente la translocación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Un ejemplo de esto lo constituye la tolerancia a la salinidad observada en el trigo como consecuencia de un aumento en la expresión *NHX1*. En este caso, la tolerancia se debió a un incremento en los niveles de  $\text{K}^+$  en la parte aérea causado, indirectamente, por el aumento de la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las vacuolas de raíz (Xue *et al.*, 2004).

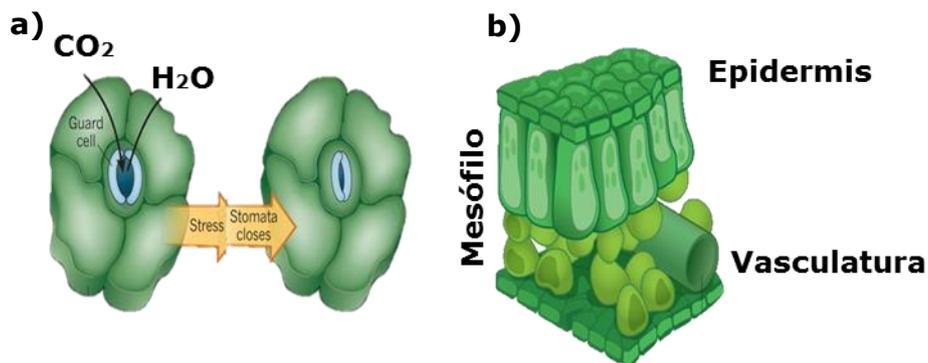
Para prevenir la salida de  $\text{Na}^+$  desde la vacuola al citoplasma, la permeabilidad del tonoplasto al  $\text{Na}^+$  parece ser menor en condiciones salinas. Así, la actividad de los canales vacuolares SV (lentos) y FV (rápidos), que son permeables al  $\text{Na}^+$  se encuentran reprimidos en plantas que crecen en condiciones de salinidad (Bonales-Alatorre *et al.*, 2013); (Maathuis y Prins, 1990).

### **1.6. Importancia del control de la pérdida de agua en la tolerancia a salinidad y sequía. Papel de los estomas en la adaptación de las plantas a estreses que causan alteraciones en el estatus hídrico**

Para que las plantas se desarrollen de forma eficiente deben mantener un equilibrio en el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior de la hoja con el objetivo de maximizar la captación de CO<sub>2</sub> para su fijación durante la fotosíntesis y minimizar la pérdida de agua por transpiración.

Los estomas son estructuras vegetales sitas en la epidermis foliar rodeadas de cutícula y compuestas por dos células guardas cuyos cambios de volumen permiten una mayor o menor apertura de un poro, el poro estomático. Estas estructuras que actúan como "guardianes" responsables del intercambio gaseoso entre la planta y el entorno atmosférico que la rodea deben adaptarse de la manera más precisa y fina posible a los estímulos medioambientales con el fin de regular la absorción de CO<sub>2</sub> y la pérdida de H<sub>2</sub>O en diferentes situaciones (**Figura 4**)(Casson and Gray 2008). Representan la primera línea de defensa de la planta frente al estrés hídrico y salino y son varios los factores que juegan un papel importante en la regulación del movimiento estomático de apertura y cierre, destacando la luz, la concentración de CO<sub>2</sub>, los niveles de hormonas vegetales, especialmente el ácido abscísico (ABA), y la disponibilidad de agua (Oh *et al.*, 2011). Para que la vía de asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico se inicie, la planta debe vencer una serie de resistencias a la difusión de este gas, que comienzan en la capa de aire que rodea inmediatamente a la hoja. Los poros estomáticos proporcionan una mayor resistencia al flujo de CO<sub>2</sub> desde la atmósfera a la cavidad sub-estomática localizada dentro de la hoja. El CO<sub>2</sub> encuentra aquí una resistencia adicional al tener que atravesar la capa lipídica de las membranas plasmáticas de las células del mesófilo y dentro

de esas células de las de los cloroplastos. El agua que sale de la hoja sigue el mismo camino pero en sentido inverso, pero sin la componente de resistencia del mesófilo (**Figura 4**).



**Figura 4.** a). Estructura esquemática de un estoma y su movimiento de cierre en situación de estrés (Adaptado de Thomine y Barbier-Brygoo, 2010. B). Esquema de la estructura de la hoja (Adaptado de Marti y Webb, 2014).

La idea de que el movimiento estomático se puede regular mediante cambios en la expresión de diversos genes está siendo corroborada por diferentes trabajos de investigación que indican que los factores de transcripción (TFs) pueden modular la apertura y cierre estomáticos cuando las plantas se someten a diferentes condiciones ambientales (Cominelli *et al.*, 2010). El intercambio gaseoso está controlado por las células guarda especializadas que rodean el poro estomático y que en algunas especies vegetales están rodeadas por células subsidiarias. El número y la distribución de los estomas y el crecimiento y la división de las células guarda también afecta al intercambio gaseoso, estando estrechamente relacionado con las diferentes capacidades de respuesta de las especies

vegetales a condiciones ambientales cambiantes. La regulación de la apertura estomática se realiza mediante el transporte de iones y agua a través de las membranas plasmática y vacuolar produciendo cambios en el turgor y en el volumen de las células guarda y dichos cambios provocan el mayor o menor grado de apertura del poro estomático (Raven, 2014).

Los estomas, mediante sus movimientos, controlan el flujo de CO<sub>2</sub> necesario para la fotosíntesis que penetra finalmente en los espacios intercelulares de las diferentes partes de la hoja. Pero también juega un papel clave en la regulación de la cantidad de H<sub>2</sub>O que la planta pierde mediante transpiración por las hojas. Esta pérdida, en virtud de las diferencias de concentración, es de un orden de magnitud mayor que la absorción de CO<sub>2</sub>, y se considera como una consecuencia inevitable de su libre difusión a través de los estomas. Aunque el área total de los poros estomáticos sólo representa una pequeña parte de la superficie de la hoja, aproximadamente un 3%, la casi totalidad del CO<sub>2</sub> absorbido y del H<sub>2</sub>O perdida (un 98%) pasa a través de estos poros. Cuando están totalmente abiertos, a través de ellos se puede evaporar una cantidad equivalente a una vez y media la misma superficie húmeda (Willmer, 1996).

El comportamiento de los estomas por tanto afectan intensamente a los flujos globales de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, estimándose que  $300 \times 10^{15}$  g de CO<sub>2</sub> y  $35 \times 10^{18}$  g de vapor de agua pasan a través de los estomas de las hojas cada año (Hetherington y Brownlee, 2004). Alteraciones en el comportamiento de los estomas en respuesta a las condiciones ambientales tanto de las hojas como de las raíces, incluyendo estímulos bióticos y abióticos, tienen un impacto inmediato en los flujos de agua en la planta. Por ejemplo, se estima que el cierre parcial de los estomas en el conjunto de la vegetación

de los bosques del hemisferio norte, impulsado por el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera en las dos últimas décadas, ha dado lugar a un aumento de la absorción de CO<sub>2</sub> y una reducción de la evapotranspiración afectando directamente a la disponibilidad de agua dulce (Keenan *et al.*, 2013).

Tanto la sequía como la salinidad provocan la activación de la biosíntesis de ABA, hormona vegetal que tiene un papel principal en la regulación del cierre estomático y por tanto en la reducción de la pérdida de agua mediante la transpiración en las plantas (Luan, 2002; Chater *et al.*, 2014). Otras hormonas como auxinas, citoquininas y jasmonatos también influyen en la función estomática (Kim *et al.*, 2010; Pillitteri y Torii, 2012).

La relación entre el agua utilizada por el metabolismo y la pérdida por la transpiración se conoce como eficiencia del uso del agua (WUE, del inglés Water Use Efficiency). La WUE intrínseca o fotosintética se define como el ratio entre la tasa de asimilación de carbono y la tasa de pérdida de agua por transpiración, mientras que la WUE integrada o referida a la productividad es el ratio entre la producción de biomasa y la tasa de transpiración (Bacon, 2009). La planta puede desplegar varias estrategias para optimizar WUE minimizando la pérdida de agua que se centran en los estomas. Una de ellos consiste en la posibilidad de aumentar o disminuir la conductancia gaseosa del conjunto de estomas por unidad de área de la hoja (determinado por la conductancia estomática,  $g_s$ ) a través de la modificación de la densidad de los estomas en la epidermis foliar (Büßis *et al.*, 2006). Otra consiste en alterar la respuesta o la sensibilidad de los estomas a las señales ambientales a través de la manipulación de las

características de las células guarda como es el caso de los mutantes *Open stoma (Ost)* (Merlot *et al.*, 2002). Se ha observado un aumento en los valores de WUE en plantas con menor  $g_s$ , pero estos beneficios se consiguen generalmente a costa de una reducción en la asimilación de carbono que induce una reducción de la tasa fotosintética que a la larga se traduce en un crecimiento más lento y un desarrollo menor, que en términos agronómicos se traduce en una disminución de la productividad en plantas cultivadas. Las plantas con mayor  $g_s$  tienen mayores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> y crecen más rápidamente en condiciones óptimas, pero por lo general exhiben menores valores de WUE y son más sensibles a estreses que provoquen una disminución del potencial hídrico como la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas. Este conjunto de resultados señalan la necesidad de explorar los caracteres físicos y funcionales de los estomas, su señalización, y los mecanismos de transporte de los solutos que determinan los cambios de volumen de las células guarda y la apertura de los poros para la posible manipulación de las respuestas de los estomas ante las señales ambientales en beneficio del rendimiento agrícola (Lawson y Blatt, 2014; Franks *et al.*, 2015).

Tanaka *et al.* (2013) utilizó la sobreexpresión de *STOMAGEN*, un regulador positivo de la densidad estomática, para generar plantas de *Arabidopsis* con una densidad de estomas 2 a 3 veces superior a las plantas no transformadas (WT). La asimilación de carbono fotosintético en estas plantas se incrementó un 30% debido a la mayor absorción de CO<sub>2</sub> en la hoja pero no a cambios en la capacidad fotosintética de carboxilación. Sin embargo, paralelamente a este aumento de la asimilación de carbono tenía lugar un incremento de la transpiración, que llegó a ser el doble de la tasa

observada en las plantas WT, con lo que del efecto de la transformación resultó al final una disminución del 50% en WUE (Tanaka *et al.*, 2013).

Las hojas de la especie silvestre relacionada con tomate que presenta mayor grado de tolerancia al déficit hídrico, *Solanum pennellii*, poseen una serie de características morfológicas que contribuyen a su mejor adaptación a la sequía, incluyendo una reducción de la relación superficie : volumen y asimismo cambios en la densidad estomática. Así, al contrario que el tomate domesticado, *S. pennellii* presenta un número de estomas similar en la zona abaxial y adaxial de las hojas, e igual ocurre con el índice estomático (la relación entre el número de estomas y células epidérmicas) (Koenig *et al.*, 2013).

Relacionado con este último parámetro *SCREAM1* es otro regulador positivo del desarrollo que parece estar involucrado en el anterior índice (Kebede *et al.*, 1994; Kanaoka *et al.*, 2008), En tomate cultivado, *S. lycopersicum*, se observa una expresión de *SCREAM1* casi dos veces menor que en *S. pennellii*. Este resultado molecular debe contribuir al mayor índice de estomas adaxiales observado en la especie silvestre comparada con la domesticada. Como característica típica de una planta adaptada al ambiente desértico, *S. pennellii* presenta hojas gruesas y suculentas (con un espesor un 50% mayor que el de *S. lycopersicum*), por lo que se piensa que el aumento relativo de los estomas en el lado adaxial de la hoja puede ser necesario para mejorar la eficiencia de la difusión del CO<sub>2</sub> en estas hojas tan gruesas (Mott *et al.*, 1982; Nakazato *et al.*, 2010).

Lawson y Blatt (2014) observaron que las variaciones de la intensidad luminosa afectan directamente a la velocidad de respuestas de los estomas y por tanto a la ganancia de carbono y la pérdida de agua por parte de la

planta. Este fenómeno demuestra que WUE mejora significativamente si los estomas responden rápidamente y en sincronía con las demandas de CO<sub>2</sub> de las células del mesófilo (Lawson y Blatt, 2014).

La sobreexpresión de la enzima NADP-málico de maíz en tabaco provocó una disminución de  $g_s$  pero también un incremento de la biomasa de las plantas transformadas, lo que sugiere que la manipulación de procesos metabólicos tanto en estomas como en células del mesófilo pueden contribuir a mejorar la WUE de la planta (Laporte *et al.*, 2002). Otras modificaciones genéticas, aparentemente más indirectas, pueden tener consecuencias inesperadas en el movimiento estomático y por tanto en WUE. Este es el caso del silenciamiento por ARN antisentido de la subunidad Fe-S de succinato deshidrogenasa *SUC2* en tomate, en el que Araújo *et al.* (2011) observaron una elevada  $g_s$  y un aumento del 25% en la tasa de asimilación de carbono. También relacionado con el metabolismo de los azúcares Antunes *et al.* (2012) observaron que la actividad invertasa en las células guarda era crítica para la funcionalidad estomática.

La acumulación de ceras epicuticulares para formar una cutícula gruesa es un mecanismo conocido para limitar la pérdida de agua por transpiración y aumentar así la tolerancia al estrés hídrico (Aharoni *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Kosma *et al.*, 2009). Estas ceras pueden llegar a representar hasta el 20% del peso seco en el caso de las hojas de *S. pennellii*, mientras que representan sólo el 0,9% de dicho peso en las hojas de *S. lycopersicum* (Fobes *et al.*, 1985). Tan marcado aumento en la acumulación de ceras epicuticulares se relaciona con diferencias significativas halladas en la expresión de genes ortólogos

asociados con la deposición de las ceras entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii* (Koenig *et al.*, 2013). Por ejemplo, la expresión de dos genes que codifican para enzimas que intervienen en la producción de precursores de componentes de cera salifáticas, *ECERIFERUM6* (*CER6*) y *ECERIFERUM10* (*CER10*) (Millar *et al.*, 1999; Fiebig *et al.*, 2000) es significativamente superior en *S. pennellii* en comparación con *S. lycopersicum* (Koenig *et al.*, 2013). Los genes homólogos en *S. pennellii* de los de *Arabidopsis FIDDLEHEAD*, gen que codifica para una enzima implicada en la síntesis de lípidos cuticulares (Yephremov *et al.*, 1999), y *CER1*, *CER2*, y *CER8*, implicados en la conversión de ácidos grasos de cadena muy larga a alcanos (Xia *et al.*, 1996; Lü *et al.*, 2009) se encuentran también expresados en mayor grado en *S. pennellii* (Koenig *et al.*, 2013). Además, *S. pennellii*, en respuesta a un estrés hídrico, también presenta una mayor expresión del gen *CER5-like*, que parece estar involucrado en la secreción de cera (Pighin *et al.*, 2004) y *LPT1* y *LPT2*, que codifican proteínas de transferencia de lípidos no específicos (LTP) (Thoma *et al.*, 1994, Treviño y Connell, 1998). En conjunto, estos resultados demuestran una regulación coordinada de genes implicados en la acumulación de cera en la epidermis foliar en la especie silvestre de tomate tolerante a la sequía, *S. pennellii*.

### **1.7. Genes reguladores implicados en la respuesta de la planta al estrés abiótico: Papel de los factores de transcripción**

Las plantas están siendo constantemente expuestas a diferentes estreses abióticos, como sequía, salinidad, temperaturas extremas, deficiencia de nutrientes y cambio de las condiciones de luz. Estos factores pueden afectar negativamente al crecimiento y desarrollo vegetal y por tanto la productividad en especies de interés agrícola. Para responder a estos

cambios climáticos y edáficos las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta.

La regulación de la expresión genética a nivel de la transcripción es un mecanismo de control ampliamente utilizado en procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación celular y el metabolismo. Durante el proceso de la transcripción se requiere la participación de factores que modulan la expresión génica, los cuales se denominan factores de transcripción (TFs). Los TFs son proteínas que reconocen secuencias específicas en el ADN en las regiones genéticas reguladoras, denominadas secuencias *cis* (los TFs se conocen como elementos *trans*), y se unen a éstas para ejercer dicha acción moduladora. Una vez se ha producido dicha unión del TF en el promotor, en la que también puede contribuir otros TFs así como las RNA polimerasas, éstos ejercen su efecto en la modulación de la expresión de las regiones genéticas codificantes, regulando la frecuencia del inicio de transcripción. Los TFs pueden actuar como activadores, represores o incluso con ambos efectos si tienen una estructura modular (Rabara *et al.*, 2014).

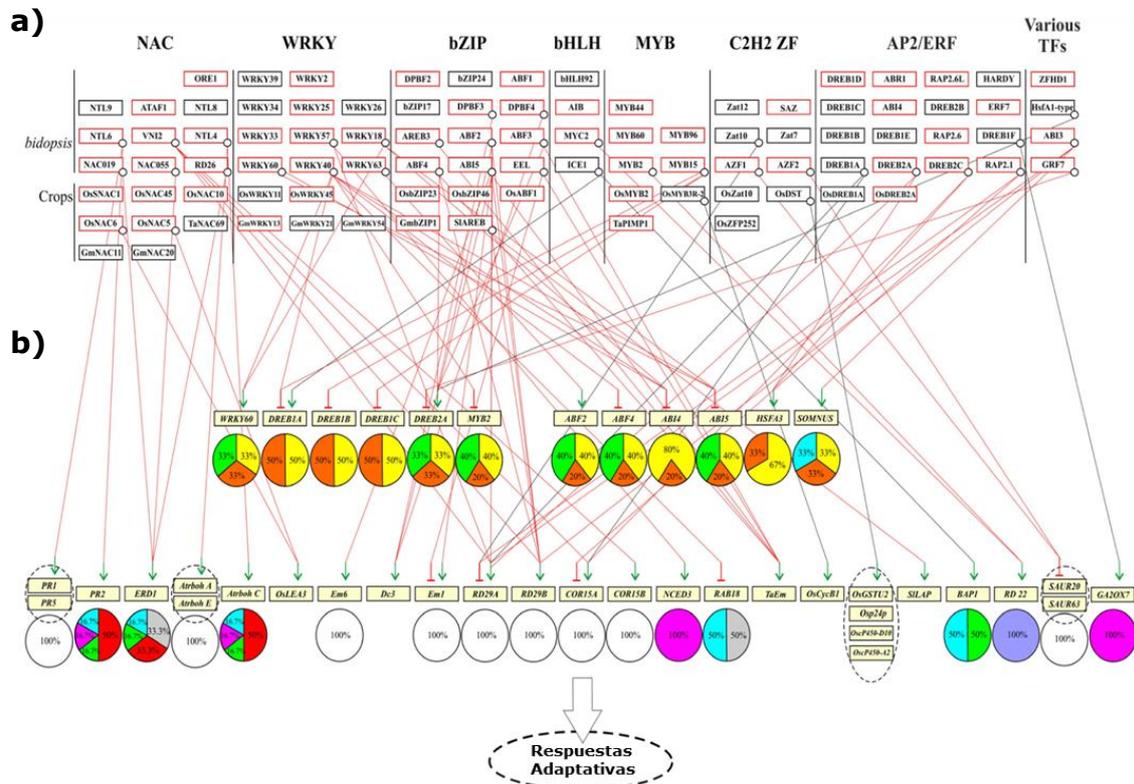
Los TFs son los iniciadores a nivel molecular de la cascada de procesos que constituye la respuesta de la planta al unirse a elementos *cis* de promotores de genes específicos que codifican proteínas con funciones implicadas en la reordenación y plegamiento de proteínas, la respuesta de la deshidratación y la modificación de la pared celular (Kilian *et al.*, 2012). La identificación de TFs implicados en la regulación de la expresión de genes implicados en las respuestas a estrés contribuye enormemente al avance del conocimiento de los complejos mecanismos de

control mediante los cuales las plantas responden a estreses abióticos (Dubos *et al.*, 2010). La modificación mediante ingeniería genética de estos TFs pueden constituir una estrategia *per se* suficiente para contribuir significativamente a la mejora de la tolerancia al estrés de las plantas (Golldack *et al.*, 2011).

Estudios recientes centrados en el genoma vegetal indican que aproximadamente el 7% de éste se corresponde con secuencias que codifican TFs (Udvardi *et al.*, 2007), muchos de los cuales son genes de respuesta a estrés abiótico. Hasta el momento, la investigación sobre los TFs que regulan las respuestas a estrés abiótico en plantas se ha centrado principalmente en abordar un único TFs y analizar su función aisladamente de otros TFs y otros elementos que participan en dichas respuestas. Sin embargo, cada vez es más evidente que los TFs funcionan como centros coordinadores, donde intervienen multitud de proteínas asociadas en redes dinámicas y como nodos entre diferentes vías de respuesta. Esta es la imagen que surge tras el análisis de las grandes superfamilias de TFs: basic leucine zipper (bZIP), APETALA2/ethylene-responsive element binding factor (AP2/ERF), NAM/ATAF1/CUC2 (NAC), WRKY, MYB, Cys2(C2)His2(H2)-type zinc fingers (ZFs), y basic helix-loop-helix (bHLH) (**Figura 5**). Un número importante los miembros de estas superfamilias participan en la regulación de las respuestas a estrés abiótico, y la expresión ectópica de varios TFs de estas familias se ha traducido en la mejora de la tolerancia al estrés de los cultivos (Lindemose *et al.*, 2013). A continuación vamos a hacer una breve digresión sobre la regulación de la expresión génica implicada en la

## Introducción

respuesta a estrés abiótico de los TFs de cada una de estas superfamilias arriba mencionadas, con especial énfasis en los de la familia MYB.



**Figura 5.** Vías de regulación la expresión génica por distintas superfamilias de TFs, implicadas en la respuesta a estrés abiótico en plantas, por rutas dependientes e independientes de ABA, e interacción entre las mismas. Los estreses abióticos regulan el nivel y la actividad de los TF (a)) y de sus genes diana (b)). Adaptada de Lindemose *et al.*, 2013.

### 1.7.1. Factores de transcripción bZIP

Los TFs de la superfamilia bZIP de *Arabidopsis thaliana* se dividen en más de diez grupos (Jakoby *et al.*, 2002). La mayoría pertenecen al grupo bZIP-A y juegan un papel importante en la señalización por ABA. Entre éstos se encuentran los ABFs/AREB (ABRE binding factors/ABRE binding proteins) que se unen a las secuencias específicas *cis* ABA responsive element (ABRE), en solitario o formando dímeros entre ellos. Estos TFs se

expresan principalmente en tejidos vegetativos y todos ellos, excepto ABF1, son reguladores clave de la señalización por ABA que responden al estrés osmótico durante el crecimiento vegetativo (Fujita *et al.*, 2013).

Mediante ingeniería genética se ha podido evaluar el impacto que la alteración de la expresión de estos TFs provocan en la respuesta de las plantas transgénicas al estrés abiótico, fundamentalmente sequía, donde ABA juega un papel fundamental. La sobreexpresión de *AREB2/ABF4* o de *ABF3* en *Arabidopsis* confiere hipersensibilidad al ABA, e induce una reducción de la tasa de transpiración y una mayor tolerancia a la sequía (Kang *et al.* 2002). Parecidas observaciones se hicieron en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban una forma activada *AREB1/ABF2* (Fujita *et al.*, 2005). Estos tres TFs tipo *AREB/ABF*, tanto en *Arabidopsis* como en arroz, requieren del ABA para la activación completa del gen diana, y así se ha observado que el triple mutante de *Arabidopsis* *areb1 areb2 abf3* muestra hiposensibilidad a ABA y reduce la tolerancia a estrés por sequía en comparación con los mutantes knockout simples y dobles, lo que sugiere la necesidad de cooperación entre los tres TFs para ejercer su efecto (Uno *et al.*, 2000, Yoshida *et al.* 2010). La triple mutación también afecta a la expresión diferencial de múltiples genes efectores finales específicos de la respuesta a estrés, incluyendo aquellos que codifican para proteínas tipo *late embryogenesis-abundant* (LEA), fosfatasas de tipo 2C del grupo A (PP2C) y otros varios TFs (Yoshida *et al.*, 2010). *AREB1/ABF2* y *AREB2/ABF4* activan directamente la expresión del gen de respuesta a sequía *RD29A* (*Responsive to desiccation 29A*), que posee una secuencia ABRE en su promotor (Uno *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado que los complejos *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4*

y el TF ABF3 se unen también al promotor y activan la expresión del TF *DRE-BINDING PROTEIN 2A (DREB2A)* (Fujita *et al.*, 2013). Estos trabajos han revelado la existencia de una vía dependiente de ABA que participa en la expresión del TF *DREB2A* específico de respuesta al estrés osmótico, cuando hasta la fecha se asociaba ésta principalmente con la regulación independiente de ABA (Miura *et al.*, 2009).

Otros TFs tipo bZIP implicados en la respuesta al estrés abiótico pertenecen al grupo B y F, entre los que destacan bZIP17 y bZIP24. El primero regula positivamente la expresión de genes de respuesta a estrés salino (Liu *et al.*, 2007), y en el segundo se ha observado que el silenciamiento por RNAi favorece la tolerancia a la salinidad (Yang *et al.*, 2009).

En relación con la mejora de la tolerancia a la sequía en especies de interés agrícola se ha identificado dos TFs miembros del grupo A, *OsABF1* de arroz y *SIAREB* de tomate responsables de una mayor tolerancia a la sequía y estrés salino (Amir Hossain *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2010). Se observó que *SIAREB* era capaz de unirse al promotor y activar la transcripción de *RD29B* de *Arabidopsis* y de *leucine aminopeptidase (LAP)* de tomate (Tang *et al.*, 2012). La sobreexpresión de los TFs de arroz *OsZIP23* y *OsZIP46* confirió hipersensibilidad al ABA y una mayor tolerancia a la salinidad y la sequía (Xiang *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2012).

En la soja (*Glycine max*) se observó que el gen que codifica para un TF tipo AREB/ABF, *GmbZIP1*, presentó una inducción extremadamente elevada por ABA, sequía, salinidad y baja temperatura, y su sobreexpresión provocaba el cierre estomático bajo condiciones de estrés.

El interés de este TF en particular se ha visto aumentado cuando se sobreexpresó de forma heteróloga en trigo y también se observó una mejora de la tolerancia a la sequía en las plantas transgénicas (Gao *et al.*, 2011).

### **1.7.2. Factores de transcripción AP2/ERF**

La superfamilia de TFs AP2/ERF está constituida por cuatro grandes subfamilias en *Arabidopsis thaliana*, denominadas AP2 (APETALLA2), RAV (RELATED TO ABI3/VP1), ERF (ethylene response factor) y DREB (dehydration-responsive element-binding protein). Las proteínas de esta última subfamilia desempeñan funciones clave en las respuestas de estrés abiótico a través de la regulación de la expresión génica por su unión a los elementos *cis* dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) (Mizoi *et al.*, 2012). La expresión de *DREB1D/CBF4*, que pertenece al subgrupo DREB1 de TF de esta subfamilia, responde frente a un estrés por sequía pero a diferencia del resto de miembros DREB1 también a ABA (Haake *et al.*, 2002, Mizoi *et al.*, 2012). La expresión de otros TFs de esta subfamilia, como *DREB1E/DDF2* y *DREB1F/DDF1*, se induce específicamente por estrés salino (Magome *et al.* 2004; 2008). Del subgrupo DREB2 destacan los TFs DREB2A y DREB2B, cuyas expresiones se inducen de manera muy marcada por sequía, salinidad y estrés por frío (Liu *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2000). Pero, con la excepción de *DREB1D/CBF4*, cuya expresión génica se induce por ABA como hemos mencionado, el resto de genes de los grupos DREB1 y DREB2 parecen no responder a esta hormona. En cambio en el grupo DREB3 se ha observado que la sobreexpresión de *ABI4* inducía a su vez la expresión diferencial de

más de un centenar de genes dependientes de ABA en *Arabidopsis* (Reeves *et al.*, 2011).

Se han llevado a cabo varios estudios con TFs DREB1 haciendo uso de aproximaciones biotecnológicas con el fin de mejorar la tolerancia a la sequía en arroz, en condiciones reales de cultivo. Así, la sobreexpresión de *DREB1A/CBF3* utilizando un promotor inducible por estrés aumentó significativamente la producción de arroz transgénico en comparación con plantas WT en condiciones de cultivo en campo (Xiao *et al.*, 2009), y la expresión heteróloga del gen de *Arabidopsis* *HARDY*, perteneciente a esta familia de TF DREB1, en arroz mejoró el WUE en este cereal sin menoscabo en su crecimiento (Karaba *et al.*, 2007).

### **1.7.3. Factores de transcripción NAC**

La familia NAC de TFs está constituida por aproximadamente 110 genes en *Arabidopsis* y 150 genes en arroz. Algunos de los mejor caracterizados por su relación con el estrés abiótico pertenecen al subgrupo III-3, también conocido como ATAF o subgrupo SNAC (Stress response NAC) (Nuruzzaman *et al.*, 2010). Se ha observado que miembros de este subgrupo como ANAC019, ANAC055, y RD26 (ANAC072), participan en la activación de la transcripción en respuesta a sequía, salinidad, ABA y jasmonato (JA), y muestran una gran capacidad para unirse al promotor del gen de respuesta a déficit hídrico *EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1 (ERD1)*. Se halló que la sobreexpresión de estos tres TFs afectó a la regulación de varios genes inducibles por estrés, provocando una mejora en la tolerancia a la sequía de las plantas transgénicas (Tran *et al.*, 2004). Además, en la función reguladora de ANAC019 y ANAC055 interviene JA y su acción conjunta induce la

expresión de genes de defensa a estrés. Por lo tanto, ANAC019 y ANAC055 pueden estar involucrados en la interacción entre las rutas de inducción de la expresión génica mediadas por el JA y por el ABA (Bu *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009a).

Pero también otros TFs tipo NAC de otras subfamilias participan en la respuesta a estrés. ORE1/AtNAC2/ANAC092, del subgrupo II-3, está implicado en el desarrollo de las raíces laterales inducido por estrés salino y ABA (He *et al.*, 2005), y desempeña además un papel en la senescencia inducida por la salinidad (Balazadeh *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2011) observaron que la expresión del gen que codifica para un TF tipo NAC del subgrupo III-1 *VND INTERACTING2 (VNI2)* se inducía por estrés salino de una manera dependiente de ABA, y que su sobreexpresión era responsable de una mejora en la tolerancia al estrés salino y del retraso en la senescencia foliar (Yang *et al.*, 2011).

La sobreexpresión de los genes de arroz inducibles por ABA, *OsNAC6/SNAC2* y *OsNAC5* provocaba una mayor tolerancia a la deshidratación y a la alta salinidad, pero al precio de afectar negativamente al crecimiento y al rendimiento del cereal (Nakashima *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Takasaki *et al.*, 2010). Estos hallazgos se refuerzan con las observaciones llevadas a cabo en estudios de ingeniería genética en otros cereales, donde la sobreexpresión de genes NAC también condujo a una mayor tolerancia al estrés como el trigo (*TaNAC69*) (Xue *et al.*, 2011) y soja (*GmNAC20* y *GmNAC11*) (Hao *et al.*, 2011).

#### **1.7.4. Factores de transcripción WRKY**

Esta familia se divide en tres grupos, en función del número de dominios WRKY y de las características del motivo "dedo de zinc" (zinc-finger) asociado (Eulgem *et al.*, 2000). Aunque al principio estos TFs se relacionaron con la regulación de las respuestas frente a patógenos, estudios recientes de análisis funcional los han implicado también en las respuestas a estrés abiótico (Chen *et al.*, 2012; Rushton *et al.*, 2012). Así, se comprobó que la sobreexpresión de genes que codifican para TF WRKY del grupo I, *WRKY25* y *WRKY3*, aumentaron tanto tolerancia a la salinidad como la sensibilidad hacia ABA en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2011). TFs de esta superfamilia son componentes clave en la señalización de estrés mediada por ABA pero además están implicados en la regulación del cierre estomático. Una mutación en el gen *ABO3* que codifica para un TF WRKY provoca un aumento de la susceptibilidad al estrés hídrico debido a una alteración en el cierre de los estomas inducido por ABA en el mutante (Ren *et al.*, 2010).

La transformación de arroz para la sobreexpresión de *OsWRKY11* controlada por un promotor específico de *HSP101* dio lugar a un mayor grado de tolerancia hacia la sequía y el estrés por calor en las plantas transgénicas (Wu *et al.*, 2009). La sobreexpresión de los genes de soja *GmWRKY21* y *GmWRKY54* en *Arabidopsis* dio como resultado una mayor tolerancia al estrés por frío, salinidad y sequía en las plantas transformadas, mientras que la sobreexpresión de *GmWRKY13* inducía un aumento de la sensibilidad a la sal y manitol pero disminuía la sensibilidad hacia ABA (Zhou *et al.*, 2008). Estos trabajos de investigación aplicando herramientas biotecnológicas revelan el potencial uso de estos genes que

codifican para WRKY TFs para la mejora de las respuestas de las plantas al estrés.

#### **1.7.5. Factores de transcripción bHLH**

162 genes codifican para TFs de la superfamilia bHLH en *Arabidopsis* implicados en la señalización por ABA y en las respuestas al estrés abiótico (Bailey *et al.*, 2003). Uno de estos, *MYC2/RD22BP1*, inducible por ABA, se caracterizó inicialmente como un regulador positivo de la transcripción bajo condiciones de estrés osmótico, que conjuntamente con el TF MYB2 participa en la activación de la expresión del gen *RD22* de respuesta a estrés hídrico (Abe *et al.*, 2003). MYC2 juega un papel importante en la interacción entre las vías de señalización de JA, ABA, ácido salicílico (SA), giberelinas y auxinas (Kazan y Manners, 2013). La expresión de *bHLH92* se observó que se inducía por NaCl, deshidratación, manitol y bajas temperaturas, y su sobreexpresión se tradujo en un ligero aumento en la tolerancia a NaCl y a estrés osmótico (Jiang *et al.*, 2009b).

No podemos dejar de citar en este apartado al FT ICE1, perteneciente a esta superfamilia, regulador positivo clave de la expresión de genes que codifican para familia de TFs DREB1 CBF1-3/DREB1A-C, implicados en la respuesta específica de las plantas a las bajas temperaturas (Chinnusamy *et al.*, 2003). Mutaciones en *ICE1* provocan la caída de la expresión de muchos genes aguas abajo de los CBFs, incluidos éstos TFs, resultando en una reducción significativa en la tolerancia de las plantas al frío y la congelación (Ruelland *et al.*, 2009; Knight y Knight, 2012). Dada esa función tan crítica de ICE1 es necesaria una modulación muy precisa de su actividad, que la planta consigue mediante la

sumoilación y ubiquitinación de dicho TF, donde participan las proteínas SIZ1 y HOS1 respectivamente (Dong *et al.*, 2006, Miura *et al.*, 2007). ICE1 interactúa con otro TF de la familia MYB, MYB15, para unirse al promotor de *DREB1A/CBF3*, el segundo modulando la acción del primero, de tal forma que en mutantes *myb15* knock-out se observa un incremento de la expresión de *DREB1A/CBF3* mientras que la sobreexpresión de *MYB15* tiene el efecto contrario, inhibiendo la expresión de genes CBF. Así, MYB15 actúa en la respuesta al estrés frío a nivel molecular como un regulador negativo de la expresión de CBFs (Agarwal *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007).

#### **1.7.6. Factores de transcripción MYB**

La característica común de todos los TFs de esta superfamilia es la presencia de repeticiones (R), llamadas también dominios SANT, cuya estructura primaria consta de 52 aminoácidos. Cada repetición forma una estructura secundaria de tipo hélice-lámina-hélice. Las repeticiones poseen 3 residuos de triptófano espaciados regularmente, que forman un núcleo hidrofóbico. Estas repeticiones son las responsables de la unión de los TF de esta superfamilia con el DNA (Feller *et al.*, 2011).

