



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Identificación y Caracterización de Mutantes  
Alterados en la Tolerancia a la Salinidad en Especies  
de Tomate. Papel del Gen *SICBL10* en los  
Mecanismos de Respuesta a Salinidad Señalizados  
por  $\text{Ca}^{2+}$  en Tomate.

D. Félix Antonio Plasencia Martínez

2015





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Identificación y caracterización de mutantes alterados en la tolerancia a la salinidad en especies de tomate. Papel del gen *SICBL10* en los mecanismos de respuesta a salinidad señalizados por  $\text{Ca}^{2+}$  en tomate.

**D. Félix Antonio Plasencia Martínez**

**2015**





Identificación y caracterización de mutantes alterados en la tolerancia a la salinidad en especies de tomate. Papel del gen *SICBL10* en los mecanismos de respuesta a salinidad señalizados por  $\text{Ca}^{2+}$  en tomate.

Tesis Doctoral

**D. Félix Antonio Plasencia Martínez**

Directores de la Tesis

**Dra. María del Carmen Bolarín Jiménez**

**Dra. María Isabel Egea Sánchez**

2015



**A mis padres,  
a mis hermanas  
y a Silvia.**



**RESUMEN**

La salinidad está considerada como uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola. Ante las predicciones del aumento de la población a nivel mundial con el consiguiente incremento de la demanda de alimentos, y los efectos negativos del cambio climático sobre la productividad de los cultivos de interés agronómico, como tomate (*Solanum lycopersicum*), un objetivo prioritario en la investigación en biología vegetal en la actualidad es avanzar en el conocimiento de los mecanismos y genes implicados en la tolerancia a la salinidad. Una de las estrategias más interesantes para abordar el anterior objetivo es el análisis de mutantes. Esta tesis se enmarca dentro del programa de mutagénesis insercional llevado a cabo por los grupos de investigación del IBMCP (Valencia), UAL (Almería) y CEBAS (Murcia), donde se han generado colecciones de mutantes de tomate cultivado y silvestre. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido la identificación y caracterización de mutantes de la especie silvestre *Solanum pennellii*. La identificación de mutantes en una especie filogenéticamente relacionada con tomate, y que presenta características morfológicas muy diferentes al tomate cultivado y altos niveles de tolerancia al estrés abiótico, puede ser la mejor elección para identificar genes y procesos determinantes de la tolerancia a la salinidad. Respecto a los mutantes de *S. pennellii*, los cambios morfológicos y fisiológicos observados en el mutante *sl-1* (*succulent leaves-1*) en ausencia de estrés están asociados a una menor pérdida de agua por transpiración, y a un mantenimiento de la homeostasis de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> frente al estrés salino. Por el contrario, el mutante hipersensible a sal *shp-1* (*salt hypersensitive pennellii-1*) experimentaba una mayor pérdida de agua por transpiración y una elevada acumulación de Na<sup>+</sup> en las hojas durante el periodo de exposición a la sal. La caracterización de ambos mutantes ha puesto de manifiesto que la regulación de la pérdida de agua es un mecanismo clave en la tolerancia a la salinidad. En este trabajo también se ha abordado la caracterización de mutantes de tomate generados a partir del cultivar Moneymaker. A nivel fenotípico y fisiológico, el mutante hipersensible a la salinidad *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*) mostraba una respuesta similar a la observada en el mutante *shp-1* de *S. Pennellii*, con alta acumulación de Na<sup>+</sup> en sus hojas. Sin embargo, la sensibilidad a la sal del mutante *she-1* parece estar relacionado con la alteración en los niveles de expresión de los genes *SIHKT1s* implicados en el transporte de Na<sup>+</sup> a la parte aérea. Además, mediante injertos recíprocos se observó que la raíz es el órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante *she-1*.

Finalmente, se ha abordado la caracterización de un mutante que tiene anulada la expresión del gen *CBL10* (*CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10*) de tomate. El mutante *cb110* es hipersensible al estrés salino a pesar de que la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las plantas del mutante es menor que en las plantas no transformadas de Moneymaker y mantiene mayores niveles de  $\text{K}^+$  con la salinidad, lo que sugiere que la capacidad de acumular  $\text{Na}^+$  en vacuolas está alterada en el mutante y por tanto se alcanzan antes niveles citotóxicos del ion en el citoplasma. Además, el mutante tiene alterada la distribución de  $\text{Na}^+$  entre hojas jóvenes y adultas, produciéndose un mayor transporte de  $\text{Na}^+$  a los tejidos en desarrollo, que puede causar el colapso apical detectado en el mutante tras su exposición a la salinidad. Otra alteración fisiológica provocada por la anulación del gen *SICBL10* es una reducción de la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de estrés. Además, la menor transpiración está asociada a una alteración en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y a cambios en el perfil de expresión del transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  vacuolar *SICAX1*, tanto en condiciones salinas como en ausencia de las mismas. Mediante injertos se ha demostrado que el principal órgano responsable de la sensibilidad del mutante *cb110* al estrés salino es la parte aérea, ya que solo muestran sensibilidad a sal las plantas injertadas con el mutante *cb110* como esqueje, pero no cuando éste es utilizado como portainjerto. Este resultado sugiere que *SICBL10* podría tener una función diferente en parte aérea y raíz, siendo su función en la parte aérea la implicada en la tolerancia a la salinidad en tomate. Además, la alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea nos lleva a proponer como papel del gen *SICBL10* su participación en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo esta función crucial para la tolerancia del tomate al estrés salino.

**ABSTRACT**

Salinity is considered as one of the major limiting effects on agriculture production. Keeping in mind the predictions about the rise of world population resulting in an increase in food demand, and the negative effects of climate change on the productivity of plants of agronomic interest, such tomato (*Solanum lycopersicum*), one current critical aim in plant biology research is to advance in the knowledge of genes and mechanisms involved in salt tolerance in plants. One of the most interesting strategies to approach this goal is the analysis of mutants. This PhD thesis is framed within the insertional mutagenesis programme carried out by the Spanish research groups from IBMCP (Valencia), UAL (Almeria) and CEBAS (Murcia), where mutant collections have been generated in domesticated tomato and in wild-related species. One of the objectives of this research work has been the identification and characterization of mutants of the tomato wild species *Solanum pennellii*. The identification of mutants in a species phylogenetically related with tomato that exhibits so different morphological characteristics and high levels of tolerance to abiotic stress could be the best choice to identify genes and processes determining tolerance to salinity. Regarding *S. pennellii* mutants, the morphological and physiological alterations observed in the *sl-1* (*succulent leaves-1*) mutant in absence of stress are associated to a lower transpirational water loss and a better maintenance of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis when confronted to salt stress. On the contrary, the salt hypersensitive *shp-1* (*salt hypersensitive pennellii-1*) mutant suffered a higher transpirational water loss and an elevated accumulation of Na<sup>+</sup> in leaves during the period of exposition to salt stress. The characterization of both mutants has revealed that regulation of water loss is a key mechanism in salt stress tolerance. In this research work it has also been approached the characterization of tomato mutants generated in Moneymaker commercial cultivar. At phenotypical as well as physiological level the salt hypersensitive *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*) mutant showed a similar response to the one observed in *shp-1* *S. pennellii* mutant: a remarkable increase in Na<sup>+</sup> accumulation in leaves. However, the susceptibility to salt of *she-1* mutant seems to be related to the alteration in the levels of expression of *SIHKT1* genes involved in the Na<sup>+</sup> transport from root to shoot. Moreover, it was observed by reciprocal grafting that the root was the responsible organ for the salt sensitivity of *she-1* mutant. Finally, it has been approached the characterization of a mutant that exhibits a knock-out expression of *CBL10* (*CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10*) tomato gene. The *cbl10* mutant is hypersensitive to salt stress in spite of

the fact that  $\text{Na}^+$  accumulation in mutant plants is lower than in untransformed WT ones and it upholds higher levels of  $\text{K}^+$  in salt stress condition. These observations suggest that ability to accumulate  $\text{Na}^+$  in vacuoles is compromised in the mutant and therefore cytotoxic levels of the ion in the cytoplasm are reached earlier in *cbll0* than in WT. What is more, the distribution of  $\text{Na}^+$  between young and adult leaves is altered in the mutant, since a higher transport of the ion to developing tissues occurred in *cbll0*. This behavior could be the cause of the apical meristem collapse detected in the mutant plant after exposition to salt stress. Another physiological alteration induced by knocking out *SICBL10* gene is the reduction of water loss via transpiration in stressful conditions. Moreover, the lower transpiration is associated with a perturbation in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and with changes in the gene expression profile of the vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$  carrier *SICAX1*, in salt stress as well as in non-stressful conditions. Grafting experiments demonstrated that the main responsible organ for the salt stress sensitivity in *cbll0* mutant is the shoot, as only grafted plants using *cbll0* as scion exhibited such sensitivity, which is not observed when *cbll0* is used as rootstock. This result suggests that *SICBL10* could have a different function in shoot and in root, being the function in shoot the one involved in salt tolerance in tomato. Also the alteration of the  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in the shoot of *cbll0* mutant lead us to propose a role for *SICBL10* in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, being this potential function a crucial one for tolerance of tomato to salt stress.

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. El tomate cultivado ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) .....	1
1.1. Origen y domesticación del tomate .....	1
1.2. Taxonomía y descripción botánica .....	2
1.3. Importancia económica y distribución geográfica.....	4
1.4. Genoma del tomate .....	7
1.5. Mejora genética del tomate.....	8
2. Especies silvestres relacionadas con tomate .....	10
2.1. Origen de las especies de tomate silvestres.....	10
2.2. Especies silvestres de tomate como fuentes de variabilidad genética.....	11
2.3. Descripción botánica y taxonomía de <i>S. pennellii</i> .....	14
3. Salinidad y sequía: Efectos sobre los cultivos .....	15
3.1. Estrés osmótico inducido por la salinidad y sequía .....	17
3.1.1. Estrategias para recuperar la homeostasis osmótico.....	19
3.2. Estrés iónico y nutricional .....	21
3.2.1. Estrategias para recuperar la homeostasis iónica y nutricional .....	23
3.3. Estrés oxidativo .....	25
4. Transportadores implicados en la homeostasis de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	27
4.1. Entrada de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> en la planta .....	28
4.2. Salida de Na <sup>+</sup> y transporte a la parte aérea .....	31
4.3. Compartimentación vacuolar de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	35

5. Papel del Ca <sup>2+</sup> en el desarrollo y tolerancia al estrés .....	37
5.1. Absorción y acumulación de Ca <sup>2+</sup> .....	39
5.2. Interacción CBLs - CIPKs .....	42
5.3. Antiportadores H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> .....	47
6. Regulación de la transpiración mediante apertura y cierre estomático .....	49
7. Interés del tomate y especies silvestres afines en los estudios de tolerancia a salinidad .....	54
8. Mutagénesis insercional. Etiquetado de genes por inserción de elementos de transposición: transposones o T-DNA .....	55
8.1. Etiquetado mediante trampas génicas o trapping .....	56
9. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación de genes .....	58
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>III. MATERIA Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
1. Material vegetal .....	67
2. Generación de líneas T-DNA de tomate y <i>S. pennellii</i> con una trampa de intensificadores .....	67
2.1. Multiplicación y mantenimiento <i>in vitro</i> de líneas T-DNA .....	69
3. Técnicas básicas utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> .....	69
3.1. Condiciones de la cámara de cultivo <i>in vitro</i> .....	69
3.2. Esterilización de semillas y germinación <i>in vitro</i> .....	70
3.3. Aclimatación de plantas <i>in vitro</i> .....	70
4. Obtención de progenies TG2 y TG3 .....	71
4.1. Selección de plantas por tolerancia a Kanamicina .....	71
5. Cultivo <i>in vivo</i> de plantas. Condiciones del estrés salino e hídrico .....	72
5.1. Condiciones de cultivo para los ensayos a corto y medio plazo de salinidad .....	72
5.1.1. Ensayos en sustrato .....	73

---

5.1.2. Ensayos en cultivo hidropónico .....	74
5.2. Condiciones de cultivo para los ensayos de salinidad a largo plazo en invernadero .....	75
5.3. Condiciones de cultivo de las plantas para los ensayos de estrés hídrico .....	77
5.4. Generación de plantas injertadas .....	77
6. Determinaciones para la caracterización fisiológica de las plantas .....	79
6.1. Desarrollo de plantas .....	79
6.2. Determinación del peso fresco y peso seco de las plantas.....	79
6.3. Contenido de agua (CW) .....	80
6.4. Pérdida de agua en hoja escindida .....	80
6.5. Conductancia estomática (gs) y tasa de transpiración foliar (E) .....	80
6.6. Determinación del contenido en clorofila .....	81
6.7. Tinción DAB en folíolos .....	81
6.8. Obtención de extractos de las plantas para análisis químicos .....	82
6.9. Determinación de cationes.....	83
6.10. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.....	83
6.11. Potencial hídrico.....	84
6.12. Potencial osmótico .....	85
6.13. Potencial de turgor.....	85
7. Determinación de la densidad y apertura estomática por microscopía.....	86
8. Técnicas de biología molecular .....	86
8.1. Extracción de ADN genómico.....	86
8.2. Extracción de ARN.....	86
8.3. Cuantificación y pureza del ADN y ARN extraído.....	87
8.4. Determinación estado de integridad y pureza del ARN por electroforesis en gel de agarosa .....	88
8.5. Síntesis de ADNc.....	88
8.6. PCR comprobativa.....	89
8.7. PCR cuantitativa a tiempo real .....	91
8.8. Genotipado.....	94
9. Tratamiento estadístico .....	95