La superfamilia de TFs MYB se divide en tres familias basándose en el número de esas regiones repetidas R altamente conservadas que constituyen el dominio de unión al DNA: R3 MYB (MYB1R) con única región repetida R, R2R3 MYB (MYB2R) con dos regiones R, y R1R2R3 (MYB3R) con tres regiones R (Feller *et al.*, 2011). Esta superfamilia se encuentra ampliamente representada en el genoma de plantas superiores. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 339 genes que codifican para

diferentes TFs tipo MYB y en arroz 230 genes. En tomate hay 294 genes que codifican algún miembro de esta superfamilia (<http://solgenomics.net>). Estos TFs participan en la regulación de la expresión génica en respuesta a gran número de diferentes situaciones de desarrollo de la planta y de condiciones ambientales a las que está expuesta. Como ejemplos se pueden mencionar AtMYB60, implicado en la regulación del movimiento estomático en *Arabidopsis* (Cominelli *et al.*, 2005); COLORED1 (C1), necesario para la biosíntesis de antocianos presentes en la aleurona del maíz (Paz-Ares, 1987); SIMYB12, que participa en la transición de color del fruto del tomate cuando inicia su maduración (Ballester *et al.*, 2010); AtMYB125/DUO1, que es un TF específico de polen que regula la división y diferenciación celular del gameto masculino (Brownfield y Twell, 2009); y finalmente VvMYBA1 y VvMYBA2, dos TFs implicados en el desarrollo del color de la piel de la uva, uno de los rasgos más importantes de calidad del fruto, cuyos genes están situados en el mismo locus y juegan un papel crucial en la regulación de la biosíntesis de antocianos en las cepas de uva tinta mientras que en las cepas de uva blanca los alelos de estos genes se encuentran inactivados, debido a la presencia de un retrotransposon en el promotor del primero y de dos mutaciones en la secuencia codificante del segundo (Allan *et al.*, 2008).

#### **1.7.6.1. Papel de los MYB TFs en el estrés hídrico**

La sequía afecta muy negativamente al desarrollo vegetativo y reproductivo vegetal, reduciendo sensiblemente la productividad de especies de interés agrícola. Resultados de la aplicación de las tecnologías de transcriptómica han revelado la existencia de multitud de TFs de tipo MYB y de genes que contienen elementos de unión a MYB cuyo expresión es sensible al estrés

hídrico en muy diversas especies vegetales, entre ellas algunas de especial interés agronómico: *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Gossypium herbaceum*, *Macrotyloma uniflorum*, *Malus pumila*, *Populus Euphratica*, *Musa* y *Glycine max* (Bhardwaj *et al.*, 2013).

En *Arabidopsis* la acumulación de flavonoides inducida por el déficit hídrico ha demostrado ser una respuesta positiva al estrés (Koops *et al.*, 2011). La sobreexpresión de *PAP1* y *MYB12*, dos genes reguladores de la síntesis del flavonol, conllevaba una menor pérdida de agua en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Nakabayashi *et al.*, 2014).

Se han identificado muchos TF MYB de tipo R2R3 que participan en la respuesta de *Arabidopsis* a la sequía. La regulación de la expresión de *MYB60* en *Arabidopsis* cuyos dos productos génicos, resultado de un diferente procesado de splicing, participan en el crecimiento radicular y tienen un papel crucial en el cierre estomático al inducir la pérdida del volumen de las células guarda en respuesta al estrés hídrico, se encuentra afectada por el déficit hídrico según el grado de intensidad de éste pero también según los niveles de ABA presentes. Así, al inicio del estrés se modula de tal forma que promueve el desarrollo radicular con el fin de aumentar la absorción de agua pero en estados severos de deshidratación se inhibe su expresión, mientras que bajos niveles de ABA inducen esta expresión y altos niveles la reprimen. La sobreexpresión de este gen indujo una respuesta de hipersensibilidad a la deficiencia de agua en las plantas transgénicas (Oh *et al.*, 2011). Las expresiones de *MYB96*, *MYB15* y *MYB2* en *Arabidopsis* se inducen por el déficit hídrico y sus productos actúan como reguladores positivos de la tolerancia a la sequía mediante la activación de

la transcripción de genes de respuesta a la deshidratación, como *RD22* (Abe *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2009).

Como hemos comentado una estrategia de tolerancia a la sequía es la producción de ceras en la superficie de la epidermis foliar que protejan contra la deshidratación. Dicha estrategia requiere la activación de la ruta de biosíntesis de cera cuticular, y en ésta participa MYB96 (Seo *et al.*, 2011). Otra estrategia consiste en la regulación de los estomas, de su desarrollo y funcionalidad. La proteína FOUR LIPS (FLP) y su parólogo MYB88, con un papel muy importante en el desarrollo de los estomas, modulan positivamente la expresión de genes de respuesta a diferentes estreses y entre ellos a la sequía y la salinidad, mientras que esta regulación del transcriptoma en respuesta al estrés abiótico se ve seriamente afectada en el doble mutante *flp-1 myb88* (Xie *et al.*, 2010). La expresión *AtMYB41* se induce por sequía y su producto parece funcionar como un TF implicado en la modulación de la expansión celular y de la estructura y composición de la cutícula durante el estrés hídrico (Cominelli *et al.*, 2008). La sobreexpresión *MYB44* de *Arabidopsis* confiere resistencia a la sequía, debido a una mayor sensibilidad a ABA y una más rápida respuesta de cierre estomático inducida por la hormona, además de exhibir una represión diferencial de la expresión de genes que codifican para las proteínas fosfatasas tipo 2C (PP2C) como *ABI1*, *ABI2*, *AtPP2CA*, *HAB1* y *HAB2*, mientras que ocurre lo contrario con la mutación knock-out para dicho gen *atmyb44* (Jung *et al.*, 2008). Otros dos ejemplos de TFs tipo MYB reguladores positivos de la tolerancia a la sequía en *Arabidopsis* son Susceptible a Botrytis (*BOS1*, *Botrytis susceptible 1*) y *AtMYB102* (Denekamp y Smeekensy 2003; Mengiste *et al.*, 2003). En particular el

mutante knock-out *bos1* es hipersensible a la sequía, la salinidad y el estrés oxidativo lo que sugiere que BOS1 es un regulador positivo de la respuestas a estreses abióticos en *Arabidopsis* (Mengiste *et al.*, 2003).

Además de las observaciones realizadas en las anteriores proteínas MYB de *Arabidopsis*, también se han identificado otros TFs MYB en otras especies involucrados en la respuesta a la sequía. En manzana *MdMYB121* se induce por estrés hídrico y su sobreexpresión en tomate y en manzana confiere tolerancia hacia este estrés (Cao *et al.*, 2013). *MdSIMYB1*, otro gen de manzana que codifica para un TF MYB, se induce también su expresión debido a sequía y otros estreses abióticos, y su producto actúa controlando positivamente la resistencia a la sequía mediante la inducción de genes de respuesta a auxinas (Wang *et al.*, 2014). En el arroz *OsMYB4*, *OsMYB3R-2* y *OsMYB2* se inducen por el estrés hídrico, y en la evaluación de líneas de sobreexpresión se observó un incremento de la resistencia a la sequía de las plantas transgénicas (Mattana *et al.*, 2005; Pasquali *et al.*, 2008). El promotor del gen *OsMYB59* contiene un elemento *cis* de sensibilidad a la deshidratación (*DRE*) que está regulado positivamente por la expresión del factor 1 de respuesta al estrés de tomate (*TSRF1*, *Tomato stress response factor 1*), resultado que indica que *OsMYB59* participa en la inducción de tolerancia a la sequía (Quan *et al.*, 2010). En trigo, *TaMYB3R1*, *TaMYB1* y *TaMYBsdu1* se inducen por estrés hídrico o por polietilenglicol (PEG), agente utilizado para inducir estrés osmótico, lo que nos señala que participa en la regulación de las rutas de respuesta a la sequía (Lee *et al.*, 2007; Rahaie *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011). La expresión de genes de trigo para el TF *TaMYB30* se incrementa en respuesta al estrés osmótico inducido por PEG, y la sobreexpresión una isoforma, *TaMYB30-B*, induce una mejora de la

tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2012). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan los genes de trigo *TaMYB33* y *TaMYB2A* también exhiben una mayor resistencia a la sequía (Mao *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012). La anulación de la síntesis de la proteína PHANTASTICA (NbPHAN) de *Nicotiana benthamiana* que pertenece a la subfamilia R2R3-MYB conlleva una mayor tolerancia ante el déficit hídrico (Huang *et al.*, 2013). Se ha comprobado que *VvMYB60* en la vid, *StMYB1R-1* en la patata y *CmMYB2* en crisantemo responden a situaciones de estrés hídrico, y su expresión constitutiva confiere resistencia a dicho estrés (Galbiati *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011; Shan *et al.*, 2012). En la soja *GmMYB177* se induce por sequía a través de una vía de señalización independiente de ABA (Liao *et al.*, 2008).

Curiosamente existe una estrecha relación entre las respuestas a la sequía y el desarrollo de la flor. Se ha observado que la expresión de genes MYB implicados en el desarrollo de la antera en *Arabidopsis* incluyendo *MYB33*, *MYB35*, *MYB65*, *MYB80*, *MYB99* y *MYB110*, se encuentra reprimida en condiciones de sequía y sin embargo la de *MYB21*, un regulador positivo del alargamiento de la antera, se encuentra estimulada por el estrés. Estas observaciones parecen formar parte de la observación más general de que la sequía provoca un retraso en el desarrollo de la antera (Wijeratne *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2013).

#### **1.7.6.2. Papel de los MYB TFs en el estrés salino**

Como se ha mencionado la salinidad en las plantas provoca dos tipos de efectos; un estrés osmótico por una disminución de potencial hídrico del suelo que dificulta la absorción radicular de agua y una toxicidad iónica debido a una acumulación excesiva de iones en la parte aérea. El primer

efecto es una característica común de la salinidad con la sequía, y así existen muchos reguladores que coordinan respuestas frente a ambos tipos de estreses abióticos (Golldack *et al.*, 2011). Se ha observado que algunas proteínas MYB tienen efectos similares en la respuesta a la sequía y salinidad, como es el caso de TaMYB2A, TaMYB3R1, TaMYB33, TaPIMP1, TaMYB1 y TaMYBsdu1 en trigo, GmMYB177 en soja, OsMYB3R-2, OsMYB2 en arroz, MdMYB1 y MdMYB121 en manzana, AtMYB44, AtMYB2, AtFLP, AtMYB88 y AtMYB41 en Arabidopsis, y CmMYB2 en crisantemo (Cominelli *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2008, Rahaie *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011, Mao *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014,).

AmMYB1 es una proteína de la especie de manglar *Avicennia marina* tolerante a la salinidad y en ensayos con ADN *in vitro* con el promotor de *AtRD22* y transactivación con células de levadura se ha observado que es capaz de activar la expresión génica en situaciones de estrés salino, además de mejorar la tolerancia hacia dicho estrés en tabaco transgénico cuando se expresa heteróloga y constitutivamente (Ganesan *et al.*, 2012). En análisis de microarrays de expresión en *Medicago truncatula* sometido a estrés salino se ha observado que la expresión de *MYB119*, *MYB634* y *MYB636* se induce en el ápice de la raíz pero la de *MYB1070* ocurre en toda la raíz, lo que sugiere una cierta especificidad de acción según el tejido y órgano (Gruber *et al.*, 2009). AtMYB73 actúa como un regulador negativo de la respuesta a la salinidad al inducir la supresión de la expresión de genes de la ruta SOS de respuesta a este estrés (Kim *et al.*, 2013). La expresión heteróloga en Arabidopsis de *TaMYB56-B* y *LcMYB1* de trigo y de la gramínea *Leymus chinensis* modula positivamente la respuesta a estrés por

salinidad de las plantas transgénicas, mediante la inducción de genes de respuesta a deshidratación y bajas temperaturas como *DREB1A/CBF3* y *COR15A* y la acumulación de solutos tales como prolina y sólidos solubles respectivamente (Zhang *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013).

Se ha observado que la proteína AtHPPBF-1 perteneciente a la familia 1R-MYB, cuya expresión génica se induce por el estrés salino, interacciona físicamente con la proteína STO de tipo Calcineurin-B-like homóloga a SOS3 e influye positivamente en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y de esa forma regula la respuesta a la salinidad en *Arabidopsis* (Nagaoka y Takano, 2003). Song *et al.* (2012) detectaron la modificación epigenética de algunos TFs tipo MYB de soja cuando las plantas se sometían a estrés salino, como *Glyma11g02400* que sufre una activación transcripcional y una reducción de la metilación. La expresión de otras TFs MYB de soja como *GmMYB76* y *GmMYB92* se ve inducida por una vía independiente de ABA en respuesta al tratamiento salino (Liao *et al.*, 2008).

En esta Tesis Doctoral se presenta el trabajo de investigación realizado para la identificación y caracterización fenotípica, genética, fisiológica y molecular de un mutante de inserción de tomate que presenta una marcada susceptibilidad al estrés salino y donde la mutación responsable está etiquetada por un inserto T-DNA y se localiza en la región codificante para un gen R1-MYB. El mutante se ha denominado *ars1* (*altered response to salt stress 1*) por dicho fenotipo de hipersensibilidad a estrés salino. En este mutante, por otra parte fenotípicamente indistinguible del tomate no transformado de la variedad donde se ha generado la colección de mutantes insercionales (Moneymaker) cuando se cultiva en condiciones estándar sin estrés, se ha observado que su hipersensibilidad a

## Introducción

la salinidad está asociada a una sobreacumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea y a la inhibición de la reducción de  $g_s$  y de la tasa de transpiración en estrés salino. Además, se ha podido comprobar que la regulación del cierre estomático en estrés salino por el gen *ARS1* está mediado por ABA.





## **Objetivos**



## 2. Objetivos

Con el objetivo final de avanzar en la identificación de genes implicados en la tolerancia a la salinidad en una especie de interés agronómico, como tomate, los objetivos que se han desarrollado en esta Tesis Doctoral han sido:

1. Identificar mutantes de inserción dominantes y recesivos (en las poblaciones TG1 y TG2, respectivamente) afectados en el desarrollo y/o tolerancia a estreses abióticos mediante el análisis fenotípico y genético de líneas T-DNA de tomate de la colección de tomate (*Solanum lycopersicum*) originada a partir del cv. Moneymaker.
2. Caracterizar a nivel fenotípico, fisiológico, genético y molecular el mutante denominado *ars1* (*altered resistance to salt*), que tiene anulada la expresión de un factor de transcripción MYB de tipo R1 y muestra sensibilidad al estrés salino a lo largo del ciclo vegetativo.
3. Llevar a cabo el análisis funcional del gen *ARS1* mediante el análisis fisiológico y molecular de líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen.

El logro de estos objetivos supondrá un importante avance en la identificación de genes reguladores en la tolerancia a la salinidad del tomate, ya que es el primer gen MYB de tipo R1 identificado en tomate.



# **Materiales y Métodos**



### **3. Material y Métodos**

#### **3.1. Material vegetal**

El material vegetal utilizado en el desarrollo de este trabajo de investigación que conforma la Tesis Doctoral ha sido tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cultivar Moneymaker. Con esta variedad de élite comercial se ha generado la colección de mutantes insercionales por T-DNA con trampa de intensificadores en el marco de un proyecto de colaboración entre los grupos de investigación dirigidos por el Prof. Vicente Moreno del IBMCP-UPV/CSIC (Valencia), del Prof. Rafael Moreno de la Universidad de Almería, y la Prof. M<sup>a</sup> Carmen Bolarín del CEBAS-CSIC (Murcia). En esta tesis se describen fenotípicamente varios mutantes identificados así como la caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de uno en particular denominado *ars1* (del inglés *altered response to salt stress 1*, mutante de respuesta alterada al estrés salino 1), en el cual se ha clonado el gen etiquetado por el T-DNA y que es responsable del fenotipo.

#### **3.2. Generación de líneas T-DNA de tomate con una trampa de intensificadores**

Para la generación de la colección de mutantes insercionales se ha utilizado una construcción proporcionada por el Dr. Thomas Jack del departamento de Biología del Dartmouth College (Hannover, NH 03755, EE.UU.) (Campisi *et al.*, 1999). La cassette T-DNA está insertada dentro del vector pD991, y entre las características más importantes que posee se encuentran (i) un promotor mínimo -60CaMV que es una versión truncada del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), que contiene una caja TATA pero que por sí mismo no es capaz de inducir la transcripción si no es con el auxilio de elementos reguladores del genoma del tomate transformado, y

que se localiza aguas arriba de (ii) la secuencia codificante del gen delator *uidA* (gen que codifica para la  $\beta$ -D-glucuronidasa, GUS), a continuación se encuentra (iii) el terminador correspondientes de la 3' nopaline sintasa (3'NOS), y finalmente (iv) la secuencia codificante de un gen de selección de transformantes que es *nptII* (*Neomicina fosfotransferasa II*) que confiere resistencia antibióticos aminoglicósidos, entre ellos kanamicina (kan), y cuya expresión está bajo el control de su propio promotor y terminador de manopina sintasa (5'-pmas y 3'-pmas) presentes en la construcción (**Figura 6**) (Campisi *et al.*, 1999).

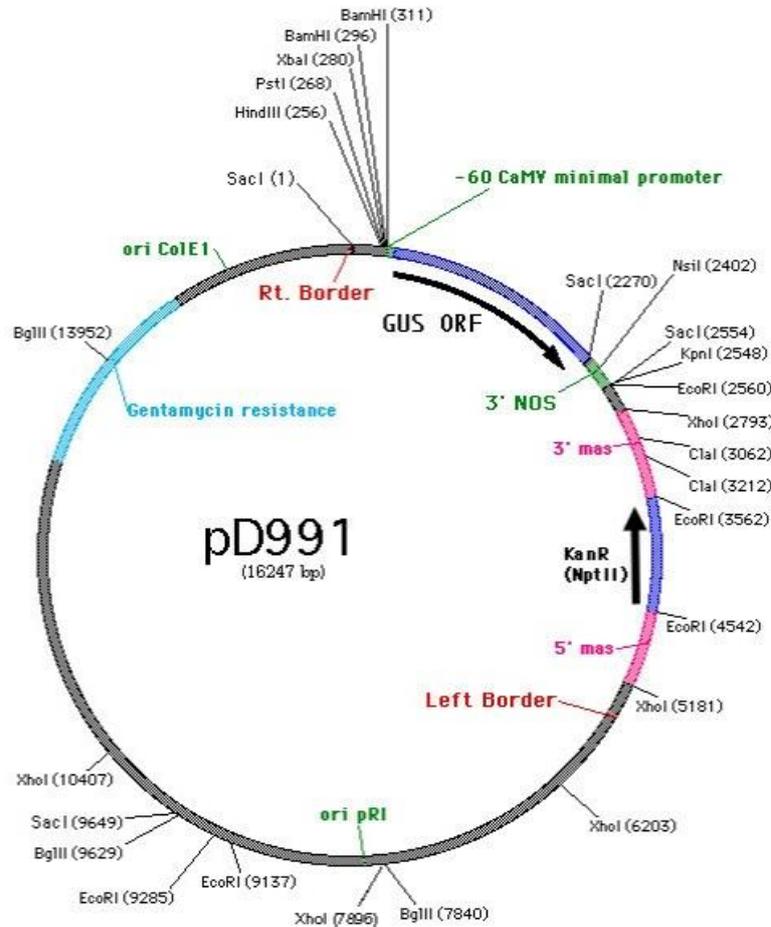
El proceso de transformación genética de las plantas de tomate con dicha construcción, la regeneración de los transformantes y la comprobación de la ploidía mediante citometría de flujo para generar la colección de mutantes se llevaron a cabo por el grupo de investigación de Biotecnología y Cultivo in vitro dirigido por el Prof. Vicente Moreno del IBMCP (UPV-CSIC, Valencia), siguiendo los protocolos descritos en Gisbert *et al.* (2000) y Atarés *et al.* (2011).

Con respecto a la caracterización molecular del mutante insercional *ars1* (*altered response to salt stress 1*), objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, el análisis por Southern Blot para detectar el número de insertos T-DNA según el método descrito por Ausubel *et al.* (1993), el clonaje de las regiones flanqueantes al inserto T-DNA mediante Anchor-PCR según el método descrito por Schupp *et al.* (1999) (Schupp *et al.* 1999), y el genotipado de las poblaciones segregantes utilizando cebadores específicos han sido llevados a cabo por el grupo de investigación de Genética de la Universidad de Almería dirigido por el Prof. Rafael Lozano.

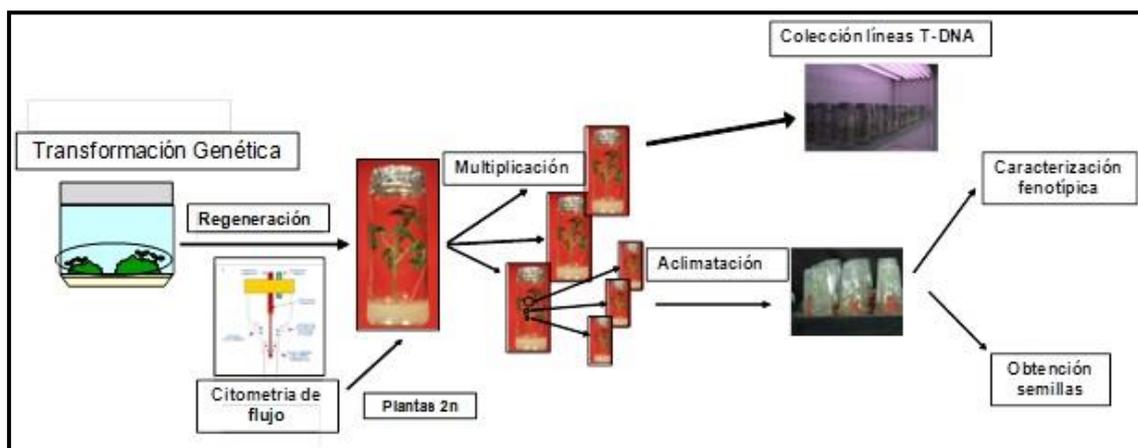
Para el análisis funcional del gen mutado e identificado en el mutante de inserción *ars1* el diseño de las construcciones genéticas de silenciamiento y sobreexpresión y su transformación en *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación de Genética de la Universidad de Almería dirigido por el Prof. Rafael Lozano, mientras que la transformación en tomate para obtener las líneas de sobreexpresión y silenciamiento fue realizada por el grupo de investigación de Biotecnología y Cultivo in vitro dirigido por el Prof. Vicente Moreno del IBMCP (UPV-CSIC, Valencia) siguiendo los protocolos descritos en Gisbert *et al.* (2000) y Atarés *et al.* (2011).

### **3.2.1. Multiplicación y mantenimiento *in vitro* de la colección de mutantes insercionales de T-DNA**

A partir de cada planta T-DNA generada en la transformación (TG1, generación transformante) se obtuvieron 9 réplicas clonales mediante tres rondas de clonación: dos copias se mantienen *in vitro* dentro de la colección; dos se aclimataron para conseguir semillas TG2 (generación segregante), dos plantas más se evaluaron para identificar aquellos con fenotipos afectados en el desarrollo vegetativo y/o reproductivo, y las tres últimas plantas se utilizaron para el análisis de la respuesta a estrés abiótico (salinidad y sequía). En la **Figura 7** se muestra un esquema del proceso de generación y evaluación de la colección de líneas T-DNA.



**Figura 6.** Esquema de la construcción genética utilizada para la generación de la colección de mutantes insercionales de T-DNA. La longitud del cuerpo del vector pD991 es de 16,2 Kb, mientras que la cassette ocupa 2,2 Kb.



**Figura 7.** Esquema del proceso de transformación genética, regeneración y selección de transformantes y obtención de plantas TG1 para aclimatar y obtener semillas y evaluar el fenotipo.

### 3.3. Medios de Cultivo utilizados

Modificaciones de las soluciones nutritivas básicas descritas por Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) (medio MS) se han utilizado como base común para la preparación de todos los medios de cultivo *in vitro* empleados en el trabajo de investigación de esta Tesis (**Tablas 2 y 3**).

**Tabla 2.** Composición de las soluciones nutritivas básicas (medio MS) para el cultivo *in vitro*.

<b>MSI</b>	<b>g*L<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5
KNO <sub>3</sub>	19,0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	4,4
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3,7
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	1,7

<b>MSII</b>	<b>g*L<sup>-1</sup></b>
KI	0,083
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	1,69
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,86
MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,0025
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,0025

<b>MSIII</b>	<b>g*L<sup>-1</sup></b>
EDTA*Na <sub>2</sub>	3,73
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,78

**Tabla 3.** Medio básico (MG) utilizado para la germinación de semillas.

<b>MG</b>	<b>g*L<sup>-1</sup></b>
Solución mineral MS	4,3
Sacarosa	10
Agar	8,0

### **3.3.1. Cultivo de semillas *in vitro***

Las semillas de mutantes seleccionados para su germinación *in vitro* se han esterilizado previamente mediante la inmersión en una solución de hipoclorito sódico al 50% + 3 gotas de Triton X-100 durante 30 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril de 5, 10 y 15 min.

Una vez esterilizadas, estas semillas se sembraron en el medio de cultivo deseado. El medio de germinación (MG) (**Tabla 3**) utilizado se usó como base a partir de la cual se realizaron otros medidos como:

- Medio para selección con kanamicina

Para los ensayos de selección por tolerancia a la kanamicina de las plantas se añade al medio de germinación 100 mg·L<sup>-1</sup> de kanamicina.

### **3.3.2. Condiciones de la cámara de cultivo *in vitro***

Las condiciones de cultivo *in vitro* fueron las siguientes: fotoperíodo de 16 h de luz a 76  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y 8 h de oscuridad, con 25°C de temperatura durante todo el ciclo día/noche.. Para la iluminación se emplearon tubos fluorescentes Sylvania GRO-LUX F58W/GRO -T8 (Alemania) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Aspecto general de la cámara de cultivo *in vitro*.

### **3.4. Aclimatación**

Las réplicas clonales TG1 procedentes de las distintas líneas mutantes se cultivaron durante 20 días en un medio de enraizamiento, y posteriormente se aclimataron mediante un proceso que consistió en trasladar la planta desde la cámara de cultivo *in vitro* con unas condiciones próximas al 100% de humedad relativa (HR) y baja iluminación hasta unas condiciones de cultivo *in vivo* donde la humedad ambiental varía entre el 30 y 70% de HR y una intensidad de radiación PAR mucho más elevada. En este proceso se hace un trasplante desde el medio de cultivo utilizado *in vitro* con ágar, que se retira de las raíces lavándolas suavemente en agua destilada, a macetas que contienen una mezcla de turba/perlita (8:3) previamente esterilizada.

Las plantas en las macetas se mantienen en un ambiente con alta humedad bien introduciendo las plantas en un mini-invernadero o bien cubriendo las plantas con un vaso de plástico, con el objetivo es mantener una alta HR en el ambiente que rodea a las plantas. Paulatinamente se va disminuyendo la HR que rodea a la planta abriendo agujeros en el plástico

del mini-invernadero o retirando el vaso, primero durante cortos periodos de tiempo que van aumentando hasta que las plantas quedan expuestas a las condiciones ambientales típicas de la cámara de cultivo. Todo este proceso tiene una duración de 6 días.

### **3.5. Obtención de progenies TG2 e identificación de líneas homocigotas TG3 para mutantes insercionales con la mutación responsable del fenotipo etiquetada por el T-DNA**

Para obtener semillas TG2 de cada mutante se aclimataron *in vivo* y se cultivaron 2 réplicas clónales TG1, primero en cámara de cultivo de condiciones controladas y después en invernadero, y se obtuvieron las semillas. La progenie TG2 segrega para la inserción de T-DNA y está compuesta por plantas acigotas, homocigotas y hemicigotas para los alelos mutante (con presencia del inserto T-DNA) y WT (ausencia del inserto). Tras seleccionar por genotipado mediante PCR con cebadores específicos las plantas TG2 homocigotas para la inserción, éstas se mantienen en cultivo hasta obtención de fruto y por tanto de semillas. Estos resultados se confirmaron mediante test de kan *in vitro* con semillas TG3, o bien *in vivo* sobre las mismas plantas TG2. Son con las progenies TG3 y sucesivas homocigotas para la inserción con las cuales se ha llevado a cabo la caracterización fenotípica, fisiológica y molecular del mutante *ars1*, utilizando como testigo de los experimentos plantas de tomate del mismo cultivar (Moneymaker) que el utilizado en la mutagénesis pero sin transformar (WT, wild-type).

### **3.5.1. Test de selección *in vitro* por resistencia a kanamicina de líneas homocigotas para el inserto T-DNA**

Se realiza con un mínimo de 110 semillas procedentes de cada planta a evaluar, que se disponen en medio de germinación con  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  kan. La lectura final se hace 21 días después de la germinación de las semillas y se hace el recuento del número de semillas germinadas así como del número de plántulas resistentes, cuyo fenotipo es el correspondiente al fenotipo de una plántula WT crecida en medio de sin kan. Las plántulas sensibles no desarrollan raíces secundarias, acumulan antocianos en el tallo (color violáceo) y no desarrollan hojas verdaderas (**Figura 9**).

### **3.5.2. Test de selección *in vivo* por resistencia a kanamicina de líneas homocigotas para el inserto T-DNA**

El objetivo es el mismo que en el apartado anterior, si bien el procedimiento difiere ya que se trata de una técnica no destructiva que permite la supervivencia de las plantas sensibles al antibiótico. Consiste en marcar con una etiqueta una o varias hojas de la planta a la que se aplicará la kan a una concentración de  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante un pulverizador. Para descartar falsos positivos provocados por posibles quemaduras foliares debido a otras causas se lleva a cabo la pulverización de agua destilada de otras hojas de la planta previamente marcadas. La aplicación se realiza cada 24 horas durante 3 días consecutivos y los resultados fueron inequívocamente visibles a los 15 días. (Weide *et al.*, 1989).



**Figura 9.** Aspecto general de la a) tolerancia y b) sensibilidad a la kanamicina en medio de cultivo *in vitro*. Y la misma técnica pero *in vivo* c) y d).

### **3.6. Cultivo de las plantas *in vivo***

#### **3.6.1. Cultivo de plantas en condiciones controladas**

El procedimiento de germinación de las semillas para los distintos experimentos realizados en esta tesis ha consistido en un tratamiento térmico durante 48 horas a 70°C, seguido de una germinación en placa Petri durante 72 horas a 28°C con humedad del 100% y agitación de 50 r.p.m. Posteriormente las semillas germinadas se colocaron en pocillos de semilleros de unas medidas de 60x40x12 cm con 96 pocillos, o bien a macetas de 8, 10 o 14 cm de diámetro. El sustrato utilizado en los semilleros y las macetas estaba compuesto por una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3. Las semillas se mantuvieron en oscuridad durante las primeras 48-72 horas después de la siembra.

Las condiciones de cultivo utilizadas para los experimentos son las siguientes: HR entre 50 y 80% y temperatura entre 18 (noche) y 25°C (día) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad de luz y la temperatura durante el ciclo día/noche variaba para intentar reproducir en lo posible un ciclo natural (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Condiciones controladas de cultivo en cámara de cultivo

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

La solución nutritiva utilizada tanto para el riego de las plántulas en los semilleros y las plantas en macetas, así como en cultivo hidropónico fue Hoagland diluida al 50% (Hoagland, 1950) (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Composición de las tres soluciones nutritivas que conforman la solución nutritiva Hoagland utilizada para el riego del tomate.

<b>Solución A</b>	<b><math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	8,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	82,6
$\text{KNO}_3$	35,7

<b>Solución B</b>	<b><math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>
$\text{KNO}_3$	5,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	27,4
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,6
$\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,053
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,140
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,015
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060

<b>Fe</b>	<b><math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>
Fe-EDDHA 6%	1,87

Las plantas se mantuvieron en los semilleros o en las macetas hasta que desarrollaron 2-3 hojas verdaderas que es cuando se llevaron a cabo los ensayos de estrés salino a corto y medio plazo o bien el tratamiento de estrés hídrico.

Los ensayos en maceta se realizaron con las plantas dispuestas en macetas de 15 cm de diámetro usando como sustrato la mezcla de turba y perlita antes descrita para la germinación de las semillas. El sustrato se humedecía completamente antes de trasplantar las plantas y se dejaban las

plantas unos días antes de empezar el tratamiento para permitir el desarrollo radicular y la aclimatación.

En los ensayos de estrés salino realizados en condiciones de cultivo hidropónico las plantas se transfirieron a las cubetas del sistema de cultivo hidropónico (**Figura 10**). Dicho sistema consta de grandes cubetas de fibra de vidrio con capacidad para 150 litros de disolución nutritiva. Las cubetas disponen de unas tapaderas perforadas donde se sitúan las plantas encajadas en unos soportes de plástico con algodón hidrófobo en su interior. Cuando las plantas presentan un mayor desarrollo es posible guiar las plantas a unos soportes situados sobre las cubetas. Las plantas se distribuyen homogéneamente por la cubeta, siendo la capacidad máxima de las cubetas de 40 plantas debiendo reducirse el número conforme aumenta el tamaño y desarrollo de las plantas. Tras el transferir las plantas a condiciones de cultivo hidropónico se mantenían en condiciones control (sin aplicación de estrés salino) durante 48-72 horas para facilitar la aclimatación de las plantas y el correcto desarrollo del sistema radicular.

La disolución utilizada en esta condición de cultivo es la misma disolución Hoagland al 50% antes mencionada (**Tabla 5**), a la que se le añaden distintas concentraciones de NaCl cuando se iniciaba el ensayo de estrés salino (100 mM o 200 mM de NaCl). La aplicación de la sal era gradual añadiéndola en 2 o 3 veces y se realizaba en los periodos de baja iluminación que es cuando las plantas experimentan un menor grado transpiración para así reducir en lo posible el choque osmótico impuesto. Se realizaba un control de las condiciones del cultivo mediante un seguimiento del pH, la conductividad eléctrica (CE) y mediante el análisis químico periódico, procediéndose al cambio de la disolución cada vez que fuera

necesario pero como mínimo una vez por semana. Esta disolución era convenientemente aireada mediante un burbujeo continuo suministrado por un compresor Puska N-150-50, con un caudal de  $115 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , presión máxima  $10 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$  y capacidad de 50 litros. Las condiciones de temperatura y humedad son las mismas que las indicadas más arriba para el cultivo en cámara en condiciones controladas (**Tabla 4**).



**Figura 10.** Aspecto general del sistema cultivo hidropónico sito en la cámara de cultivo en condiciones controladas.

### 3.6.2. Cultivo en invernadero

Los experimentos a largo plazo en condiciones similares a las estándar en agricultura se llevaron a cabo en un invernadero situado en la finca experimental del CEBAS-CSIC en la comarca de La Matanza, en el término municipal de Santomera (Murcia). Es un invernadero de unos  $1.000 \text{ m}^2$  de superficie, completamente cerrado y dotado de ventiladores y un sistema de *cooling* para la regulación de temperatura, activándose éste cuando la temperatura alcanza los  $24^\circ\text{C}$ . El sustrato utilizado en los contenedores de poliestireno, de un volumen de 32 litros y espacio para 6 plantas en cada

## Materiales y Métodos

uno, es fibra de coco donde se trasplantaban las plantas desde semillero o maceta (**Figura 11**).

El riego era suministrado por goteo, usándose goteros de caudal de 3 L·hora<sup>-1</sup>. El marco de plantación fue de 0,5x2 m<sup>2</sup> con un gotero cada dos plantas. Las plantas se cultivaban entutoradas por el tallo principal, eliminándose periódicamente las yemas laterales, y se situaban enfrentadas las plantas de un mismo gotero a cada lado del contenedor (**Figura 11**). La fertilización estaba ajustada para el cultivo de tomate (Cadahia, 1995) (**Tabla 6**).



**Figura 11.** Vista general de los contenedores de poliestireno con fibra de coco y sistema de riego por goteo localizado utilizado para el cultivo del tomate en invernadero.