<b>IV. CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES</b>	<b>99</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>99</b>
1. Identificación y caracterización de mutantes de la especie silvestre <i>S. pennellii</i>	99
1.1. Identificación del mutante 4607-ETSP de <i>S. pennellii</i> afectado en el desarrollo vegetativo	101
1.2. Caracterización del mutante <i>sl-1</i> ( <i>succulent leaves-1</i> )	102
1.2.1. Caracterización fenotípica y fisiológica en condiciones control	102
1.2.2. Caracterización fenotípica y fisiológica en condiciones de salinidad	105
1.3. Identificación y caracterización del mutante <i>ss-3</i> ( <i>salt sensitive-3</i> )	108
1.4. Identificación y caracterización del mutante <i>shp-1</i> ( <i>salt hypersensitive pennellii-1</i> )	110
1.4.1. Caracterización fenotípica, genética y molecular	110
1.4.2. Caracterización fisiológica en condiciones de salinidad	116
2. Caracterización del mutante de tomate <i>she-1</i> ( <i>salt hypersensitive esculentum-1</i> )	121
2.1. Caracterización fisiológica en condiciones de salinidad	122
2.2. Expresión de genes implicados en el transporte de Na <sup>+</sup>	131
2.3. Importancia de la raíz y parte aérea en la sensibilidad a la sal del mutante <i>she-1</i>	133
<b>DISCUSION</b>	<b>139</b>
1. Interés de utilizar la especie silvestre <i>S. pennellii</i> para identificar mutantes implicados en la tolerancia a la salinidad	139
2. Algunas alteraciones en el desarrollo vegetativo de las plantas están relacionadas con una mayor tolerancia al estrés salino	141
3. El análisis de mutantes de <i>S. pennellii</i> demuestra la importancia de regular la pérdida de agua como mecanismo de tolerancia a la salinidad	142
4. Relación entre tolerancia a la salinidad y homeostasis de K <sup>+</sup>	145

5. La regulación del transporte de Na <sup>+</sup> a la parte aérea es un mecanismo de tolerancia común en la especie cultivada y silvestre .....	145
<b>V. CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DE TOMATE QUE TIENE ANULADA LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>SICBL10</i>.....</b>	<b>153</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>153</b>
1. Patrón de expresión espacial del gen <i>SICBL10</i> en tomate .....	154
2. La expresión del gen <i>SICBL10</i> se induce por estrés salino en tomate .....	156
3. La elevada sensibilidad a la sal del mutante <i>cb110</i> está relacionada con una alteración de la distribución de Na <sup>+</sup> en la planta .....	158
4. La anulación del gen <i>SICBL10</i> altera el patrón de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na <sup>+</sup> .....	162
5. La anulación del gen <i>SICBL10</i> reduce la pérdida de agua vía transpiración en condiciones salinas .....	166
6. La anulación del gen <i>SICBL10</i> altera la homeostasis de Ca <sup>2+</sup> en condiciones de estrés salino.....	167
7. La anulación del gen <i>SICBL10</i> también reduce la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de deshidratación .....	171
8. El mutante <i>cb110</i> muestra importantes alteraciones morfológicas así como síntomas de deficiencia de Ca <sup>2+</sup> cuando se cultiva en invernadero .....	173
9. Importancia de la raíz y parte aérea en la sensibilidad a la sal del mutante <i>cb110</i> ...	178
10. El injerto entre la parte aérea del mutante <i>cb110</i> y la raíz del mutante <i>she-1</i> revela un efecto sinérgico para la sensibilidad a la sal.....	185
<b>DISCUSION .....</b>	<b>193</b>
1. El gen <i>SICBL10</i> es clave en la tolerancia del tomate a la salinidad.....	193

2. El gen <i>SICBL10</i> está implicado en la homeostasis de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> .....	194
3. La expresión de genes implicados en la homeostasis de Na <sup>+</sup> está alterada por la disrupción de <i>SICBL10</i> .....	196
4. La anulación de <i>SICBL10</i> no altera el nivel de expresión de <i>SISOS2</i> .....	197
5. El gen <i>SICBL10</i> está implicado en la homeostasis de Ca <sup>2+</sup> .....	199
6. Posible relación entre el gen <i>SICBL10</i> y <i>SICAX1</i> para el control de la homeostasis de Ca <sup>2+</sup> .....	200
7. Las plantas injertadas muestran alteraciones morfológicas y sensibilidad a la sal cuando el mutante <i>cb110</i> actúa como esqueje pero no como portainjerto .....	206
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>211</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>217</b>

**ABREVIATURAS**

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADN (DNA)</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario, sintetizado a partir de ARN mensajero
<b>AFLP</b>	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
<b>Al<sup>3+</sup></b>	Aluminio
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidasas
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>B<sup>3+</sup></b>	Boro
<b>BACs</b>	Cromosomas artificiales de bacterias
<b>BER</b>	Blossom End-Rot o podredumbre apical
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>CAPS</b>	Secuencia polimórfica amplificada y cortada
<b>CAT</b>	Catalasas
<b>CE</b>	Conductividad eléctrica
<b>CIC</b>	Capacidad de intercambio de cationes
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion cloruro
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Cobre
<b>cv</b>	Cultivar
<b>CW</b>	Contenido de agua
<b>d</b>	Día
<b>DAB</b>	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>dCAPS</b>	Marcadores CAP derivados
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>dS</b>	Decisiemens

<b>DTS</b>	Días de tratamiento salino
<b>E</b>	Transpiración foliar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EE.UU</b>	Estados Unidos
<b>EMS</b>	Etil metano sulfonato
<b>EST</b>	Marcador de secuencia expresada
<b>ETMM</b>	Línea mutante insercional en MM con trampa de intensificadores
<b>ETSP</b>	Línea mutante insercional en SP con trampa de intensificadores
<b>FAO</b>	Organización para la Alimentación y la Agricultura
<b>FAOSTAT</b>	Organización para la agricultura y la alimentación de las naciones unidas
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ion férrico
<b>GPX</b>	Glutación peroxidasa
<b>gs</b>	Conductancia estomática
<b>GST</b>	Glutation S-transferasa
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>ha</b>	Hectárea
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HO·</b>	Radical hidroxilo
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>ICP</b>	Espectrofotómetro de iones acoplado a plasma
<b>ITAG</b>	Grupo internacional de anotación del tomate
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>KCl</b>	Cloruro potásico
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>Kv</b>	Kilovatio
<b>L</b>	Litro

---

<b>m</b>	Metros
<b>M</b>	Molar
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros cuadrados
<b>MAGRAMA</b>	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
<b>mb</b>	Milibar
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MM</b>	Cultivar de tomate <i>Moneymaker</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M-MLV-RT</b>	Retrotranscripción del virus de la leucemia murina Moloney
<b>MMt</b>	Millones de toneladas
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Ion manganeso
<b>mOsmol</b>	MiliOsmoles
<b>MPa</b>	Megapascales
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b><i>nptII</i></b>	Gen de la neomicinfosfotranferasa II
<b>O<sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>PAR</b>	Radiación fotosintéticamente activa
<b>pb</b>	Pares de bases

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PS</b>	Peso seco
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
<b>QTL</b>	Locus de un carácter cuantitativo
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RFLP</b>	Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción
<b>RID</b>	Índice de refracción
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>s</b>	Segundos
<b>SB</b>	Sodio-ácido Bórico (tampón)
<b>secc.</b>	Sección
<b>SGN</b>	Solanaceae Genome Network
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SP</b>	Cultivar de tomate silvestre <i>Solanum pennellii</i>
<b>SSR</b>	Repetición de secuencias discretas
<b>TAE</b>	Tampón usado en la electroforesis
<b>T-DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
<b>TG (1)</b>	(Primera) generación de plantas transgénicas
<b>uidA</b>	Gen de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS)
<b>v</b>	Voltios
<b>VK</b>	Canal vacuolar de $K^+$
<b>W</b>	Vatios
<b>WT</b>	Planta no transformada
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zinc
<b><math>\Psi</math></b>	Potencial; w= hídrico; $\pi$ =osmótico; p= de turgor

<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitro
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrómetro
<b><math>\mu\text{moles}</math></b>	Micromoles



---



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Aspecto de las flores y frutos del cultivar de tomate <i>Moneymaker</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Producción de tomate a nivel mundial .....	6
<b>Figura 3.</b> Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas .....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema de los efectos del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas .....	27
<b>Figura 5.</b> Proteínas de transporte implicadas en la absorción, flujo y distribución de Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> a lo largo de la planta y su compartimentación a nivel celular .....	31
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del funcionamiento de la ruta SOS .....	33
<b>Figura 7.</b> Sistemas de transporte de Ca <sup>2+</sup> en las células de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
<b>Figura 8.</b> Modelo de interacción entre CBL-CIPK y sus funciones en la regulación de la homeostasis de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> .....	45
<b>Figura 9.</b> La ruta CBL-CIPK regula los movimientos estomáticos, controlando el flujo de K <sup>+</sup> y Ca <sup>2+</sup> de las células guarda.....	51
<b>Figura 10.</b> Regulación de los canales, bombas y transportadores iónicos localizados en las células guarda durante la apertura y cierre de los estomas .....	53
<b>Figura 11.</b> Esquema del vector pD991 utilizado para la transformación y generación de los mutantes T-DNA.....	68
<b>Figura 12.</b> Sistema de cultivo hidropónico.....	75
<b>Figura 13.</b> Aspecto general del sistema de riego y del invernadero donde se han realizado los experimento a largo plazo .....	77
<b>Figura 14.</b> Esquema de diseño del injerto .....	78
<b>Figura 15.</b> Cebadores diseñados para el vector pD991 .....	91
<b>Figura 16.</b> Esquema de trabajo .....	100
<b>Figura 17.</b> Fenotipos mutantes identificados en la población segregante TG2 de la línea 4607 ETSP.....	101
<b>Figura 18.</b> Fenotipo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del mutante <i>sl-1</i> ( <i>succulent leaves-1</i> ) .....	103

<b>Figura 19.</b> El mutante <i>sl-1</i> tiene mayor contenido de agua en hoja en condiciones control .....	104
<b>Figura 20.</b> Respuesta del mutante <i>sl-1</i> a la salinidad.....	106
<b>Figura 21.</b> Identificación del mutante <i>ss-3</i> ( <i>salt-sensitive-3</i> ) .....	109
<b>Figura 22.</b> Hipersensibilidad a la sal del mutante recesivo <i>shp-1</i> ( <i>salt hypersensitive pennellii-1</i> ) .....	111
<b>Figura 23.</b> El fenotipo clorótico mostrado por el mutante <i>shp-1</i> en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días) revierte durante la etapa de recuperación (12 días regadas con disolución nutritiva control) .....	112
<b>Figura 24.</b> Análisis <i>Southern blot</i> realizado en dos lotes de plantas de la población TG2 de la línea mutante <i>shp-1</i> .....	114
<b>Figura 25.</b> El mutante <i>shp-1</i> incrementa el contenido de agua y la concentración de Na <sup>+</sup> en las hojas de las plantas desarrolladas en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días) .....	117
<b>Figura 26.</b> Las hojas del mutante hipersensible <i>shp-1</i> son capaces de mantener el turgor y mejorar el estado hídrico en condiciones salinas.....	119
<b>Figura 27.</b> La concentración de sacarosa se anula en las hojas del mutante <i>shp-1</i> en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días).....	121
<b>Figura 28.</b> Hipersensibilidad a la sal del mutante recesivo <i>she-1</i> después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl).....	123
<b>Figura 29.</b> El mutante <i>she-1</i> incrementa el contenido de agua de la parte aérea con la salinidad (100 mM NaCl).....	125
<b>Figura 30.</b> La hipersensibilidad del mutante <i>she-1</i> a la salinidad está relacionada con un alto transporte de Na <sup>+</sup> a la parte aérea .....	126
<b>Figura 31.</b> La hipersensibilidad del mutante <i>she-1</i> a la salinidad está relacionada con valores muy elevados en la relación Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> en hojas jóvenes y adultas.....	128
<b>Figura 32.</b> El grado de estrés oxidativo inducido por la salinidad es mayor en el mutante <i>she-1</i> como refleja la tinción de DAB .....	129

<b>Figura 33.</b> Concentración de Na <sup>+</sup> (a) y medidas de conductancia estomática y tasa de transpiración (b) en hoja joven de plantas WT y mutante <i>she-1</i> desarrolladas a 100 mM de NaCl (valores medios ± ES) .....	130
<b>Figura 34.</b> Niveles de expresión de los genes <i>SIHKT1;1</i> , <i>SIHKT1;2</i> y <i>SISOS1</i> en raíz y hoja de plantas WT y mutante <i>she-1</i> en control (día 0) y después de 1 día de tratamiento salino (100 mM de NaCl) (valores medios ± ES) .....	132
<b>Figura 35.</b> La raíz es el principal órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante <i>she-1</i> .....	134
<b>Figura 36.</b> Cuando el mutante <i>she-1</i> actúa como portainjerto (WT/ <i>she-1</i> y <i>she-1</i> / <i>she-1</i> ) se reduce el peso de la raíz y parte aérea de los injertos al final del tratamiento salino	135
<b>Figura 37.</b> La elevada acumulación de Na <sup>+</sup> y relación Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> en hojas de las plantas autoinjertadas del mutante <i>she-1</i> y en las plantas injertadas WT/ <i>she-1</i> están relacionadas con la hipersensibilidad a la sal .....	136
<b>Figura 38.</b> Organización genómica del gen <i>SICBL10</i> y del tándem de dos copias de T-DNA en el mutante de tomate <i>cbll0</i> realizado por el grupo de la UAL.....	154
<b>Figura 39.</b> Patrón de expresión del gen <i>SICBL10</i> en plantas adultas (23-24 hojas completamente desarrolladas) de WT cultivadas en ausencia de estrés salino (control) .....	155
<b>Figura 40.</b> La expresión del gen <i>SICBL10</i> se induce por estrés salino en tomate .....	157
<b>Figura 41.</b> Fenotipo de plantas WT y del mutante <i>cbll0</i> desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 1 día y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes) .....	160
<b>Figura 42.</b> La alta sensibilidad del mutante <i>cbll0</i> está relacionada con una alteración en el patrón de distribución de Na <sup>+</sup> en la planta.....	161
<b>Figura 43.</b> El mutante <i>cbll0</i> tiene alterada la expresión de genes implicados en la absorción y transporte de Na <sup>+</sup> a la parte aérea.....	164
<b>Figura 44.</b> Niveles de expresión de los genes <i>LeNHX1</i> , <i>LeNHX3</i> y <i>SISOS2</i> en raíz y hojas superiores (1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> hoja completamente desarrollada) de plantas WT y mutante <i>cbll0</i> antes de aplicar el estrés salino (Control) y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2 <sup>o</sup> día a 200 mM de NaCl).....	165