**Tabla 6.** Composición de la solución nutritiva usada para el riego de las plantas en el invernadero

Macronutrientes (mM)					
N(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	N(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	P(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>
12,0	0,5	1,5	7,0	4,0	2,0

<b>Micronutrientes (mM)</b>				
<b>Fe<sup>+3</sup></b>	<b>Cu<sup>+2</sup></b>	<b>Mn<sup>+2</sup></b>	<b>Zn<sup>+2</sup></b>	<b>B<sup>+3</sup></b>
29-59	2-5	10-20	3-7	20-45

Se dispone de tres depósitos de 2.000 litros de capacidad para preparar las disoluciones concentradas de abonos y micronutrientes (disoluciones madre) que posteriormente se adicionaban al agua de riego en las diluciones adecuadas para alcanzar los niveles de nutrientes deseados. Todos los abonos se preparaban al 5% de concentración. Un cuarto depósito contenía ácido para regular el pH de la disolución de riego, mientras que en el quinto depósito se preparaba la disolución concentrada de NaCl utilizada para los ensayos de estrés salino.

Las disoluciones finales de riego se preparaban en otros cuatro depósitos a partir de las disoluciones madres anteriores y añadiendo sal del depósito de NaCl concentrado mediante un sistema de mezcla por inyección automática, permitiendo el sistema hasta realizar cuatro tratamientos salinos distintos. La regulación de la inyección se lleva a cabo mediante la medición de CE. El agua de riego tenía una CE alrededor de  $1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-2}$ , la disolución de riego en control  $2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-2}$ , mientras que la disolución utilizada en el tratamiento salino de 100 mM de NaCl posee una CE de  $12 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-2}$ . Se llevaban a cabo análisis químicos periódicos tanto del agua utilizada como de la disolución de riego y del lixiviado producido por el riego para comprobar que las condiciones de cultivo eran las deseadas. El control de riego se realiza gracias a un autómata controlado por un software, variándose las condiciones según la edad de la planta y las condiciones ambientales.

Las plantas se transportaban al invernadero y se trasplantaban cuando habían desarrollado 7-8 hojas verdaderas, y tras un periodo de aclimatación a las condiciones del invernadero de entre 7 y 15 días se iniciaban los ensayos de estrés salino.

### **3.6.3. Ensayos de estrés salino**

Para estudiar la respuesta al estrés salino de las plantas de la colección de mutantes insercionales de tomate se llevaron a cabo ensayos a corto, medio (cámara de cultivo de condiciones controladas) y a largo plazo (invernadero). Como testigos se utilizaban plantas de tomate del mismo cultivar utilizado para la mutagénesis (Moneymaker) pero sin transformar (plantas WT).

En la respuesta a corto y medio plazo, el trabajo se desarrolló tanto en condiciones de cultivo con sustrato (macetas) como en hidropónico. El nivel salino aplicado para los experimentos en cámara de cultivo era de 200 mM de NaCl. La adición de sal se hacía en dos pasos; primero se aplicaba una dosis de 100 mM durante 24 horas y luego la definitiva de 200 mM con el fin de minimizar el efecto del choque osmótico de la sal en las plantas.

En los ensayos de estrés salino en condiciones de cultivo en invernadero el trasplante se realizaba con 7-8 hojas. El tratamiento salino se iniciaba entre 8 y 15 días después del trasplante. El nivel salino utilizado para los experimentos en invernadero fue de 100 mM de NaCl.

En todos los ensayos el tamaño muestral era de 12 plantas mutantes y 12 WT en condición de estrés y el mismo número para cada genotipo en condición control a modo de comparación para el seguimiento del impacto del estrés.



**Figura 12.** Aspecto general del sistema de riego y del invernadero donde se han realizado los experimento a largo plazo.

#### **3.6.4. Ensayos de estrés hídrico**

El estudio de la respuesta al estrés hídrico de las plantas mutantes en respuesta al estrés hídrico se realizó tanto en cámara de cultivo en condiciones controladas como en invernadero. En ambos casos la aplicación del estrés hídrico se realizó mediante ciclos sucesivos de deshidratación/rehidratación.

En cámara de cultivo, las plantas mutantes y WT se cultivaron en parejas en la misma maceta para asegurar que ambas estaban expuestas a las mismas condiciones de deshidratación y rehidratación del sustrato, y por tanto al mismo descenso de potencial hídrico del mismo.

Se utilizaron 10 parejas mutante-WT a las que se aplicaba el estrés hídrico y otras 10 parejas que se mantenían en condición control, periódicamente regadas. Se aplicaron tres ciclos de deshidratación/rehidratación con un periodo de privación de riego de tres días, después del cual se reiniciaba el riego durante dos días antes de comenzar el siguiente ciclo. Entre el cuarto y último ciclo se aumentó el periodo de privación de riego hasta conseguir la completa deshidratación de las plantas mutantes y WT y así poder evaluar la recuperación de ambas.

En cultivo en invernadero se aplicaron ciclos de deshidratación de mayor duración entre 13 y 15 días por ciclo, dejando 5 días de recuperación entre cada tratamiento. En total, se realizaron 7 ciclos. Para ello se utilizaron 12 plantas mutantes y 12 plantas WT para el tratamiento de estrés hídrico en una línea de riego del invernadero destinada para este objetivo, y otras 12 plantas de cada línea como control. Las plantas se disponían en contenedores de poliestireno con fibra de coco como se ha descrito anteriormente. Con el fin de asegurar las mismas condiciones de cultivo para ambos genotipos, mutante y WT, se alternaron plantas mutantes y WT dentro del mismo contenedor.

### **3.7. Evaluación fenotípica y fisiológica**

#### **3.7.1. Parámetros de desarrollo vegetativo de producción**

La evaluación fenotípica de las líneas mutantes consistió en medidas del peso fresco de la planta completa y del peso por separado de la parte aérea y de la raíz. También se cuantificó cuando procedía la altura de la planta, la longitud de la raíz, el número de hojas, y el peso y el número de frutos. Estos datos se compararon siempre con testigos WT en las mismas condiciones.

#### **3.7.2. Contenido de agua**

El contenido de agua se obtuvo por diferencia de peso fresco y seco aplicando la fórmula:

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

Para ello los materiales se pesaron al ser muestreados (peso fresco) y se mantuvieron un mínimo de 48 horas en una estufa a 70°C hasta conseguir un peso constante (peso seco) (**Figura 12**). El contenido de agua se expresa en mL H<sub>2</sub>O·g<sup>-1</sup> peso seco.

#### **3.7.3. Evolución de la pérdida de agua de folíolos escindidos**

Para analizar la capacidad de pérdida de agua de los folíolos del mutante se procedió a cortar 10 folíolos de la tercera hoja de cada planta mutante y WT, de similares dimensiones y se monitorizó periódicamente la pérdida de peso del folíolo durante 24 horas. La pérdida de agua se expresó como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial del folíolo. El tamaño muestral estaba constituido por 10 folíolos procedentes de tres plantas de cada genotipo (mutante y WT) en condiciones control de cultivo.



**Figura 13.** Estufa usada para el secado de las muestras y material vegetal seco para la determinación de contenido de agua.

#### **3.7.4. Procesamiento de las muestras para los análisis fisiológicos**

El procesamiento de las muestras obtenidas se realizaba por tres métodos diferentes según el tipo de análisis a realizar: por digestión con mezcla de ácido nítrico/ácido perclórico, y por centrifugación para obtener un extracto crudo a partir de material fresco.

Para la determinación de los contenidos en iones se realizaba un proceso de digestión de la muestras de material vegetal mediante el siguiente protocolo: 100 mg de material seco (hojas, raíz, tallo) y molido se depositaban en un tubo de vidrio al que se le añadían 10 mL de una disolución de  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$  en proporción 2:1 (v/v) que se introducía en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante al menos 6 horas. Cuando el material está completamente digerido se retiran las muestras del digestor y se enrasaban los tubos a 50 mL, se agitaba la mezcla y se transfiere a un recipiente limpio para el análisis.

Para la determinación de los contenidos en azúcares y ácidos orgánicos y del potencial osmótico, y también de iones en medio líquido, se preparó un extracto líquido obtenido directamente del material vegetal fresco; este material vegetal (hojas, raíz, tallo) se introducía en una cantidad suficiente (aprox. 8 g) en puntas de pipeta de 5 mL con una pequeña cantidad de fibra de lana de vidrio dispuesta en la punta a modo de filtro. Esta punta se pesaba vacía (sólo con el filtro de lana de vidrio) y llena (con el material vegetal).

Las puntas con el material se congelaban en nitrógeno líquido y posteriormente se dejaban descongelar durante 15 minutos antes de introducirlas en la centrifuga, este proceso de congelación-descongelación permite la ruptura de las células liberando su contenido al exterior. A continuación, las puntas se centrifugaban en una centrifuga Haerus labofuge II (Haerus, Alemania) durante 15 minutos a 1.000 g y 4°C. El volumen obtenido se recogía por duplicado en tubos de 1,5 mL y vuelto a centrifugar a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C en una centrifuga Sigma 2k15 (B. Braun, Alemania) recogiendo el sobrenadante quedando en el precipitado todas las impurezas y restos celulares. Se medía el volumen de estos extractos crudos finales líquidos y se conservaban -20°C hasta su posterior análisis.

### **3.7.5. Determinación de cationes**

La medida de los cationes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se realizó a partir de extracto vegetal crudo o bien digestiones descritas anteriormente. Los análisis se realizaron en la Plataforma de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

### **3.7.6. Relaciones hídricas**

Para evaluar las relaciones hídricas de las plantas objeto de estudio se analizó tanto el potencial hídrico como el osmótico, que junto con el contenido en agua nos permite estimar el estatus hídrico del material vegetal.

#### **3.7.6.1. Potencial hídrico**

El potencial hídrico de las plantas se estimó mediante una cámara de presión tipo Scholander (Soil Moisture modelo 3000, EE.UU) (**Figura 13**). El método se basa en la medida de la salida de la savia del xilema de una hoja o tallo; cuando la presión aplicada es suficiente para forzar la salida del agua de las células vasculares, esta presión será igual al potencial hídrico de las hojas. Para el cálculo del potencial hídrico de cada planta se realizaban medidas en tres folíolos de la tercera o cuarta hojas completamente desarrollada. Las medidas siempre se realizan en el mismo periodo de tiempo, tres horas a partir del inicio de la fase luminosa en cámara de cultivo o temprano por la mañana en el invernadero, y se expresaron en MPa.



**Figura 14.** Imagen de la toma de medidas de potencial hídrico con cámara de presión tipo Scholander.

### **3.7.6.2. Potencial osmótico**

El potencial osmótico se midió por el método crioscópico (depresión del punto de congelación) utilizando para ello un osmómetro *Osmometer automatic* (Roebing, Alemania) (**Figura 15**). El aparato utiliza dos patrones, uno de agua destilada (valor 0) y otro de una disolución de NaCl de 300 mOsmol. Se utilizaban 100  $\mu$ L de extracto crudo líquido preparado como se ha descrito anteriormente para cada medida. La transformación desde mOsmol, que son las unidades que da el equipo, a MPa se realiza por la equivalencia 400 mOsmol igual a 1 MPa.



**Figura 15.** Osmómetro Roebling utilizado para el análisis del potencial osmótico.

### **3.7.8. Análisis de clorofilas y eficacia fotosintética**

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

La determinación de la eficacia del fotosistema II de la fotosíntesis se lleva a cabo mediante el análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila, haciendo uso de un fluorómetro portátil OS-30 (ADC BioScientific,

Reino Unido). El equipo da los resultados expresados como ratio  $F_v/F_m$ , definido según la siguiente fórmula:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

$F_v/F_m$  es la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima, el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II.  $F_m$  es la máxima intensidad de emisión de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos, e inducida por una fuente de excitación de luz roja lejana ( $3.000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante 0,8 s.  $F_o$  es la intensidad de fluorescencia mínima producida por la exposición de la hoja a una fuente de luz actínica ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Maxwell y Johnson, 2000).

Este parámetro se correlaciona directamente con el número de centros de reacción del fotosistema II activos.  $F_v/F_m$  es una relación que mide la capacidad fotoquímica primaria del fotosistema II, que es particularmente sensible a los factores inductores de estrés ambiental. La relación  $F_v/F_m$  suele encontrarse en un rango de 0.75 - 0.85 en plantas no sometidas a estrés, y típicamente disminuye ante una situación de estrés antes que otros síntomas lleguen a manifestarse en la planta. El estrés ambiental determina un descenso de esta relación por lo que se utiliza para cuantificar el grado de fotoinhibición debido al estrés. Estos parámetros de emisión de fluorescencia de la clorofila se utilizan rutinariamente para evaluar el efecto de un estrés sobre la maquinaria fotosintética de las plantas (Sayed, 2003). Se realizaron 6 medidas por cada genotipo (mutante vs. WT) y condición de cultivo (control vs. estrés).

### **3.7.9. Determinación de la conductancia estomática, tasa de transpiración y tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> o fotosintética**

La determinación de estos parámetros clave para evaluar la capacidad de transpiración de la planta y el comportamiento de sus estomas, así como la tasa fotosintética, tan importantes en el mutante cuya caracterización es objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo mediante el análisis IR de intercambio gaseoso hoja-atmósfera (IRGA) haciendo uso de un medidor portátil de fotosíntesis CIRAS-2 (PP Systems Inc., Amesbury, MA 01913, EE.UU.) (**Figura 16**).

Con este equipo se determinaron la conductancia estomática ( $g_s$ , expresada en  $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), parámetro que mide el grado de apertura/cierre estomático mediante la determinación de la tasa de entrada de CO<sub>2</sub>/salida de H<sub>2</sub>O por los estomas, la tasa de transpiración foliar ( $E$ , expresado  $\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y tasa de fotosíntesis neta o asimilación de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $P_n$ , expresado como  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las condiciones del equipo fueron las siguientes: la superficie foliar de medida fue de  $1,7\text{ cm}^2$ , el nivel de CO<sub>2</sub> de referencia fue 480 ppm, la temperatura de la hoja en la cámara variaba entre 25,7 a 26,8°C, la velocidad del flujo de gas de la hoja en la cámara de medición fue de  $195\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , presión ambiental (1.010 mb) y la densidad del flujo de fotones (energía de la radiación fotosintéticamente activa o PAR)  $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Las medidas se hacían diariamente y siempre a la misma hora y sobre hojas con un desarrollo similar con unas condiciones de luz de  $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 40% de HR y 27°C de temperatura. Las medidas se realizaban siempre en estas condiciones con el fin de eliminar las posibles variaciones debidas al ciclo circadiano de las plantas y no a la condición

experimental. Se utilizaron 6 plantas mutantes y 6 WT para las medidas en plantas control y 6 plantas mutantes y 6 WT para las medidas en estrés salino.



**Figura 16.** Fotografía de medidor portátil de intercambio gaseoso CYRAS-2 utilizado en este trabajo de tesis Doctoral.

### **3.8. Microscopía óptica para determinación densidad y grado de apertura de estomas en plantas sometidas a estrés salino y hojas tras tratamiento con ácido abscísico**

Con unas pinzas cortas de punta fina, se extrajeron entre 8 y 10 tiras de tejido cuticular de la superficie adaxial de la epidermis de las hojas de plantas mutantes y WT, según se describe en Driscoll et al. (2006) (Driscoll *et al.*, 2006). Las tiras epidérmicas se montaron en un portaobjetos y se incubaron en una solución que contenía 60 mM KCl y 10 mM MES a pH de 6,15. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio óptico Olympus SZX PT en campo claro. El procesamiento de las imágenes y los análisis morfométricos se realizaron usando el sistema de análisis digital ImageJ desarrollado por el NIH (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Se contaron

el número de estomas presentes en 5 imágenes digitales seleccionadas aleatoriamente tanto de WT como del mutante.

Para los tratamientos con ácido abscísico (ABA) se incubaron entre 8 y 10 tiras de epidermis mediante inmersión en la solución anteriormente descrita, en una primera fase en ausencia de hormona durante 2 horas, y en una segunda en presencia de la hormona durante 3 horas, a las concentraciones de 1, 2, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Todo el proceso se realizó mediante iluminación artificial controlada (intensidad de radiación PAR de 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). El reactivo ABA utilizado en estos experimentos pertenecía a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.). La determinación de la apertura estomática se hizo por microscopía óptica como se ha descrito en el párrafo anterior.

### **3.9. Análisis espacio-temporal de la expresión del gen delator *uidA* mediante análisis histoquímico de actividad $\beta$ -glucuronidasa**

La expresión del gen delator que constituye la trampa de intensificadores que contiene la cassette de T-DNA de los mutantes insercionales objeto de estudio de esta Tesis es una herramienta muy útil que nos puede permitir inferir el patrón de expresión del gen etiquetado, es decir, afectado por el inserto T-DNA. En este programa de mutagénesis insercional se ha utilizado el gen *uidA* como delator, que codifica para una enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). La actividad de esta enzima se puede detectar espacialmente en órganos y tejidos vegetales mediante un análisis histoquímico.

Para el análisis de la expresión espacio-temporal GUS se ha aplicado el siguiente protocolo (Atarés *et al.*, 2011) Cada una de las muestras de material vegetal a analizar se dispuso en un pocillo de una placa

multipocillos que contenía la solución de tinción GUS con la composición indicada en la **Tabla 6**, y que contiene el sustrato cromogénico ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucurónico (X-Gluc) (Campisi *et al.*, 1999). Se incubaba el conjunto durante 24 h y posteriormente se procede a la degradación de la clorofila (**Figura 17**). Para ello el material vegetal se lava sucesivas veces con etanol, un primer lavado en etanol al 70% y los siguientes con etanol puro hasta que se pierda completamente la clorofila de los tejidos. Cuando está suficientemente lavado la muestra se almacena en una solución de glicerol al 20%. Se examina la tinción GUS con un estereomicroscopio SMZ1500 (Nikon, Japón) acoplado a una cámara fotográfica Nikon D70.

**Tabla 6.** Composición de la disolución de tinción utilizada para el análisis histoquímico GUS.

Reactivo GUS	Concentración
Tampón Fosfato pH 7	50 mM
EDTA	10 mM
Triton-X 100	0,5 mg·mL <sup>-1</sup>
Reactivo X-Gluc	1 mg·mL <sup>-1</sup>
FeCN	0,5 mM
Metanol	20%



**Figura 17.** Imagen de preparación de material vegetal para el análisis histoquímico GUS para revelar el patrón de expresión del gen delator

### **3.10. Métodos de biología molecular**

#### **3.10.1. Extracción ADN genómico**

Para la extracción de ADN genómico se ha utilizado el protocolo de Rogers (1985) (Rogers and Bendich 1985) modificado. 0,1 g de material vegetal (hoja) se tomó y congeló en N<sub>2</sub> líquido en un tubo de 1,5 mL. Este material se trituró mediante un pistilo estéril y se le añadió el tampón de extracción (0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS).

Se incubó el conjunto a 65°C durante 5 minutos, y posteriormente se adicionó 150  $\mu$ L acetato potásico 5 M, se agitó la mezcla y se mantuvo incubándose en hielo durante 15 minutos, para ser finalmente centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El ADN que se localiza en el sobrenadante se recogió y se precipitó con isopropanol a -20°C y centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm y 4°C. El precipitado se lavaba varias veces con etanol al 70% a -20°C. Por último se resuspendió el precipitado en agua destilada estéril (25-50  $\mu$ L).

### 3.10.2. Cuantificación de ADN y ARN

La concentración del ADN y ARN extraído se estimó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.) con los valores de absorbancia a 280 y 260 respectivamente. Las relaciones  $DO_{260}/DO_{280}$  y  $DO_{260}/DO_{230}$  se utilizaron para comprobar la calidad del extracto estimando la contaminación de los ácidos nucleicos por proteínas y fenoles por el primer ratio, y por azúcares por el segundo. Se considera que una extracción de ARN es de buena calidad cuando el ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  se encuentra próximo a 2,0 pero no inferior a 1,8 y el  $DO_{260}/DO_{230}$  se encuentran entre 2,0-2,2.

### 3.10.3. Amplificación por PCR

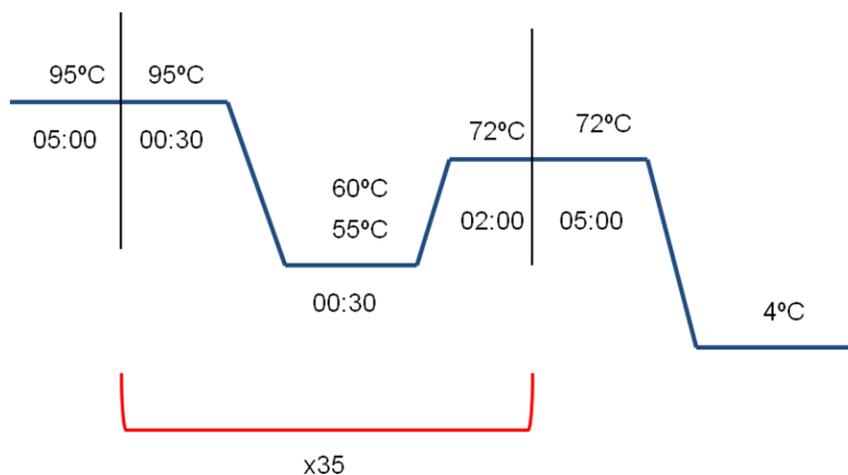
La determinación de la presencia o ausencia de los genes marcador de selección (*nptII*) y delator (*uidA*) en la planta se llevó a cabo mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un termociclador Modelo CG1-96, Marca Corbett Research (Australia), con el fin de amplificar las secuencias correspondientes a los anteriores genes, utilizando cebadores específicos (**Tabla 7**). Para dicha amplificación se utilizó una mezcla de reacción con la composición que se señala en la **Tabla 8**.

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para la amplificación específica de los genes marcador de selección (*nptII*) y delator (*uidA*).

ID Cebador	Secuencia	Amplicón
<i>nptII</i> F	5' -AGCCGAACTGTTCCGCCAG-3	280 bp
<i>nptII</i> R	5' -GAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'	
<i>uidA</i> F	5' -ACTGAACTGGCAGACTATCC-3	800 bp
<i>uidA</i> R	5' -CAATACTCCACATCACCACG-3'	

**Tabla 8.** Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR.

Componente	Volumen	Concentración
Agua destilada-esterilizada	15 µl	
Tampón 10x (con Mg <sup>+2</sup> )	2 µl	1x
dNTP (10 mM)	0,8 µl	400 µM
Cebador A (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Cebador B (20 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Taq polimerasa (5U* µl <sup>-1</sup> )	0,2 µl	1 U
Muestra de ADN	1 µl	< 100 ng/reacción
Volumen de reacción	20 µl	



**Figura 18.** Programa de ciclos de reacción de la PCR. La temperatura de hibridación para *nptII* es 60°C y para *uidA* es 55°C.

### 3.10.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se ha realizado según Sambrook y Russell (2001). Los fragmentos de DNA, procedentes de digestiones con enzimas de restricción o de reacciones de PCR, a partir de gDNA así como de RNA total aislado, se separaron en geles horizontales de agarosa del 0,8-2,0% (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. El tampón utilizado fue el SB (Brody y Kern, 2004) y

los geles se tiñeron con una solución de Bromuro de Etidio ( $50 \mu\text{L}^{-1}$ ) durante 10-15 minutos que posteriormente se expusieron a luz UV para visualizar las bandas. Las muestras de DNA o RNA se prepararon en tampón de carga (sacarosa 8,33% (p/v), Azul de Bromofenol 0,04%, EDTA 0,017 M) para luego cargar en los pocillos del gel (10  $\mu\text{L}$ ). La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a voltaje constante (100 V) durante 60-70 minutos.

El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador comercial (GeneRuler™ 100bp DNA ladder, Thermo Scientific). Los geles de agarosa fueron fotografiados realizó en una estación de análisis de imagen (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

### **3.10.5. Extracción de DNA, RNA y síntesis de DNA complementario para análisis expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real**

Para la extracción de DNA genómico (gDNA) se usa una modificación del protocolo de extracción descrito por Rogers (1985). Se utilizó 0,1 g de material vegetal congelado en  $\text{N}_2$  líquido que se dispuso en un tubo de 1,5 mL y se molió mediante un pistilo estéril. Se le añadió el tampón de extracción (0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS) y la solución se incubó a  $65^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, tras lo cual se añadieron 150 mL acetato potásico 5 M. Se sometió a agitación y se dejó incubar en hielo durante 15 minutos, para finalmente centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El DNA que se localiza en el sobrenadante se recogió y se precipitó con isopropanol a  $-20^\circ\text{C}$ , manteniendo la solución durante 12 horas a  $-20^\circ\text{C}$  y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado se lavó varias veces con

etanol (70%) a -20°C. Por último, se resuspendió el precipitado en agua destilada estéril (25-50 µl).

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 0,1 g de material previamente congelado en N<sub>2</sub> líquido (almacenado a -80°C) con el kit RNeasy® Plant Minikit (Qiagen) utilizando los reactivos e instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN extraído se estimó por espectrofotometría (Nanodrop® Spectrophotometer – Nanodrop Technologies) a una longitud de onda de 260 nm y se comprobó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo los protocolos descritos en el **Apartado 10.5**.

Para la síntesis de cDNA se usó el kit comercial iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BIO-RAD) partiendo de 100 ng de ARN total y siguiendo las especificaciones del fabricante. Utilizándose un termociclador Modelo CG1-96, Marca Corbett Research (Australia).

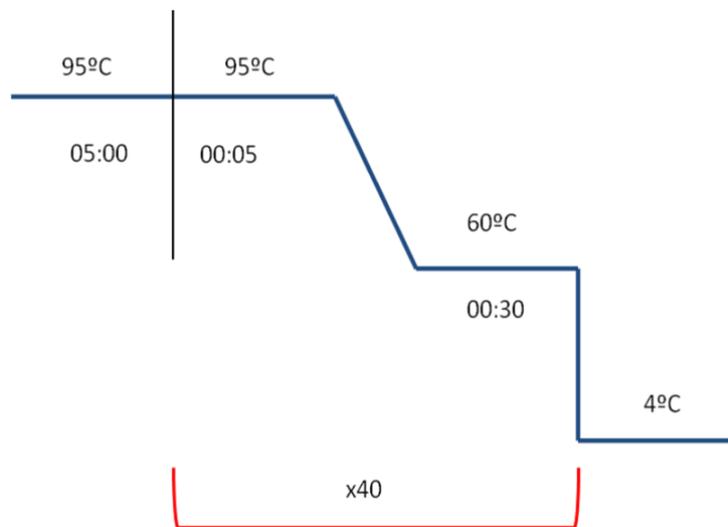
### **3.10.6. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).**

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), con un equipo ROTORGEN 3000 (Qiagen, Holanda). Para ello se utilizó el ADNc obtenido según descrito en el apartado anterior y se hizo uso del kit comercial Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen, Holanda), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción para la amplificación se describe en la **Tabla 7**, y el programa de ciclos para la amplificación se presenta en la **Figura 19**. Consistiendo en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, el annealing a temperatura entre 55°C y 60°C y la elongación a 72°C durante 2 minutos. Este ciclo se repite 35 veces.

**Tabla 7.** Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR

Componente	Volumen	Concentración
Agua RNase-free	9 $\mu$ l	
MasterMix 2x	12,5 $\mu$ l	1x
Cebador A (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Cebador B (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Muestra de ADNC	1 $\mu$ l	< 100 ng/reacción
Volumen de reacción	25 $\mu$ l	

**Figura 19.** Programa de ciclos y de temperatura de reacción de la RT-qPCR.

Una vez concluido la segunda etapa del programa de amplificación se obtuvieron los datos necesarios para cuantificar la expresión de los genes a tiempo real. La expresión relativa del gen se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) que utiliza la siguiente fórmula:

$$-\Delta\Delta Ct = -(-\Delta Ct \text{ problema} - \Delta Ct \text{ control})$$

Donde Ct es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra excede de un valor umbral seleccionado, es decir, el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal asociada con el inicio de la fase exponencial de la señal de fluorescencia y cuyo valor será

inversamente proporcional a la cantidad de ADNc.  $\Delta C_t$  problema corresponde al valor umbral para el mutante y  $\Delta C_t$  control al valor umbral para WT.

Para la normalización y como referencia se utilizó la expresión del gen de tomate EF1 $\alpha$  (Elongation Factor 1 $\alpha$  accesión de GenBank AB061263) y como control negativo se utilizó mezcla de reacción sin añadir ADNc.

Se diseñaron cebadores específicos para la cuantificación de la expresión de los distintos genes de interés a partir de las secuencias de unigenes disponibles para tomate en Sol Genomics Network (<http://solgenomisc.net/>). Todos los cebadores fueron sintetizados por Life Technologies (Madrid, España) y se calculó la eficiencia cada pareja (**Tabla 8**) mediante el método de diluciones seriadas de las muestras para obtener el valor de la pendiente de la recta que resulta de representar Ct/Log Input (Eficiencia =  $10^{-1/\text{slope}} - 1$ )

**Tabla 8.** Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes

Nombre	Secuencia 5'→3'	Amplicon (pb)	Eficiencia
<b>LeEF1<math>\alpha</math>-F</b>	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	119	99,8
<b>LeEF1<math>\alpha</math>-R</b>	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC		
<b>SIMYB2-F</b>	TGTGGGAACATCACAATTCC	80	99,9
<b>SIMYB2-R</b>	TGTTGGAGTCCCTGTTCGATT		
<b>SISOS1-F</b>	TCGAGTGATGATTCTGGTGG	129	107
<b>SISOS1-R</b>	GACGCCTTTCCCACTCTGAT		
<b>SIHKT1.1-F</b>	TCTAGCCCAAGAACTCAAAT	178	107
<b>SIHKT1.1-R</b>	CTAATGTTACAACCTCAAGGAATT		
<b>SIHKT1.2-F</b>	TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG	188	97
<b>SIHKT1.2-R</b>	AGAGAGAACTAACGATGAACC		

### 3.11. Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo aplicando los métodos estandarizados que ofrece el programa informático SPSS 21.0. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (ES) y se

sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar si había diferencias significativas entre medias. En el caso de haberlas se aplicó el test de la LSD (test mínima diferencia mínima) considerando un nivel de confianza de  $p < 0,05$  (5%) para identificar dichas diferencias entre varias medias. En el caso de estudiar si había diferencias significativas entre pares de medias se aplicó el test t de Student considerando también un nivel de confianza de  $p < 0,05$ .



## **Resultados**



## **4. Resultados**

### **4.1. Identificación de mutantes afectados en el desarrollo vegetativo y en la respuesta al estrés salino**

Dentro de un proyecto coordinado que se viene desarrollando desde hace unos años entre los grupos de Mejora Biotecnológica dirigido por el Prof. Vicente Moreno (IBMCP-UPV, Valencia), de Biología Molecular dirigido por el Prof. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y el grupo de Estrés Abiótico del CEBAS, se han generado dos colecciones de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) a partir de los cultivares Moneymaker y P73. El interés de estas colecciones es doble, ya que permiten identificar genes implicados en procesos del desarrollo vegetativo (arquitectura de la planta) y reproductivo (flor y fruto), así como genes implicados en la tolerancia a los estreses salino e hídrico.

La primera parte de este trabajo fue la identificación y preselección de mutantes de interés afectados tanto en el desarrollo como en la tolerancia a salinidad, bien dominantes mediante el fenotipado en la población TG1 (plantas directamente transformadas) o recesivos si el carácter se presentaba en la generación TG2. Para llevar a cabo la identificación de mutantes, las diferentes líneas se cultivaban en condiciones sin estrés y con salinidad, con el objetivo de diferenciar los mutantes afectados en el desarrollo, en la tolerancia a salinidad, o en ambos caracteres. Después de evaluar más de 150 líneas de la colección generada a partir del cv Moneymaker, se preseleccionaron 10 líneas que presentaban diferentes alteraciones en el desarrollo y/o tolerancia a salinidad. Una descripción resumida de estas líneas se presenta a

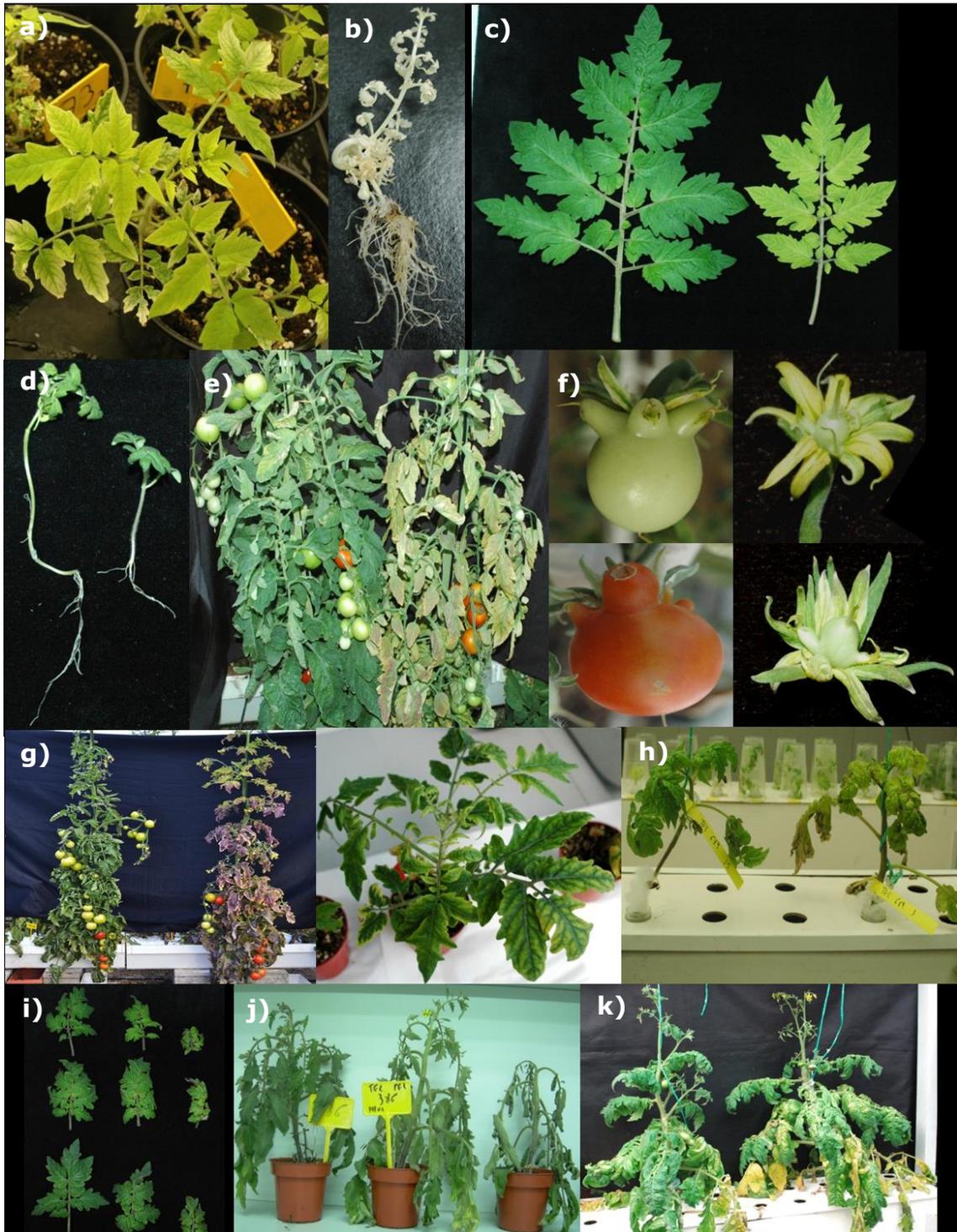
continuación, así como los fenotipos mutantes identificados en cada línea (**Figura 20**).