<b>Figura 45.</b> La anulación de <i>SICBL10</i> provoca un mayor cierre estomático en condiciones de salinidad.....	166
<b>Figura 46.</b> El mutante <i>cb110</i> acumula mayor concentración de $Ca^{2+}$ en la parte aérea	168
<b>Figura 47.</b> El mutante <i>cb110</i> tiene alterada la expresión del gen <i>SICAX1</i> implicado en la homeostasis de $Ca^{2+}$ .....	170
<b>Figura 48.</b> El menor grado de deshidratación del mutante <i>cb110</i> está asociado a mayor reducción de la conductancia estomática y tasa de transpiración en condiciones de estrés hídrico.....	172
<b>Figura 49.</b> El mutante <i>cb110</i> muestra importantes alteraciones morfológicas cuando se cultiva en invernadero en condiciones de alta transpiración.....	174
<b>Figura 50.</b> El mutante <i>cb110</i> muestra alteraciones morfológicas tanto en condiciones no salinas como salinas (100 mM NaCl durante 50 días) cuando se cultiva en invernadero en condiciones de alta transpiración.....	176
<b>Figura 51.</b> El mutante <i>cb110</i> muestra una menor conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis neta, así como un mayor contenido de agua en estrés salino cuando se cultiva en invernadero (100 mM NaCl durante 50 días).....	177
<b>Figura 52.</b> El mutante <i>cb110</i> tiene alterada la homeostasis de $Ca^{2+}$ .....	178
<b>Figura 53.</b> El injerto provoca una alteración morfológica en la parte aérea cuando se utiliza el mutante <i>cb110</i> como esqueje.....	180
<b>Figura 54.</b> La parte aérea es el principal órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante <i>cb110</i> .....	181
<b>Ampliación figura 54a:</b> Sin embargo, cuando el mutante <i>cb110</i> se utilizó solo como portainjerto y WT como esqueje ( <i>WT/cb110</i> ) no se detectaron síntomas de mayor sensibilidad, sino que sorprendentemente lo que parecía observarse una ligera mejora de la tolerancia al estrés salino. Así tras 5 días de tratamiento salino las plantas de estos injertos presentaron una aparente menor clorosis en hojas que el autoinjerto de <i>WT/WT</i> .....	182
<b>Figura 55.</b> El similar grado de sensibilidad a la sal del mutante ( <i>cb110/cb110</i> ) y del injerto recíproco <i>cb110/WT</i> está principalmente asociado a la alteración que provoca el mutante en la homeostasis del $Ca^{2+}$ de la parte aérea.....	184

- Figura 56.** El fenotipo de las plantas autoinjertadas de *she-1* (*she-1/she-1*) y del injerto recíproco cuando el mutante *she-1* es el esqueje y el mutante *cbl10* es el portainjerto (*she-1/cbl10*) era similar antes de aplicar el estrés, mientras que las plantas injertadas con el mutante *she-1* como portainjerto y el mutante *cbl10* como parte aérea muestran un menor desarrollo y alteraciones morfológicas similares a aquellas observadas en las plantas autoinjertadas del mutante (*cbl10/cbl10*) .....186
- Figura 57.** La unión del mutante *she-1* como portainjerto y del mutante *cbl10* como parte aérea incrementa el grado de sensibilidad a la sal respecto a las plantas autoinjertadas de ambos mutantes, mientras que la respuesta opuesta es observada en la combinación *she-1/cbl10* .....188
- Figura 58.** Alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  cuando se une mediante injerto un mutante cuyo órgano responsable de la sensibilidad a sal es la parte aérea (*cbl10*) y otro que es la raíz (*she-1*) .....189
- Figura 59:** Propuesta de posibles funciones del gen *SlCBL10* en parte aérea de tomate en base a las alteración en la homeostasis de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) detectada en el mutante *cbl10* cultivado en condiciones de salinidad .....205



---



---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Superficie y producción del cultivo de tomate en España.....	5
<b>Tabla 2.</b> Especies de <i>Solanum</i> sección <i>Lycopersicon</i> y sus equivalentes en el género <i>Lycopersicon</i> .....	11
<b>Tabla 3.</b> Características agronómicas de interés de las especies silvestre de tomate .....	13
<b>Tabla 4.</b> Composición del medio de enraizamiento y crecimiento.....	69
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio de germinación de semillas .....	70
<b>Tabla 6.</b> Condiciones ambientales controladas de la cámara de cultivo.....	72
<b>Tabla 7.</b> Composición de la solución nutritiva utilizada para el riego en cámara de cultivo .....	73
<b>Tabla 8.</b> Composición de la solución nutritiva usada para el riego de las plantas en el invernadero .....	76
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de trabajo del HPLC tanto para azúcares como para ácidos.....	84
<b>Tabla 10:</b> Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de ADNc.....	88
<b>Tabla 11:</b> Programa utilizado en el termociclador para la síntesis de ADNc.....	89
<b>Tabla 12:</b> Mezcla de reacción final para una PCR comprobativa .....	89
<b>Tabla 13:</b> Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR comprobativa .....	90
<b>Tabla 14:</b> Cebadores utilizados para la amplificación de los genes marcador ( <i>nptII</i> ) y delator ( <i>uidA</i> ).....	91
<b>Tabla 15:</b> Mezcla de reacción final para una PCR comprobativa .....	92
<b>Tabla 16:</b> Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR comprobativa .....	93
<b>Tabla 17:</b> Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión y tamaño del fragmento amplificado.....	94
<b>Tabla 18.</b> Análisis de segregación de plantas con fenotipo WT (F-WT) y fenotipo mutante (M) en los 4 ensayos diferentes llevados a cabo con plantas TG2 y en la suma de ellos. Ajuste a los modelos de segregación .....	113

<b>Tabla 19:</b> Correlación fenotipo-genotipo en la población segregante TG2. Presencia del gen marcador <i>nptII</i> y genotipado para la secuencia clonada.....	115
<b>Tabla 20.</b> Concentración de $K^+$ en diferentes tejidos de plantas WT y mutante en condiciones control (día 0) y después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl) .....	127
<b>Tabla 21.</b> Relación $Na^+/K^+$ en raíz, tallo (entre 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> hoja), hojas superiores (1 <sup>a</sup> -2 <sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas) y hojas en desarrollo de plantas WT y mutante <i>cb110</i> desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 24 h y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes) a los 2 y 6 días de tratamiento.....	162



# **INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*)

#### 1.1. Origen y domesticación del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., era una especie conocida y utilizada por los mesoamericanos desde mucho antes de la llegada de los españoles a América. Venía empleándose como cultivo secundario en pequeños huertos con el objetivo de abastecer las necesidades familiares, por lo que su importancia económica en aquella época no podría considerarse del todo significativa (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995).

El origen del género *Lycopersicum* se localiza en la región Andina, que se extiende desde el Sur de Colombia al Norte de Chile, y desde la costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Rick, 1973; Taylor, 1986; Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). Estas investigaciones coinciden en asignar dicho origen basándose principalmente en la presencia de una gran diversidad de especies silvestres en zonas no antropizadas de esta zona de Sudamérica, que no se encuentran presentes en gran medida en otras zonas del mundo. Sin embargo, parece que fue en México donde se originó el cultivo del tomate, muy probablemente a partir de *L. esculentum* variedad *cerasiforme*, único *Lycopersicum* silvestre que crece como mala hierba en las regiones tropicales y subtropicales americanas (Nuez *et al.*, 1996; Nesbitt y Tanksley, 2002) y que se encuentra fuera del área de distribución del género. Otras investigaciones basadas en secuencias genéticas, establecen como alternativa que la antigua variedad *cerasiforme* podría ser la resultante de continuas hibridaciones entre poblaciones de *S. lycopersicum* y *Solanum pimpinellifolium* Jusl. Es decir, la antigua variedad *cerasiforme* surgiría de forma posterior a la domesticación y, por tanto, no constituiría la especie predecesora del tomate cultivado (Nesbitt y Tanksley, 2002), siendo *S. pimpinellifolium* el candidato a ancestro con más probabilidades en este caso. En este sentido, se han documentado casos de hibridación espontánea entre *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* y la antigua variedad *cerasiforme* en áreas donde confluyen dichas poblaciones. Estas poblaciones se encuentran muy próximas y son interfértiles (Peralta *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2005), de modo que pueden establecer flujo génico entre ellas. Un estudio reciente basado en el análisis de polimorfismos de nucleótido simple confirma que *S. lycopersicum* variedad

*cerasiforme* no es el ancestro del tomate cultivado, y también refuerza el modelo de que se produjo una pre-domesticación del tomate en la región andina (hipótesis del Perú), completada con la domesticación en Mesoamérica (hipótesis de México), seguido de su introducción a Europa por los españoles y luego se extendió por todo el mundo (Blanca *et al.*, 2012).

Sin embargo hasta la fecha, el origen de la domesticación del tomate esta sin resolver, a pesar de que se ha informado de que los tomates procedentes de Europa y América del Norte comparten similares isoenzimas y marcadores moleculares con los de México y Centroamérica, lo que sugiere que el tomate fue introducido a Europa y América del Norte a partir de estas regiones (Peralta y Spooner, 2006; Bauchet y Causse, 2012). Ninguna de las hipótesis sobre el origen de la domesticación del tomate es más concluyente que el otro. Podría ser que la domesticación se produjo de forma independiente en ambas regiones.

### 1.2. Taxonomía y descripción botánica

La primera descripción botánica del tomate la realizó Pier Andrea Mattioli, del jardín botánico de Padua (Italia), quien publicó su herbario en 1554. Desde entonces aparece descrito en numerosos herbarios como el de Matthias de L'Obel en 1581, el de Gerard en Inglaterra en 1597 o el de Salmon en Estados Unidos, ya en 1710.

El tomate pertenece al género *Solanum*, siendo probablemente el género de mayor importancia económica, ya que contiene tanto especies dedicadas al consumo humano, como especies que generan productos tóxicos y medicamentosos (Weese y Bohs, 2007). En cuanto a número de especies, es relativamente poco importante dentro de la familia *Solanaceae*, la cual comprende 98 géneros y más de 3000 especies que crecen en una gran diversidad de hábitats, desde zonas áridas hasta la alta montaña. Esto ha contribuido, en buena medida, a la importante variabilidad genética presente entre las especies de este grupo (Olmstead y Bohs, 2006). Esta familia se divide, atendiendo a características morfológicas del embrión, en dos subfamilias: la *Cestroidae* y la *Solanoidae*. El carácter más importante de la subfamilia *Solanoidae*, en la que se incluyen los géneros *Lycopersicum* y *Solanum* L., es que todos sus miembros poseen una gran uniformidad en el número cromosómico ( $2n=24$ ). Estos dos géneros se diferencian entre sí por la presencia de expansiones apicales estériles en las anteras en *Lycopersicum*, que están

ausentes en *Solanum* (Taylor, 1986). Otra característica diferenciadora es el mecanismo de dehiscencia anteridial, presentando *Lycopersicum* dehiscencia tipo longitudinal mientras que en *Solanum* la apertura de las anteras es mediante poros apicales (Rick, 1982). No obstante, estudios posteriores demostraron que la dehiscencia en *Lycopersicum* comienza por poros apicales que derivan rápidamente en surcos longitudinales (Bonner y Dickinson, 1989). La familia Solanáceas, además del tomate, incluye otras especies de interés agronómico como el pimiento, la patata, la berenjena y el tabaco, constituyéndose por lo tanto en una de las familias de mayor importancia alimenticia y económica del mundo.

La taxonomía del tomate ha sufrido cambios a través del tiempo, originalmente el tomate fue clasificado como *Solanum lycopersicum* por Linneo (Linnaeus, 1753), después fue reclasificado por Miller (1754) como *Lycopersicon esculentum*. 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 la familia *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 (Foolad, 2007; Peralta *et al.*, 2008). La taxonomía aceptada para esta especie es la siguiente:

- I. Clase: *Dicotyledoneas*.
- II. Orden: *Solanales (Personatae)*.
- III. Familia: *Solanaceae*.
- IV. Subfamilia: *Solanoideae*.
- V. Género: *Solanum*.
- VI. Especie: *Lycopersicum*.

Se trata de una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Hay dos tipos diferenciados por el tipo de crecimiento que tienen. Están las de crecimiento determinado y las de crecimiento indeterminado. La planta indeterminada es la normal, en ella, los tallos presentan segmentos uniformes con tres hojas (con yemas) y una inflorescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo. A diferencia de esta, la planta determinada tiene tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas por

inflorescencia y terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado. Los tallos son gruesos y angulosos, de color verde, y la planta presenta tallos secundarios que salen de las axilas de las hojas. El sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y débil, y raíces secundarias que son numerosas y potentes. Las hojas son compuestas anchas, planas con 7-11 folíolos peciolados, lobulados y borde dentado. Las flores son hermafroditas, simétricas, regulares e hipóginas. La inflorescencia está compuesta de 4 a 12 flores. La corola está formada por 5 o más pétalos de color amarillo, lanceolados y fusionados en la base. Los sépalos son más pequeños que los pétalos. La flor contiene cinco estambres fusionados a la corola por sus filamentos, las anteras largas de color amarillo, están unidas lateralmente, formando un cono estaminal que envuelve el gineceo. El pistilo está formado por un ovario bi- o plurilocular, de estilo delgado y el estigma cubierto por una secreción de naturaleza lipídica. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (**Figura 1**). El fruto es una baya con gran diversidad de tamaños y formas, generalmente de color rojo, bilocular o multilocular, de gruesa placenta con numerosas semillas recubiertas de una sustancia mucilaginoso (Peralta *et al.*, 2008). Está unido a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado que contiene la capa de abscisión. Posee una semilla discoidal-lenticular comprimida y embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme (**Figura 1**) (Chamarro, 1995).



**Figura 1.** Aspecto de las flores y frutos del cultivar de tomate Moneymaker.

### **1.3. Importancia económica y distribución geográfica**

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los más extendidos en la actualidad y de mayor valor económico (FAOSTAT, 2013). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la

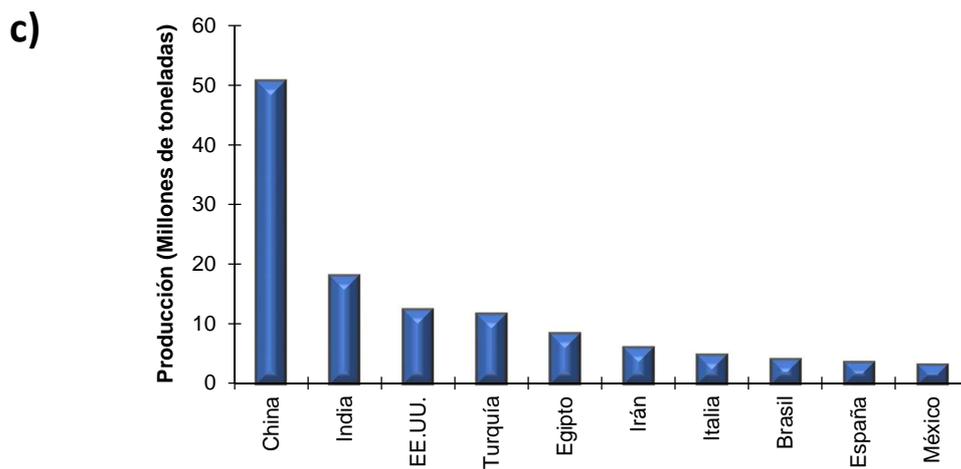
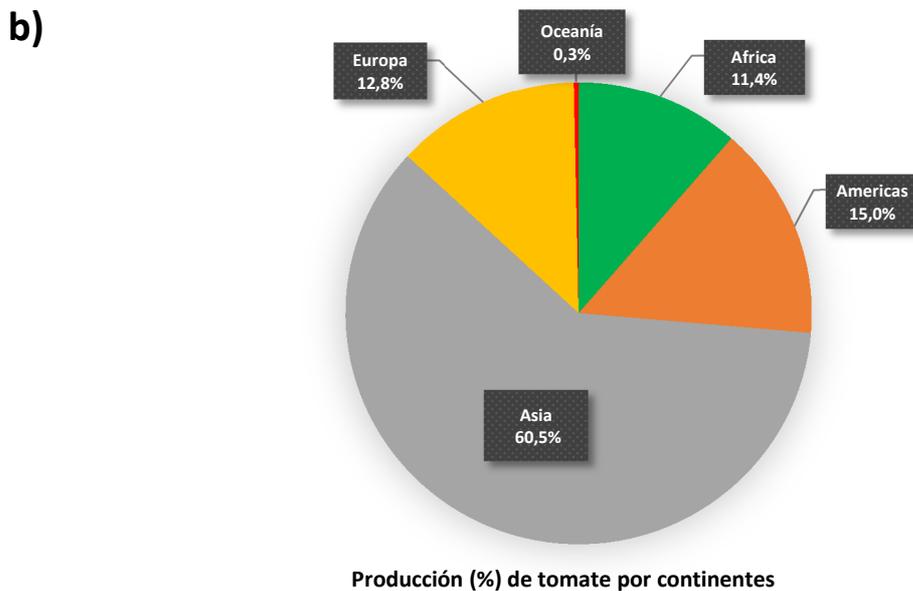
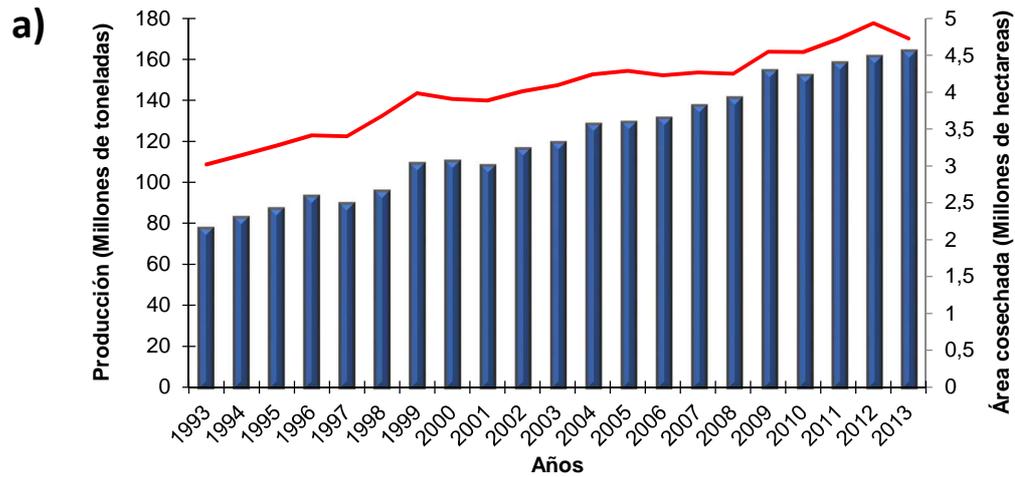
producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y, en menor proporción, al aumento de la superficie cultivada (Bergougnoux, 2014). Con una producción anual en aumento, en el año 2013 se produjeron en el mundo 163.96 MMt (millones de toneladas) de tomate fresco (FAOSTAT, 2013). El tomate es el séptimo cultivo más importante después del maíz, arroz, trigo, patatas, soja y yuca, siendo las regiones tropicales y subtropicales donde se encuentran los mayores productores a nivel mundial. Durante los últimos 20 años, la producción de tomate, así como el área dedicada al cultivo, prácticamente se han duplicado (**Figura 2a**). A día de hoy, Asia domina el mercado de tomate con más del 60% de la producción mundial, seguido por América, Europa, África y por último Oceanía con apenas un 0,3% de la producción mundial (**Figura 2b**). Siendo China el mayor productor a nivel mundial, con 50,66 MMt, le sigue India y EE.UU con una producción de 18,22 y 12,57 MMt, respectivamente. España ocupa el noveno puesto mundial con una producción en 2013 de 3,6 MMt (**Figura 2c**).

El cultivo del tomate está bastante extendido en España, encontrándose las mayores producciones en Andalucía, Extremadura, Región de Murcia, Navarra y Canarias (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Superficie y producción del cultivo de tomate en España.**

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)				Rendimiento (kg/ha)			Producción (toneladas)
	Secano	Regadío		Total	Secano	Regadío		
		Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
Andalucía	25	5.490	13.047	18.562	19.880	57.596	99.836	1.619.261
Extremadura	–	17.190	4	17.194	–	81.606	220.000	1.403.681
Murcia	–	190	2.417	2.607	–	60.000	115.000	289.355
Navarra	–	1.715	60	1.775	–	83.748	71.017	147.889
Canarias	46	94	1.185	1.325	35.000	54.369	100.802	126.171
Casillas-La Mancha	–	1.504	40	1.544	–	72.522	170.000	115.874
Galicia	–	213	858	1.071	–	74.574	101.528	102.996
Aragón	–	867	16	883	–	81.792	170.625	73.644
C. Valenciana	80	576	498	1.154	11.325	23.774	106.835	67.804
Cataluña	50	1.222	139	1.411	5.760	32.743	86.163	52.278
La Rioja	–	183	13	196	–	73.705	83.000	14.567
Baleares	21	135	89	245	7.000	42.000	52.980	10.532
Otros	158	187	97	442	42.938	137.451	367.022	22.361
<b>ESPAÑA</b>	<b>380</b>	<b>29.736</b>	<b>18.501</b>	<b>48.617</b>	<b>14.545</b>	<b>72.605</b>	<b>101.720</b>	<b>4.046.413</b>

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. Datos 2014



**Figura 2. Producción de tomate a nivel mundial.** a) Producción (barras verticales) y área cosechada (línea roja) de tomate en el mundo desde 1993 hasta 2013, b) producción (%) de tomate por continentes y c) principales países productores de tomate en el mundo.

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

La Región de Murcia es una de las principales productoras de tomate en el ámbito nacional, gracias a sus inmejorables condiciones climáticas y de suelo. Las principales variedades de tomate que actualmente se comercializan en la Región de Murcia son las siguientes: tipos Beef, Marmande, Vemone, Moneymaker, Cocktail, Cereza (Cherry), Larga Vida, Liso y Ramillete. La Región de Murcia, con alrededor de 289.355 toneladas producidas en 2014, es la tercera comunidad autónoma productora de tomate de España, por detrás de Extremadura y Andalucía. Su producción se destina al mercado en fresco exportándose una gran parte de ella. En esta comunidad, a diferencia de la provincia de Almería, donde predominan los pequeños y medianos productores, la mayor parte de la producción de tomate para fresco es llevada a cabo por grandes empresas con gran capacidad de explotación, sin olvidar la importancia de las cooperativas en este sector. Es de destacar que el destino mayoritario de nuestras exportaciones son los Países Bajos, donde se redistribuye a otros países como complemento de sus exportaciones en los meses improductivos (MAGRAMA, 2014).

#### 1.4. Genoma del tomate

El genoma diploide ( $2n=24$ ) del tomate tiene un tamaño aproximado de 950 Mb, está organizado en 12 cromosomas y contiene unos 35.000 genes (The Tomato Genome Consortium, 2012). Actualmente un buen número de genes han sido descritos y asignados a localizaciones específicas en el mapa genético.

Dentro de la familia de las Solanáceas el tomate es considerado la especie modelo para los análisis genéticos (Bergougnoux, 2014; Schwarz *et al.*, 2014). Es ampliamente conocido que existen otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz u olmo, pero el tomate es filogenéticamente distinto a las anteriores especies y posee características morfológicas específicas (Bergougnoux, 2014). Ofrece ventajas como son un genoma de tamaño reducido con respecto a otros cultivos, tiempos de generación cortos, autógama y posibilidad de utilizar tecnología rutinaria de transformación. Por ello ha sido posible obtener gran cantidad de información de tomate, así como recursos genéticos, citogenéticos y fisiológicos (<http://solgenomics.net/>). Entre las herramientas genéticas, hay numerosos mutantes caracterizados (<http://www.zamir.sgn.cornell.edu>) y son muy abundantes los recursos fitogenéticos y entradas de especies silvestres (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). También se han desarrollado micromatrices con genes de copia

única para uso de la comunidad científica, diversas librerías BACs de la variedad Heinz 1706, etc. (<http://www.genome.arizona.edu/fpc/tomato>).

Existen varias bases de datos donde se recopila diversa información sobre distintos aspectos del tomate, que pueden ser consultadas mediante internet. La base de datos SGN (Solanaceae Genome Network; <http://www.solgenomics.net/>) contiene herramientas para el estudio de todas las solanáceas incluye todas las secuencias de genes y ESTs, marcadores moleculares y herramientas para su análisis. El SGN, contiene más de 20 mapas genéticos y físicos de tomate, patata, pimiento y tabaco con miles de marcadores. Los marcadores de esta base de datos van desde AFLP, CAPS, PCR, RFLP, SNP, SSR y dCAPS (Bombarely *et al.*, 2011). Por su parte, existen aproximadamente 300.000 secuencias ESTs, disponibles en bases de datos públicos como el DNA-Banco de datos de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), Solgenomics Network (<http://www.solgenomics.net/>) y MiBASE (<http://www.pgb.kazusa.or.jp/mibase/>) (Shirasawa *et al.*, 2010).

En el año 2004, se inició el proyecto de secuenciación del genoma de tomate por un consorcio internacional en donde estaban involucrados Korea, China, Inglaterra, India, Holanda, Francia, Japón, España, Italia y Estados Unidos. El objetivo inicial fue la secuenciación BAC a BAC de la región eucromatida lográndose secuenciar más de 1200 BACs. En 2009 se inició la secuenciación del genoma completo habiéndose logrado un ensamblaje de alta calidad. En el 2012 se publicó por parte de The Tomato Genome Consortium los resultados finales de la secuenciación del cultivar "Heinz 1706". Las anotaciones del genoma del tomate, generadas por el proyecto de secuenciación son realizadas por el International Tomato Annotation Group (ITAG).