- 60ETMM. Es un mutante recesivo sensible al frío. Se identificó en la población TG2 en condiciones de cultivo de invierno en invernadero, donde se observó una segregación 3 WT:1Mutante. El mutante presenta un fenotipo antociánico donde se llega a producir una degradación total de la clorofila. Aunque el desarrollo de los frutos era muy pequeño y prácticamente no producían semillas, se consiguió obtener la línea homocigota para la mutación. Esta mutación no está asociada al T-DNA.
- 73ETMM. Es un mutante recesivo que presenta un alto grado de clorosis en sus hojas. Las plantas de fenotipo mutante presentan un retraso en el desarrollo de la parte aérea y raíz debido fundamentalmente a los menores contenidos de clorofila y menor capacidad fotosintética.
- 232ETMM. Este mutante recesivo se seleccionó inicialmente por ser completamente albino. *In vivo*, la mutación era letal al estadio de cotiledón, e *in vitro* se mantenía el desarrollo del mutante mediante su cultivo en un medio MS enriquecido con sacarosa. Sin embargo, también se observó que el mutante segregaba para tolerancia a la salinidad. La caracterización de este mutante se ha realizado por otro miembro del grupo.
- 254ETMM. Las características fenotípicas de este mutante eran muy similares a las del mutante anterior, mutante albino y letal al estado de cotiledón, y también mantenía el desarrollo en un medio MS enriquecido en sacarosa.

- 259ETMM. Es una mutación recesiva, con una segregación 3 WT:1M, con hojas semicloróticas pero que revertían a fenotipo WT cuando las plantas se desarrollaban en sal. La mutación no está asociada al T-DNA.
- 309ETMM. Es una mutación dominante que muestra un menor desarrollo vegetativo, y especialmente se reduce el desarrollo radicular. Debido probablemente al menor desarrollo radicular, el mutante parece ser tolerante al estrés iónico inducido por la salinidad, ya que el mutante acumula menos Na<sup>+</sup> en sus hojas que el WT.
- 386ETMM. Es un mutante recesivo con alta sensibilidad a la salinidad y a la sequía, aunque también segrega para desarrollo, ya que en la población segregante TG2 había plantas con pérdida de dominancia apical.
- 388ETMM. Se identificó como un mutante de sensibilidad a la sal en TG2.
- 560ETMM. Es un mutante recesivo de desarrollo. El fenotipo mutante muestra un alto grado de degradación de clorofila y senescencia foliar en cultivo de verano, mientras que en cultivo de invierno predomina en el fenotipo mutante un alto nivel de antocianos. El mayor interés de este mutante es que el fenotipo mutante parece revertir al menos parcialmente con el estrés salino.
- 619ETMM. Es un mutante recesivo de desarrollo reproductivo. El fenotipo mutante se caracteriza por alteraciones en los estambres, produciéndose engrosamiento e incluso la maduración de los mismos.

## Resultados

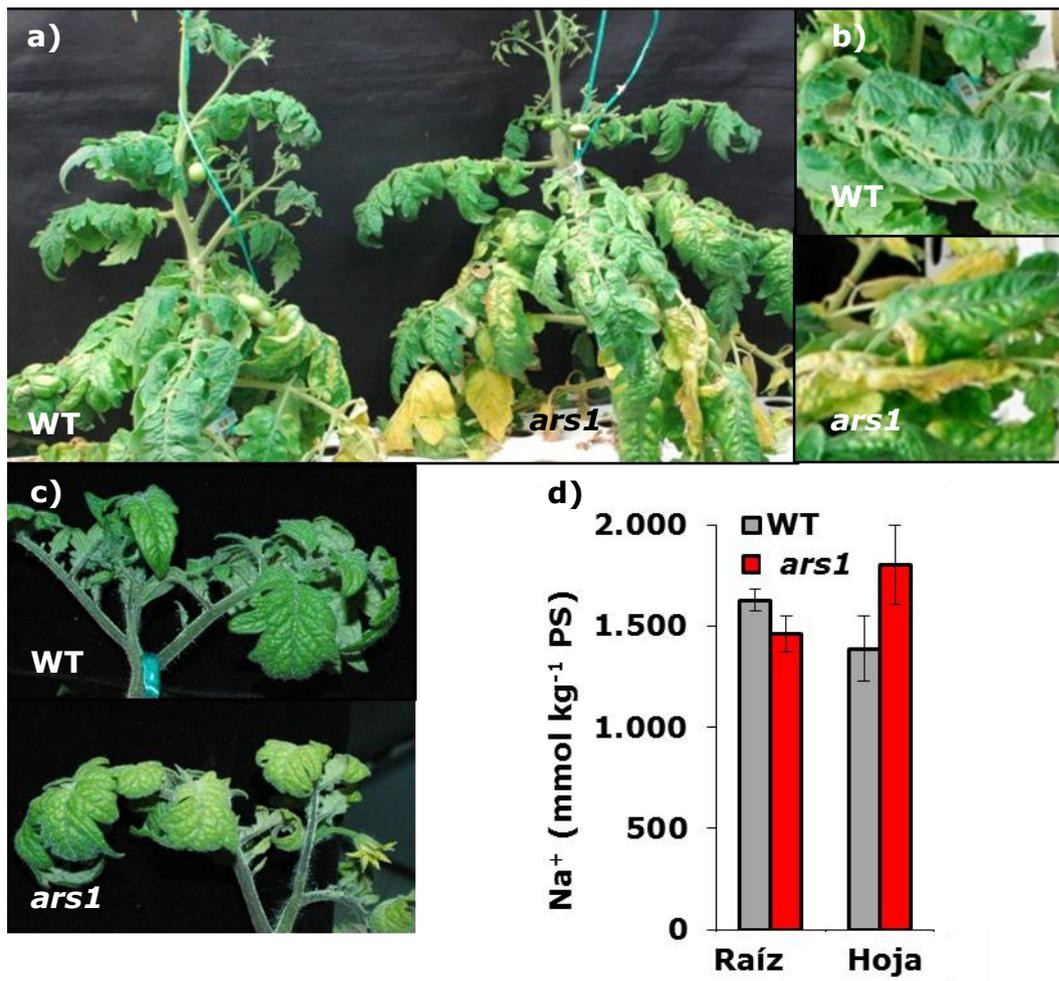
Además de las líneas indicadas anteriormente, también se identificó dentro de la colección de líneas T-DNA de Moneymaker el mutante 374 ETMM que mostraba sensibilidad a la salinidad. Este mutante se ha seleccionado en este trabajo para llevar a cabo su caracterización.



**Figura 20:** Fenotipo de las líneas T-DNA preseleccionadas por presentar alteraciones en el desarrollo y/o tolerancia a salinidad dentro de la colección generada a partir del cv Moneymaker. a) 73ETMM: línea clorótica. b) 232ETM: línea albina con letalidad al estadio de cotiledón que pueden crecer *in vitro* con suplementación de sacarosa. c) 259ETMM: mutante clorótico que revierte parcialmente su fenotipo en presencia de NaCl. d) 309ETMM: mutante con un porte pequeño y una reducción del 70% en el crecimiento de la raíz. e) 560ETMM: mutante con adelanto en la senescencia de las hojas e incremento en su contenido en antocianos (derecha). f) 619ETMM: mutante con engrosamiento y maduración de los estambres. g) 60ETMM: línea antocianótica como respuesta a estrés por frío. Invernadero (fotografía de la izquierda) y maceta (fotografía de la derecha). h) 698ETMM: mutante hipersensible a sal (derecha). i) 388ETMM: línea con caracteres de sensibilidad a la sal en hoja. j) 386ETMM: mutante recesivo para salinidad y déficit hídrico (derecho). k) 374ETMM: mutante *altered response to salt stress 1* (*ars1*) sensible a salinidad y déficit hídrico (derecha).

#### **4.2. El mutante *ars1* (*altered response to salt stress 1*) identifica un factor de transcripción MYB.**

El mutante 374 ETMM se identificó en la primera generación (TG1). El fenotipado en medio salino se realizó en plantas WT y mutante desarrolladas en cultivo hidropónico, y cuando las plantas tenían 8 hojas completamente desarrolladas, se aplicó el tratamiento salino (200 mM de NaCl) durante 20 días. Las plantas mutantes mostraban mayor grado de enrollamiento en sus hojas, pérdida de clorofila e incluso necrosis (**Figura 21**), lo que indica mayor sensibilidad a la sal que el WT. En base a su fenotipo en medio salino, se denominó *ars1* (*altered response to salt stress 1*). Además, la sensibilidad del mutante parecía estar asociada a una mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en hoja. Así, las concentraciones de Na<sup>+</sup> en raíz eran similares en WT y mutante después de 14 días de tratamiento, mientras que la concentración de Na<sup>+</sup> en hoja incrementaba significativamente en el mutante, respecto a WT (**Figura 21 d**)).



**Figura 21:** Identificación del mutante sensible a la sal en TG1. Tanto las plantas mutantes (*ars1*) como las Wild Type (WT) se cultivaron en hidroponía (solución Hoagland  $\frac{1}{2}$ ) y el estrés salino (200 mM) se impuso durante 20 días cuando las plantas tenían ocho hojas verdaderas. a) Fenotipos que aparecen en las plantas WT (izquierda) y mutantes (derecha) al final del experimento. La sensibilidad del mutante a la sal se observa en la necrosis de las hojas adulta (b) y en el enrollamiento y la clorosis de las hojas jóvenes (c), al compararlas con WT. d) La concentración de sodio se analizó en las raíces y en las hojas jóvenes después de 14 días de tratamiento salino (medias  $\pm$  SE de 6 réplicas).

Debido al interés que parecía mostrar el mutante, la etapa siguiente fue obtener las siguientes generaciones (TG2 y TG3). Se utilizó el gen marcador *nptII* para identificar las plantas sensibles a kanamicina (acigotas), y tolerantes a kanamicina, donde estaban incluidas las heterocigotas y homocigotas. Finalmente se identificó en TG3 una línea

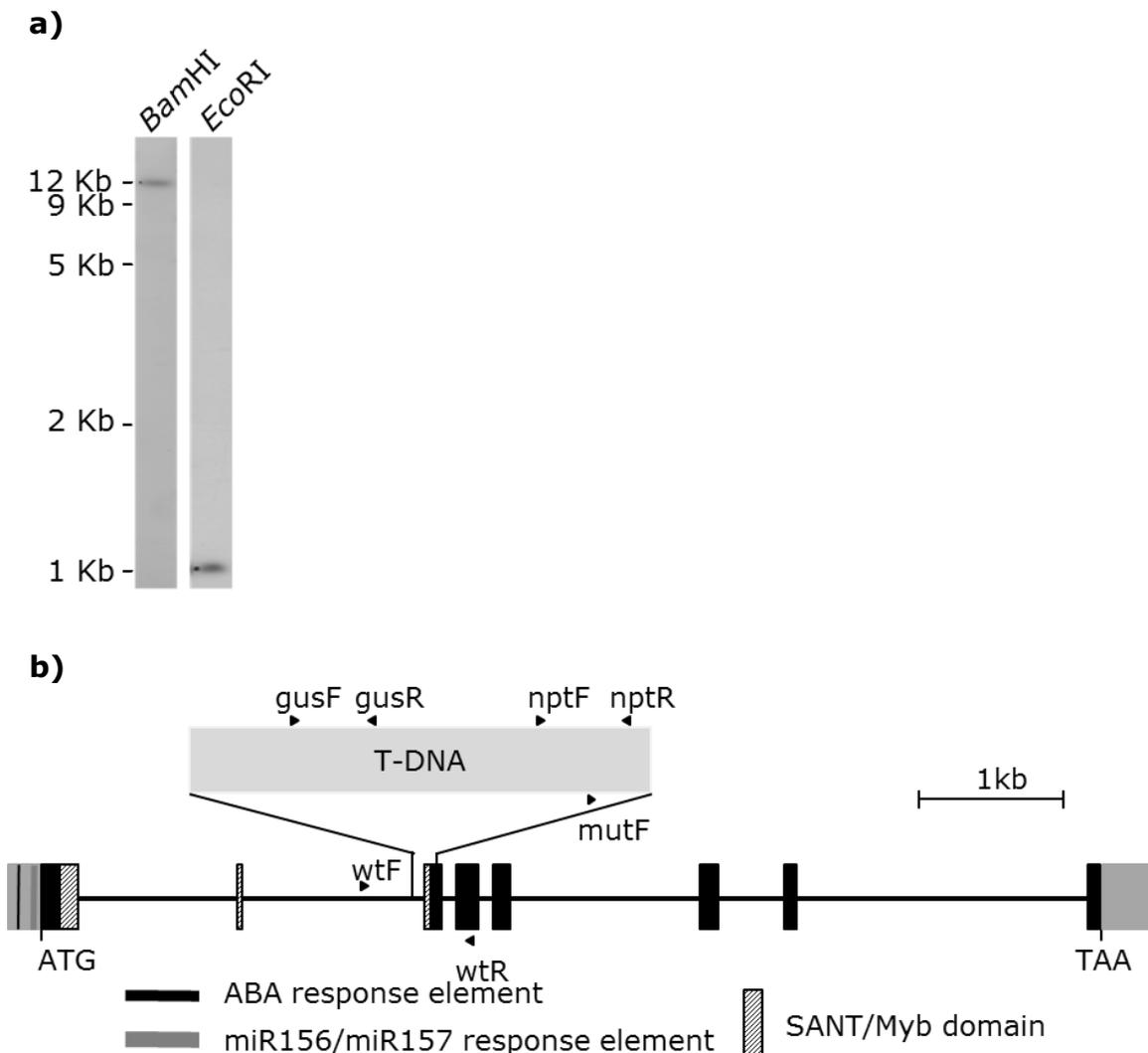
homocigota para fenotipo y tolerante a kanamicina (línea 374-9 ETMM), con la que se han llevado a cabo todos los experimentos de caracterización del mutante.

Simultáneamente, el grupo de la UAL inició la caracterización molecular del mutante *ars1*. El número de insertos de T-DNA presentes en el genoma del mutante sensible a la salinidad se determinó mediante la técnica de Southern Blot utilizando el gen *nptII* como sonda de marcaje. Para ello, se utilizó DNA de la línea TG1 obtenida directamente del evento de transformación. Esta técnica de análisis molecular identificó que existía una única copia de la construcción T-DNA en el genoma del mutante *ars1* (**Figura 22 a**). Mediante Anchor-PCR, el grupo de la UAL clonó las secuencias flanqueantes a la inserción del T-DNA, y estas secuencias se compararon con las secuencias del genoma del tomate disponible actualmente en la base de datos de SOL GENOMICS NETWORK ([www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net)). Los resultados revelaron que el T-DNA está localizado en el cromosoma 1 e insertado entre el segundo intrón de un gen que codifica para un factor de transcripción del tipo MYB-like (Solyc01g095030.2, SGN-U581870), aproximadamente 3 Kb aguas abajo desde el posible sitio de inicio de la transcripción. Además, un fragmento de 102 pb localizado entre la parte final del segundo intrón y la parte inicial del tercer exón había sido eliminado durante la mutagénesis por T-DNA.

El gen etiquetado tiene 7781 pb y está formado por 8 exones que se transcriben en un mRNA de 1545 pb que contienen un único marco abierto de lectura de 996 pb. Codifica una proteína cuya estructura primaria es de 331 aminoácidos, que contiene un dominio de unión a DNA localizado entre

## Resultados

los aminoácidos de la posición 66 y la 116 y con gran similitud con el dominio de la clase SHAQKYF (pfam00249) o SANT (smart00717). A través de la plataforma Tagger Prediction del Tomato Functional Genomics Database ([www.ted.bti.cornell.edu](http://www.ted.bti.cornell.edu)) se realizó el análisis de la secuencia genómica de *ARS1* identificándose la presencia de un posible elemento de respuesta a miR156/miR157 en la región 5' UTR del gen, localizado a 68 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y de un posible elemento de respuesta a ABA, localizado también en la misma región genómica (**Figura 22 b**).



**Figura 22:** Caracterización genética y molecular del mutante de tomate *ars1*. a) Southern blot para detectar la presencia del T-DNA utilizando el gen *nptII* como sonda en la planta TG1. La presencia de un solo fragmento de restricción de nueve kilobases al utilizar la enzima de restricción *Bam*HI y de una kilobase, con *Eco*RI (1Kb) nos indica la existencia de una única inserción de T-DNA en el genoma del mutante *ars1*. b) Organización genómica del gen *ARS1* y posición del inserto de T-DNA en el genotipo de *ars1*. Los exones se representan como cajas de color negro y los intrones como una raya horizontal. Las cajas rayadas representan secuencias con una gran homología con dominios SANT y MYB. Las cabezas de flecha indican los lugares de anealing de los cebadores utilizados para la caracterización del mutante. En el extremo 5' (caja verde izquierda) aparece una region no traducida de elementos de respuesta a ABA (línea negra vertical) y a miR156/miR157 (línea negra discontinua).

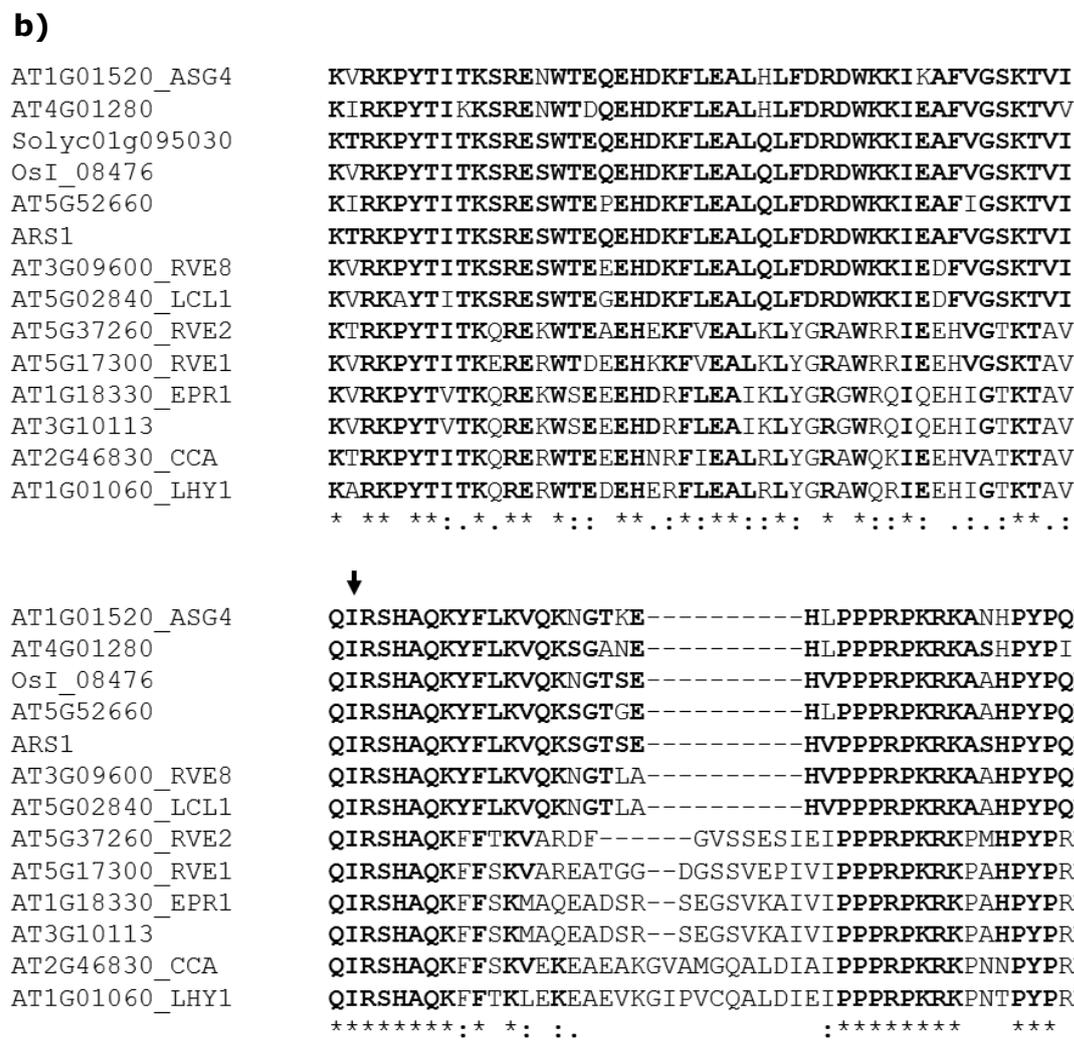
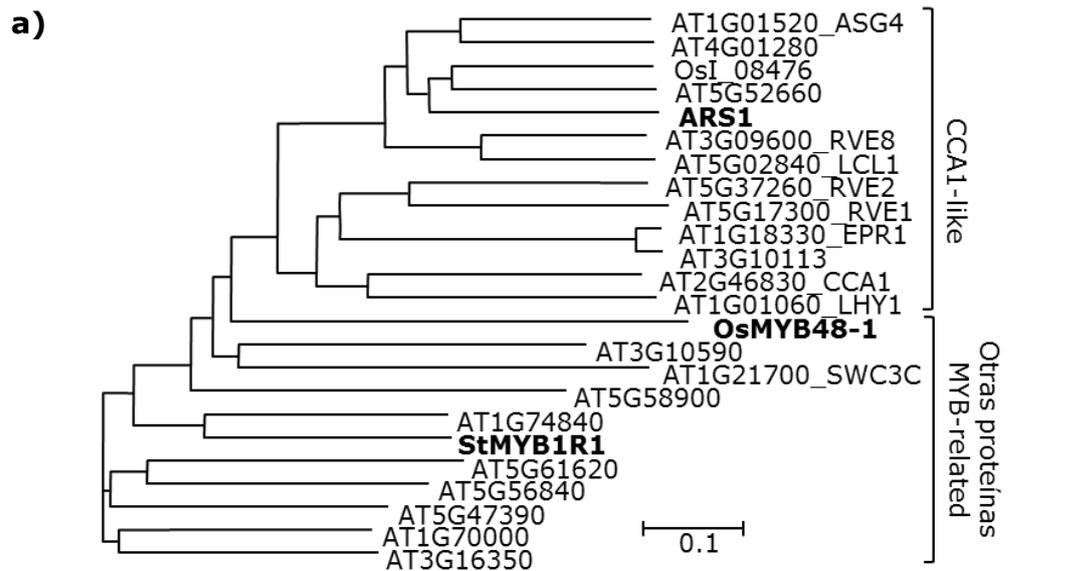
La comparación de la proteína codificada por *ARS1* con la información disponible en bases de datos de proteínas dio como resultado que presentaba una gran similitud con otras plantas cuyas proteínas poseían dominios SHAQKYF/MYB-like. Y en concreto con otros miembros de la familia Solanaceae tales como *Cestrum nocturnum* y *Nicotiana tabacum*. El estudio filogenético de *ARS1* y de todas las proteínas MYB identificadas en *Arabidopsis*, indicaron que la proteína con mayor homología con *ARS1* era AT5G52660 que presentaba un 54% de identidad de secuencia y un 64% de similitud de secuencia (**Figura 23 a**). Esta proteína de *Arabidopsis* se había clasificado dentro de la subfamilia CCA1 like de proteínas relacionadas con MYB. Además de estar relacionada filogenéticamente con proteínas MYB de *Arabidopsis*, *ARS1* presentaba gran homología con OsI\_08476. Esta última es una proteína MYB de arroz que forma una agrupación específica con AT5G52660, cuando ambos son analizados filogenéticamente (**Figura 23 b**). La elevada coincidencia en la homología de los dominios conservados de las proteínas de tipo CCA1-like, incluyendo *ARS1* de tomate y OsI\_0876CC de arroz, se ha comprobado tras múltiples alineamientos

## Resultados

entre dominios MYB-like y dominios adyacentes ricos en fósforo característicos de las proteínas que pertenecen a esta agrupación filogenética.

Finalmente, se comprobó si había co-segregación fenotipo – genotipo mediante el análisis fenotípico y genético de 14 plantas TG2 de la población segregante desarrolladas en estrés salino (200 mM NaCl) durante 20 días. El genotipado era analizado por PCR con los cebadores específicos del gen *ARS1* y del T-DNA (Tabla 3). La segregación fenotípica corroboraba que la mutación era dominante, obteniendo una segregación fenotípica de 11 individuos con fenotipo mutante y 3 con fenotipo WT ( $\chi^2_{1gl} = 0,10$ ,  $P < 0,001$ ). Estos datos de segregación fenotípica se correlacionan con el genotipo de las plantas TG2, obteniéndose 3 plantas azigotas, 8 hemizigotas y 3 homocigotas (**Figura 24 a**).

El fenotipo mutante era similar al que se había observado anteriormente en TG1, aunque en este ensayo las plantas se cultivaron en sustrato de turba, donde la velocidad de absorción de la solución salina es menor que en el ensayo con TG1 realizado en cultivo hidropónico. Así, a los 12 días de tratamiento se observó mayor enrollamiento de las hojas en las plantas homocigotas, comparadas con las azigotas, y una mayor clorosis a los 20 días de tratamiento (**Figura 24 b**). Estos resultados confirman que el gen etiquetado e interrumpido por el T-DNA es el responsable del fenotipo mutante.



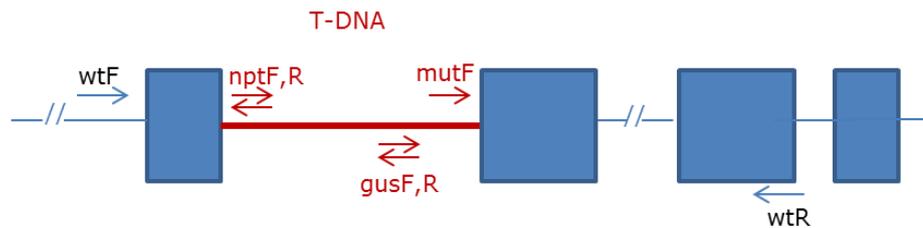
**Figura 23:** a) Árbol filogenético utilizando MEGA5 y alineamiento con Clustal-X. En negrita se destacan proteínas de tipo R1 implicadas en resistencia a estrés salino tanto en arroz como en patata. Todas las proteínas que forman parte del grupo de

## Resultados

CCA1-like se localizan agrupadas en el mismo clado, incluyéndose la proteína ARS1 (en negrita). La escala indica el tanto por ciento de sustituciones. b) Alineamiento múltiple de la secuencia conservada del MYB-like y de los dominios adyacentes ricos en P de las proteínas CCA1-like que aparecen en la gráfica a). La flecha indica el lugar donde el T-DNA cambia el marco de lectura de ARS1, provocando un cambio en la traducción que produce 3 nuevos residuos aminoacídicos (VVC) y un codón de parada antes del dominio SHAQKYF.

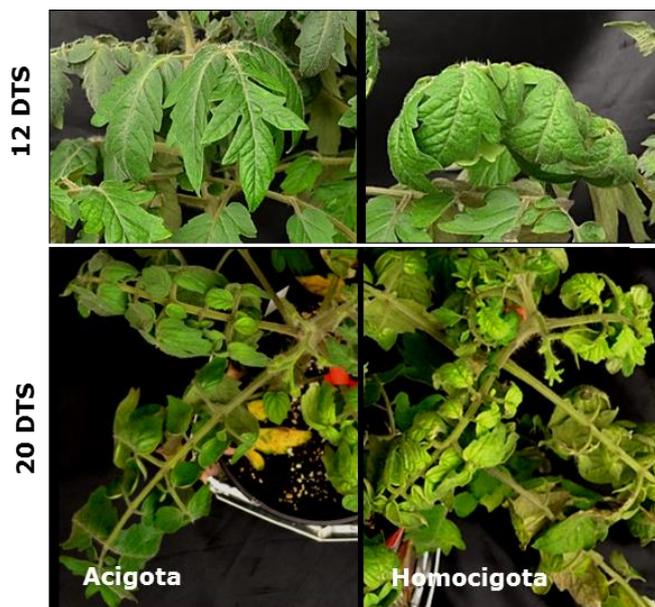
En base a los resultados obtenidos en TG1, en este ensayo se consideró interesante analizar la acumulación de Na<sup>+</sup> en la 2<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada de cada una de las plantas TG2 (**Figura 24 c**)). La concentración de Na<sup>+</sup> en hoja también cosegrega con el genotipo de las plantas TG2 (Tabla 3), como se observa al calcular los valores medios de Na<sup>+</sup> en las plantas azigotas (similares al WT), hemizigotas (incrementa un 50%) y homocigotas (incrementa un 100%).

a)

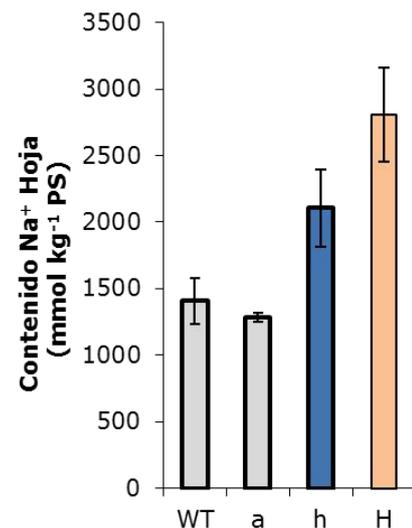


Cebador	H <sub>2</sub> O	WT	<i>ars1</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Wt 1	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Mut 2	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>nptII</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
GUS	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Genotipo	-	a	H	a	H	a	h	h	h	h	a	H	h	h	h	h	H

b)



c)

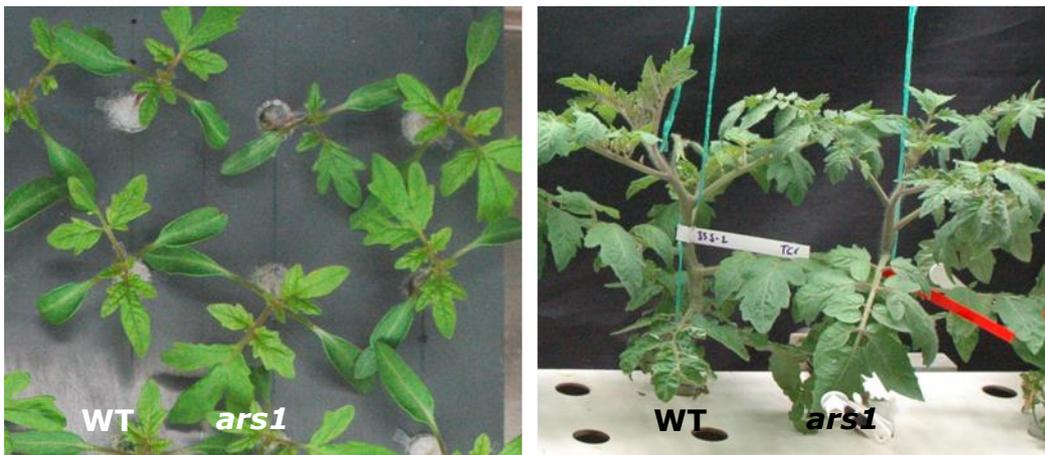


**Figura 24:** Análisis de co-segregación fenotipo-genotipo de plantas TG2 cultivadas en presencia de NaCl (200 mM) durante 20 días. a) El genotipado de 14 plantas TG2 se realizó por PCR utilizando los primers específicos para *ARS1* y el T-DNA. Acigotas (a), hemicigotas (h) y homocigotas (H). b) Las plantas homocigotas muestran mayor enrollamiento en las hojas después de 12 días de tratamiento salino y un incremento de la clorosis a los 20 días de tratamiento. c) La sensibilidad del mutante *asr1* estaba asociada a la elevada acumulación de Na<sup>+</sup> en la hoja tras 20 días de tratamiento salino. Se presentan los valores medios ± ES de 14 plantas WT, 3 acigotas, 8 hemicigotas y 3 homocigotas.

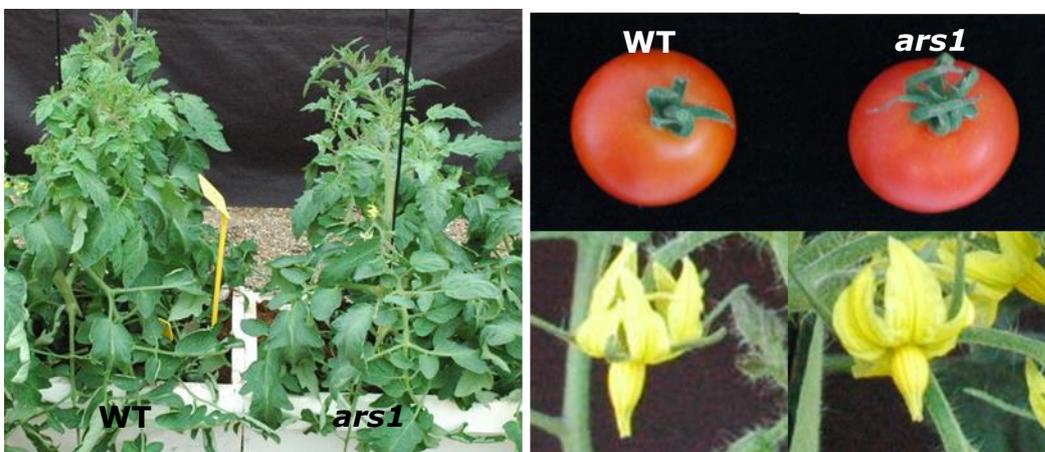
### 4.3. Fenotipo del mutante *ars1* en condiciones sin estrés

La caracterización fenotípica del mutante en condiciones sin estrés (control) se ha realizado a diferentes estados de desarrollo, desde el estado de plántula hasta completar el ciclo vegetativo (**Figura 25**), tanto en cámara de condiciones controladas como en invernadero. El mutante *ars1* muestra un fenotipo similar al del WT en todas las condiciones y estados de desarrollo vegetativo. Respecto al desarrollo reproductivo, el mutante tampoco presentaba ninguna alteración debido a la anulación del gen *ARS1*, tal como se demuestra en las fotos representativas de las flores y frutos de WT y mutante (**Figura 25 b**).

a)



b)



**Figura 25:** El desarrollo vegetativo y reproductivo no está alterado en el mutante nulo *ars1* cuando las plantas se desarrollan sin estrés. a) Desarrollo vegetativo en condiciones controladas. b) Desarrollo vegetativo y reproductivo en condiciones naturales (invernadero).

#### **4.4. Caracterización del mutante *ars1* a la salinidad**

Para llevar a cabo la caracterización del mutante, se realizó un experimento con plantas WT y la línea homocigota (TG3) del mutante en invernadero. El tratamiento salino (100 mM NaCl) se aplicó cuando las plantas tenían 10 hojas desarrolladas. El estrés salino provocaba clorosis en las hojas del mutante a los 30 días de tratamiento (DTS), y estos efectos aumentaban hasta necrosis y senescencia de las hojas a los 60 DTS (**Figura 26 a**). El rendimiento en fruto se estimó mediante varias recogidas semanales, observando que no hay diferencias entre WT y mutante en condiciones sin sal, mientras que el mutante reducía significativamente su producción en condiciones salinas (**Figura 26 b**). La reducción del rendimiento en el mutante se debía principalmente al número de frutos, ya que se reducía un 45% respecto al WT, mientras que en el peso medio solo se observó una tendencia a decrecer en el mutante que no llegaba a ser significativa.

##### **4.4.1 Análisis de la expresión espacial del gen *ARS1*.**

El patrón de expresión espacial del gen se analizó por RT-qPCR en tejidos vegetativos y reproductivos de plantas WT y mutante desarrolladas sin y con sal durante 7 DTS (**Figura 26 c**). Las partes de la planta analizadas fueron: raíz, la 3ª hoja completamente desarrollada, flores en antesis y frutos verdes. La expresión del gen *ARS1* no se detectó en ninguno de los órganos analizados del mutante, indicando que el mutante *ars1* es un mutante nulo, tal como se esperaba de acuerdo con los cambios en la

secuencia de la proteína ARS1 inducida por la inserción del T-DNA (**Figura 22 b**)).

En WT, los niveles de expresión eran similares en los diferentes órganos analizados de las plantas control, excepto en flores, donde la expresión del gen *ARS1* era alrededor de ocho veces mayor que en los órganos restantes. En medio salino, la expresión del gen solo incrementaba significativamente en hoja, mientras que en los restantes órganos los niveles eran similares en control y sal.