### **1.5. Mejora genética del tomate**

En las últimas décadas los objetivos de mejora han pasado por cuatro fases: aumento de rendimiento (década de 1970), conservación post cosecha (década de 1980), mejora de propiedades organolépticas (década de 1990) y mejora de las propiedades nutricionales. Por lo tanto los programas de mejora se han orientado a obtener altos rendimientos, con frutos de alta calidad, manteniendo los costes de producción lo más bajos posible (Bai y Lindhout, 2007). Paralelamente las casas de mejora han ido incorporando genes de resistencia al estrés biótico y abiótico. La mayor parte de estos genes provienen de especies emparentadas como *S. peruvianum* L., *S. pimpinellifolium* L. y *S. habrochaites*

S. Knapp y D.M Spooner. Estas especies han permitido incrementar la variabilidad genética y han provocado importantes cambios en la estructura genética y fenotípica de las variedades cultivadas (Casals Missio, 2012). Como resultado de décadas de mejora genética, se han identificado mutaciones de forma aleatoria, afectando caracteres importantes. El tomate es una de las especies en las que se ha realizado mayor inversión a nivel de programas de mejora genética, y los avances obtenidos en las últimas décadas son espectaculares. Los cultivares disponibles actualmente disponen de resistencias a numerosos patógenos, unos rendimientos espectaculares y una gran capacidad de adaptación en ambientes de cultivo diferentes (Casals Missio, 2012). No obstante, en los últimos tiempos los consumidores están interesados en variedades singulares y reclaman al mercado cultivares con morfologías singulares y un perfil sensorial superior. En este ámbito las casas de semillas están intentando sacar al mercado nuevas variedades que cumplan con estas demandas, reorientando una parte de sus programas de mejora. Un buen punto de partida para obtener este tipo de cultivares son las variedades tradicionales, las cuales aglutinan gran parte de las características deseadas por los consumidores. Esto está llevando a plantear el sabor como un importante objetivo en la mejora genética del tomate.

Por otro lado, el desarrollo de cultivos tolerantes a estrés abiótico es un objetivo de mejora prioritario para todos los cultivos agrícolas. Se considera que el mayor desafío para los próximos años será aumentar la producción de cultivos en las tierras afectadas por estrés abiótico. Por lo que respecta a tomate, las mayores producciones en nuestro país se obtienen en las áreas que en mayor medida acusan los problemas de sequía y salinidad (por ejemplo, Andalucía y Murcia). A título de ejemplo, en tomate se han llegado a encontrar reducciones del 30-40% del rendimiento para salinidades moderadas de 6-8 dS/m (Caro *et al.*, 1991), que son valores normales en las aguas subterráneas de la zona costera de Murcia y Almería utilizadas para el riego (Bolarín y Caro, 1995). Por otra parte, el crecimiento de muchas especies halófilas es estimulada dentro de un intervalo de salinidad de 15-25 dS m<sup>-1</sup> (Rozema y Schat, 2013). Por tanto, los programas de mejora que permitan incrementar la tolerancia a la sequía y salinidad de tomate van a repercutir en beneficios para la economía de las principales zonas productoras.

## 2. Especies silvestres relacionadas con tomate

### 2.1. Origen de las especies de tomate silvestres

La clasificación taxonómica 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). Actualmente se reconocen trece especies de tomates (Peralta *et al.*, 2005), once de ellas distribuidas en Los Andes desde la zona central de Ecuador hasta el norte de Chile y dos de ellas endémicas de las Islas Galápagos (**Tabla 2**).

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

**Tabla 2. Especies de *Solanum* sección *Lycopersicon* y sus equivalentes en el género *Lycopersicon* (Peralta et al., 2005).**

Nombre de la especie	Equivalente en <i>lycopersicon spp</i>	Distribución
<i>Solanum arcanum</i> Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Valles andinos costeros e interiores en N de Perú, desde alrededor de 100 hasta 2500 m. Lomas, quebradas secas y pendientes rocosas secas.
<i>Solanum cheesmaniae</i> (L. Riley) Fosberg	<i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley	Endémico de las Islas Galápagos, Ecuador, desde el nivel del mar hasta 500 m.
<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>Lycopersicon chilense</i> Dunal	En la ladera occidental de los Andes desde Tacna en el S de Perú hasta el N de Chile, en llanuras rocosas hiper-áridas y desiertos costeros desde el nivel del mar hasta 2000 m.
<i>Solanum chmielewskii</i> (C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M. Holle).	<i>Lycopersicon chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	En valles andinos secos elevados desde Apurímac en el S de Perú hasta Sorata en el N de Bolivia, desde 2300-2880 m de cota.
<i>Solanum corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller; también conocido como <i>Lycopersicon glandulosum</i> C.F. Mull.	Elevaciones medias a altas en la ladera occidental de los Andes desde Centro a Sur de Perú, ocasionalmente en laderas más bajas en tierras deslizables hacia la parte S del rango de la especie; (400) 1000-3000 m.
<i>Solanum galapagense</i> S. Darwin y Peralta	Parte de <i>Lycopersicon cheesmaniae</i> L. Riley (conocido previamente como forma o var. <i>minor</i> )	Endémico de las Islas Galápagos, concretamente de las islas occidentales y sur, principalmente en lava costera hasta 1 m de la marca de marea alta dentro de la zona de alcance del mar (altamente tolerante a salinidad), pero también ocasionalmente tierra adentro.
<i>Solanum habrochaites</i> S. Knapp y D.M Spooner	<i>Lycopersicon hirsutum</i> Dunal	En una variedad de tipos de bosques, desde premontanos hasta secos, en las pendientes occidentales de los Andes desde el Centro de Ecuador hasta el Centro de Perú, alrededor de 500-2500 m. cota
<i>Solanum huaylasense</i> Peralta	Parte de <i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	Laderas rocosas del Callejón de Huaylas a lo largo del río Santa en Ancash (Perú) y en el drenaje adyacente del río Fortaleza desde 1700-3000 m
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller	Sólo se conocen formas cultivadas o fugas; a nivel mundial en gran variedad de hábitats.
<i>Solanum neorickii</i> D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	<i>Lycopersicon parviflorum</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle	S Perú (Apurímac) hasta S Ecuador (Azuay) en valles interandinos secos desde 1950-2600 m. A menudo sobre bancos rocosos y bordes de carreteras.
<i>Solanum pennellii</i> Correll	<i>Lycopersicon pennellii</i> (Correll) D'Arcy	N Perú (Piura) hasta N Chile (Tarapacá) en laderas rocosas secas y áreas arenosas desde el nivel del mar hasta 3000 m.
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (L.) Miller	En lomas y ocasionalmente en desiertos costeros desde el Centro de Perú al N de Chile, desde nivel del mar hasta 600 m. A veces como mala hierba en bordes de campos en riveras de valles costeros.
<i>Solanum pimpinellifolium</i> L.	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> (L.) Miller	Áreas costeras desde el Centro de Ecuador hasta el Centro de Chile, 0-500 m.

## 2.2. Especies silvestres de tomate como fuentes de variabilidad genética

En los trabajos de transformación dirigidos al aumento de la tolerancia a estreses abióticos, la mayor parte de los genes que se han clonado y transferido provienen de

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

El tomate cultivado posee una variabilidad genética limitada, en gran parte debida a las selecciones naturales y artificiales producidas durante la domesticación y desarrollo de los cultivares modernos (Ladizinsky, 1985) y especialmente por el cuello de botella que se produjo al importarlo a Europa. Así, el reducido número de tomates introducidos por los españoles tras el descubrimiento constituye la base genética de todo los cultivares modernos. Se estima que solo un 5% de la variabilidad total del género *Solanum* secc. *Lycopersicon* está presente en *S. lycopersicum* (Miller y Tanksley, 1990). A pesar de que las especies silvestres de tomate actualmente son una fuente de genes de interés agrícola para programas de mejora, aún están muy poco aprovechadas. Para ello hay que identificar primero fuentes de variabilidad en el carácter de interés, y después introducir esa variabilidad en un programa de mejora (Francia *et al.*, 2005). En la tabla 3 se presenta un resumen de las principales características de las especies silvestres de tomate, con las características de interés que han sido o podrían ser consideradas en eventuales programas de mejora genética.

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). Entre las características agronómicas más interesantes que muestran las especies silvestres del género *Solanum* secc. *Lycopersicon* se encuentran la resistencia a diferentes tipos de estrés. Tradicionalmente, los factores que provocan estrés en las plantas se han dividido en bióticos: plagas, enfermedades, malas hierbas entre otros; y abióticos: sequía, salinidad, bajas y altas temperaturas, viento, problemas de suelo, etc. (Cuartero *et al.*,

1995). Como ejemplo cabe citar la gran tolerancia a la salinidad en especies como *S. cheesmaniae*. Otras como *S. pennellii*, florecen en hábitats extremadamente secos del Perú Occidental, *S. habrochaites* puede tolerar el frío y las heladas, mientras que variedades de la forma silvestre de *S. lycopersicum* L. “cerasiforme” poseen tolerancia a la humedad (Esquinas-Alcazar y Resources, 1981).

**Tabla 3. Características agronómicas de interés de las especies silvestre de tomate (Prohens *et al.*).**

Especie	Características de interés
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> L.	Tolerancia humedad, resistencia a hongos y enfermedades de suelo.
<i>S. cheesmaniae</i> L. Riley Fosberg y <i>S. galapagense</i> S. Darwin y peralta	Tolerancia a salinidad y espesor del pericarpio.
<i>S. pimpinellifolium</i> L.	Color y calidad de la fruta, resistencia a insectos, nematodos y enfermedades
<i>S. chmielewskii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes & M. Holle D.M. Spooner, G.J. Anderson & R.K. Jansen	Alto contenido de azúcares
<i>S. neorickii</i> C.M. Rick, Kesicki, Fobes y M.Holle D.M. Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen	Resistencia a bacterias
<i>S. habrochaites</i> S.Knapp D.M Spooner	Tolerancia a frío y heladas, resistencia a insectos y enfermedades
<i>S. pennellii</i> Correll	Resistencia a sequía, salinidad e insectos
<i>S. chilense</i> Dunal Reiche	Resistencia a sequía y enfermedades
<i>S. peruvianum</i> L.; <i>S. huaylasense</i> Peralta y S. Knaap; <i>S. arcanum</i> Peralta; <i>S. corneliomuelleri</i> J.F. Macbr.	Resistencia a virus, hongos y bacterias

Las herramientas de genómica funcional están permitiendo la identificación de numerosos genes inducidos por estrés, pero solo se conoce hasta el momento la función de un número muy limitado de los mismos (Bartels y Sunkar, 2005; Munns y Tester, 2008). Además, en la mayoría de los casos, los genes identificados proceden de especies modelo (Munns, 2005; Cuartero *et al.*, 2006). Los mayores esfuerzos para identificar genes implicados en la tolerancia a estrés abiótico se han dirigido en la última década hacia la sobreexpresión de genes endógenos o la expresión heteróloga de genes que supuestamente actúan en diferentes procesos (revisado en Munns, 2005; Tuberosa y Salvi *et al.*, 2006; Vij y tyagi, 2007; Cuartero *et al.*, 2008). Una estrategia alternativa sería la búsqueda de genes en especies tolerantes, en vez de centrarse en las especies cultivadas con mayor sensibilidad al estrés. Diferentes autores han revisado los mecanismos de tolerancia en halófitas (plantas capaces de sobrevivir y reproducirse en ambientes con altas concentraciones salinas) y han propuesto que la investigación futura se debería dirigir hacia la identificación de los determinantes de tolerancia en estas especies

(Flowers y Colmer, 2008; Lugan *et al.*, 2010). Además, las plantas halófitas parecen poseen más genes relacionados con la tolerancia a la salinidad y la sequía que glicófitas (Askari *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011; Bartels y Dinakar, 2013), por lo que el uso de especies halófitas para identificar genes implicados en la tolerancia a la salinidad o sequía puede ser una buena estrategia para mejorar la tolerancia a estos estreses en los cultivos actuales. En resumen, el tomate puede ser un modelo excelente en este sentido, ya que hay accesiones de especies silvestres relacionadas, como las de *S. pennellii* que hemos utilizado en este trabajo, que exhiben un alto grado de tolerancia tanto a la salinidad como al estrés hídrico (Bolarin *et al.*, 1991).

### **2.3. Descripción botánica y taxonomía de *S. pennellii***

*Solanum pennellii* se trata de una especie silvestre de tomate endémica de la región andina de América del Sur, Perú y Chile. Debido a su capacidad para tolerar el estrés extremo, como la sequía y la salinidad, y a su morfología inusual, es un donante importante de germoplasma para el tomate cultivado *S. Lycopersicum* (Bolger *et al.*, 2014). Es una parte importante de un tipo especial de vegetación llamado "vegetación de las lomas". Es común encontrarla en la arena junto al mar o en zonas rocosas y secas a más altitud, hasta a 3.000m sobre el nivel del mar. El porte es rastrero y aparecen múltiples ramas laterales desde la base de la planta. Las hojas son compuestas e imparipinnadas. Los folíolos se unen a un eje central o raquis a través del peciolo. La forma de los folíolos es ovada con el margen ondulado y la nervadura pinnada en la cual se distingue un nervio central, los nervios secundarios y muy poco desarrollados unos nervios terciarios. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimo. La flor es hipógina formada por cuatro verticilos, los cuales contienen cinco piezas cada uno. Los cinco sépalos están soldados por la base. Los pétalos de color amarillo también están soldados hasta la mitad de su longitud. Las anteras se mantienen unidas y sobre ellas sobresale el estigma. El fruto es una baya pequeña con forma redondeada, pegajosa, no comestible, de color verde en todos los estadios, que cuando está maduro se hace más intenso. En su interior presenta una zona mucilaginoso donde se encuentran las semillas. El sistema radicular es poco desarrollado y tiene una amplia variabilidad genética derivada de su autoincompatibilidad. Ocupa un estatus especial, pues tiene dehiscencia poral (como es propio de género *Solanum*).

*S. pennellii* es una planta dicotiledónea que se encuadra en la familia de las solanáceas, que comprenden la patata, el tabaco y la petunia, así como la hierbamora, belladona y otras plantas venenosas. La taxonomía de *S. pennellii* es la siguiente:

- I. Clase: *Magnoliophyta*.
- II. Orden: *Solanales*.
- III. Familia: *Solanaceae*.
- IV. Género: *Solanum*.
- V. Especie: *S. pennellii* (Sinónimo: *Lycopersicon pennellii*).