#### **4.4.2. Caracterización fisiológica**

En este experimento se analizaron los cambios en la acumulación de  $\text{Na}^+$  y conductancia estomática ( $g_s$ ) de la hoja, medida indicativa de la pérdida de agua por transpiración, a lo largo del periodo de tratamiento salino. Tal como se observó en los ensayos llevados a cabo en TG1 y TG2, la acumulación de  $\text{Na}^+$  era mucho mayor en la línea homocigota del mutante que en el WT después de 30 y, especialmente, 50 DTS (**Figura 26 d**)).

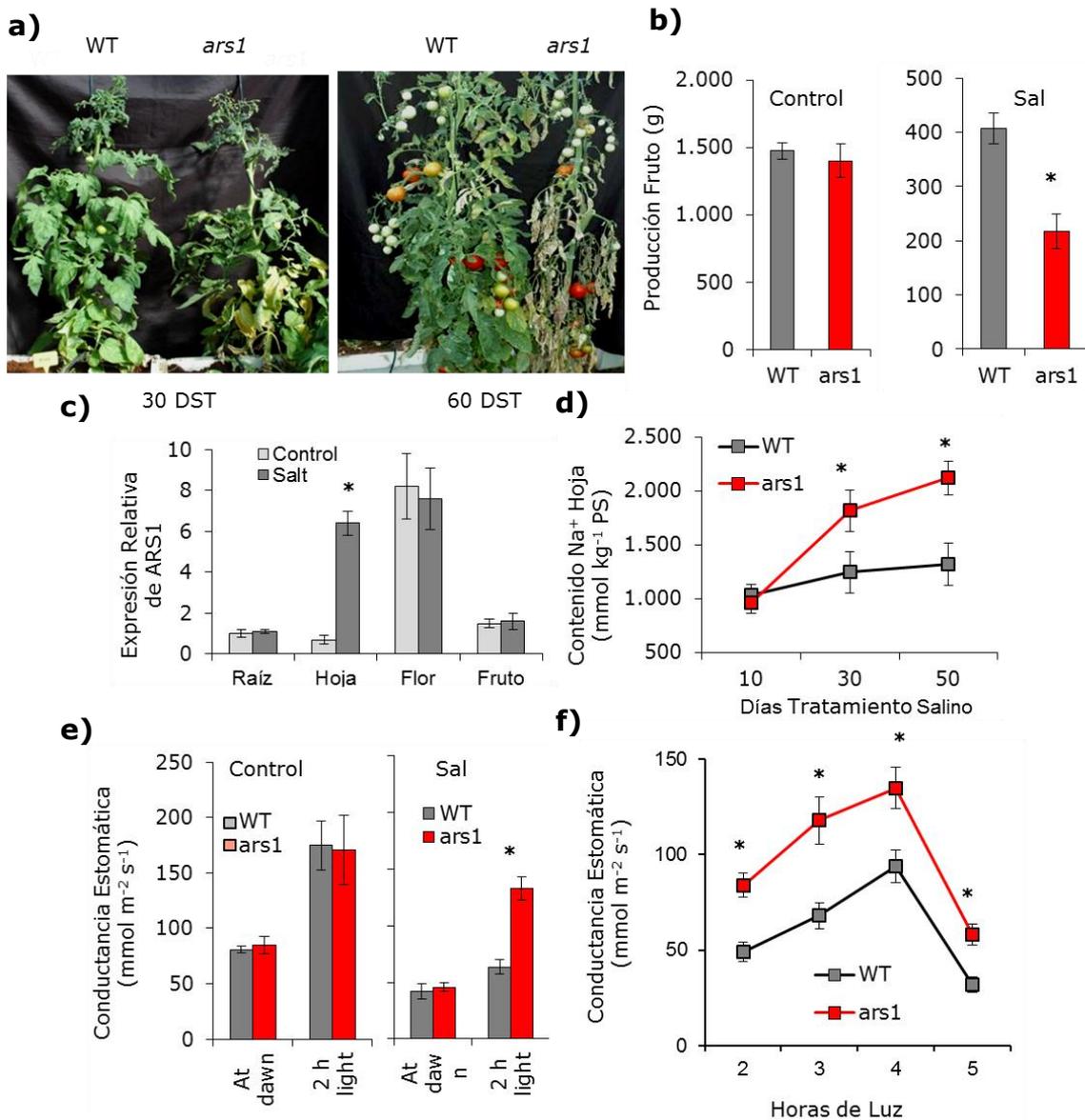
A los 30 DTS, se tomaron medidas de  $g_s$  al amanecer y después de 2 h de luz, puesto que  $g_s$  varía a lo largo del periodo de luz y los estomas tienden a cerrar durante la noche y abrir durante el día (**Figura 26 e**)). En ambas condiciones, control y sal, las hojas de las plantas WT y mutante tenían valores de  $g_s$  similares al amanecer, lo que indica que el mutante cierra los estomas a la misma extensión que el WT en oscuridad. Sin embargo, después de 2 h de luz, los valores de WT y mutante eran similares solo en control pero no en sal, donde se duplicaba el valor de  $g_s$  en el mutante respecto al WT. Las diferencias entre los valores de  $g_s$  en WT y mutante se mantenían a los 50 DTS, como se muestra en la evolución de

$g_s$  entre 2 y 5 h de luz (**Figura 26 e**). Según estos resultados, la desregulación estomática observada en el mutante es provocada por la salinidad, y además parece ser independiente del ciclo circadiano de la planta.

Finalmente, se analizó la densidad estomática en hojas procedentes de plantas control y sal, puesto que  $g_s$  es dependiente del número de estomas. No hay diferencias significativas entre WT y mutante ni en las hojas control ni en las procedentes de plantas desarrolladas en sal (**Tabla 9**), lo que indica que el incremento en  $g_s$  encontrado en el mutante en medio salino no se debe a las diferencias en el número de estomas entre WT y mutante, sino más bien a la extensión a la que el mutante abre sus estomas en estrés.

**Tabla 9:** Densidad estomática ( $\text{mm}^{-2}$ ) en las hojas del mutante *ars1* y del WT, tanto en control como en salinidad (100 mM). Las mediciones de cada genotipo y condición se desarrollaron en cinco muestras de diferentes hojas recogidas de tres plantas distintas. Los valores se expresan como media  $\pm$  SE, sin que se encontraran diferencias significativas.

Genotipo	Control	Sal
WT	235,17 $\pm$ 23,48	204,33 $\pm$ 14,65
<i>ars1</i>	269,18 $\pm$ 21,65	254,90 $\pm$ 22,80



**Figura 26:** El mutante con anulación de función *ars1* muestra sensibilidad a la sal en un experimento a largo plazo. El estrés salino (100 mM) se aplicó cuando las plantas tenían diez hojas verdaderas. a) Las fotos son representativas del fenotipo aparecido en ocho plantas por tratamiento desde el primer mes hasta el segundo. b) Rendimiento en fruto de la línea WT y de *ars1* tanto en control como en sal al final del experimento. c) Respuesta de la expresión espacial del gen *ARS1* en diferentes órganos de la planta tras 7 días de crecimiento en sal y en control. (Raíces, la tercera hoja completamente desarrollada, flores en antesis y Frutos verdes). d) Evolución de la concentración de Na<sup>+</sup> en las hojas de WT y del mutante durante los primeros 50 días. e) Conductancia estomática medida en las hojas de WT y de *ars1* tanto en control como tras 30 días en tratamiento salino. Las

mediciones se realizaron al amanecer y 2 horas después. f) Evolución de la conductancia estomática entre las 2 y 5 primeras horas de la mañana. Se utilizaron plantas de WT y *ars1* que habían crecido en condiciones control y otras que llevaban 50 días en sal. Los valores representan la media  $\pm$ SE de ocho plantas por líneas y tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y el estrés o entre las plantas del mutante y WT ( $P < 0.05$ ).

#### **4.5. Cambios fisiológicos implicados en la sensibilidad a la sal del mutante *ars1***

Los resultados fisiológicos a largo plazo mostraban que tanto la homeostasis iónica como la osmótica estaban alteradas en el mutante, pero no se podía precisar si ambos procesos eran independientes, o bien si la alteración de uno de ellos provocaba los cambios en el otro, es decir si la alteración del transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea en el mutante estaba afectando al cierre estomático, o era más bien a la inversa, si el menor cierre estomático del mutante en condiciones salinas inducía un mayor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea vía transpiración. Con el objetivo de dilucidar cuál es el principal cambio fisiológico responsable del fenotipo mutante, se realizó un experimento en cultivo hidropónico, donde la velocidad de absorción y transporte de iones es muy alta. El tratamiento salino (200 mM NaCl) se aplicó cuando las plantas habían desarrollado 10 hojas verdaderas con el fin de analizar la distribución de  $\text{Na}^+$  a lo largo de la parte aérea.

##### **4.5.1 Análisis de la expresión temporal del gen *ARS1*.**

En primer lugar, se analizó la expresión temporal del gen en hojas de plantas WT durante 7 DTS (**Figura 27 a**). Los niveles de transcritos incrementaban significativamente desde el primer día de tratamiento salino y alcanzaban un nivel incluso mayor después de 7 DTS, lo que pone de manifiesto que la expresión de *ARS1* no solo se induce durante las primeras

fases de estrés salino, sino que se mantiene al aumentar el periodo de tratamiento (Tabla 3).

#### **4.5.2 Cambios inducidos por la salinidad en la apertura estomática**

Con el objetivo de comprobar si las alteraciones de  $g_s$  y transpiración (E) en el mutante tenían lugar desde la imposición del estrés, en este ensayo se analizaron ambos parámetros después de solo 1 DTS (**Figura 27 b**). Mientras que en condiciones control no había diferencias entre WT y mutante, en medio salino los valores de  $g_s$  y E eran significativamente mayores en el mutante que en WT.

En base a estos resultados, se midió la apertura estomática y el número de estomas abiertos en hojas de plantas WT y mutante desarrolladas en control y estrés salino durante 3 y 7 DTS (**Figuras 27 c** y **d**). Mientras que los valores de apertura estomática eran similares en WT ( $11,48 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) y mutante ( $11,76 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) en condiciones control, la salinidad inducía un incremento de la apertura estomática en el mutante a los 3 DTS y esta diferencia se mantenía a los 7 DTS. Además, el porcentaje de estomas abiertos era entre 3 y 4 veces mayor en el mutante que en el WT después de 3 y 7 DTS. Estos resultados corroboran que la sensibilidad del mutante está relacionada con una menor capacidad para cerrar los estomas en respuesta al estrés salino, como se observa en la Figura 27 d).

#### **4.5.3 Cambios inducidos por la salinidad en las concentraciones de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$ .**

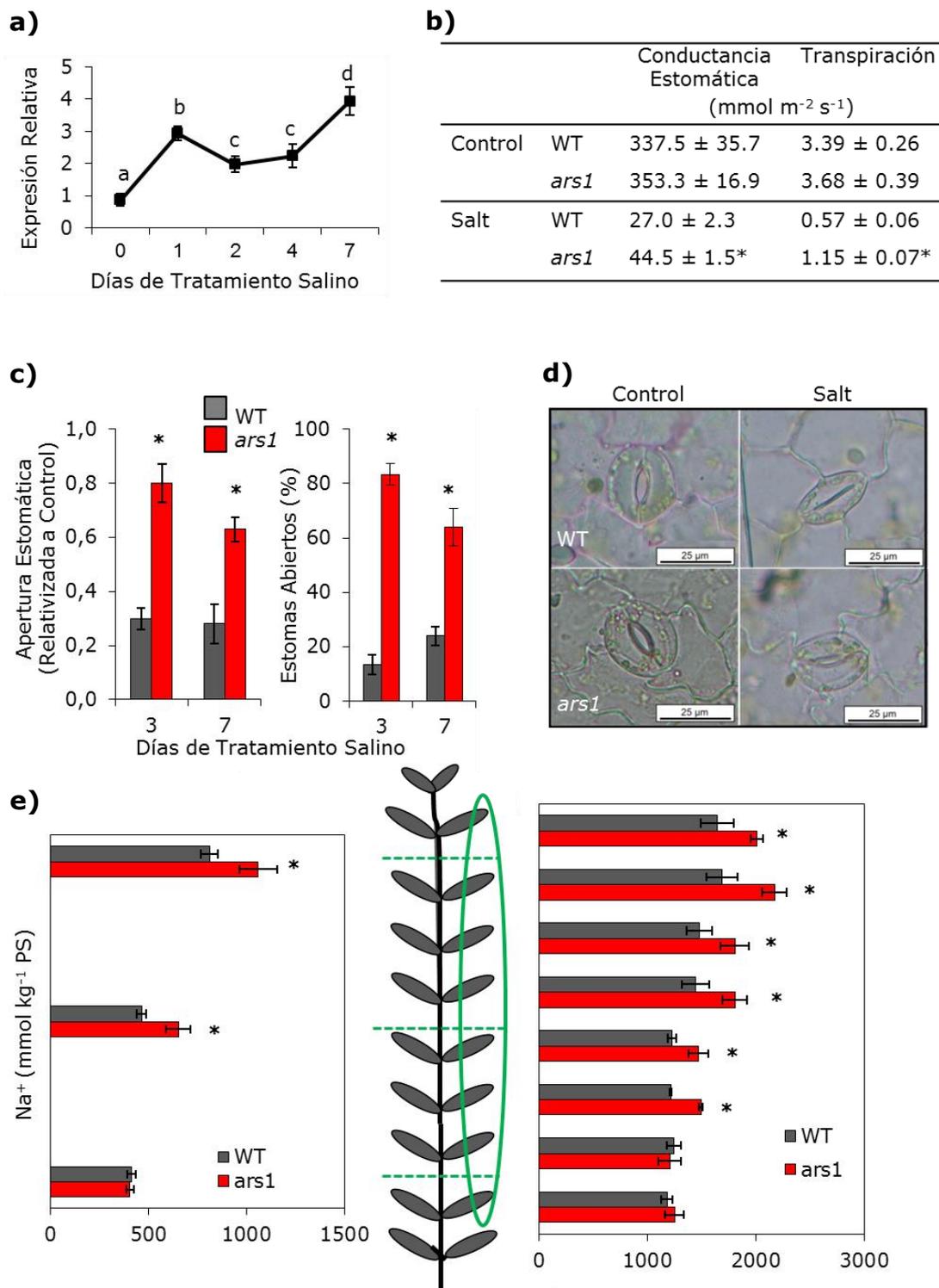
Puesto que la mayor apertura estomática del mutante podría estar provocando un mayor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, se analizó la distribución de  $\text{Na}^+$  en las plantas después de 10 DTS (**Figura 27 e**). En

raíces, no había cambios significativos en la concentración de  $\text{Na}^+$  de WT y mutante ( $2260 \pm 55$  y  $2179 \pm 174$  mmol  $\text{kg}^{-1}$  PS, respectivamente). Sin embargo, la concentración de  $\text{Na}^+$  incrementaba en el tallo medio y superior del mutante, respecto a WT, y esta mayor acumulación en el tallo iba acompañada de una mayor acumulación en las hojas medias y, especialmente, en las superiores.

A pesar de la alta acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas del mutante, sin embargo no había cambios significativo en las concentraciones de  $\text{K}^+$ , y por tanto los cambios en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se debían principalmente a  $\text{Na}^+$ , aunque solo se alcanzaban diferencias significativas en algunas de las hojas analizadas (**Figuras 28 a) y b)**).

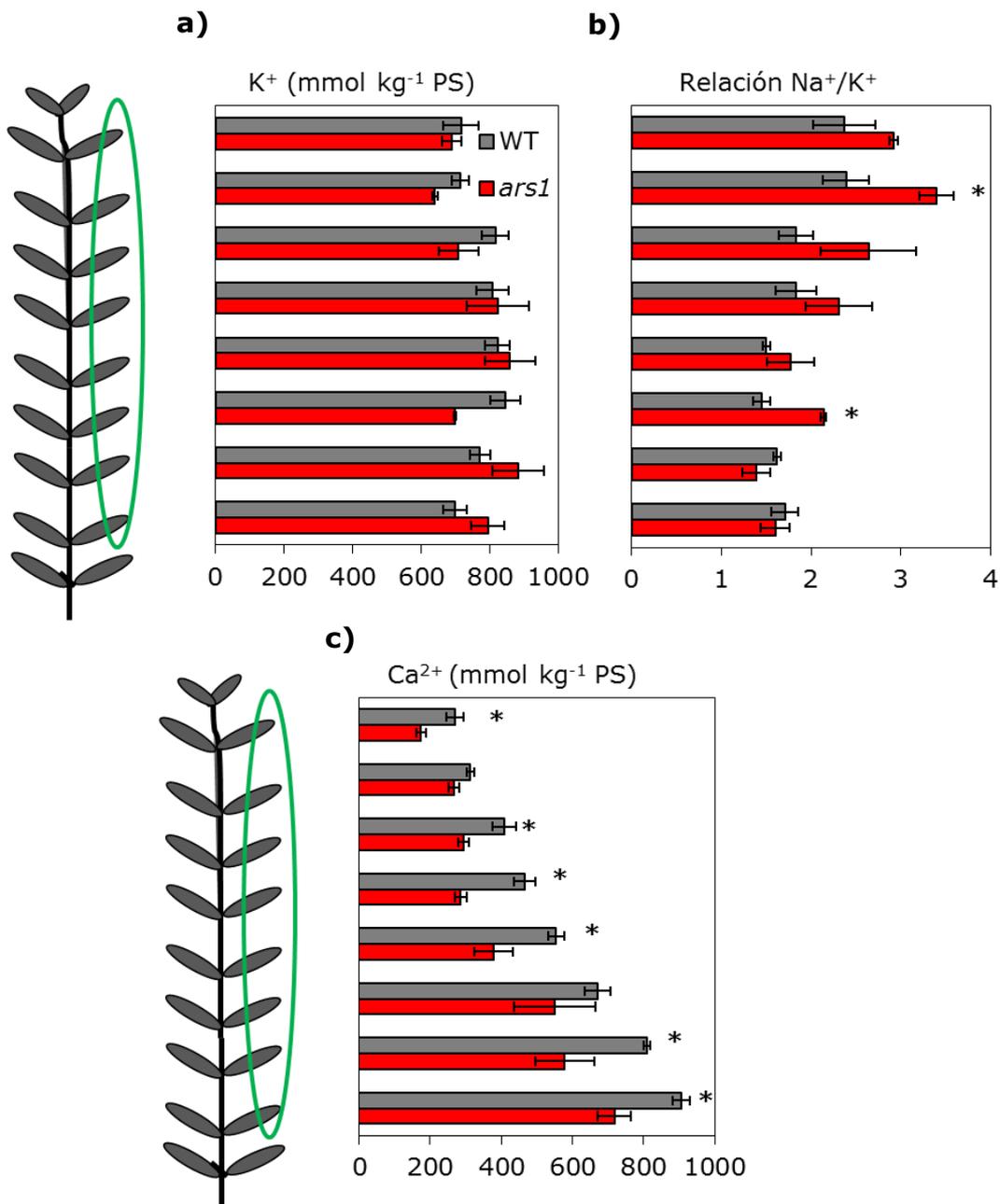
En este ensayo también se analizó la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en las hojas (**Figura 28 c)**), observando que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  también estaban afectados en el mutante, ya que en la mayoría de las hojas se reducía la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mutante en comparación con WT.

## Resultados



**Figura 27:** a) Análisis cuantitativo de la respuesta de *ars1*. Comparación en cada tejido del nivel de expresión según el tratamiento aplicado. Para ello, se ha dividido el  $\Delta\Delta Ct$  del tejido en condiciones de salinidad entre el  $\Delta\Delta Ct$  del tejido en condiciones control. Así podemos decir que en hoja, éste factor de transcripción MYB se expresa aproximadamente 3 veces más en condiciones de estrés salino que en condiciones normales. b) Tabla del estudio a corto plazo de la respuesta del

mutante *ars1* a la salinidad. Al igual que ocurre en el experimento a largo plazo, la conductividad y la evapotranspiración del mutante no se diferencian de las del WT cuando se cultiva en condiciones control. Sin embargo, a 200 mM de NaCl tanto la conductividad como la evapotranspiración, son mayores en *ars1* que en la línea silvestre. c) Valores de la apertura estomática relativos al valor inicial y número de estomas abiertos en respuesta a la sal. Datos en porcentaje. d) Microfotografías de los estomas abaxiales de las hojas del mutante y del WT, cultivadas en tanto en control como tras 3 días en estrés salino (200 mM de NaCl). Se utilizaron entre 8-10 tiras epidérmicas para cada tratamiento. e) Acumulación de Na<sup>+</sup> en medio salino. En la gráfica de la izquierda se representa el papel del tallo en el almacenamiento del ion tóxico y en la derecha representa la distribución de las hojas después de 10 días de tratamiento salino. Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y mutantes para  $p < 0.05$ .



**Figura 28:** a) Contenido de K<sup>+</sup>. b) Relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. c) Contenido de Ca<sup>2+</sup> en las hojas de las plantas WT y *ars1*.

#### 4.6. Caracterización del mutante *ars1* a estrés hídrico

Puesto que la salinidad además del estrés iónico provoca también un déficit hídrico similar al que se produce en condiciones de sequía, se estudió la respuesta comparativa de WT y mutante al estrés hídrico con el objetivo de comprobar si la anulación del gen *ARS1* también alteraba la transpiración en condiciones de sequía. Al estado de desarrollo de 8 hojas verdaderas, las

plantas eran sometidas a cuatro ciclos sucesivos de deshidratación, mediante cese del riego hasta marchitez y posterior rehidratación. Además, en cada maceta había una planta WT y otra mutante con el fin de que no hubiese diferencias en el estado de hidratación del sustrato; de este modo se consigue que las diferencias se deban exclusivamente a las líneas y no a otros factores no controlados.

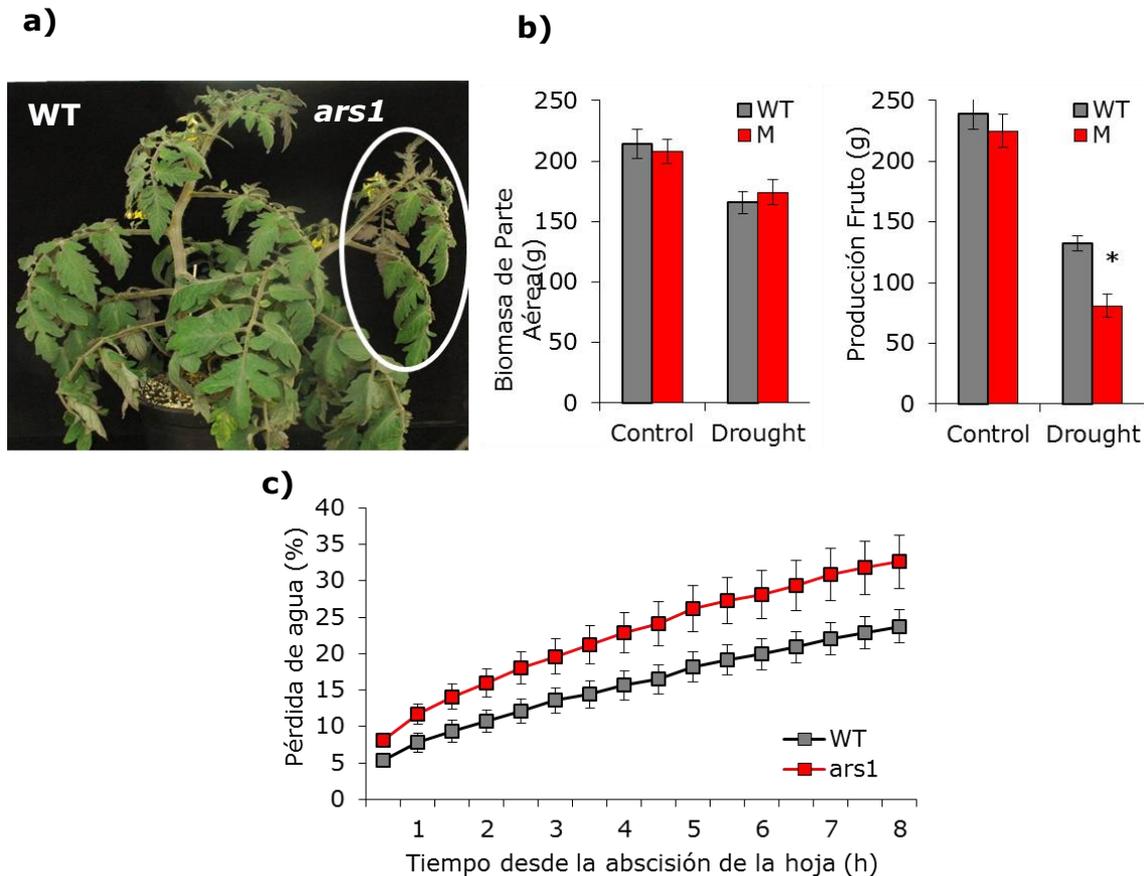
En los diferentes ciclos de deshidratación se observó que el mutante se deshidrató más rápidamente que el WT, tal como se observa en una de las fotos representativas (**Figura 29 a**). Además, cuando se estimó la biomasa (al final del 4º ciclo), no se encontraron diferencias en la biomasa vegetativa, mientras que sí había una mayor reducción en el rendimiento en fruto del mutante (**Figura 29 b**), y ello a pesar de que solo habían fructificado las dos primeras inflorescencias cuando se dio por finalizado el ensayo. Estos datos sugieren que el mutante es sensible al estrés hídrico, aunque los efectos negativos inducidos por el estrés son menores en estrés hídrico que en estrés salino debido a que en este caso el proceso fisiológico afectado solo puede ser la pérdida de agua por transpiración pero no la toxicidad iónica, como en el caso de salinidad.

#### **4.6.1. Pérdida de agua en folíolos escindidos**

Una técnica sencilla para detectar diferencias en la pérdida de agua de las hojas es mediante la escisión y pesada de las mismas. Justo antes de empezar a aplicar el estrés hídrico, se cortaban folíolos de WT y mutante y se pesaban a intervalos de 30 minutos durante 8 horas. En la **Figura 29 c**) se observa que los folíolos de *ars1* se deshidrató más rápidamente que los del WT desde los primeros 30 minutos y continuaban perdiendo agua

## Resultados

durante las 8 horas siguientes, lo que está relacionado con el mayor grado de deshidratación observado en las plantas mutantes después de cortar el riego.

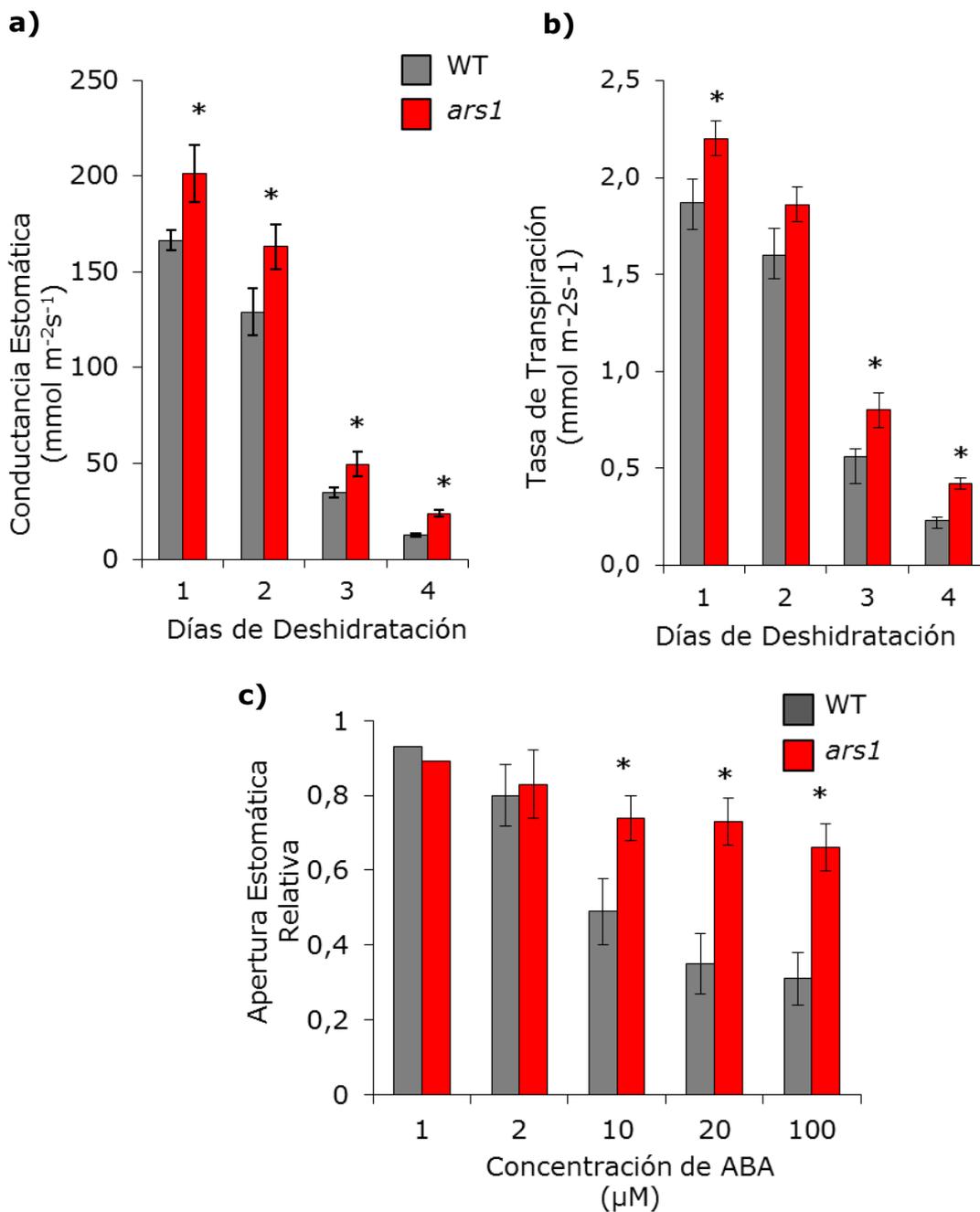


**Figura 29:** El mutante *ars1* está afectado por estrés hídrico. a) Fotografías representativas de plantas WT y mutante después de 3 días sin riego durante el 3º ciclo de deshidratación. b) Biomasa vegetativa y reproductiva al final del 4º ciclo de deshidratación. c) Pérdida de agua en hojas escindidas de WT y mutante justo antes de empezar a aplicar el estrés hídrico. Las medidas eran tomadas en intervalos de 30 minutos durante 8 horas. Los valores se han expresado como porcentaje de pérdida de agua en relación con el peso fresco a tiempo 0. Valores son la media  $\pm$  ES de 6 plantas individuales por línea. \* Diferencias significativas entre WT y mutante ( $P < 0.005$ ).

#### 4.6.2. Conductancia estomática y transpiración a lo largo del ciclo de deshidratación

Se midió  $g_s$  y  $E$  en la 2ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante durante los primeros 4 días de cese del riego del 2º ciclo de deshidratación. En las plantas que se mantenían con riego (control), los valores de  $g_s$  y  $E$  eran similares en WT y mutante durante los 4 días consecutivos, con valores medios de 235 y 2.4  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para  $g_s$  y  $E$ , respectivamente. Sin embargo, en las plantas sin regar el mutante mostraba mayores valores de  $g_s$  y  $E$  desde el primer día de deshidratación, y las diferencias respecto al WT se mantenían durante los días siguientes a pesar de los bajos valores que se alcanzaban en ambos parámetros al avanzar el periodo de deshidratación (**Figura 30 a**). Considerados en conjunto, se puede concluir que el mutante muestra la misma alteración fisiológica bajo condiciones de déficit hídrico y salinidad, ya que aumenta la transpiración y por consiguiente experimenta una mayor pérdida de agua en condiciones de estrés. Por consiguiente, el gen *ARS1* parece estar involucrado en el cierre estomático en condiciones de salinidad y sequía.

## Resultados



**Figura 30:** Efecto de la deshidratación y ABA en la pérdida de agua por transpiración del mutante *ars1*. a) Conductancia estomática y transpiración a lo largo del segundo ciclo de deshidratación. b) Apertura estomática de hojas tratadas con diferentes concentraciones de ABA. Valores son la media  $\pm$  ES de 6 plantas individuales por línea. \* Diferencias significativas entre WT y mutante ( $P < 0,05$ ).

### 4.6.3. Efecto del ABA en la apertura estomática

Es conocido que ABA es un regulador clave del cierre estomático. Con el objetivo de comprobar si la mutación afecta al cierre estomático en

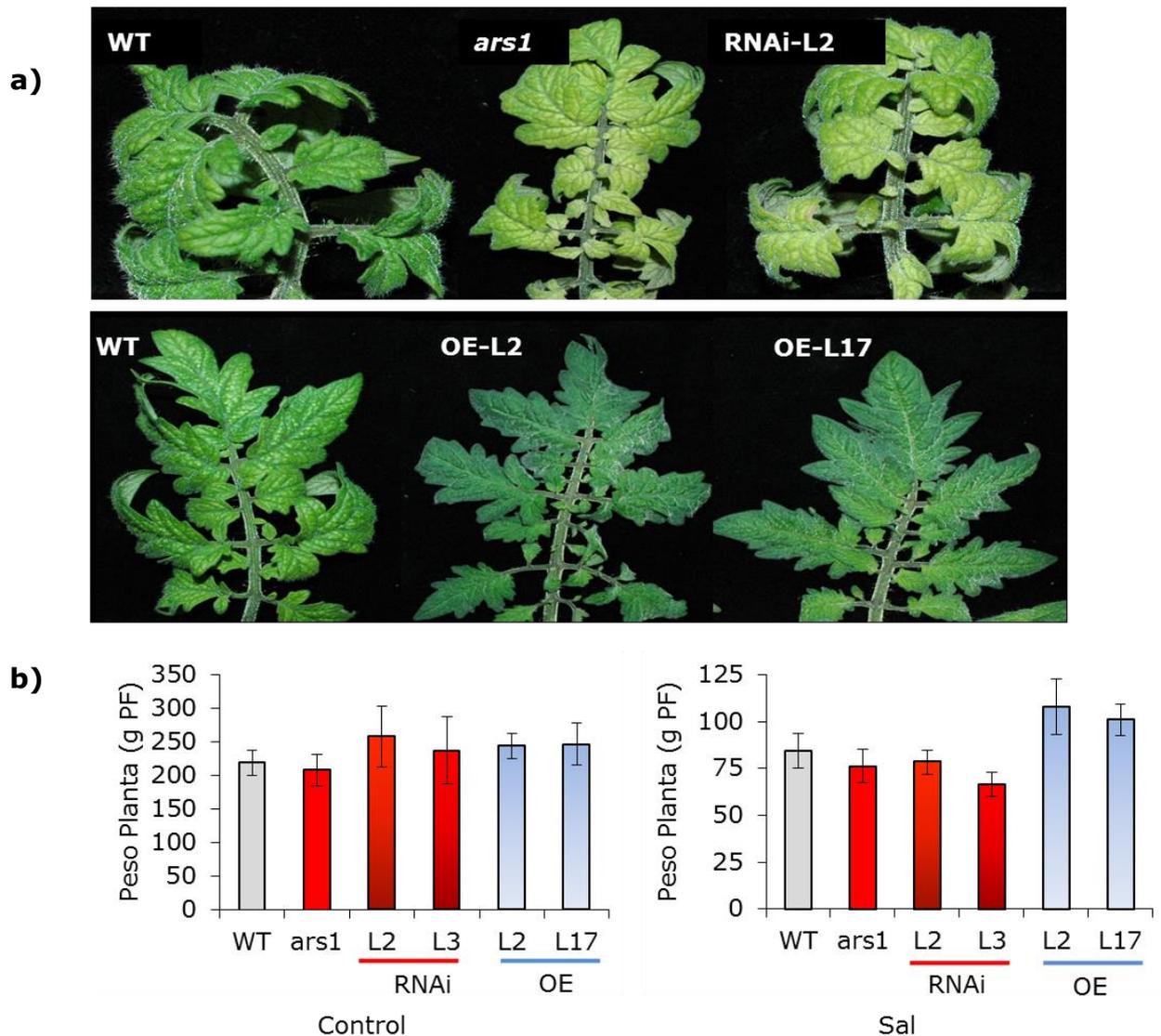
respuesta al ABA, folíolos de las plantas que se mantenían en control eran tratados con diferentes concentraciones de ABA en condiciones de luz normal (**Figura 30 b**). La apertura estomática era reducida al aumentar la concentración de ABA en el WT desde 10  $\mu\text{M}$  de ABA, alcanzando una reducción del 70% a 100  $\mu\text{M}$  de ABA. Sin embargo, en el mutante las reducciones en medio con ABA eran mucho menores (30% a 100  $\mu\text{M}$  de ABA) y, por consiguiente, la apertura estomática se mantenía significativamente mayor en el mutante que en el WT desde 10  $\mu\text{M}$  de ABA en adelante. Estos resultados indican que el papel del gen *ARS1* parece ser dependiente de ABA.

#### **4.6. Análisis funcional del gen *ARS1* mediante el estudio de la respuesta a la salinidad de líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen**

Para completar el análisis funcional del gen *ARS1*, el grupo de la UAL hizo la construcción y el grupo del IBMCP hizo la transformación para generar líneas de silenciamiento del gen (RNAi) y líneas de sobreexpresión (OE).

El primer ensayo se realizó con las líneas directamente transformadas y se seleccionaron 2 líneas RNAi (RNAi-L2 y RNAi-L3) que mostraban una reducción de expresión de *ARS1* mayor del 75% (0,12 y 0,24 veces respecto al WT que es la unidad). También se seleccionaron dos líneas OE, las líneas OE-L2 y OE-L17 con 27.1 y 9.3 x-veces, respectivamente, en relación al WT). Estas líneas junto con WT y el mutante *ars1* se cultivaron en hidropónico y al estado de 6 hojas se aplicó el tratamiento salino (200 mM NaCl) durante 10 días. El fenotipo de las plantas mostraba diferencias evidentes entre las líneas RNAi y OE en relación a los síntomas de toxicidad iónica reflejados en clorosis en las hojas cuando las plantas se desarrollaban

en medio salino. Así, las líneas RNAi mostraban un alto grado de clorosis en sus hojas y enrollamiento, similar al fenotipo observado en el mutante *ars1* (**Figura 31 a**). Por el contrario, las hojas de las líneas de sobreexpresión eran de color verde intenso en medio salino, siendo el fenotipo de estas líneas más similar al de las plantas desarrolladas sin sal, mientras que las hojas del WT mostraban un fenotipo intermedio entre las líneas RNAi y OE. Aunque el periodo de tratamiento salino no había sido suficiente para que se detectaran diferencias significativas en la biomasa de las diferentes líneas, sin embargo hay una tendencia a reducirse el peso de las RNAi y a aumentar el de las OE con respecto al WT, efecto que no se observa en las plantas desarrolladas en control (**Figura 31 b**).



**Figura 31.** Caracterización fenotípica de líneas de silenciamiento (RNAi) y sobreexpresión (OE) del gen *ARS1*. Dos líneas RNAi (RNAi-L2 and RNAi-L3) y dos líneas OE (OE-L2 y OE-L17) junto con WT y mutante eran desarrolladas en control y sal (10 días a 200 mM NaCl). a) Diferencias entre las líneas RNAi y OE en relación a los síntomas de toxicidad iónica reflejados en clorosis en las hojas. v) Peso de las plantas en medio control y salino. Valores son la media  $\pm$  ES de 6 plantas individuales por línea.

A los 3 días de tratamiento, se analizó  $g_s$  y E en las diferentes líneas. Para ello, y con objeto de evitar las diferencias que se pudieran obtener debido simplemente al periodo de exposición a la luz de cada una de las líneas, cada línea transgénica se analizaba conjuntamente con una serie de plantas WT, es decir en cada línea transgénica se hacían 6 medidas de esa

línea y 6 del WT, tal como se muestra en la **Tabla 9**. No hay diferencias en ninguna de las líneas de silenciamiento ni de sobreexpresión, respecto al WT, cuando las plantas se desarrollan sin sal, y tampoco las hay en el mutante *ars1*, tal como se había observado anteriormente en los diferentes experimentos llevados a cabo. Interesantemente, el mutante y las líneas RNAi incrementan  $g_s$  y E, respecto al WT, en condiciones salinas, la respuesta opuesta a la encontrada en las líneas OE, donde los valores de  $g_s$  y E son significativamente menores que los del WT. La similitud entre las respuestas de las líneas RNAi y mutante se observa de manera más clara cuando se representan los valores relativos de cada línea respecto a su correspondiente valor medio del WT (**Figura 32**). Así mismo, las líneas OE reducen significativamente ambos caracteres respecto al WT, lo que demuestra el papel del gen *ARS1* en regular la pérdida de agua por transpiración en condiciones salinas.

**Tabla 9.** Conductancia estomática ( $g_s$ ) y transpiración (E) en WT, el mutante *ars1*, las líneas de silenciamiento RNAi-L2, RNAi-L3, y las líneas de sobreexpresión OE-L2 y OE-L17 en control y sal (3 días a 200 mM NaCl). Cada línea transgénica se analizaba conjuntamente con una serie de plantas WT, es decir en cada línea transgénica se hacían 6 medidas de la línea y 6 del WT con objeto de evitar las diferencias que se pueden deber exclusivamente al periodo de exposición a la luz. Valores son la media  $\pm$  ES de 6 plantas individuales por línea. \* Diferencias significativas entre WT y mutante ( $P < 0,05$ ).

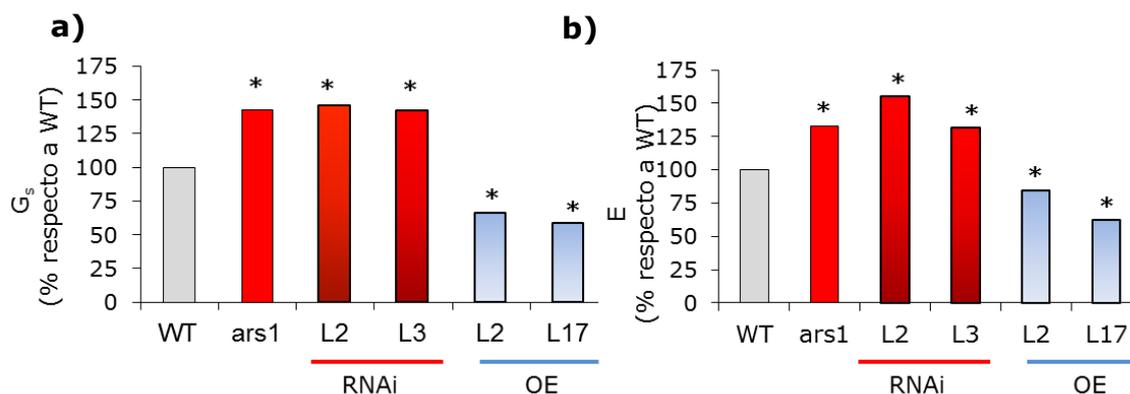
**Control**

<b>Genotipo</b>	<b><math>g_s</math> (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>E</math> (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
WT	328 ± 25.5	3.10 ± 0.20
<i>ars1</i>	358 ± 24.8	3.50 ± 0.20
WT	400 ± 17.4	3.75 ± 0.19
RNAi-L2	413 ± 17.5	4.02 ± 0.24
WT	373 ± 7.0	3.26 ± 0.25
RNAi-L3	379 ± 18.3	3.35 ± 0.12
WT	329 ± 31.4	3.52 ± 0.33
OE-L2	305 ± 35.8	3.44 ± 0.24
WT	296 ± 27.6	3.48 ± 0.26
OE-L17	321 ± 21.9	3.70 ± 0.23

**Sal**

<b>Genotipo</b>	<b><math>g_s</math> (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>E</math> (mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
WT	32.6 ± 2.86	0.79 ± 0.04
<i>ars1</i>	46.4 ± 1.53*	1.05 ± 0.05*
WT	42.8 ± 4.30	0.92 ± 0.11
RNAi-L2	62.6 ± 7.14*	1.43 ± 0.18*
WT	30.5 ± 3.66	0.79 ± 0.07
RNAi-L3	43.5 ± 4.46*	0.98 ± 0.06*
WT	43.2 ± 2.83	0.83 ± 0.08
OE-L2	28.7 ± 3.75*	0.60 ± 0.06*
WT	44.2 ± 3.99	0.93 ± 0.77
OE-L17	26.1 ± 1.75*	0.58 ± 0.04*

## Resultados



**Figura 32.** Las líneas de silenciamiento (RNAi) y de sobreexpresión (OE) corroboran que el gen *ARS1* está involucrado en la regulación de la conductancia estomática y transpiración en condiciones salinas. a) Valores relativos de conductancia estomática ( $g_s$ ). b) Valores de transpiración ( $E$ ) en la 3ª hoja completamente desarrollada de dos líneas RNAi (RNAi-L2 and RNAi-L3) y dos líneas OE (OE-L2 y OE-L17) junto con WT y mutante después de 3 días de tratamiento (200 mM NaCl). Los valores absolutos se muestran en la Tabla 9.

Finalmente, se realizó un segundo ensayo con líneas homocigotas obtenidas en la 3ª generación. Para ello, una vez obtenidas las semillas de las diferentes líneas RNAi y OE, se realizaron test de kanamicina para identificar líneas que tuvieran un solo inserto. Se identificaron dos líneas RNAi (RNAi-L2 y RNAi-L5) y dos OE (OE-L4 y OE-L19) que segregaban en una proporción 3:1 tolerancia/sensibilidad a kanamicina. En la población TG3 se identificaron las correspondientes líneas homocigotas de cada una de ellas y se analizó por RT-qPCR el nivel de expresión del gen *ARS1* en cada una de ellas. En las líneas RNAi la expresión de *ARS1* estaba prácticamente anulada, mientras que en las líneas OE-L4 y OE-L19 incrementaba 35 y 70 x-veces, respectivamente, en relación al WT.

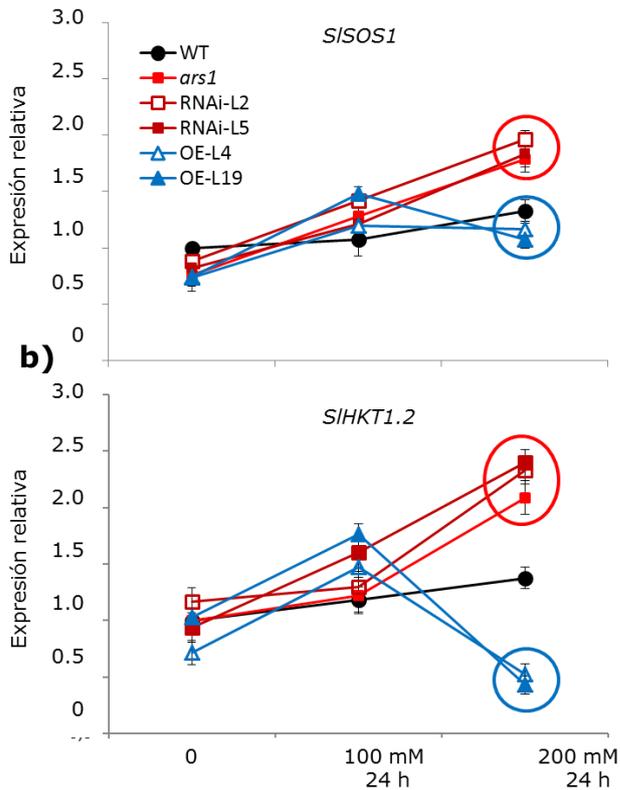
El objetivo de este ensayo era comprobar si realmente el mayor transporte de  $Na^+$  a la parte aérea en el mutante es exclusivamente debido a la desregulación del cierre estomático en condiciones de estrés, y no

están alterados, aunque sea en menor grado, los transportadores implicados en el transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea. El diseño del experimento fue similar al anterior, aunque el tratamiento salino se incrementó durante los primeros 2 días, 24 h a 100 mM NaCl y después de 24 h se incrementó a 200 mM NaCl y se mantuvo con este nivel de estrés hasta el final del ensayo (7 días de tratamiento).

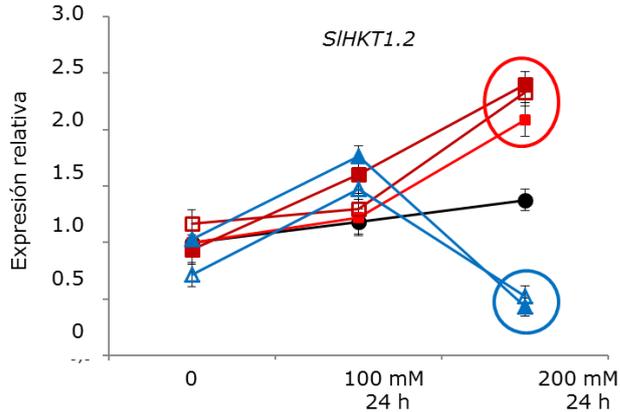
El mayor transporte de  $\text{Na}^+$  del mutante podría estar relacionado con menores niveles de expresión de los principales genes implicados en el transporte de  $\text{Na}^+$  desde la raíz a la parte aérea, *SISOS1* y *SIHKT1;2*, en tomate (Asins et al., 2013). La expresión relativa de estos genes se analizó en raíces a tiempo 0 (justo antes de aplicar el tratamiento salino), después de 24 h a 100 mM NaCl y después de 24 h más a 200 mM NaCl (**Figura 33**). Los resultados muestran una clara tendencia a incrementar los niveles de expresión de ambos genes durante el primer día de tratamiento (100 mM NaCl), tendencia que es similar en todas las líneas así como en WT y mutante.

## Resultados

a)



b)



**Figura 33.** La expresión relativa de los genes implicados en la absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  incrementa en ambos el mutante *ars1* y líneas RNAi, mientras que disminuye en las líneas de sobreexpresión con la salinidad. a) Niveles de expresión del gen *SISOS1* en respuesta a la salinidad y b) niveles de expresión de *SIHKT1.2*.

Sin embargo, durante el 2º día donde se incrementa el nivel de sal de 100 a 200 mM NaCl, se establecen diferencias significativas entre las líneas RNAi y las líneas de sobreexpresión. Así, los niveles de expresión de *SISOS1* y, especialmente, de *SIHKT1;2* continúan incrementando a los mismos niveles en las líneas RNAi y en el mutante el 2º día de tratamiento. Sin embargo, en las líneas de sobreexpresión se observa la respuesta opuesta, una tendencia a decrecer los niveles de expresión de ambos transportadores el 2º día de tratamiento respecto al primer día. A 200 mM NaCl, es interesante señalar que los niveles de expresión de *SISOS1* son similares en las líneas OE y en el WT, mientras que los niveles de *SIHKT1;2*,

el principal gen implicado en la carga de  $\text{Na}^+$  del xilema, es menor en las líneas OE que en el WT. Estos resultados ponen claramente de manifiesto que el mayor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea inducido por la anulación del gen *ARS1* no está causado por una reducción en la expresión de los principales genes implicados en la carga de  $\text{Na}^+$  en el xilema, La respuesta es justo la contraria, la expresión de los transportadores se induce por la anulación del gen *ARS1* con la sal, lo que es esperable cuando la planta detecta un mayor transporte de agua y solutos, entre ellos el  $\text{Na}^+$ , hasta las hojas debido a la mayor pérdida de agua por transpiración. También se explica la reducción de expresión de *SISOS1* y *SIHKT1;2* en las líneas OE, ya que el mayor cierre estomático debe reducir el transporte de agua y  $\text{Na}^+$  y esto se ve reflejado en los menores niveles de expresión de genes.

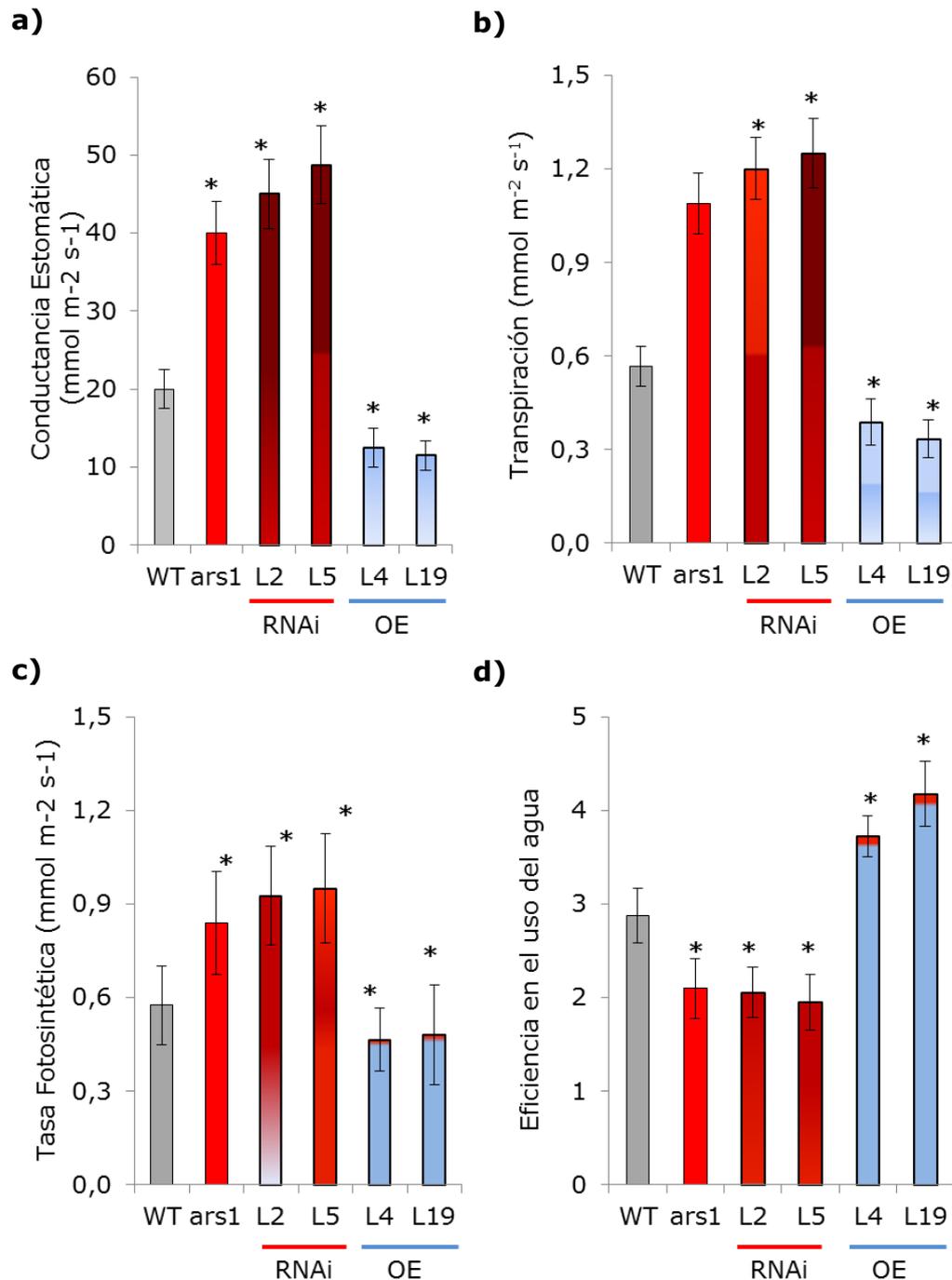
Finalmente, en este ensayo se tomaron medidas de  $g_s$  y E al final del ensayo (7 días) con el objetivo de corroborar que en las líneas homocigotas RNAi y OE se mantenía la pérdida de agua por transpiración a más largo plazo, como se había observado en el mutante. Los resultados son similares a los obtenidos en el primer experimento, donde una de las líneas RNA era la misma (L2) pero la otra era diferente (L5), y las dos líneas OE eran diferentes (OE-L4 y OE-L19), y además las medidas se tomaron después de 7 días de tratamiento en este experimento, mientras que en el primero a los 3 días. Así, los valores de  $g_s$  y E se duplican en el mutante y las líneas RNAi respecto al WT, mientras que se reducen significativamente en las dos líneas de sobreexpresión (**Figuras 34 a)** y **b)**). La mayor apertura estomática provoca un mayor intercambio de  $\text{CO}_2$  que puede llegar a aumentar la tasa fotosintética. Aunque hay una clara tendencia a incrementar la tasa fotosintética en el mutante y las líneas RNAi y a

## Resultados

decrecer en las líneas OE, respecto al WT, sin embargo las diferencias no eran significativas.

El uso eficaz del agua (WUE) se define en términos agronómicos como la relación entre la producción de biomasa (vegetativa o reproductiva) por unidad de uso del agua, aunque en un contexto fisiológico el WUE se puede estimar mediante la relación entre la tasa fotosintética y la conductancia estomática. En la **Figura 34 d)** se presentan los valores del WUE, donde se observa el menor uso eficaz del agua en el mutante *ars1* así como en las líneas RNAi, ya que la mayor pérdida de agua por transpiración no parece estar compensada por una mayor tasa fotosintética.

Considerados en conjunto, estos resultados demuestran el importante papel que tiene el gen *ARS1* en la tolerancia a la salinidad del tomate, ya que interviene en la regulación de la pérdida de agua por transpiración cuando las plantas se enfrentan al estrés.



**Figura 34.** Cambios inducidos por la salinidad a largo plazo en los caracteres fisiológicos relacionados con la pérdida de agua en líneas de silenciamiento (RNAi) y de sobreexpresión (OE) del gen *ARS1*. Las medidas de a)  $g_s$ , b)  $E$ , c) tasa fotosintética y d) eficiencia en el uso del agua (WUE) se tomaron en la 3ª hoja completamente desarrollada de dos líneas RNAi (L2 y L5) y dos líneas OE (OE-L4 y OE-L19) junto con WT y mutante después de 10 días de tratamiento (200 mM NaCl). Valores son la media  $\pm$  ES de 6 plantas individuales por línea. \* Diferencias significativas entre cada línea respecto al WT ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 10.** Cebadores diseñados y utilizados para la secuenciación, genotipado y cuantificación del gen *ars1*. Están subrayados los nucleótidos introducidos para generar sitios de restricción.

Nombre	Abreviatura	Secuencia 5' →3'	Utilización
nptII_forward	nptF	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA	Amplificación del gen marcador <i>nptII</i> para identificar la inserción T-DNA
nptII_reverse	nptR	CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG	
Gus_forward	gusF	ACGTGGCAAAGGATTCGATA	Amplificación del gen marcador <i>uidA</i> para identificar la inserción T-DNA
Gus_reverse	gusR	TTGACTGCCTCTTCGCTGTA	
Adapter_1	Ad1	CTAATACGACTCACTATAGGC	Clonación de la region etiquetada por la inserción T-DNA
RigthBorder_1	RB-1	ACAGTTTTCGCGATCCAGAC	
Adapter_2	Ad2	CTATAGGGCTCGAGCGGC	
RightBorder_2	RB-2	GGTCTTGCGAAGGATAGTGG	
Adapter_3	Ad3	AGCGGCGGGGAGGT	
RightBorder_3	RB-3	CTGGCGTAATAGCGAAGAGG	
WT_forward	wtF	CATCTGTTGTATGCTGGTGAAG	Genotipado de la población segregante de <i>ars1</i>
WT_reverse	wtR	CTGTAAGTGGTCCCTCGTACTT	
Mut_forward	mutF	AAGTTGGGTAACGCCAGGGTT T	
ARS1comp_F	ARS1compF	<u>GAGCTCCCATTT</u> CATAAACGAA ACAGACC	Contrucción de la sobreexpresion de <i>ARS1</i>
ARS1comp_R	ARS1compR	<u>GGTACCCTTCCTCCAGCCTCC</u> TTTA	
ARS1Fv		<u>TCTAGACTCGAGGCTGGAGGA</u> AGGTTTCAGATG	Contrucción del silenciamiento de

ARS1Rv		<u>ATCGATGGTACCCACACTAGAT</u> GCACAAGCAAAA	<i>ARS1</i>
ARS1 forward		GTTCGACCGTGATTGGAAAA	Cuantificación de <i>ARS1</i> por RT-qPCR
ARS1 reverse		ACTTCCAGGTCTTCTCACCT	
LeEF1α forward		GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	Gen normalizador (Asins et al. 2013)
LeEF1α reverse		GGGTATTCAGCAAAGGTCTC	



## **Discusión**



## 5. Discusión

### 5.1. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación y análisis funcional de genes

El análisis de mutantes es una herramienta de gran interés para avanzar en el conocimiento de procesos claves en el desarrollo y tolerancia a estreses, tanto bióticos como abióticos, así como para identificar la función de genes implicados en diferentes procesos biológicos (Dent *et al.*, 2015; Serrat *et al.*, 2014). Así, el análisis de mutantes ha permitido grandes avances en la disección genética de diversos procesos de desarrollo vegetativo y reproductivo en tomate (Giovannoni, 2007; Lozano *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011; Okabe *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2011).

La mutagénesis insercional con T-DNA representa en la actualidad una de las alternativas más prometedoras para la identificación y caracterización funcional de los genes que regulan tanto el desarrollo como la tolerancia o sensibilidad a diferentes estreses abióticos (Fu *et al.*, 2009; Atarés *et al.*, 2011). Esta herramienta se ha utilizado sobre todo en *Arabidopsis* para la identificación de genes involucrados en procesos biológicos muy diferentes (O'Malley y Ecker, 2010; Ghedira *et al.*, 2013; Wilson-Sánchez *et al.*, 2014). Recientemente, se ha demostrado que la mutación RPN1 mediante la inserción de T-DNA provocaba un incremento de los tricomas ramificados en el tallo y en el número de tricomas normales tanto en las hojas de la roseta como en el tallo (Yu *et al.*, 2015a). En otro estudio, se ha llegado a relacionar la función de compuestos biológicos, como las ceramidasas, con las respuestas al estrés biótico y abiótico mediante la identificación del mutante pleiotrópico acer-1, donde se han

## Discusión

detectado alteraciones en diferentes caracteres, como en altura de la planta, reducción del tamaño de la hoja y de la capa de cera de la misma (Wu *et al.*, 2015). El análisis de mutantes de inserción se ha desarrollado también en otras especies vegetales de interés agronómico (Jeong *et al.*, 2002; Mathieu *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). En el mutante *ep3* se ha identificado que el T-DNA se ha insertado dentro de la secuencia del Os02g15950 (*EP3*), produciendo una reducción en el tamaño de las células guarda de los estomas y por consiguiente una disminución de la tasa fotosintética de la hoja (Yu *et al.*, 2015b). El mutante nulo de arroz *apx2* muestra mayor sensibilidad a estreses abióticos debido a la pérdida de función de la proteína OsAPX2, responsable de la homeostasis de ROS en plantas (Zhang *et al.*, 2013).

Las colecciones de mutantes en tomate se han generado principalmente a partir del cultivar Micro-Tom, y la mayoría se han obtenido por mutagénesis química con EMS (Okabe *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2011) o mediante inserción de T-DNA (Khuong *et al.*, 2013). Hasta la fecha, no tenemos conocimiento de que se haya generado ninguna colección de mutantes de inserción a partir de un cultivar de tomate comercial, como las que se están obteniendo entre los tres grupos de investigación que colaboran conjuntamente desde hace años. Esto justifica el interés de llevar a cabo el análisis fenotípico de la colección de líneas T-DNA generadas en tomate.

En este trabajo, el primer objetivo era la identificación de mutantes afectados tanto en el desarrollo como en la tolerancia a la salinidad en la colección generada a partir del cv. Moneymaker. El interés de identificar

mutantes de desarrollo es doble, primero por avanzar en el conocimiento de los genes implicados en el desarrollo, pero en nuestro caso por la relación existente entre desarrollo y defensa. Así, algunas alteraciones en el desarrollo pueden favorecer la respuesta a estrés, aunque la inducción de ciertos mecanismos de defensa frente al estrés también puede suponer un coste energético importante y viceversa (Claeys y Inzé 2013, Cui *et al.*, 2014). Por ejemplo, el interés de identificar mutantes con alteraciones en el desarrollo radicular es evidente, ya que la raíz afecta a la absorción y transporte de agua y nutrientes y, por tanto, a la tolerancia a la salinidad. La propia arquitectura de la raíz es una organización flexible, ya que las plantas están en continua interacción con un medio ambiente cambiante al que deben de intentar adaptarse para sobrevivir. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la adaptación de la morfología de la raíz y su relevancia para la tolerancia a sal (Galvan-Ampudia y Testerink, 2011). Por tanto, el mutante que se ha identificado con escaso desarrollo radicular ha sido uno de los seleccionados para su posterior caracterización (**Figura 20**).

También puede ser interesante la identificación de mutantes afectados en la maquinaria fotosintética, tal como se ha llevado a cabo en *Arabidopsis* (Ajjawi *et al.*, 2010). La función principal del cloroplasto es la realización de la fotosíntesis, pero también está implicado en otras muchas funciones: metabolismo lipídico, síntesis de almidón, aminoácidos, hormonas y diversos metabolitos secundarios (Inaba y Ito-Inaba, 2010). Recientemente se le han adjudicado a los cloroplastos (y los demás tipo de plastos) funciones en la respuesta de las plantas a los distintos estreses abióticos (Le Martret *et al.*, 2011). En respuesta al estrés salino, se ha sugerido que el cloroplasto puede actuar como un almacén de sodio para

retirarlo del citoplasma (Balsemão-Pires *et al.*, 2011). Sorprendentemente, la aparición de mutantes con alteraciones en los niveles de clorofila está siendo mucho más frecuente de lo esperado, pues 5 de los 11 mutantes identificados en este trabajo presentaban diferentes alteraciones en los niveles de clorofila, desde los albinos 232 ETMM y 254 ETMM, que eran letales al estado de cotiledón, hasta el mutante 560 ETMM, donde la aparición del fenotipo clorótico se manifiesta en estado adulto (**Figura 20**). La mayoría de estos mutantes o bien están siendo caracterizados por investigadores de los grupos que colaboramos en el programa de mutagénesis insercional, o por investigadores de otros grupos ajenos al programa.

La caracterización de uno de los mutantes identificados en nuestro grupo, el mutante recesivo *res* (*restored cell structure by salinity*), demuestra el interés de identificar mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo para estudiar la respuesta a salinidad. El mutante *res* se seleccionó por presentar ambas alteraciones morfológicas, ser un mutante de raíz que además de reducir su desarrollo muestra importantes alteraciones en la morfología de las raíces, y las hojas del mutante son de menor tamaño y grosor y con un alto grado de clorosis. Sin embargo, todas las alteraciones morfológicas desaparecían cuando el mutante *res* se desarrollaba en medio salino, e incluso se reorganizaba la estructura celular con la salinidad, incluidos los cloroplastos (García-Abellán *et al.*, 2015).

## **5.2. El mutante *ars1* ha permitido identificar el primer gen R1-MYB de tomate**

El mutante *ars1* se seleccionó por mostrar sensibilidad al estrés salino a nivel de planta adulta, ya que es una opinión cada vez más generalizada que, en vez de desarrollar genotipos que puedan sobrevivir a eventos de estrés extremo, puede ser mejor enfocarlo a conseguir genotipos que puedan completar el ciclo vegetativo en condiciones de estrés (Bechtold *et al.*, 2010; Deyholos, 2010). El mutante *ars1*, además de mostrar las características fenotípicas de sensibilidad a sal, como el enrollamiento de las hojas, clorosis e incluso senescencia de las mismas, estaba afectado no solo en la biomasa vegetativa sino que reducía el rendimiento en fruto por efecto del estrés salino.

Mediante la caracterización molecular y genética del mutante, llevada a cabo por el grupo de la UAL, se identificó el gen *ARS1*, que está localizado en el cromosoma 1 y codifica para una proteína relacionada con la familia MYB, la cual contiene un único dominio de unión a DNA entre los aminoácidos 66 y 116, y con una elevada similitud con los dominios de clase SHAQKYF (pfam00249) y SANT (smart00717). Además, la inserción del T-DNA ha modificado el marco abierto de lectura del gen *ARS1* justo antes del dominio SHAQKYF, lo que provoca una proteína truncada incapaz de realizar la función de unión a DNA como se ha propuesto para los factores de transcripción R1-MYB (Feller *et al.*, 2011). Esta característica molecular podría explicar la naturaleza dominante-negativa de la mutación *ars1*, como se ha descrito en otras mutaciones de otras especies vegetales (Veitia, 2007). En la última actualización de la base de datos del genoma del tomate, se han identificado 247 genes que codifican proteínas del tipo

MYB, 121 de los cuales pertenecen al tipo R2R3-MYB. (Zhao *et al.*, 2014). Los factores de transcripción MYB juegan diferentes papeles en procesos de desarrollo y en mecanismos de respuesta y defensa frente a estreses (Schmitz *et al.*, 2002; Mathews *et al.*, 2003; Gong y Bewley 2008; Adato *et al.*, 2009; Ballester *et al.*, 2010; Naz *et al.*, 2013), aunque la función de la mayoría de estos genes permanece aún sin dilucidar (Li *et al.*, 2015).

El gen *ARS1* es un nuevo miembro de la familia de proteínas MYB, la cual pertenece al clado CCA1-like de las proteínas de tipo R1. La subfamilia 1R-MYB es un grupo heterogéneo dividido en varios subgrupos que incluyen proteínas CCA1-like, CPC-like, TRF-like, TBP-like, I-box-binding like y otros MYB-related (Chen *et al.*, 2014). Desafortunadamente, no hemos encontrado información sobre las proteínas del tipo R1 incluidas en este clado de *Arabidopsis*, y las proteínas de *Arabidopsis* y arroz con mayor similitud a *ARS1* son las que están etiquetadas con "función desconocida". En comparación con los genes MYB de tipo R2R3, el número de genes de tipo R1 identificados hasta ahora por estar implicados en la respuesta a estrés abiótico es relativamente escaso. Recientemente, (Du *et al.*, 2013) han demostrado mediante análisis de expresión y análisis filogenéticos que R1-MYB regulan el desarrollo de las plantas y las respuestas a estrés (Du *et al.*, 2013). Así, se han identificado algunos genes de tipo R1-MYB implicados en la tolerancia a estrés abiótico, como el gen de patata *StMYB1R-1* (Shin *et al.*, 2011), otro en una hierba para el ganado (*LcMYB1*) (Cheng *et al.*, 2013) y el de arroz *OsMYB48-1* (Xiong *et al.*, 2014).

### **5.3. La anulación del gen *ARS1* no afecta al desarrollo cuando las plantas se cultivan sin estrés pero induce sensibilidad a la salinidad**

El interés de la identificación del nuevo gen de tipo R1-MYB en tomate es doble. Por una parte, el único factor de transcripción que se había identificado hasta ahora en tomate y que se ha involucrado en la tolerancia a estreses es un gen de tipo R2R3-MYB (AbuQamar *et al.*, 2009) y, por tanto, el gen *ARS1* es el primer gen de tipo R1-MYB identificado en tomate. Por otra parte, es un gen que realmente tiene un papel importante en la respuesta del tomate a la salinidad a largo plazo. En este sentido, uno de los retos propuestos para avanzar en la tolerancia a estreses abióticos es examinar la respuesta de las plantas a largo plazo en condiciones naturales (Hirayama y Shinozaki, 2010). En este sentido, Sharukov (2013) cuestionaba los genes que se identifican como respuesta a un choque salino y que se inducen durante los primeros minutos o primeras horas de exposición. Así, al comparar este autor los genes que se inducen por choque salino con los genes que se inducen a más largo plazo observó que los patrones de expresión de genes eran muy diferentes. Además, Blum (Blum, 2011) sugería que entre los cientos de genes de respuesta a estrés que se identifican a corto plazo, solo una pequeña proporción de ellos pueden ser realmente importantes desde el punto de vista de la productividad. En este estudio, La evaluación de la tolerancia a la salinidad del mutante *ars1* se realizó a largo plazo hasta completar el ciclo de vida, en condiciones naturales (invernadero), donde quedó de manifiesto la sensibilidad a la sal del mutante a largo plazo, que se reflejó en una reducción del rendimiento en fruto (**Figura 26 a) y b)**).