### 3. Salinidad y sequía: Efectos sobre los cultivos

Se prevé que la población mundial aumente en más de un tercio, o en unas 2.300 millones de personas hasta el año 2050 (FAO), llegando hasta los 9.500 millones de personas. Esto produce un reto importante para la agricultura mundial, ya que implica la producción de un 70% más de alimentos en los próximos 40 años. Ello implicaría no solo sobreexplotar las tierras ya cultivadas, sino buscar nuevas áreas donde llevar a cabo la actividad agrícola, teniendo que dirigir nuestra mirada hacia las zonas áridas y semiáridas. El 40% de la superficie mundial corresponde a regiones áridas y caracterizadas por ser suelos secos debido a la escasez de lluvias, temperaturas extremas y una alta velocidad de evaporación donde la producción agrícola depende fuertemente de la irrigación. En estas condiciones, el efecto del uso continuado de aguas que contienen sales disueltas, unido a una velocidad de evaporación y la baja capacidad de lixiviación de algunos suelos, así como el uso de elevadas cantidades de fertilizantes y de penetración del agua del mar en zonas costeras y marismas, incrementan la salinización de los suelos (Munns, 2005). Además, la demanda de agua de alta calidad debido al incremento de la población humana conlleva el uso cada vez más frecuente de aguas de baja calidad en la agricultura, que unido a la sobreexplotación del suelo produce una salinización de las áreas de cultivo.

La salinidad del suelo es uno de los factores ambientales que más incide sobre la productividad agrícola y limita el uso potencial de nuevas áreas de cultivo (Munns, 2005; Munns y Tester, 2008; Ahuja *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). 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). Se calcula que un 40% del área

mundial dedicada a regadío, está afectada por la salinidad, especialmente aquellas más productivas, como California, el sur de Asia y gran parte del área mediterránea. Dentro de esta última, algunas de las zonas más afectadas son las marismas del Sur, Almería, Murcia, Alicante y Valle del Ebro, así como toda la franja atlántica de la costa marroquí (FAO). Por todas estas razones, la salinidad de suelos y aguas constituye una verdadera amenaza para la agricultura, puesto que la mayoría de las plantas cultivadas, entre ellas el tomate, se ven afectadas en mayor o menor medida por este factor ambiental.

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. 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. El incremento de tierras de regadío es en parte responsable del consumo global de agua, que se ha triplicado en los últimos 50 años, y hay que destacar que más de dos tercios del agua consumida en el mundo se usa con fines agrícolas (Fang y Xiong, 2015).

Ante esta situación, en las últimas décadas se ha incrementado de forma considerable el número de estudios sobre las respuestas al estrés salino e hídrico, tanto en plantas cultivadas de interés económico, como en plantas adaptadas a medios salinos, las denominadas halófitas. En la naturaleza existen especies halófitas (tolerantes a la salinidad y la sequía) que resisten concentraciones salinas de hasta 500 mM, y glicófitas, que son sensibles a alta salinidad e incluyen a la mayoría de especies cultivadas (Tester y Davenport, 2003; Hasegawa, 2013; Gupta y Huang, 2014). En general, ambos tipos de especies comparten mecanismos de resistencia al estrés salino e hídrico (Cushman y Bohnert, 2000; Hasegawa *et al.*, 2000), aunque se diferencian en los perfiles de expresión de genes, de manera que las halófitas son capaces de “responder mejor” en la lucha contra

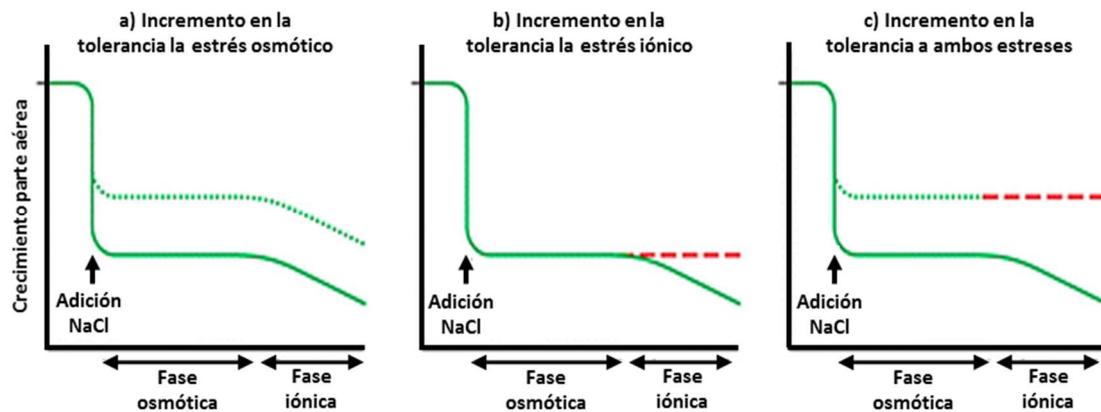
ambos estreses (Shabala, 2013). Como ejemplo ilustrativo, la especie halófila *Thellungiella salsuginea*, cuyo genoma muestra una homología del 90-95% con el de *Arabidopsis thaliana*, induce constitutivamente más de 40 genes, mientras que en *Arabidopsis* estos sólo se expresan en condiciones de estrés (Taji *et al.*, 2004). La investigación en mejora de la halotolerancia se dirige a la mejor comprensión de los efectos causados por el estrés salino, tanto a nivel celular como de organismo completo, así como de las respuestas adaptativas de las plantas frente a dicho estrés. Para ello es necesario identificar tanto los componentes que determinan la tolerancia a sal como los elementos reguladores de éstos (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001).

La acción negativa de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas se debe a la combinación de varios efectos (Greenway y Munns, 1980; Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001): a) la salinidad produce en la planta un estado fisiológico similar al causado por el estrés hídrico, es más, ambos tipos de estrés se superponen, ya que una alta concentración de sal en el suelo genera un estrés osmótico que conduce al establecimiento de una zona de bajo potencial hídrico que dificulta la absorción de agua por las raíces de las plantas; b) la salinidad puede generar una toxicidad iónica específica asociada normalmente a la excesiva absorción de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ; c) el exceso de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  conduce a una menor absorción de nutrientes minerales o a una alteración de la distribución de iones esenciales como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nitrato o fosfato, determinando una alteración nutricional; y d) la salinidad conlleva procesos de estrés oxidativo secundario debidos a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

### **3.1. Estrés osmótico inducido por salinidad y sequía**

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. Ambos estreses producen a nivel morfológico, fisiológico y molecular una amplia variedad de respuestas, tales como la reducción del turgor, inhibición de las funciones de membrana, alteración de determinadas actividades enzimáticas, producción de radicales libres, disminución de la fotosíntesis e inducción de deficiencias iónicas.

A bajas concentraciones de NaCl, el componente osmótico del estrés salino ejerce un efecto sobre la tasa de crecimiento mayor que el provocado por el estrés iónico. A altas concentraciones de NaCl o en especies sin capacidad de regular el transporte de Na<sup>+</sup>, el efecto iónico domina sobre el efecto osmótico (Munns y Tester, 2008). De esta forma, actualmente se acepta que el efecto negativo de la salinidad sobre el crecimiento sigue un modelo bifásico, consistente en una fase muy temprana debida a la reducción del suministro de agua generado por el aumento de presión osmótica externa (fase osmótica), y una respuesta tardía (días, semanas, dependiendo de la especie) debida a la alta concentración intracelular de iones Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>, que provoca daños a nivel celular y acelera la senescencia de las hojas (fase iónica) (**Figura 3**).



**Figura 3. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas:** Fase osmótica (respuesta inmediata) y fase iónica (respuesta tardía). La línea verde continua indica el cambio en la tasa de crecimiento después de la adición de NaCl. a) Línea verde discontinua indica la respuesta hipotética de una planta con mayor tolerancia al componente osmótico del estrés salino, b) línea roja discontinua indica la respuesta de una planta con mayor tolerancia al componente iónico del estrés salino (Munns *et al.*, 1995) y c) línea verde-roja discontinua indica la respuesta de una planta con mayor tolerancia a los componentes osmótico e iónico del estrés salino (Munns y Tester, 2008).

La concentración umbral de NaCl en el medio de crecimiento de las raíces a partir de la cual empiezan a ser visibles los efectos osmóticos es de aproximadamente 40 mM. Por encima de esta concentración, la mayor parte de las células pierden agua, por lo que para mantener la actividad citosólica, el agua pasa desde la vacuola al citosol, lo que conlleva una pérdida transitoria del volumen y el turgor celular. En unas horas las células recuperan el volumen y turgor original debido al ajuste osmótico, pero a pesar de ello, se reduce la tasa de elongación celular (Yeo *et al.*, 1991; Passioura y Munns, 2000; Fricke y Peters, 2002), produciéndose cambios en las dimensiones de la célula (Munns y Tester, 2008; Shabala y Cuin, 2008). También se reduce la velocidad de división celular, lo que

conduce a una ralentización en la aparición y crecimiento de las hojas. Por otro lado, los brotes laterales dejan de crecer y se forman menos ramas. Además, se afecta el desarrollo reproductivo, produciéndose floración temprana o reducción del número de botones florales (Munns y Tester, 2008).

El estrés osmótico también genera señales intracelulares como síntesis de ABA o aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático libre que desencadenan posteriores respuestas adaptativas (Hasegawa *et al.*, 2000). Se ha comprobado que después del cierre estomático inducido por un estrés se debe producir una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula, donde se encuentra almacenado principalmente en vacuolas, al apoplasto para que se produzca la apertura estomática (Gilliham *et al.*, 2011). El uso eficiente del agua es otro indicador relacionado con la apertura o cierre de estomas, con la reducción de la tasa de transpiración y con el área foliar en condiciones de déficit hídrico (Farooq *et al.*, 2009). Se plantea que este interviene en el mantenimiento de la transpiración y del área foliar, incrementando el vigor y la densidad de las raíces en respuesta a la sequía. Por consiguiente, el estrés por déficit hídrico provoca la disminución de la asimilación de  $\text{CO}_2$  y consecuentemente una reducción de la tasa fotosintética, aunque las causas de la disminución de la fotosíntesis en condiciones de estrés abiótico no están todavía bien esclarecidas (Chaves *et al.*, 2009; Saibo *et al.*, 2009). La disminución de la difusión de  $\text{CO}_2$  de la atmósfera al sitio de carboxilación se considera la causa principal de la disminución de fotosíntesis en condiciones de déficit hídrico moderado (Chaves *et al.*, 2009; Pinheiro y Chaves, 2011). Si la velocidad de producción de nuevas hojas es mayor que la de las hojas que mueren habrá suficiente capacidad de fotosíntesis para mantener el crecimiento y desarrollo de la planta hasta la producción de flores y frutos, aunque a un número reducido. Si dicha velocidad es menor, la planta no sobrevivirá para producir semillas (Munns, 2005).

### **3.1.1. Estrategias para recuperar la homeostasis osmótica**

Para recuperar la homeostasis osmótica, las plantas llevan a cabo el ajuste osmótico acumulando iones que se encuentran en exceso en el suelo y son transportados a la parte aérea, o sintetizando solutos orgánicos compatibles con el metabolismo celular (Alarcon *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Rathinasabapathi, 2000; Heidari y Mesri, 2008; Talebi *et al.*, 2009). La acumulación de estos solutos compatibles en respuesta al estrés salino es una adaptación metabólica útil para el equilibrio osmótico

entre la vacuola y el citosol (Yancey *et al.*, 1982; Rhodes y Hanson, 1993), ya que, incluso a elevadas concentraciones no provocan daños a nivel celular ni alteran las actividades enzimáticas (Sickler *et al.*, 2007). Si bien hay que tener en cuenta el coste energético que supone la utilización de solutos para realizar el ajuste osmótico ante una situación de estrés. Así, el coste requerido para la acumulación de iones salinos (exclusión de la sal, compartimentación intracelular y/o excreción por medio de glándulas salinas) es relativamente pequeño en relación al que se necesita para sintetizar solutos orgánicos (Yeo, 1983; Raven, 1985). Según Munns (2002), el número de moles de ATP necesarios para usar un mol de NaCl como osmolitos 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. Raven (1985) establecía 3,5 moles de ATP para Na<sup>+</sup>, 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.

Los solutos compatibles comprenden una amplia gama de compuestos orgánicos: monosacáridos (fructosa y glucosa), alcoholes (glicerol, inositoles metilados), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos), polioles, aminoácidos y compuestos de amonio cuaternario (prolina, glicina betaína, alanina betaína o prolina betaína) (Rhodes y Hanson, 1993; Nuccio *et al.*, 1999; Heidari y Mesri, 2008). 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). Como los solutos compatibles son hidrofílicos, pueden sustituir al agua en la superficie de las proteínas y membranas, lo que explica su acción como osmoprotectores y como chaperonas de bajo peso molecular (Hasegawa *et al.*, 2000). 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). En muchas plantas halófitas, la prolina o la glicina betaína se almacenan en grandes cantidades en las vacuolas de las hojas. En glicófitas, los solutos compatibles se acumulan a concentraciones no superiores a 10 mM, pero sólo en el citoplasma, contribuyendo de forma significativa al

mantenimiento de la presión osmótica (Rhodes *et al.*, 2002). Aunque la síntesis de estos compuestos permite a la planta sobrevivir en presencia de altas concentraciones externas de sal, al requerir energía, se produce a expensas del crecimiento de la planta.