Entre las múltiples funciones que los factores de transcripción MYB llevan a cabo en las plantas destaca la regulación del metabolismo vegetal y

del desarrollo de la planta (Feller *et al.*, 2011). Un ejemplo lo encontramos en *Arabidopsis*, donde *AtMYB93* actúa como regulador negativo del desarrollo de las raíces laterales (Gibbs y Coates, 2014). En la misma especie vegetal, *MYB96* controla la expresión del gen ABA-INSENSITIVE 4 (*ABI4*) y regula el metabolismo lipídico que contribuye al desarrollo embrionario de la semilla en condiciones de germinación poco óptimas (Lee *et al.*, 2015). Otro proceso regulado por genes MYB en algunas especies es el color del fruto; así, el color de la uva, uno de los rasgos más importantes para la calidad del vino, está controlado por dos factores de transcripción MYB que desarrollan un papel crucial en la regulación de la biosíntesis de antocianos (Allan *et al.*, 2008). En tomate, también se ha observado que los factores de transcripción MYB pueden jugar un papel importante en el desarrollo. Por ejemplo, *SlIAA15* es responsable de la formación de tricomas de tipo I, V y VI y de los brotes axilares (Deng *et al.*, 2012), el gen *Trifoliolate* participa tanto en el proceso de formación de los folíolos como en el de los meristemas axilares de las hojas (Naz *et al.*, 2013), y *SIMYB12* controla el cambio de color del fruto del tomate cuando se inicia la maduración (Ballester *et al.*, 2010).

En el caso de nuestro mutante podemos observar que la disrupción del gen *ARS1* no afecta al desarrollo vegetativo de la planta ni al rendimiento del fruto cuando se cultiva en condiciones naturales (**Figuras 25 y 26 b**). Esto puede ser de gran interés en la respuesta a estrés, ya que en los últimos años se ha sugerido la necesidad de cambiar el enfoque en la investigación sobre estrés abiótico. Puesto que las plantas tienen recursos finitos que deben ser balanceados entre desarrollo y defensa frente al estrés, es frecuente que la sobreexpresión o anulación de un gen afecte

negativamente al desarrollo de la planta y a su producción en condiciones sin estrés, lo que supone una gran desventaja desde un punto de vista agronómico (Dubouzet *et al.*, 2003; Priyanka *et al.*, 2010).

#### **5.4. La sensibilidad del mutante *ars1* a la salinidad está relacionada con alta acumulación de Na<sup>+</sup> en sus hojas**

El efecto perjudicial que la salinidad provoca a largo plazo en las plantas es debido principalmente a la toxicidad del Na<sup>+</sup> (Flowers y Colmer, 2008; Maathuis, 2014). En diferentes experimentos se ha comprobado que la sensibilidad a la sal del mutante *ars1* se debe principalmente al mayor transporte de Na<sup>+</sup> desde la raíz hasta la parte aérea, lo que se refleja en una elevada acumulación de Na<sup>+</sup> en hojas (**Figura 26 d**), que provoca un importante efecto tóxico. Además, la mutación *ars1* produce una alteración en la distribución del Na<sup>+</sup> entre las hojas adultas y jóvenes, un rasgo relacionado directamente con la tolerancia a la sal en el tomate (Cuartero *et al.*, 2006), ya que la acumulación de Na<sup>+</sup> en el mutante va incrementando en las hojas de abajo a arriba (**Figura 27 e**). Por tanto, el gen *ARS1* podría estar implicado en la homeostasis iónica, tal como se ha observado en otros genes MYB. Así, el gen de *Arabidopsis* *MYBL* desempeña un papel importante en la protección de la hoja contra los efectos tóxicos de la salinidad (Zhang *et al.*, 2011). En tomate, el gen *SIAIM1* parece estar implicado en la regulación del transporte iónico, ya que la anulación del gen incrementaba la acumulación de Na<sup>+</sup> en la parte aérea mientras que la sobreexpresión tenía el efecto contrario (AbuQamar *et al.*, 2009).

La alta acumulación de Na<sup>+</sup> en las hojas del mutante podría estar relacionada con menores niveles de expresión de los principales genes implicados en la absorción y transporte de Na<sup>+</sup> (Olías *et al.*, 2009; Asins *et*

*al.* 2013; García-Abellan *et al.* 2014). Sin embargo, esto no parece ser así, ya que la expresión de los transportadores *SISOS1* y *SIHKT1;2* se induce con la sal no solo en el mutante *ars1* sino también en las líneas de silenciamiento (RNAi), mientras que una reducción en la expresión de *SISOS1* y *SIHKT1;2* se observa en las líneas de sobreexpresión (**Figura 33**). Según estos resultados, los cambios en los niveles de expresión de ambos genes son proporcionales al mayor o menor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, donde se observa que el WT tiene un nivel de expresión de *SIHKT1;2* intermedio entre las líneas RNAi y las de sobreexpresión. En definitiva, el mutante *ars1* es sensible al estrés iónico inducido por la salinidad, pero la anulación del gen *ARS1* no parece actuar sobre los genes de respuesta implicados en los procesos de transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea.

### **5.5. El papel del gen *ARS1* es regular la pérdida de agua por transpiración cuando las plantas se enfrentan a salinidad y sequía**

Tanto en condiciones de estrés salino como hídrico, el mutante *ars1* incrementa la conductancia estomática y transpiración, respecto al WT (**Figuras 26 e), 26 b) y 30 a)**). Por consiguiente, el elevado transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea del mutante *ars1* en condiciones salinas debe ser una consecuencia de la pérdida de agua por transpiración. Esto explica que el fenotipo se vea menos afectado en estrés hídrico que en estrés salino, ya que el proceso fisiológico afectado en estrés hídrico es la pérdida de agua por transpiración, mientras que a esta alteración se suma la toxicidad iónica en el caso de salinidad. En diferentes especies como *Arabidopsis*, trigo y arroz, se han identificado genes MYB involucrados en la respuesta a la salinidad y sequía (Cominelli *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008; Liao *et al.*,

2008; Wang *et al.*, 2010; Rahaie *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013), lo que indica que su papel está relacionado, principalmente, con el estrés osmótico inducido por ambos estreses abióticos.

Las plantas pueden utilizar estrategias diferentes de respuesta para evitar la deshidratación, bien mediante la acumulación de solutos, o bien utilizando mecanismos que permitan evitar la pérdida de agua a través del cierre rápido de los estomas (Fang y Xiong 2014). El papel del gen *ARS1* en la regulación de la pérdida de agua por transpiración se ha corroborado mediante el estudio de la respuesta de líneas de silenciamiento y de sobreexpresión del gen *ARS1*. Así, el mutante y las líneas de silenciamiento incrementan la conductancia estomática y transpiración, respecto al WT, en condiciones salinas, la respuesta opuesta a la encontrada en las líneas de sobreexpresión del gen *ARS1* (**Figuras 32 y 34**). En este aspecto, el gen *R1-MYB* de patata inducía tolerancia a la sequía mediante la activación de genes de respuesta implicados en la regulación de la pérdida de agua a través del cierre estomático. Es interesante señalar que en el mutante *ars1* no está afectado el número de estomas y, por tanto, la mayor pérdida de agua por transpiración se debe tanto al elevado porcentaje de estomas abiertos como a su mayor apertura estomática (**Figuras 26 c) y d)**). En los últimos años, se está dando gran importancia al control de la pérdida de agua de la hoja por transpiración en condiciones de estrés, especialmente después del estudio comparativo entre la especie silvestre y cultivada publicado por Koenig *et al* (2013), y con la información obtenida tras la secuenciación del genoma de la especie silvestre *Solanum pennellii* con alto

grado de tolerancia a salinidad y, especialmente, sequía (Bolger *et al.*, 2014).

Sin embargo, hay discrepancias en la bibliografía a la hora de definir la mejor estrategia para mejorar la eficiencia del uso del agua por la planta (WUE). Así, una estrategia propuesta es aumentar, a través de la modificación de las densidades estomáticas, la conductancia para aumentar la tasa fotosintética, mientras que la estrategia opuesta parece ser más eficaz en las especies tolerante (Shabala, 2013). En general, el WUE aumenta en las plantas que pierden menos agua por transpiración, pero este beneficio puede conducir a una reducción en la asimilación de carbono fotosintético y a un crecimiento más lento de las plantas. Sin embargo, Tanaka *et al* (2013) utilizó la sobreexpresión del gen STOMAGEN, un regulador positivo de la densidad de estomas, para producir plantas con una densidad de estomas entre 2 y 3 veces mayor que el WT. En estas plantas, la asimilación de carbono fotosintético incrementó un 30% debido a la mayor difusión de CO<sub>2</sub> en la hoja, pero este aumento provocó que la transpiración fuese el doble de la observada en las plantas WT, lo que resultó finalmente en una disminución del 50% en el uso eficaz del agua. Recientemente, Lawson y Blatt (2014) sugerían que el WUE mejora significativamente si los estomas responden rápidamente y sincronizados con las demandas de CO<sub>2</sub> de las células del mesófilo. Es interesante señalar que al estimar el WUE en base a la tasa fotosintética y la conductancia se observan los mayores valores de WUE en las líneas de sobreexpresión de ARS1 y los menores en el mutante y las líneas de silenciamiento, mostrando el WT una respuesta intermedia (Figura 15).

La fitohormona ABA es clave en la regulación del cierre estomático (Raghavendra *et al.*, 2010). En este estudio, también hemos demostrado que la mutación *ARS1* afecta a la apertura estomática en respuesta a ABA, de una forma similar a la respuesta a estrés salino. En la bibliografía podemos encontrar que existen diversos factores de transcripción que participan en las respuestas a estreses abióticos y en las rutas de señalización por ABA, incluyendo en estos a los factores de transcripción MYB (Rushton *et al.*, 2012). Además, varios genes R2R3-MYB se han identificado como dependientes de ABA (Denekamp y Smeekens, 2003; Cominelli *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2011). Así, el gen de arroz *OsMYB48-1* se induce por respuesta a sal, sequía y ABA (Xiong *et al.*, 2014). La mutación del gen *ARS1* también afecta al cierre estomático en respuesta a ABA, ya que la apertura estomática se mantenía significativamente mayor en el mutante que en el WT desde 10  $\mu\text{M}$  de ABA en adelante (**Figura 30 b**). Estos resultados indican que el papel del gen *ARS1* parece ser dependiente de ABA. Otro aspecto interesante desde un punto de vista fisiológico es el déficit de  $\text{Ca}^{2+}$  en la hoja del mutante *ars1* (**Figura 28 c**). En primer lugar el cierre estomático depende de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , y en segundo lugar hay señales mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  que son dependientes de ABA (Luan, 2002; Roelfsema y Hedrich, 2010). Sería, por lo tanto, muy interesante dilucidar si *ARS1* está involucrado o no en la homeostasis del calcio.

En resumen, se ha demostrado que el factor de transcripción R1-MYB, identificado a partir del mutante de inserción *ars1*, está involucrado en regular la pérdida de agua por transpiración en condiciones de estrés y, por tanto, desempeña una función esencial en la respuesta del tomate al estrés

salino e hídrico. Un aspecto a tener en cuenta es el importante papel que puede tener este nuevo gen en la tolerancia a otros estreses abióticos. En este trabajo se ha demostrado su papel en salinidad y sequía, pero con toda probabilidad estará involucrado también en otros estreses donde la regulación de la pérdida de agua por transpiración sea un proceso fisiológico clave frente al estrés. Si bien, hay que tener en consideración que puede haber un desequilibrio entre acumulación de biomasa y la estrategia de evitación vía reducción de la transpiración. Es evidente que si los periodos de exposición son largos y severos, los genotipos con transpiración reducida tienen ventaja para evitar la deshidratación, especialmente cuando la demanda evaporativa es alta, como ocurre a altas temperaturas, ya que pueden ahorrar agua para usarla en las fases posteriores del ciclo de vida de la planta (Tardieu *et al.*, 2010). Sin embargo, altos valores de conductancia estomática, como los observados por la anulación del gen *ARS1*, podrían ir asociados a un mayor desarrollo de la planta a niveles bajos e incluso moderados de estrés salino e hídrico, sobre todo cuando los periodos de exposición al estrés no sean demasiado prolongados, ya que podría mejorar la eficiencia fotosintética. Futuros estudios con las líneas de silenciamiento y sobreexpresión del gen *ARS1* dirigidos a estudiar la respuesta a diferentes niveles de estrés podrían permitir definir la estrategia óptima para garantizar que el equilibrio desarrollo-defensa se incline hacia el primero, y así garantizar la máxima producción en condiciones de estrés.





## **Conclusiones**



## 6. Conclusiones

1. En la colección de líneas T-DNA generada a partir del cv MoneyMaker, se han preseleccionado 11 mutantes afectados en el desarrollo vegetativo o reproductivo, así como en la tolerancia a la salinidad.
2. Uno de los mutantes identificados tiene anulada la expresión de un factor de transcripción R1-MYB, y se ha denominado *ars1* (*altered response to salt stress 1*) por estar afectado por la salinidad. Si bien, el desarrollo vegetativo y reproductivo del mutante no se ve alterado cuando las plantas se desarrollan en condiciones normales de cultivo.
3. Aunque el gen *ARS1* se expresa en los diferentes órganos de la planta, su expresión se induce por la salinidad solamente en hoja. Además, la expresión se mantiene e incluso incrementa con el periodo de exposición al estrés.
4. La sensibilidad del mutante *ars1* al estrés salino está relacionada con una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  y un incremento de la conductancia estomática de la hoja a lo largo del periodo de exposición a la sal.
5. Las alteraciones en la conductancia estomática y transpiración tienen lugar en las hojas del mutante *ars1* desde la imposición del estrés. Además, la mayor apertura estomática y el alto número de estomas abiertos en las hojas del mutante, respecto al WT, después de 3 y 7 días de tratamiento sugieren que la sensibilidad del mutante está relacionada con su menor capacidad para cerrar los estomas en respuesta al estrés salino.
6. En condiciones de estrés hídrico, también se observa una mayor pérdida de agua por transpiración en el mutante *ars1*. Su fenotipo se

## Conclusiones

ve menos afectado que en estrés salino, ya que el proceso fisiológico afectado en estrés hídrico es la pérdida de agua por transpiración, mientras que a esta alteración se suma la toxicidad iónica en el caso de salinidad. Además, la mutación también afecta al cierre estomático en respuesta a la fitohormona ABA.

7. El papel del gen *ARS1* en la regulación de la pérdida de agua por transpiración en condiciones salinas se ha corroborado mediante el estudio de la respuesta de líneas de silenciamiento y de sobreexpresión del gen *ARS1*. Así, el mutante y las líneas RNAi incrementan la conductancia estomática y transpiración, respecto al WT, en condiciones salinas, la respuesta opuesta a la encontrada en las líneas OE.
8. Se ha comprobado que el mayor transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea inducido por la anulación del gen *ARS1* no está causado por una reducción en la expresión de los principales genes implicados en la carga de  $\text{Na}^+$  en el xilema. Por el contrario, la expresión de los transportadores *SISOS1* y *SIHKT1;2* se induce con la sal en el mutante y en las líneas de silenciamiento, lo que es esperable al transportar más  $\text{Na}^+$  a la parte aérea como consecuencia del aumento en la transpiración.
9. Finalmente, señalar el importante papel que puede tener este nuevo gen, identificado a partir del mutante de inserción *ars1*, en la tolerancia a diferentes estreses abióticos en tomate. En este trabajo se ha demostrado su papel en salinidad y sequía, pero con toda probabilidad estará involucrado también en otros estreses donde la

regulación de la pérdida de agua por transpiración sea un proceso fisiológico clave frente al estrés.



## **Bibliografía**



## 7. Bibliografía

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, **15**, 63-78.
- AbuQamar, S., Luo, H., Laluk, K., Mickelbart, M.V. and Mengiste, T.** (2009) Crosstalk between biotic and abiotic stress responses in tomato is mediated by the AIM1 transcription factor. *The Plant Journal*, **58**, 347-360.
- Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., Domínguez, E., Wang, Z., De Vos, R.C.H., Jetter, R., Schreiber, L., Heredia, A., Rogachev, I. and Aharoni, A.** (2009) Fruit-Surface Flavonoid Accumulation in Tomato Is Controlled by a *SIMYB12*-Regulated Transcriptional Network. *PLoS Genet*, **5**, e1000777.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X. and Zhu, J.-K.** (2006) A R2R3 Type MYB Transcription Factor Is Involved in the Cold Regulation of CBF Genes and in Acquired Freezing Tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 37636-37645.
- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., van Arkel, G. and Pereira, A.** (2004) The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties, and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 2463-2480.

- Ajjawi, I., Lu, Y., Savage, L.J., Bell, S.M. and Last, R.L.** (2010) Large-scale reverse genetics in Arabidopsis: case studies from the Chloroplast 2010 Project. *Plant physiology*, **152**, 529-540.
- Ali, Z., Park, H.C., Ali, A., Oh, D.-H., Aman, R., Kropornicka, A., Hong, H., Choi, W., Chung, W.S., Kim, W.-Y., Bressan, R.A., Bohnert, H.J., Lee, S.Y. and Yun, D.-J.** (2012) TsHKT1;2, a HKT1 Homolog from the Extremophile Arabidopsis Relative *Thellungiella salsuginea*, Shows K<sup>+</sup> Specificity in the Presence of NaCl. *Plant Physiology*, **158**, 1463-1474.
- Allan, A.C., Hellens, R.P. and Laing, W.A.** (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*, **13**, 99-102.
- Amir Hossain, M., Lee, Y., Cho, J.-I., Ahn, C.-H., Lee, S.-K., Jeon, J.-S., Kang, H., Lee, C.-H., An, G. and Park, P.** (2010) The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. *Plant Mol Biol*, **72**, 557-566.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. and Blumwald, E.** (1999) Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in Arabidopsis. *Science*, **285**, 1256-1258.
- Asamizu, E. and Ezura, H.** (2009) Inclusion of Tomato in the Genus *Solanum* as *Solanum lycopersicum*; is Evident from Phylogenetic Studies. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **78**, 3-5.
- Ashraf, M., Athar, H., Harris, P. and Kwon, T.** (2008) Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, **97**, 45-110.

**Asins, M.J., Villalta, I., Aly, M.M., Olías, R., Álvarez De Morales, P.A.Z., Huertas, R., Li, J.U.N., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E.A. and Belver, A.** (2013) Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis. *Plant, Cell & Environment*, **36**, 1171-1191.

**Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J., Antón, T., García-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., Flores, F., Moreno, V., Carmen Bolarin, M. and Pineda, B.** (2011) An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Rep*, **30**, 1865-1879.

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K** (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.

**Azpiroz-Leehan, R. and Feldmann, K.A.** (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics*, **13**, 152-156.

**Bacon, M.** (2009) *Water use efficiency in plant biology*: John Wiley & Sons.

**Bai, Y. and Lindhout, P.** (2007) Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, **100**, 1085-1094.

**Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M. and Weisshaar, B.** (2003) Update

on the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **15**, 2497-2502.

**Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A.D., Matallana-Ramirez, L.P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanon, M.-I., Köhler, B. and Mueller-Roeber, B.** (2010) A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *The Plant Journal*, **62**, 250-264.

**Balsemão-Pires, E., Jaillais, Y., Olson, B.J., Andrade, L.R., Umen, J.G., Chory, J. and Sachetto-Martins, G.** (2011) The *Arabidopsis* translocator protein (AtTSPO) is regulated at multiple levels in response to salt stress and perturbations in tetrapyrrole metabolism. *BMC plant biology*, **11**, 108.

**Ballester, A.-R., Molthoff, J., de Vos, R., Hekkert, B.t.L., Orzaez, D., Fernández-Moreno, J.-P., Tripodi, P., Grandillo, S., Martin, C., Heldens, J., Ykema, M., Granell, A. and Bovy, A.** (2010) Biochemical and Molecular Analysis of Pink Tomatoes: Deregulated Expression of the Gene Encoding Transcription Factor SIMYB12 Leads to Pink Tomato Fruit Color. *Plant Physiology*, **152**, 71-84.

**Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B. and Pardo, J.M.** (2012) Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **24**, 1127-1142.

**Barrero, L. and Tanksley, S.** (2004) Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theor Appl Genet*, **109**, 669-679.

- Barrero, L.S., Cong, B., Wu, F. and Tanksley, S.D.** (2006) Developmental characterization of the fasciated locus and mapping of Arabidopsis candidate genes involved in the control of floral meristem size and carpel number in tomato. *Genome*, **49**, 991-1006.
- Bechtold, U., Lawson, T., MEJIA-CARRANZA, J., Meyer, R.C., Brown, I.R., Altmann, T., Ton, J. and Mullineaux, P.M.** (2010) Constitutive salicylic acid defences do not compromise seed yield, drought tolerance and water productivity in the Arabidopsis accession C24. *Plant, cell & environment*, **33**, 1959-1973.
- Bedinger, P.A., Chetelat, R.T., McClure, B., Moyle, L.C., Rose, J.K.C., Stack, S.M., van der Knaap, E., Baek, Y.S., Lopez-Casado, G., Covey, P.A., Kumar, A., Li, W., Nunez, R., Cruz-Garcia, F. and Royer, S.** (2011) Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: Opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, **24**, 171-187.
- Bergougnoux, V.** (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, **32**, 170-189.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Véry, A.A., Sentenac, H. and Casse, F.** (2003) *Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance.*
- Bhardwaj, J., Chauhan, R., Swarnkar, M., Chahota, R., Singh, A., Shankar, R. and Yadav, S.** (2013) Comprehensive transcriptomic study on horse gram (*Macrotyloma uniflorum*): De novo assembly,

functional characterization and comparative analysis in relation to drought stress. *BMC Genomics*, **14**, 647.

**Blum, A.** (1988) *Plant breeding for stress environments*.

**Blum, A.** (2011) Drought resistance–is it really a complex trait? *Functional Plant Biology*, **38**, 753-757.

**Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M.E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., Alseekh, S., Sorensen, I., Lichtenstein, G., Fich, E.A., Conte, M., Keller, H., Schneeberger, K., Schwacke, R., Ofner, I., Vrebalov, J., Xu, Y., Osorio, S., Aflitos, S.A., Schijlen, E., Jimenez-Gomez, J.M., Ryngajllo, M., Kimura, S., Kumar, R., Koenig, D., Headland, L.R., Maloof, J.N., Sinha, N., van Ham, R.C.H.J., Lankhorst, R.K., Mao, L., Vogel, A., Arsova, B., Panstruga, R., Fei, Z., Rose, J.K.C., Zamir, D., Carrari, F., Giovannoni, J.J., Weigel, D., Usadel, B. and Fernie, A.R.** (2014) The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nat Genet*, **46**, 1034-1038.

**Bonales-Alatorre, E., Shabala, S., Chen, Z.-H. and Pottosin, I.** (2013) Reduced Tonoplast Fast-Activating and Slow-Activating Channel Activity Is Essential for Conferring Salinity Tolerance in a Facultative Halophyte, Quinoa. *Plant Physiology*, **162**, 940-952.

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

- Bramley, P.M.** (2000) Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, **54**, 233-236.
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A. and Masmoudi, K.** (2007) Overexpression of wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter TNH1 and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase TVP1 improve salt-and drought-stress tolerance in Arabidopsis thaliana plants. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 301-308.
- Brownfield, L. and Twell, D.** (2009) A dynamic DUO of regulatory proteins coordinates gamete specification and germ cell mitosis in the angiosperm male germline. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 1159-1162.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.-B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q. and Li, C.** (2008) Role of the Arabidopsis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res*, **18**, 756-767.
- Büßis, D., von Groll, U., Fisahn, J. and Altmann, T.** (2006) Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in Arabidopsis thaliana at growth light conditions. *Functional Plant Biology*, **33**, 1037-1043.
- Cadahia, C.** (1995) Fertilización. En el cultivo del tomate. *Ediciones Mundi-Prensa.*, 169-187.
- Cai, H., Tian, S., Liu, C. and Dong, H.** (2011) Identification of a MYB3R gene involved in drought, salt and cold stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*, **485**, 146-152.
- Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H. and Jack, T.** (1999) Generation of enhancer

- trap lines in Arabidopsis and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal*, **17**, 699-707.
- Cao, Z.-H., Zhang, S.-Z., Wang, R.-K., Zhang, R.-F. and Hao, Y.-J.** (2013) Genome Wide Analysis of the Apple MYB Transcription Factor Family Allows the Identification of *MdoMYB121* Gene Confering Abiotic Stress Tolerance in Plants. *PLoS ONE*, **8**, e69955.
- Carvalho, R.F., Campos, M.L., Pino, L.E., Crestana, S.L., Zsögön, A., Lima, J.E., Benedito, V.A. and Peres, L.E.** (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, **7**, 1-14.
- Casson, S. and Gray, J.E.** (2008) Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, **178**, 9-23.
- Causse, G.B.a.M.** (2012) *Genetic diversity in tomato (Solanum lycopersicum) and its wild relatives.*
- Causse, M., Damidaux, R. and Rousselle, P.** (2006) Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of Solanaceous crops*, **2**, 153-192.
- Claeys, H. and Inzé, D.** (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant physiology*, **162**, 1768-1779.
- Cominelli, E., Galbiati, M. and Tonelli, C.** (2010) Transcription factors controlling stomatal movements and drought tolerance. *Transcription*, **1**, 41-45.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. and Tonelli, C.**

- (2005) A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology*, **15**, 1196-1200.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G. and Tonelli, C.** (2008) Over-expression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, **53**, 53-64.
- Cong, B., Barrero, L.S. and Tanksley, S.D.** (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, **40**, 800-804.
- Cong, B., Liu, J. and Tanksley, S.D.** (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13606-13611.
- Cong, B. and Tanksley, S.D.** (2006) FW2. 2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Mol Biol*, **62**, 867-880.
- Consortium, T.G.** (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **485**, 635-641.
- Cuartero, J.** (2009) Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In *Molecular Techniques for Crop Improvement*. (D.S., A.K.J.J.y.B. ed.
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Asíns, M.J. and Moreno, V.** (2006) Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1045-1058.

- Cui, L.-G., Shan, J.-X., Shi, M., Gao, J.-P. and Lin, H.-X.** (2014) The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*, n/a-n/a.
- Chater, C.C., Oliver, J., Casson, S. and Gray, J.E.** (2014) Putting the brakes on: abscisic acid as a central environmental regulator of stomatal development. *New Phytologist*, **202**, 376-391.
- Chen, H., An, R., Tang, J.-H., Cui, X.-H., Hao, F.-S., Chen, J. and Wang, X.-C.** (2007) Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Molecular Breeding*, **19**, 215-225.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C. and Yu, D.** (2012) The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1819**, 120-128.
- Chen, N., Yang, Q., Pan, L., Chi, X., Chen, M., Hu, D., Yang, Z., Wang, T., Wang, M. and Yu, S.** (2014) Identification of 30 MYB transcription factor genes and analysis of their expression during abiotic stress in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Gene*, **533**, 332-345.
- Cheng, L., Li, X., Huang, X., Ma, T., Liang, Y., Ma, X., Peng, X., Jia, J., Chen, S., Chen, Y., Deng, B. and Liu, G.** (2013) Overexpression of sheepgrass R1-MYB transcription factor LcMYB1 confers salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**, 252-260.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M. and Zhu, J.-K.** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced

transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & development*, **17**, 1043-1054.

**Demidchik, V., Cuin, T.A., Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A. and Yurin, V.** (2010) Arabidopsis root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science*, **123**, 1468-1479.

**Denekamp, M. and Smeekens, S.C.** (2003) Integration of Wounding and Osmotic Stress Signals Determines the Expression of the AtMYB102 Transcription Factor Gene. *Plant Physiology*, **132**, 1415-1423.

**Deng, W., Yang, Y., Ren, Z., Audran-Delalande, C., Mila, I., Wang, X., Song, H., Hu, Y., Bouzayen, M. and Li, Z.** (2012) The tomato SIIAA15 is involved in trichome formation and axillary shoot development. *New Phytologist*, **194**, 379-390.

**Dent, R.M., Sharifi, M.N., Malnoë, A., Haglund, C., Calderon, R.H., Wakao, S. and Niyogi, K.K.** (2015) Large-scale insertional mutagenesis of *Chlamydomonas* supports phylogenomic functional prediction of photosynthetic genes and analysis of classical acetate-requiring mutants. *The Plant Journal*, **82**, 337-351.

**Deyholos, M.K.** (2010) Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, cell & environment*, **33**, 648-654.

**Ding, Z., Li, S., An, X., Liu, X., Qin, H. and Wang, D.** (2009) Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*, **36**, 17-29.

- Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. and Zhu, J.-K.** (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 8281-8286.
- Driscoll, S., Prins, A., Olmos, E., Kunert, K. and Foyer, C.** (2006) Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO<sub>2</sub> enrichment in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 381-390.
- Du, H., Wang, Y.-B., Xie, Y., Liang, Z., Jiang, S.-J., Zhang, S.-S., Huang, Y.-B. and Tang, Y.-X.** (2013) Genome-Wide Identification and Evolutionary and Expression Analyses of MYB-Related Genes in Land Plants. *DNA Research*, **20**, 437-448.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. and Lepiniec, L.** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **15**, 573-581.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, **33**, 751-763.
- Emmanuel, E. and Levy, A.A.** (2002) Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current opinion in plant biology*, **5**, 112-117.
- Estañ, M.T., Martinez-Rodriguez, M.M., Perez-Alfocea, F., Flowers, T.J. and 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**, 703-712.

- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E.** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, **5**, 199-206.
- Evans, A.R., Hall, D., Pritchard, J. and Newbury, H.J.** (2012) The roles of the cation transporters CHX21 and CHX23 in the development of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 59-67.
- Fang, Y. and Xiong, L.** (2014) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1-17.
- FAO** (2010) [www.fao.org](http://www.fao.org).
- FAO** (2013) [www.fao.org](http://www.fao.org).
- FAOSTAT** (2013) <http://faostat3.fao.org>.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L. and Grotewold, E.** (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The Plant Journal*, **66**, 94-116.
- Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L. and Preuss, D.** (2000) Alterations in CER6, a Gene Identical to CUT1, Differentially Affect Long-Chain Lipid Content on the Surface of Pollen and Stems. *The Plant Cell*, **12**, 2001-2008.
- Florido Bacallao, M. and Bao Fundora, L.** (2014) Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, **35**, 70-88.
- Flowers, T.J. and Colmer, T.D.** (2008) Salinity tolerance in halophytes\*. *New Phytologist*, **179**, 945-963.

- Fobes, J.F., Mudd, J.B. and Marsden, M.P.F.** (1985) Epicuticular Lipid Accumulation on the Leaves of *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D'Arcy and *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Physiology*, **77**, 567-570.
- Foolad, M.R.** (2007) Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, **2007**.
- Franks, P.J., W. Doheny-Adams, T., Britton-Harper, Z.J. and Gray, J.E.** (2015) Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, n/a-n/a.
- Frary, A., Nesbitt, T.C., Frary, A., Grandillo, S., Van Der Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B. and Tanksley, S.D.** (2000) fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, **289**, 85-88.
- Fu, F.-F., Ye, R., Xu, S.-P. and Xue, H.-W.** (2009) Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population. *Cell Res*, **19**, 380-391.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2005) AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **17**, 3470-3488.
- Fujita, Y., Yoshida, T. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2013) Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **147**, 15-27.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H. and Tanaka, Y.** (2004) Function, Intracellular

- Localization and the Importance in Salt Tolerance of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter from Rice. *Plant and Cell Physiology*, **45**, 146-159.
- Galbiati, M., Matus, J., Francia, P., Rusconi, F., Canon, P., Medina, C., Conti, L., Cominelli, E., Tonelli, C. and Arce-Johnson, P.** (2011) The grapevine guard cell-related VvMYB60 transcription factor is involved in the regulation of stomatal activity and is differentially expressed in response to ABA and osmotic stress. *BMC Plant Biology*, **11**, 142.
- Galvan-Ampudia, C.S. and Testerink, C.** (2011) Salt stress signals shape the plant root. *Current opinion in plant biology*, **14**, 296-302.
- Ganesan, G., Sankararamasubramanian, H.M., Harikrishnan, M., Ashwin, G. and Parida, A.** (2012) A MYB transcription factor from the grey mangrove is induced by stress and confers NaCl tolerance in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4549-4561.
- Gao, S.-Q., Chen, M., Xu, Z.-S., Zhao, C.-P., Li, L., Xu, H.-j., Tang, Y.-m., Zhao, X. and Ma, Y.-Z.** (2011) The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, **75**, 537-553.
- García-Abellan, J.O., Egea, I., Pineda, B., Sanchez-Bel, P., Belver, A., Garcia-Sogo, B., Flores, F.B., Atares, A., Moreno, V. and Bolarin, M.C.** (2014) Heterologous expression of the yeast HAL5 gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na<sup>+</sup> accumulation in the long term. *Physiologia Plantarum*, n/a-n/a.
- Garcia-Abellan, J.O., Fernandez-Garcia, N., Lopez-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F.B., Angosto, T., Capel, J., Lozano, R., Pineda, B. and Moreno, V.** (2015) The tomato res mutant which

accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiologia plantarum*.

**Garciadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A. and Rodríguez-Navarro,**

**A.** (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal*, **34**, 788-801.

**Ghedira, R., De Buck, S., Van Ex, F., Angenon, G. and Depicker, A.**

(2013) T-DNA transfer and T-DNA integration efficiencies upon *Arabidopsis thaliana* root explant cocultivation and floral dip transformation. *Planta*, **238**, 1025-1037.

**Gibbs, D.J. and Coates, J.C.** (2014) AtMYB93 is an endodermis-specific

transcriptional regulator of lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, **9**, e970406.

**Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., Pérez-**

**Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V. and Lozano, R.** (2010) Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, **5**, e14427.

**Giovannoni, J.J.** (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening

control. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 283-289.

**Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín, M.C., López-Coronado, J.M., Arrillaga,**

**I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and Moreno, V.** (2000)

The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiology*, **123**, 393-402.