También se han relacionado algunos tipos de proteínas con la tolerancia a la salinidad. Se trata de proteínas sintetizadas bajo condiciones de estrés salino, como osmotinas, dehidrinas, proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*) y poliaminas, (Tester y Davenport, 2003; Groppa y Benavides, 2008; Alcazar *et al.*, 2010; Gill y Tuteja, 2010; Janicka-Russak *et al.*, 2010; Muñoz-Mayor *et al.*, 2012). Se desconoce en gran medida la función de osmotinas y dehidrinas en la tolerancia a la salinidad (Rorat, 2006; Saavedra *et al.*, 2006; Battaglia *et al.*, 2008). De manera general, se ha propuesto que el papel de estos compuestos estaría relacionado con el mantenimiento de la estructura de proteínas (Campbell y Close, 1997; Battaglia *et al.*, 2008; Bies-Etheve *et al.*, 2008). Las proteínas LEA se acumulan en los tejidos vegetativos de todas las especies vegetales en respuesta al estrés osmótico causado por sequía, salinidad o frío (Xiong y Zhu, 2002; Dalal *et al.*, 2009). Estas proteínas probablemente contribuyen a la preservación de la integridad estructural de la célula (Winicov, 1998), actuando como chaperonas para prevenir la desnaturalización de otras proteínas (Xiong y Zhu, 2002; Goyal *et al.*, 2005; Grelet *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005). Por la importancia de los flujos hídricos en los procesos de ajuste osmótico celular, la actividad de las acuaporinas también tendría un papel clave entre los mecanismos de adaptación al estrés osmótico (Maurel y Chrispeels, 2001; Vera-Estrella *et al.*, 2004), ya que las acuaporinas facilitan la toma de agua desde el medio y determinan la conductividad hidráulica de la raíz en respuesta a numerosos estreses ambientales (Luu y Maurel, 2005; Maurel *et al.*, 2008).

### **3.2. Estrés iónico y nutricional**

El efecto iónico es el provocado por la sal en el interior de la planta y es específico de la salinidad (Hasegawa, 2013). El ión  $\text{Cl}^-$  puede interferir con los sitios aniónicos implicados en el ligamiento de ARN y con metabolitos aniónicos como bicarbonatos, carboxilatos y azúcares fosfatos. De otro lado, el  $\text{Na}^+$  puede interferir con los sitios catiónicos implicados en el ligamiento de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . La consecuencia general de todos estos efectos es la reducción del crecimiento que, en caso de extrema severidad del estrés, puede llevar a la muerte de la planta (Tester y Davenport, 2003; Tuteja, 2007; Yeo, 2007; Munns y Tester, 2008; Shabala y Cuin, 2008; Ehsanzadeh *et al.*, 2009). En algunas plantas perennes, sobre

todo leñosas (como los cítricos y la vid), el  $\text{Na}^+$  es almacenado en las raíces y tallos leñosos, mientras que el  $\text{Cl}^-$  se acumula en las ramas jóvenes, siendo más perjudicial para la planta (Flowers y Yeo, 1988). Sin embargo, para la mayoría de las plantas, entre ellas las gramíneas, el  $\text{Na}^+$  es la causa principal de toxicidad iónica (Tester y Davenport, 2003). El crecimiento de la planta se ve afectado en condiciones salinas ya que la acumulación de  $\text{Na}^+$  causa necrosis de las hojas adultas, primero en los bordes y posteriormente en el interior. Si la tasa de muerte de las hojas adultas es mayor que la de producción de hojas nuevas, se verá afectada la capacidad fotosintética de la planta, que no será capaz de suministrar los hidratos de carbono que requieren las hojas jóvenes, lo cual reduce aún más los niveles de crecimiento y producción de la planta (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). La escala de tiempo en la cual se manifiesta el daño específico del ión  $\text{Na}^+$  depende de su tasa de acumulación en hojas, y de la eficacia de su compartimentación en células de la hoja.

Cuando la concentración de sales en el medio externo es alta, aumenta la competencia entre los iones, pudiendo producirse deficiencias nutricionales importantes al perturbarse los equilibrios iónicos de nutrientes. El desplazamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{Na}^+$  en las posiciones de intercambio de las membranas y paredes celulares altera la permeabilidad de las mismas y dificulta la homeostasis iónica en general (Maathuis, 2014). Uno de los efectos más importantes de las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  es el desplazamiento del  $\text{K}^+$  en sus funciones, ya que ambos iones muestran gran similitud química. El primer punto de interacción entre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es en la entrada de estos iones al simplasto de la raíz. Por una parte, las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  inhiben directamente los sistemas de entrada de  $\text{K}^+$ . Por otra, el  $\text{Na}^+$  da lugar a una despolarización del potencial eléctrico de la membrana, disminuyendo la entrada de  $\text{K}^+$ . En consecuencia, ante un estrés salino, se induce generalmente una deficiencia de  $\text{K}^+$  debido al aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$ , ya que el  $\text{Na}^+$  compite con  $\text{K}^+$  interfiriendo su absorción y transporte por los transportadores de  $\text{K}^+$ , tanto de alta como de baja afinidad (Nieves-Cordones *et al.*, 2010). Por estas razones, el exceso de  $\text{Na}^+$  está implicado en la inhibición de muchos procesos metabólicos o enzimáticos como la fotosíntesis, la generación de estrés oxidativo a través de la producción de especies de oxígeno activado, la absorción de  $\text{CO}_2$  a través de los estomas y el crecimiento en general (Dajic, 2006; Fricke *et al.*, 2006; Shoji *et al.*, 2006; Tuteja, 2007; Munns y Tester, 2008). Por otro lado, el  $\text{Na}^+$  entra en la célula, lo que disminuye la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  del citoplasma, y los procesos

metabólicos que dependen del  $K^+$  se ven afectados negativamente. Por ello, mantener unos niveles de  $K^+$  elevados durante el estrés salino es una de las estrategias para aumentar la tolerancia al estrés salino, y un aumento en la relación  $K^+/Na^+$  es uno de los parámetros más importantes usados para definir la tolerancia (Olías *et al.*, 2009).

### 3.2.1. Estrategias para recuperar la homeostasis iónica y nutricional

El mantenimiento de la homeostasis por absorción y compartimentación de iones no sólo es crucial para el crecimiento normal de la planta, sino también es un proceso esencial para el crecimiento durante el estrés salino (Niu *et al.*, 1995; Hasegawa, 2013). Con independencia de su naturaleza, tanto las plantas glicófitas como las halófitas no pueden tolerar altas concentraciones de sal en su citoplasma (Hasegawa, 2013). Por lo tanto, el exceso de sal se transporta ya sea a la vacuola o secuestrado en tejidos más viejos que finalmente son sacrificados, protegiendo así a la planta del estrés salino (Reddy *et al.*, 1992; Zhu, 2003). Las plantas pueden poner en marcha varios tipos de respuestas adaptativas frente al componente iónico de la salinidad. Por un lado, un mecanismo de evitación, mediante el desarrollo de funciones y estructuras celulares que protegen de dichas condiciones; y por otro lado, un mecanismo de tolerancia mediante el cual las células adaptan sus funciones a las altas concentraciones intracelulares de sales. Para ello, se requiere una coordinación precisa entre los mecanismos celulares y los que operan a nivel intercelular, en tejidos y órganos.

A nivel radicular, los mecanismos que controlan la absorción selectiva de iones y su compartimentación intracelular gobiernan la tolerancia relativa a la salinidad (Cheeseman, 1988; Niu *et al.*, 1995; Tester y Davenport, 2003). La absorción por las raíces de grandes cantidades de iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  provoca la alteración de la absorción y, por tanto, del contenido de otros iones, particularmente  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003), resultando de especial importancia en la tolerancia a la sal, el mantenimiento de una alta selectividad para el  $K^+$  frente al  $Na^+$  (Greenway y Munns, 1980; Maathuis y Amtmann, 1999; Maathuis, 2009). El control en la selectividad  $K^+/Na^+$  parece establecerse a nivel de la membrana plasmática y del tonoplasto de las células epidérmicas y corticales de la raíz, que son las que controlan la absorción selectiva de iones y su compartimentación celular (Munns, 2002). Otro punto de control en la selectividad  $K^+/Na^+$  se establece a nivel del plasmalema de las células parenquimáticas del xilema, responsable de la carga activa de iones en el xilema, y por tanto, de la

concentración relativa de iones que llega a la parte aérea por la corriente xilemática (Munns, 2002). En muchas especies glicófitas, con altas relaciones  $K^+/Na^+$  en partes aéreas, la liberación preferente de  $K^+$  en el xilema o la reabsorción de  $Na^+$  de la savia xilemática, conduce a una mayor selectividad  $K^+/Na^+$ .

A nivel foliar, los mecanismos de respuesta al estrés salino son también complejos y, probablemente, presentan una mayor variación entre especies. De igual forma que en la raíz, los mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática y tonoplasto de las células de la hoja son los responsables últimos de la distribución de solutos a nivel intracelular y de tejido (Niu *et al.*, 1995). Para evitar la acumulación excesiva de sales en tejidos fotosintéticos, algunas plantas acumulan diferencialmente  $Na^+$  en determinadas zonas de la hoja (vacuolas), en hojas maduras o en el tallo, o bien lo recirculan en dirección a las hojas basales o las raíces (Jeschke, 1984; Tester y Davenport, 2003; Cuartero *et al.*, 2006).

En el contexto de la planta entera, la toxicidad al  $Na^+$  se ha asociado con su grado de acumulación en la parte aérea (hojas) en plantas glicófitas. Para evitar esta acumulación, las plantas glicófitas han desarrollado una estrategia de exclusión de iones a nivel de la raíz (Tester y Davenport, 2003). La capacidad de exclusión de  $Na^+$  viene dada por el control del flujo neto de absorción de  $Na^+$ , que resulta del balance entre el flujo unidireccional de entrada y el eflujo de salida al medio, así como del control de su translocación a la parte aérea. Este control conduce a una acumulación de  $Na^+$  en las vacuolas de las raíces o en las células proximales del tallo evitando así su acumulación en las hojas (Apse y Blumwald, 2007). Una segunda estrategia, propia de plantas glicófitas tolerantes y halófitas, es la capacidad de distribución del  $Na^+$  en los tejidos vegetales, esencialmente hacia el tallo y las hojas. Esta estrategia está basada en una adecuada regulación de la velocidad de absorción de los iones por la raíz y su translocación a la parte aérea, donde la compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico (Apse y Blumwald, 2007; Munns y Tester, 2008; Shabala y Mackay, 2011). 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  $Na^+$  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  $Na^+$  (Estañ *et al.*, 2005; Cuartero *et al.*, 2006).

Según Craig Plett y Møller (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  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y la tolerancia tisular del  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$ , 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. 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). 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 *et al.*, 2009). En este sentido, nada se sabe sobre transportadores de  $\text{Cl}^-$  y tan sólo algunos trabajos informan de avances importantes en los procesos relacionados con el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Nieves-Cordones *et al.*, 2008; Olías *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2012).

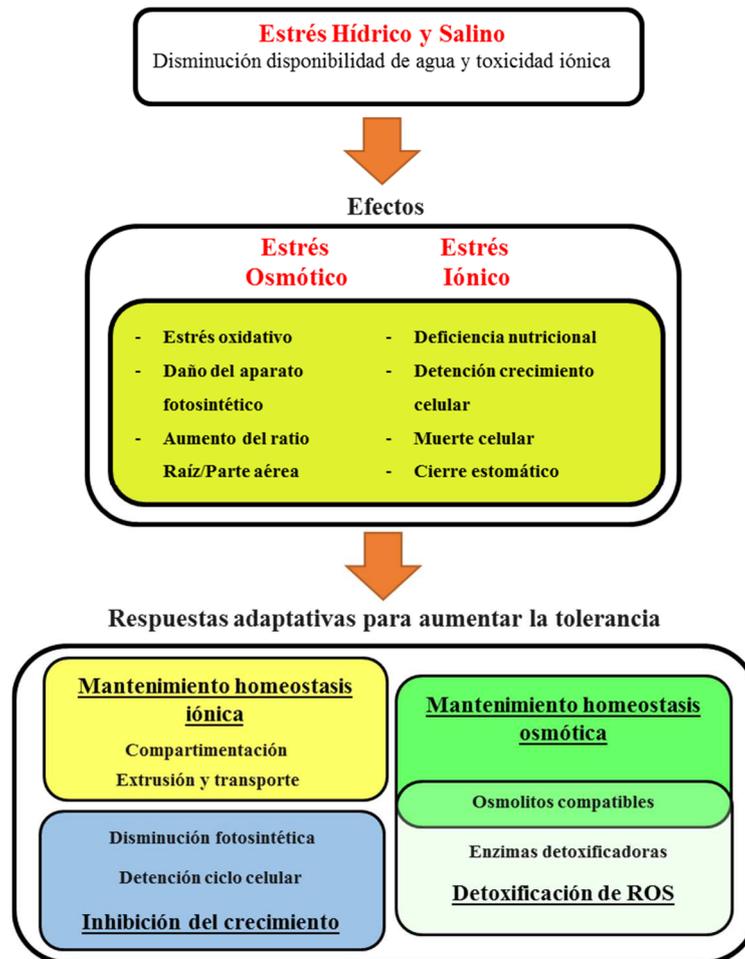
### 3.3. Estrés oxidativo

El estrés salino e hídrico provocan en las plantas un estrés oxidativo secundario (Shanker *et al.*, 2004) debido a la sobreacumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*). Cuando la planta se expone al estrés abiótico, disminuye la disponibilidad y fijación de  $\text{CO}_2$  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 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) (Smirnoff, 1993; Moran *et al.*, 1994; Borsani *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2001). El exceso de ROS causa

daños oxidativos en lípidos de membrana plasmática, proteínas y ácidos nucleicos (Smirnoff, 1993; Hernández *et al.*, 2001; Pang y Wang, 2008; Yu *et al.*, 2012). Las plantas, en respuesta a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) producida por un estrés salino e hídrico, sintetizan un conjunto de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico, glutatión reducido, tocoferoles y carotenoides; además, aumentan la expresión de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), ascorbato peroxidasas (APX), glutatión S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX) para transformar en compuestos inocuos las ROS (Apse y Blumwald, 2007; Xiong y Zhu, 2002; Pang y Wang, 2008). La producción de plantas transgénicas sobreexpresando algunas de las enzimas decodificadoras, como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión reductasa resultó en la mejora de la tolerancia a salinidad (Roxas *et al.*, 1997; Bohnert y Sheveleva, 1998). En la especie tolerante a sal *S. pennellii* se ha correlacionado su inherente tolerancia a estrés salino y oxidativo con una mayor actividad de SOD y APX (Mittova *et al.*, 2002).