**Golldack, D., Lüking, I. and Yang, O.** (2011) Plant tolerance to drought

and salinity: stress regulating transcription factors and their

- functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep*, **30**, 1383-1391.
- Gong, X. and Derek Bewley, J.** (2008) A GAMYB-like gene in tomato and its expression during seed germination. *Planta*, **228**, 563-572.
- Grandillo, S., Ku, H. and Tanksley, S.** (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet*, **99**, 978-987.
- Grandillo, S., Ku, H.M. and Tanksley, S.D.** (1996) Characterization of fs8.1, a major QTL influencing fruit shape in tomato. *Molecular Breeding*, **2**, 251-260.
- Grandillo, S., Termolino, P. and van der Knaap, E.** (2013) Molecular mapping of complex traits in tomato. *Genetics, Genomics and Breeding of crop plants (Series Editor C. Kole) Volume: Genetics, Genomics and Breeding of Tomato.(Volume editors BE Liedl, JA Labate, AJ Slade, JR Stommel, C. Kole). Science Publishers, Enfield, NH, USA*, 150-227.
- Gruber, V., Blanchet, S., Diet, A., Zahaf, O., Boualem, A., Kakar, K., Alunni, B., Udvardi, M., Frugier, F. and Crespi, M.** (2009) Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in *Medicago truncatula*. *Mol Genet Genomics*, **281**, 55-66.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J., Pineda, O., Thomashow, M.F. and Zhang, J.Z.** (2002) Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **130**, 639-648.
- Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.-K.** (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the

- calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 3735-3740.
- Hall, D., Evans, A.R., Newbury, H.J. and Pritchard, J.** (2006) Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1201-1210.
- Hao, Y.-J., Wei, W., Song, Q.-X., Chen, H.-W., Zhang, Y.-Q., Wang, F., Zou, H.-F., Lei, G., Tian, A.-G., Zhang, W.-K., Ma, B., Zhang, J.-S. and Chen, S.-Y.** (2011) Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal*, **68**, 302-313.
- Hasegawa, P.M.** (2013) Sodium (Na<sup>+</sup>) homeostasis and salt tolerance of plants. *Environmental and Experimental Botany*, **92**, 19-31.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J.** (2000) Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**, 463-499.
- He, X.-J., Mu, R.-L., Cao, W.-H., Zhang, Z.-G., Zhang, J.-S. and Chen, S.-Y.** (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, **44**, 903-916.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R. and Sevilla, F.** (2001) Antioxidant Systems and O<sub>2</sub>(.-)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiology*, **127**, 817-831.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F.** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is

- associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment*, **23**, 853-862.
- Hetherington, A.M. and Brownlee, C.** (2004) The Generation of  $Ca_{2+}$  Signals in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 401-427.
- Hirayama, T. and Shinozaki, K.** (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal*, **61**, 1041-1052.
- Hirschberg, J.** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 210-218.
- Hoagland, D.R., Arnon, D. I.** (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Agric. Exp. Station*, 31.
- Hobson, G. and Grierson, D.** (1993) Tomato. In *Biochemistry of Fruit Ripening* (Seymour, G., Taylor, J. and Tucker, G. eds): Springer Netherlands, pp. 405-442.
- Hoel, B.O. and Solhaug, K.A.** (1998) Effect of Irradiance on Chlorophyll Estimation with the Minolta SPAD-502 Leaf Chlorophyll Meter. *Annals of Botany*, **82**, 389-392.
- Hong, C.Y. and Kao, C.H.** (2008) NaCl-induced expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is not associated with osmotic component. *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 199-201.
- Horie, T., Hauser, F. and Schroeder, J.I.** (2009) HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science*, **14**, 660-668.
- Hsieh, T.-H., Li, C.-W., Su, R.-C., Cheng, C.-P., Sanjaya, Tsai, Y.-C. and Chan, M.-T.** (2010) A tomato bZIP transcription factor, SIAREB,

## Bibliografía

- is involved in water deficit and salt stress response. *Planta*, **231**, 1459-1473.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z. and Xiong, L.** (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, **67**, 169-181.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U.** (2005) Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **168**, 541-549.
- Huang, C., Hu, G., Li, F., Li, Y., Wu, J. and Zhou, X.** (2013) NbPHAN, a MYB transcriptional factor, regulates leaf development and affects drought tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Physiologia Plantarum*, **149**, 297-309.
- Huertas, R., Olias, R., Eljakaoui, Z., Galvez, F.J., Li, J., De Morales, P.A., Belver, A. and Rodriguez-Rosales, M.P.** (2012) Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant Cell Environ*, **35**, 1467-1482.
- Inaba, T. and Ito-Inaba, Y.** (2010) Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant and cell physiology*, **51**, 1847-1853.
- IPCC** (2014) Informe Resumen del Cambio Climático 2014. *Panel Intergubernamental para el Cambio Climático*.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.-S., Shi, W. and Zhu, J.-K.** (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell Online*, **12**, 1667-1677.

- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F.** (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **7**, 106-111.
- Jeon, J.-S., Lee, S., Jung, K.-H., Jun, S.-H., Jeong, D.-H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Lee, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M.-J., Sung, R.-J., Choi, H.-S., Yu, J.-H., Choi, J.-H., Cho, S.-Y., Cha, S.-S., Kim, S.-I. and An, G.** (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal*, **22**, 561-570.
- Jeong, D.-H., An, S., Kang, H.-G., Moon, S., Han, J.-J., Park, S., Lee, H.S., An, K. and An, G.** (2002) T-DNA Insertional Mutagenesis for Activation Tagging in Rice. *Plant Physiology*, **130**, 1636-1644.
- Jiang, H., Li, H., Bu, Q. and Li, C.** (2009a) The RHA2a-interacting proteins ANAC019 and ANAC055 may play a dual role in regulating ABA response and jasmonate response. *Plant Signaling & Behavior*, **4**, 464-466.
- Jiang, Y., Yang, B. and Deyholos, M.** (2009b) Functional characterization of the Arabidopsis bHLH92 transcription factor in abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, **282**, 503-516.
- Jin, Y., Jing, W., Zhang, Q. and Zhang, W.** (2014) Cyclic nucleotide gated channel 10 negatively regulates salt tolerance by mediating Na<sup>+</sup> transport in Arabidopsis. *J Plant Res*, 1-10.
- Jung, C., Seo, J.S., Han, S.W., Koo, Y.J., Kim, C.H., Song, S.I., Nahm, B.H., Choi, Y.D. and Cheong, J.-J.** (2008) Overexpression of AtMYB44 Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology*, **146**, 623-635.

- Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.-K. and Torii, K.U.** (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to Arabidopsis Stomatal Differentiation. *The Plant Cell*, **20**, 1775-1785.
- Kang, J.-y., Choi, H.-i., Im, M.-y. and Kim, S.Y.** (2002) Arabidopsis Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, **14**, 343-357.
- Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., Trijatmiko, K.R., Marsch-Martinez, N., Krishnan, A., Nataraja, K.N., Udayakumar, M. and Pereira, A.** (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 15270-15275.
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2013) MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, **6**, 686-703.
- Kebede, H., Martin, B., Nienhuis, J. and King, G.** (1994) Leaf Anatomy of Two Lycopersicon Species with Contrasting Gas Exchange Properties. *Crop Science*, **34**, 108-113.
- Keenan, T.F., Hollinger, D.Y., Bohrer, G., Dragoni, D., Munger, J.W., Schmid, H.P. and Richardson, A.D.** (2013) Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise. *Nature*, **499**, 324-327.
- Khuong, T., Cr  t  , P., Robaglia, C. and Caffarri, S.** (2013) Optimisation of tomato Micro-tom regeneration and selection on glufosinate/Basta

and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant Cell Rep*, **32**, 1441-1454.

**Kilian, J., Peschke, F., Berendzen, K.W., Harter, K. and Wanke, D.**

(2012) Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1819**, 166-175.

**Kim, J.H., Nguyen, N.H., Jeong, C.Y., Nguyen, N.T., Hong, S.-W. and**

**Lee, H.** (2013) Loss of the R2R3 MYB, AtMyb73, causes hyper-induction of the SOS1 and SOS3 genes in response to high salinity in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 1461-1465.

**Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. and Schroeder, J.I.**

(2010) Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sub>2+</sub> Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 561-591.

**Klee, H.J. and Giovannoni, J.J.** (2011) Genetics and control of tomato

fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, **45**, 41-59.

**Knapp, S.** (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit

diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 2001-2022.

**Knight, M.R. and Knight, H.** (2012) Low-temperature perception leading

to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, **195**, 737-751.

**Koenig, D., Jiménez-Gómez, J.M., Kimura, S., Fulop, D., Chitwood,**

**D.H., Headland, L.R., Kumar, R., Covington, M.F., Devisetty, U.K., Tat, A.V., Tohge, T., Bolger, A., Schneeberger, K.,**

- Ossowski, S., Lanz, C., Xiong, G., Taylor-Teeple, M., Brady, S.M., Pauly, M., Weigel, D., Usadel, B., Fernie, A.R., Peng, J., Sinha, N.R. and Maloof, J.N.** (2013) Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, E2655-E2662.
- Koops, P., Pelsler, S., Ignatz, M., Klose, C., Marrocco-Selden, K. and Kretsch, T.** (2011) EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 5547-5560.
- Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lü, S., Joubès, J. and Jenks, M.A.** (2009) The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **151**, 1918-1929.
- Krysan, P.J., Young, J.C. and Sussman, M.R.** (1999) T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **11**, 2283-2290.
- Ku, H.M., Doganlar, S., Chen, K.Y. and Tanksley, S.D.** (1999) The genetic basis of pear-shaped tomato fruit. *Theor Appl Genet*, **99**, 844-850.
- Laporte, M.M., Shen, B. and Tarczynski, M.C.** (2002) Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 699-705.
- Laurie, S., Feeney, K.A., Maathuis, F.J.M., Heard, P.J., Brown, S.J. and Leigh, R.A.** (2002) A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant Journal*, **32**, 139-149.

- Lawson, T. and Blatt, M.R.** (2014) Stomatal Size, Speed, and Responsiveness Impact on Photosynthesis and Water Use Efficiency. *Plant Physiology*, **164**, 1556-1570.
- Le Martret, B., Poage, M., Shiel, K., Nugent, G.D. and Dix, P.J.** (2011) Tobacco chloroplast transformants expressing genes encoding dehydroascorbate reductase, glutathione reductase, and glutathione-S-transferase, exhibit altered anti-oxidant metabolism and improved abiotic stress tolerance. *Plant biotechnology journal*, **9**, 661-673.
- Lee, K., Lee, H.G., Yoon, S., Kim, H.U. and Seo, P.J.** (2015) The Arabidopsis MYB96 Transcription Factor Is a Positive Regulator of ABI4 in the Control of Seed Germination. *Plant Physiology*.
- Lee, T.G., Jang, C.S., Kim, J.Y., Kim, D.S., Park, J.H., Kim, D.Y. and Seo, Y.W.** (2007) A Myb transcription factor (TaMyb1) from wheat roots is expressed during hypoxia: roles in response to the oxygen concentration in root environment and abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, **129**, 375-385.
- Lèlievre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. and Pech, J.C.** (1997) Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, **101**, 727-739.
- Lessani, H. and Marschner, H.** (1978) Relation Between Salt Tolerance and Long-Distance Transport of Sodium and Chloride in Various Crop Species. *Functional Plant Biology*, **5**, 27-37.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D. and Tadmor, Y.** (2005) Not just colors - Carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in

- tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science and Technology*, **16**, 407-415.
- Li, C., Ng, C.K.Y. and Fan, L.-M.** (2015) MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*, **114**, 80-91.
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W. and Yu, D.** (2011) Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*, **233**, 1237-1252.
- Liao, Y., Zou, H.-F., Wang, H.-W., Zhang, W.-K., Ma, B., Zhang, J.-S. and Chen, S.-Y.** (2008) Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Cell Res*, **18**, 1047-1060.
- Lindemose, S., Shea, C., Jensen, M. and Skriver, K.** (2013) Structure, Function and Networks of Transcription Factors Involved in Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 5842-5878.
- Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Hare, R.A. and Munns, R.** (2004) A locus for sodium exclusion (Nax1), a trait for salt tolerance, mapped in durum wheat. *Functional Plant Biology*, **31**, 1105-1114.
- Ling, Q., Huang, W. and Jarvis, P.** (2011) Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in Arabidopsis thaliana. *Photosynth Res*, **107**, 209-214.
- Linnaeus, C.** (1753) *Species plantarum*: Impensis GC Nauk.
- Lippman, Z. and Tanksley, S.D.** (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited

- wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, **158**, 413-422.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1998) Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **10**, 1391-1406.
- Liu, Y., Koornneef, M. and Soppe, W.J.J.** (2007) The Absence of Histone H2B Monoubiquitination in the *Arabidopsis* *hub1* (*rdo4*) Mutant Reveals a Role for Chromatin Remodeling in Seed Dormancy. *The Plant Cell Online*, **19**, 433-444.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, **25**, 402-408.
- Lozano, R., Giménez, E., Cara, B., Capel, J. and Angosto, T.** (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, **53**, 1635.
- Lü, S., Song, T., Kosma, D.K., Parsons, E.P., Rowland, O. and Jenks, M.A.** (2009) *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal*, **59**, 553-564.
- Luan, S.** (2002) Signalling drought in guard cells. *Plant, cell & environment*, **25**, 229-237.
- Ma, Q., Turner, D.W., Levy, D. and Cowling, W.A.** (2004) Solute accumulation and osmotic adjustment in leaves of *Brassica* oilseeds

- in response to soil water deficit. *Crop and Pasture Science*, **55**, 939-945.
- Maathuis, F.J.M.** (2014) Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 849-858.
- Maathuis, F.J.M. and Prins, H.B.A.** (1990) Patch Clamp Studies on Root Cell Vacuoles of a Salt-Tolerant and a Salt-Sensitive Plantago Species : Regulation of Channel Activity by Salt Stress. *Plant Physiology*, **92**, 23-28.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K.** (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal*, **37**, 720-729.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y. and Oda, K.** (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA<sub>2</sub>ox<sub>7</sub>*, under high-salinity stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **56**, 613-626.
- Mao, X., Jia, D., Li, A., Zhang, H., Tian, S., Zhang, X., Jia, J. and Jing, R.** (2011) Transgenic expression of TaMYB2A confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in Arabidopsis. *Functional & Integrative Genomics*, **11**, 445-465.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P. and Giovannoni, J.J.** (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology*, **157**, 1568-1579.

- Marti, M.C. and Webb, A.A.R.** (2014) Plant science: Leaf veins share the time of day. *Nature*, **515**, 352-353.
- Martienssen, R.A.** (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 2021-2026.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J. and Wagner, D.R.** (2003) Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport. *The Plant Cell Online*, **15**, 1689-1703.
- Mathieu, M., Winters, E.K., Kong, F., Wan, J., Wang, S., Eckert, H., Luth, D., Paz, M., Donovan, C. and Zhang, Z.** (2009) Establishment of a soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. *Planta*, **229**, 279-289.
- Mattana, M., Biazzi, E., Consonni, R., Locatelli, F., Vannini, C., Provera, S. and Coraggio, I.** (2005) Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **125**, 212-223.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 659-668.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J. and Dietrich, R.** (2003) The *Botrytis Susceptible1* Gene Encodes an R2R3MYB Transcription Factor Protein That Is Required for Biotic and Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 2551-2565.

- Merlot, S., Mustilli, A.-C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A. and Giraudat, J.** (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*, **30**, 601-609.
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C. and Kunst, L.** (1999) CUT1, an Arabidopsis Gene Required for Cuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility, Encodes a Very-Long-Chain Fatty Acid Condensing Enzyme. *The Plant Cell*, **11**, 825-838.
- Miller, G.A.D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R.O.N.** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 453-467.
- Miller, P.** (1754) *The gardeners dictionary*.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M.** (2002) Response of the Cultivated Tomato and Its Wild Salt-tolerant Relative *Lycopersicon Pennellii* to Salt-dependent Oxidative Stress: Increased Activities of Antioxidant Enzymes in Root Plastids. *Free Radical Research*, **36**, 195-202.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.-J. and Hasegawa, P.M.** (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **19**, 1403-1414.
- Miura, K., Lee, J., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T. and Hasegawa, P.M.** (2009) Sumoylation of ABI5 by the Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 5418-5423.

- Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1819**, 86-96.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Daros, E., De Campos, M.K.F., De Carvalho, J.F.R.P., Filho, J.C.B., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E.** (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, **130**, 218-229.
- Møller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coates, J.C., Haseloff, J. and Tester, M.** (2009) Shoot Na<sup>+</sup> Exclusion and Increased Salinity Tolerance Engineered by Cell Type-Specific Alteration of Na<sup>+</sup> Transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **21**, 2163-2178.
- Mott, K.A., Gibson, A.C. and O'Leary, J.W.** (1982) The adaptive significance of amphistomatic leaves. *Plant, Cell & Environment*, **5**, 455-460.
- Munns, R.** (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, **25**, 239-250.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 651-681.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J.O., Garcia-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V. and Bolarin, M.C.** (2008) The HAL1 function on Na<sup>+</sup> homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but

the high reduction of Na<sup>+</sup> in leaf is not associated with salt tolerance. *Physiologia plantarum*, **133**, 288-297.

**Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.

**Nagaoka, S. and Takano, T.** (2003) Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2231-2237.

**Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A.J., Tohge, T., Yamazaki, M. and Saito, K.** (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant Journal*, **77**, 367-379.

**Nakashima, K., Shinwari, Z., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol*, **42**, 657-665.

**Nakashima, K., Tran, L.-S.P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, **51**, 617-630.

- Nakazato, T., Warren, D.L. and Moyle, L.C.** (2010) Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, **97**, 680-693.
- Naz, A.A., Raman, S., Martinez, C.C., Sinha, N.R., Schmitz, G. and Theres, K.** (2013) Trifoliolate encodes an MYB transcription factor that modulates leaf and shoot architecture in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 2401-2406.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A., Alemán, F., Martínez, V. and Rubio, F.** (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol*, **68**, 521-532.
- Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H. and Kikuchi, S.** (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, **465**, 30-44.
- O'Malley, R.C. and Ecker, J.R.** (2010) Linking genotype to phenotype using the Arabidopsis unimutant collection. *The Plant Journal*, **61**, 928-940.
- Oh, J., Kwon, Y., Kim, J., Noh, H., Hong, S.-W. and Lee, H.** (2011) A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Mol Biol*, **77**, 91-103.
- Okabe, Y., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Mizoguchi, T. and Ezura, H.** (2011) Tomato TILLING Technology: Development of a Reverse Genetics Tool for the Efficient Isolation of Mutants from Micro-Tom Mutant Libraries. *Plant and Cell Physiology*.
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Li, J.U.N., De Morales, P.A., Marín-Manzano, M.C., Pardo, J.M. and Belver, A.** (2009) The plasma membrane

## Bibliografía

- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na<sup>+</sup> between plant organs. *Plant, Cell & Environment*, **32**, 904-916.
- ONU** (2012) Prospectiva de la Población Mundial [www.unpopulation.org](http://www.unpopulation.org).
- Osmond, C.B.** (1976) Ion absorption and carbon metabolism in cells of higher plants. In *Transport in plants II*. (Berlin-Heidelberg., S.-V. ed, pp. 347-372.
- Osorio, S., Alba, R., Damasceno, C.M., Lopez-Casado, G., Lohse, M., Zanor, M.I., Tohge, T., Usadel, B., Rose, J.K. and Fei, Z.** (2011) Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology*, **157**, 405-425.
- Pardo, J.M.** (2010) Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 185-196.
- Pasquali, G., Biricolti, S., Locatelli, F., Baldoni, E. and Mattana, M.** (2008) Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Rep*, **27**, 1677-1686.
- Paz-Ares J, G.D., Wienand U, Peterson PA, Saedler H** (1987) The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J*, **6**, 3553–3558.
- Peralta, I.E., Knapp, S. and Spooner, D.M.** (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, **30**, 424-434.

- Peralta, I.E. and Spooner, D.M.** (2001) Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*, **88**, 1888-1902.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M. and Knapp, S.** (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*).
- Perry, C., Steduto, P., Allen, R.G. and Burt, C.M.** (2009) Increasing productivity in irrigated agriculture: agronomic constraints and hydrological realities. *Agricultural Water Management*, **96**, 1517-1524.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L. and Samuels, A.L.** (2004) Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science*, **306**, 702-704.
- Pillitteri, L.J. and Torii, K.U.** (2012) Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 591-614.
- Pineda, B.** (2010) Tomato: Genomic Approaches for Salt And Drought Stress Tolerance. In *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress* (Narendra Tuteja ed: Wiley-VCH Verlag and co. KGaA, pp. 1085-1110).
- Prasad, P., Pisipati, S., Momčilović, I. and Ristic, Z.** (2011) Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **197**, 430-441.

- Priyanka, B., Sekhar, K., Sunita, T., Reddy, V. and Rao, K.V.** (2010) Characterization of expressed sequence tags (ESTs) of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) and functional validation of selected genes for abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, **283**, 273-287.
- Qin, Y., Wang, M., Tian, Y., He, W., Han, L. and Xia, G.** (2012) Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*, **39**, 7183-7192.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S. and Zhu, J.-K.** (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 8436-8441.
- Quan, R., Hu, S., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, Z. and Huang, R.** (2010) Overexpression of an ERF transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, **8**, 476-488.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K. and Pardo, J.M.** (2002) Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 9061-9066.
- Rabara, R.C., Tripathi, P. and Rushton, P.J.** (2014) The Potential of Transcription Factor-Based Genetic Engineering in Improving Crop Tolerance to Drought. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, **18**, 601-614.

- Radhamony, R.N., Mohan Prasad, A. and Srinivasan, R.** (2005) T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**, 82-106.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. and Grill, E.** (2010) ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, **15**, 395-401.
- Rahaie, M., Xue, G.-P., Naghavi, M., Alizadeh, H. and Schenk, P.** (2010) A MYB gene from wheat (*Triticum aestivum* L.) is up-regulated during salt and drought stresses and differentially regulated between salt-tolerant and sensitive genotypes. *Plant Cell Rep*, **29**, 835-844.
- Raven, J.A.** (2014) Speedy small stomata? *Journal of experimental botany*, eru032.
- Reeves, W., Lynch, T., Mobin, R. and Finkelstein, R.** (2011) Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Mol Biol*, **75**, 347-363.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., Hong, X., Zhu, J.-K. and Gong, Z.** (2010) ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **63**, 417-429.
- Ren, Z.-H., Gao, J.-P., Li, L.-G., Cai, X.-L., Huang, W., Chao, D.-Y., Zhu, M.-Z., Wang, Z.-Y., Luan, S. and Lin, H.-X.** (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet*, **37**, 1141-1146.

- Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R.** (2010) Making sense out of Ca<sup>2+</sup> signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 305-321.
- Rogers, S. and Bendich, A.** (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, **5**, 69-76.
- Roy, S.J., Negrão, S. and Tester, M.** (2014) Salt resistant crop plants. *Current opinion in biotechnology*, **26**, 115-124.
- Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A. and Hurry, V.** (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*, **49**, 35-150.
- Rus, A., Lee, B.-h., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.-K., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M.** (2004) AtHKT1 facilitates Na<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup> nutrition in planta. *Plant Physiology*, **136**, 2500-2511.
- Rushton, D.L., Tripathi, P., Rabara, R.C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A.K., Langum, T.J., Smidt, L., Boomsma, D.D., Emme, N.J., Chen, X., Finer, J.J., Shen, Q.J. and Rushton, P.J.** (2012) WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant Biotechnology Journal*, **10**, 2-11.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K. and Ezura, H.** (2011) TOMATOMA: A Novel Tomato Mutant Database Distributing Micro-Tom Mutant Collections. *Plant and Cell Physiology*.
- Sayed, O.H.** (2003) Chlorophyll Fluorescence as a Tool in Cereal Crop Research. *Photosynthetica*, **41**, 321-330.

- Schmidt, R., Mieulet, D., Hubberten, H.-M., Obata, T., Hoefgen, R., Fernie, A.R., Fisahn, J., San Segundo, B., Guiderdoni, E., Schippers, J.H.M. and Mueller-Roeber, B.** (2013) SALT-RESPONSIVE ERF1 Regulates Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling during the Initial Response to Salt Stress in Rice. *The Plant Cell*, **25**, 2115-2131.
- Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F. and Theres, K.** (2002) The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 1064-1069.
- Schupp, J., Price, L., Klevytska, A. and Keim, P.** (1999) Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *BioTechniques*, **26**, 905-910, 912.
- Schwarz, D., Thompson, A.J. and Kläring, H.-P.** (2014) Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in Plant Science*, **5**.
- Seo, P.J., Lee, S.B., Suh, M.C., Park, M.-J., Go, Y.S. and Park, C.-M.** (2011) The MYB96 Transcription Factor Regulates Cuticular Wax Biosynthesis under Drought Conditions in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **23**, 1138-1152.
- Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogues, S. and Lalanne, E.** (2014) EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Methods*, **10**, 5.

- Shabala, S.** (2013) Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of botany*, mct205.
- Shabala, S. and Cuin, T.A.** (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, **133**, 651-669.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal, M.** (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, **112**, 487-494.
- Shan, H., Chen, S., Jiang, J., Chen, F., Chen, Y., Gu, C., Li, P., Song, A., Zhu, X., Gao, H., Zhou, G., Li, T. and Yang, X.** (2012) Heterologous Expression of the Chrysanthemum R2R3-MYB Transcription Factor CmMYB2 Enhances Drought and Salinity Tolerance, Increases Hypersensitivity to ABA and Delays Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biotechnol*, **51**, 160-173.
- Shanker, A.K., Maheswari, M., Yadav, S., Desai, S., Bhanu, D., Attal, N.B. and Venkateswarlu, B.** (2014) Drought stress responses in crops. *Functional & integrative genomics*, **14**, 11-22.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.-K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 6896-6901.
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M. and Zhu, J.-K.** (2002) The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *SOS1* controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *The Plant Cell Online*, **14**, 465-477.

- Shin, D., Moon, S.-J., Han, S., Kim, B.-G., Park, S.R., Lee, S.-K., Yoon, H.-J., Lee, H.E., Kwon, H.-B., Baek, D., Yi, B.Y. and Byun, M.-O.** (2011) Expression of StMYB1R-1, a Novel Potato Single MYB-Like Domain Transcription Factor, Increases Drought Tolerance. *Plant Physiology*, **155**, 421-432.
- Sickler, C.M., Edwards, G.E., Kiirats, O., Gao, Z. and Loescher, W.** (2007) Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology*, **34**, 382-391.
- Springer, P.S.** (2000) Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell Online*, **12**, 1007-1020.
- Stommel, J.R.** (2001) USDA 97L63, 97L66, and 97L97: Tomato breeding lines with high fruit beta-carotene content. *HortScience*, **36**, 387-388.
- Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N.L., Guo, B., Assmann, S.M. and Ma, H.** (2013) Flower Development under Drought Stress: Morphological and Transcriptomic Analyses Reveal Acute Responses and Long-Term Acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **25**, 3785-3807.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.** (1995) Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & development*, **9**, 1797-1810.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Nakashima, K.** (2010) The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics*, **284**, 173-183.

- Tanaka, Y., Sugano, S.S., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I.** (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. *New Phytologist*, **198**, 757-764.
- Tang, N., Zhang, H., Li, X., Xiao, J. and Xiong, L.** (2012) Constitutive Activation of Transcription Factor OsZIP46 Improves Drought Tolerance in Rice. *Plant Physiology*, **158**, 1755-1768.
- Tanksley, S.D.** (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell*, **16**, S181-S189.
- Tester, M. and Davenport, R.** (2003) Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, **91**, 503-527.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S. and Somerville, C.** (1994) Tissue-Specific Expression of a Gene Encoding a Cell Wall-Localized Lipid Transfer Protein from Arabidopsis. *Plant Physiology*, **105**, 35-45.
- Thomine, S. and Barbier-Brygoo, H.** (2010) Structural biology: A peep through anion channels. *Nature*, **467**, 1058-1059.
- Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004) Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell*, **16**, 2481-2498.
- Treviño, M.B. and Connell, M.A.O.** (1998) Three Drought-Responsive Members of the Nonspecific Lipid-Transfer Protein Gene Family in *Lycopersicon pennellii* Show Different Developmental Patterns of Expression. *Plant Physiology*, **116**, 1461-1468.

- Türkan, I. and Demiral, T.** (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **67**, 2-9.
- Tuteja, N.** (2007) Chapter Twenty-Four-Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in enzymology*, **428**, 419-438.
- Udvardi, M.K., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J.-Y., Benedito, V., Hofer, J.M.I., Chueng, F. and Town, C.D.** (2007) Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. *Plant Physiology*, **144**, 538-549.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 11632-11637.
- van der Knaap, E.** (2013) Molecular Mapping of Complex Traits in Tomato. *Genetics, Genomics, and Breeding of Tomato*, 150.
- Van der Knaap, E. and Tanksley, S.** (2001) Identification and characterization of a novel locus controlling early fruit development in tomato. *Theor Appl Genet*, **103**, 353-358.
- Veitia, R.A.** (2007) Exploring the Molecular Etiology of Dominant-Negative Mutations. *The Plant Cell Online*, **19**, 3843-3851.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.-K.** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, **45**, 523-539.

- Verslues, P.E., Batelli, G., Grillo, S., Agius, F., Kim, Y.-S., Zhu, J., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S. and Zhu, J.-K.** (2007) Interaction of SOS2 with Nucleoside Diphosphate Kinase 2 and Catalases Reveals a Point of Connection between Salt Stress and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 7771-7780.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. and Giovannoni, J.** (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, **296**, 343-346.
- Walter, J.M.** (1967) Hereditary Resistance to Disease in Tomato. *Annual Review of Phytopathology*, **5**, 131-160.
- Wang, R.-K., Cao, Z.-H. and Hao, Y.-J.** (2014) Overexpression of a R2R3 MYB gene MdSIMYB1 increases tolerance to multiple stresses in transgenic tobacco and apples. *Physiologia Plantarum*, **150**, 76-87.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A.** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**, 1-14.
- Weide, R., Koornneef, M. and Zabel, P.** (1989) A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theor Appl Genet*, **78**, 169-172.
- Weinl, S. and Kudla, J.** (2009) The CBL-CIPK Ca<sup>2+</sup>-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, **184**, 517-528.
- Westgate, M.E.** (1994) Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. *Crop Science*, **34**, 76-83.

- Wijeratne, A.J., Zhang, W., Sun, Y., Liu, W., Albert, R., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Zhao, D. and Ma, H.** (2007) Differential gene expression in Arabidopsis wild-type and mutant anthers: insights into anther cell differentiation and regulatory networks. *The Plant Journal*, **52**, 14-29.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.C., Giovannoni, J.J. and Klee, H.J.** (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science*, **270**, 1807-1809.
- Wilson-Sánchez, D., Rubio-Díaz, S., Muñoz-Viana, R., Pérez-Pérez, J.M., Jover-Gil, S., Ponce, M.R. and Micol, J.L.** (2014) Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for Arabidopsis leaf mutants. *The Plant Journal*, **79**, 878-891.
- Williams, W.D.** (1999) Salinisation: A major threat to water resources in the arid and semi-arid regions of the world. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, **4**, 85-91.
- Willits, M.G., Kramer, C.M., Prata, R.T.N., De Luca, V., Potter, B.G., Stephens, J.C. and Graser, G.** (2005) Utilization of the genetic resources of wild species to create a nontransgenic high flavonoid tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1231-1236.
- Willmer C, F.M.** (1996) Stomata(Chapman and Hall, L. ed.
- Wu, J.-X., Li, J., Liu, Z., Yin, J., Chang, Z.-Y., Rong, C., Wu, J.-L., Bi, F.-C. and Yao, N.** (2015) The Arabidopsis ceramidase AtACER functions in disease resistance and salt tolerance. *The Plant Journal*, **81**, 767-780.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y. and Toriyama, K.** (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings

- overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep*, **28**, 21-30.
- Xia, Y., Nikolau, B.J. and Schnable, P.S.** (1996) Cloning and characterization of CER2, an Arabidopsis gene that affects cuticular wax accumulation. *The Plant Cell*, **8**, 1291-1304.
- Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H. and Xiong, L.** (2008) Characterization of OsbZIP23 as a Key Player of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family for Conferring Abscisic Acid Sensitivity and Salinity and Drought Tolerance in Rice. *Plant Physiology*, **148**, 1938-1952.
- Xiao, B.-Z., Chen, X., Xiang, C.-B., Tang, N., Zhang, Q.-F. and Xiong, L.-Z.** (2009) Evaluation of Seven Function-Known Candidate Genes for their Effects on Improving Drought Resistance of Transgenic Rice under Field Conditions. *Molecular Plant*, **2**, 73-83.
- Xie, Z., Li, D., Wang, L., Sack, F.D. and Grotewold, E.** (2010) Role of the stomatal development regulators FLP/MYB88 in abiotic stress responses. *The Plant Journal*, **64**, 731-739.
- Xiong, H., Li, J., Liu, P., Duan, J., Zhao, Y., Guo, X., Li, Y., Zhang, H., Ali, J. and Li, Z.** (2014) Overexpression of *OsMYB48-1*, a Novel MYB-Related Transcription Factor, Enhances Drought and Salinity Tolerance in Rice. *PLoS ONE*, **9**, e92913.
- Xue, G.-P., Way, H.M., Richardson, T., Drenth, J., Joyce, P.A. and McIntyre, C.L.** (2011) Overexpression of TaNAC69 Leads to Enhanced Transcript Levels of Stress Up-Regulated Genes and Dehydration Tolerance in Bread Wheat. *Molecular Plant*, **4**, 697-712.
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X. and Xia, G.-M.** (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum*

- aestivum L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science*, **167**, 849-859.
- Yang, O., Popova, O.V., Süthoff, U., Lüking, I., Dietz, K.-J. and Goldack, D.** (2009) The Arabidopsis basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance. *Gene*, **436**, 45-55.
- Yang, S.-D., Seo, P.J., Yoon, H.-K. and Park, C.-M.** (2011) The Arabidopsis NAC Transcription Factor VNI2 Integrates Abscisic Acid Signals into Leaf Senescence via the COR/RD Genes. *The Plant Cell*, **23**, 2155-2168.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D.E., Wu, Y. and Schroeder, J.I.** (2010) Differential Sodium and Potassium Transport Selectivities of the Rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 Transporters in Plant Cells. *Plant Physiology*, **152**, 341-355.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K. and Saedler, H.** (1999) Characterization of the FIDDLEHEAD Gene of Arabidopsis Reveals a Link between Adhesion Response and Cell Differentiation in the Epidermis. *The Plant Cell*, **11**, 2187-2201.
- Yi, G., Luth, D., Goodman, T.D., Lawrence, C.J. and Becraft, P.W.** (2009) High-throughput linkage analysis of Mutator insertion sites in maize. *The Plant Journal*, **58**, 883-892.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that

- cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, **61**, 672-685.
- Yu, D., Yu, F., Du, C., Li, X., Zhao, X. and Liu, X.** (2015a) RPN1a, a subunit of the 26S proteasome, controls trichome development in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, **88**, 82-88.
- Yu, H., Murchie, E.H., González-Carranza, Z.H., Pyke, K.A. and Roberts, J.A.** (2015b) Decreased photosynthesis in the erect panicle 3 (ep3) mutant of rice is associated with reduced stomatal conductance and attenuated guard cell development. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 1543-1552.
- Zhang, H.-X. and Blumwald, E.** (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotech*, **19**, 765-768.
- Zhang, J.-Y., Broeckling, C., Sumner, L. and Wang, Z.-Y.** (2007) Heterologous expression of two Medicago truncatula putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in Arabidopsis led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Mol Biol*, **64**, 265-278.
- Zhang, J.-Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W. and Wang, Z.-Y.** (2005) Overexpression of WXP1, a putative Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, **42**, 689-707.

- Zhang, L., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X. and Kong, X.** (2012) A wheat R2R3-MYB gene, TaMYB30-B, improves drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 5873-5885.
- Zhang, X., Ju, H.-W., Chung, M.-S., Huang, P., Ahn, S.-J. and Kim, C.S.** (2011) The R-R-Type MYB-Like Transcription Factor, AtMYBL, is Involved in Promoting Leaf Senescence and Modulates an Abiotic Stress Response in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, **52**, 138-148.
- Zhang, Z., Rosenhouse-Dantsker, A., Tang, Q.-Y., Noskov, S. and Logothetis, D.E.** (2010) The RCK2 Domain Uses a Coordination Site Present in Kir Channels to Confer Sodium Sensitivity to Slo2.2 Channels. *The Journal of Neuroscience*, **30**, 7554-7562.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wu, J., Zheng, X., Zheng, S., Sun, X., Qiu, Q. and Lu, T.** (2013) Gene Knockout Study Reveals That Cytosolic Ascorbate Peroxidase 2(OsAPX2) Plays a Critical Role in Growth and Reproduction in Rice under Drought, Salt and Cold Stresses. *PLoS ONE*, **8**, e57472.
- Zhao, P., Li, Q., Li, J., Wang, L. and Ren, Z.** (2014) Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in Solanum lycopersicum. *Mol Genet Genomics*, 1-25.
- Zhou, Q., Tian, A., Zou, H., Xie, Z., Lei, G., Huang, J., Wang, C., Wang, H., Zhang, J. and Chen, S.** (2008) Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Biotechnol J*, **6**, 486 - 503.

Bibliografía

- Zhu, J.-K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, **53**, 247.
- Zhu, J.-K.** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, **6**, 441-445.
- Zushi, K. and Matsuzoe, N.** (2009) Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia Horticulturae*, **120**, 181-187.