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 (Vendruscolo *et al.*, 2007), ya que se acumulan en cantidades demasiado bajas como para permitir participar en el reajuste osmótico (Zhu, 2001). Los resultados más interesantes 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 cultivadas y silvestres, 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).



**Figura 4. Esquema de los efectos del estrés y las respuestas adaptativas de las plantas.** Las condiciones de salinidad y sequía causan a las plantas en primer lugar estrés iónico y osmótico. De éstos se derivan varios efectos secundarios (estrés oxidativo, deficiencia en la toma de nutrientes, desregulación de la fotosíntesis, detención del crecimiento celular, cierre estomático y muerte celular programada). Las plantas desarrollan respuestas adaptativas como el mantenimiento de la homeostasis iónica y osmótica, la detoxificación de las ROS y la inhibición del crecimiento, que tienen como última consecuencia el incremento de su tolerancia a estrés.

#### 4. Transportadores implicados en la homeostasis de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

Gran parte de la toxicidad del  $\text{Na}^+$  intracelular es consecuencia de la sustitución que éste realiza por el  $\text{K}^+$  en la activación de enzimas y la biosíntesis proteica (Marschner y Marschner, 2012). Por lo que es obvio pensar que no es sólo la cantidad de  $\text{Na}^+$  *per se*, sino más bien la proporción citosólica  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  la que determine las capacidades del metabolismo celular, y, en última instancia, la capacidad de la planta para sobrevivir en ambientes salinos. De hecho, la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  se considera un factor clave en la tolerancia a la salinidad (Gorham *et al.*, 1991; Gaxiola *et al.*, 1992; Dvorak *et al.*, 1994; Maathuis y Amtmann, 1999; Cuin *et al.*, 2003; Colmer *et al.*, 2006; Shabala y Pottosin, 2014). El funcionamiento de los sistemas de transporte de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  a través de las distintas

membranas celulares es fundamental para el mantenimiento de una adecuada relación  $K^+/Na^+$  citoplasmática. En este sentido se ha descrito que tanto los transportadores de alta afinidad de  $K^+$  de la familia HAK como los canales del tipo AKT, son importantes para la entrada de  $K^+$  en la planta (Rubio *et al.*, 2008), y éstos son inhibidos por concentraciones de  $Na^+$  que producen estrés salino. Además de la selectividad  $K^+/Na^+$  de los transportadores, la regulación de su actividad también puede ser determinante. Se ha descrito que tanto la deficiencia de  $K^+$  como el elevado  $Na^+$  externo pueden inducir cambios en el  $Ca^{2+}$  celular que a su vez activan complejas redes de señalización (Luan, 2009).

Las evidencias recientes obtenidas en plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz sugieren que la homeostasis del  $K^+$  en condiciones salinas tiene lugar no sólo por la acción de transportadores específicos de  $K^+$ , sino también por la regulación de las concentraciones de  $Na^+$  en los diferentes tejidos. Diversos transportadores de  $Na^+$  controlan la relación  $K^+/Na^+$ , mediante la extrusión de  $Na^+$  al medio externo, su compartimentación vacuolar, así como la carga y descarga xilemática (Tester y Davenport, 2003; Horie y Schroeder, 2004; Ren *et al.*, 2005; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Apse y Blumwald, 2007; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). Además, el mantenimiento de la relación  $K^+/Na^+$  también depende del control de la pérdida de  $K^+$  celular que provoca el estrés salino (Shabala y Cuin, 2008).

#### **4.1. Entrada de $Na^+$ y $K^+$ en la planta**

En condiciones fisiológicas, las plantas mantienen una alta relación  $K^+/Na^+$  en su citosol con una concentración de  $K^+$  en torno a 100-200 mM y una concentración de  $Na^+$  entre 1 y 10 mM (Higinbotham, 1973; Tester y Davenport, 2003). Considerando la diferencia de potencial eléctrico en la membrana celular (-140 mV) (Higinbotham, 1973), una subida de la concentración de  $Na^+$  extracelular establecerá un gran gradiente de potencial electroquímico de  $Na^+$  que favorecerá el transporte pasivo de este ión desde el medio al citosol, a través de sistemas uniporte o canales (Niu *et al.*, 1995). Se han propuesto tres rutas para la absorción del  $Na^+$  por la planta (Tester y Davenport, 2003). Una primera ruta, no mediada por transportadores y denominada flujo de desvío, se atribuye a la filtración a través del apoplasto debida a la discontinuidad en la endodermis. Las células endodérmicas constituyen un importante punto de control y regulación del transporte radicular de iones desde el medio externo, debido a que la banda de células suberinizadas

de Caspari es una barrera impermeable para el movimiento apoplástico de solutos (Azaizeh y Steudle, 1991; Niu *et al.*, 1995; Amaya *et al.*, 1999), obligando a que el movimiento de agua e iones se realice de un modo simplástico. La importancia del flujo apoplástico en el flujo total de  $\text{Na}^+$  de la planta, varía entre distintas especies y entre distintas condiciones de crecimiento. En arroz, se ha sugerido al apoplasto como principal vía de entrada de  $\text{Na}^+$  (Yeo *et al.*, 1991; Yadav *et al.*, 1996). En trigo, la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del apoplasto es 10 veces menor que en arroz (García *et al.*, 1997). En plantas de *Arabidopsis* cultivadas a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , todas las rutas de entrada de  $\text{Na}^+$  contribuyen en la misma medida (Essah *et al.*, 2003), mientras que en plantas halófitas existen gran número de adaptaciones anatómicas para reducir al mínimo la entrada apoplástica de sal. En este sentido, la anchura de la banda de Caspari es de dos a tres veces mayor en halófitas que en glicófitas (Kalir y Poljakoff-Mayber, 1975), y la capa interior de células corticales puede diferenciarse en una segunda endodermis (Stelzer y Läuchli, 1977). Las otras dos rutas son de tipo simplástico y están mediadas por canales y transportadores que pueden ser sensibles o insensibles a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Es conocido que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio externo generalmente reduce los efectos tóxicos del  $\text{Na}^+$  (Shabala *et al.*, 2000; Cramer, 2002). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede actuar como segundo mensajero, respondiendo a cambios del potencial de membrana relacionados con las fluctuaciones del  $\text{Na}^+$  extracelular y del  $\text{K}^+$  intracelular (Tracy *et al.*, 2008; Kader y Lindberg, 2010).

La identidad molecular de los transportadores implicados en las vías de entrada masiva de  $\text{Na}^+$  es todavía materia de debate (Apse y Blumwald, 2007; Yeo, 2007; Munns y Tester, 2008). Existen evidencias bioquímicas y electrofisiológicas que indican que el  $\text{Na}^+$  entra en la célula a través de canales no selectivos sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (Demidchik *et al.*, 2002; Demidchik y Tester, 2002; Horie y Schroeder, 2004; Demidchik y Maathuis, 2007). Estos sistemas incluyen los canales catiónicos no selectivos (NSCC, *Non Selective Cation Channels*), siendo la vía más probable de entrada de  $\text{Na}^+$  sensible al  $\text{Ca}^+$ , y los transportadores LCT1 (*Low affinity Cation Transporter 1*) (Leng *et al.*, 2002; Kaplan *et al.*, 2007). Dentro de la familia de los NSCC, las principales subfamilias de canales candidatos son los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC) y los canales activados por glutamato (GLR) (Lacombe *et al.*, 2001; Leng *et al.*, 2002). Finalmente, la proteína LCT1 (*Low Affinity Cation Transporter 1*) de trigo, con una estructura distinta al

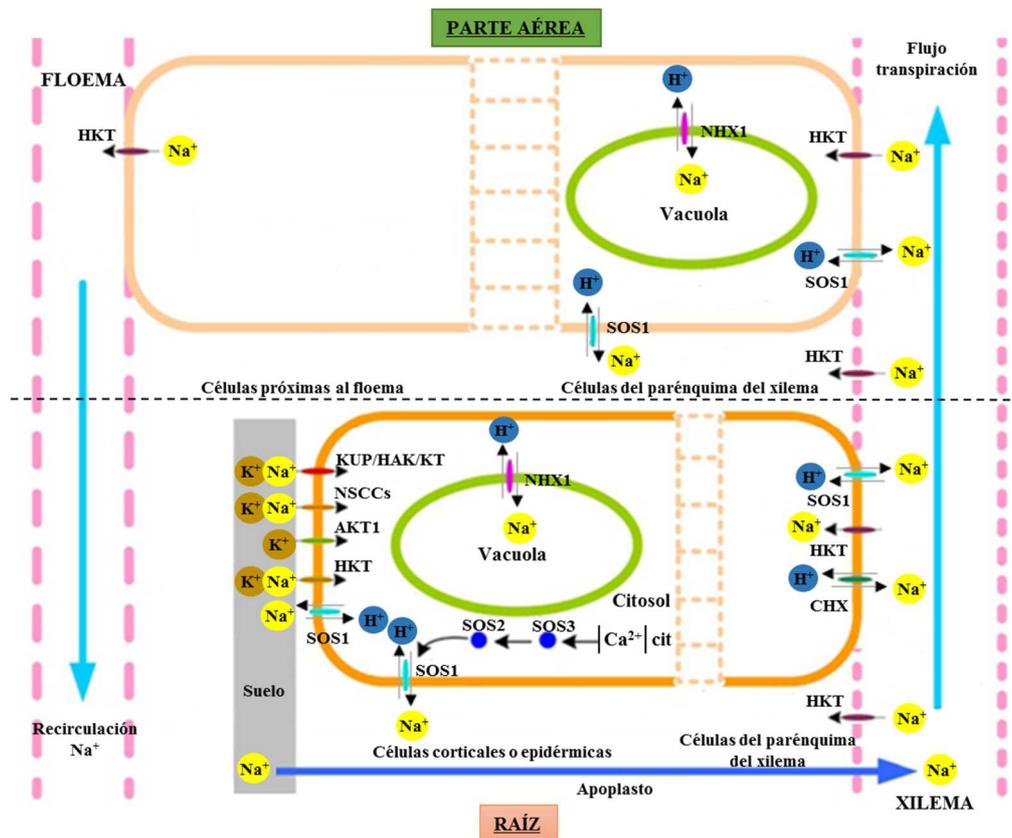
resto de transportadores iónica de plantas superiores, permite la toma de baja afinidad de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Na}^+$  y causa sensibilidad a  $\text{Na}^+$  al ser expresada en levadura.

Debido a que la inhibición del influjo de  $\text{Na}^+$  por el  $\text{Ca}^{2+}$  no es completa, deben existir otros procesos de entrada de  $\text{Na}^+$  independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , como los transportadores de  $\text{K}^+$  de la familia HKT (*High affinity  $\text{K}^+$  transporter*) (**Figura 5**) 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) (Horie *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2012).

Algunos transportadores de alta afinidad de  $\text{K}^+$  de la familia KUP/HAK/KT (**Figura 5**) parecen tener también capacidad de mediar el transporte de  $\text{Na}^+$  de baja afinidad a concentraciones elevadas de  $\text{Na}^+$  (Santa-Maria *et al.*, 1997). Los transportadores de alta afinidad AtHAK5 y AtKUP1 tienen una alta capacidad de discriminar entre  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , aunque disminuyen su actividad de captación de  $\text{K}^+$  en presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (Fu y Luan, 1998; Rubio *et al.*, 2000; Martínez-Cordero *et al.*, 2004; Martínez-Cordero *et al.*, 2005). A este respecto, en plantas glicófitas como *Arabidopsis* y tomate, se ha descrito que AtHAK5 y LeHAK5 aumentan su expresión cuando existen bajas concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+$  (Nieves-Cordones *et al.*, 2008; Nieves-Cordones *et al.*, 2010), siendo LeHAK5 el principal responsable de la captura de  $\text{K}^+$  en presencia de concentraciones de  $\text{K}^+$  inferiores a 0,01mM (Rubio *et al.*, 2010). Se ha comprobado que estos mismos transportadores disminuyen su expresión en presencia de altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (Rubio *et al.*, 2000; Nieves-Cordones *et al.*, 2008; Nieves-Cordones *et al.*, 2010). En halófitas, como *T. halophila*, la disminución de la expresión de HAK en presencia de  $\text{Na}^+$  es menos acusada (Alemán *et al.*, 2009), mientras que en *Mesembryanthemum crystallinum* el  $\text{Na}^+$  produce un aumento de la expresión de las proteínas McHAK1 y McHAK2 (Su *et al.*, 2002). También se ha observado que los niveles de transcritos de KUP2 disminuyen en la parte aérea de plantas tratadas con NaCl (Maathuis, 2006).

Se ha descrito que algunos canales de tipo *Shaker* (Bertl *et al.*, 1997), como el canal de tipo KIR ( *$\text{K}^+$  Inward-Rectifying channel*), AtAKT1, que son la causa de la disminución

de la absorción de  $K^+$  inducido por elevadas concentraciones de  $Na^+$  (Qi y Spalding, 2004; Nieves-Cordones *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2010), debido a que la despolarización de la membrana causada por las altas concentraciones externas de  $Na^+$  hace el transporte pasivo de  $K^+$  termodinámicamente imposible (Shabala *et al.*, 2005).



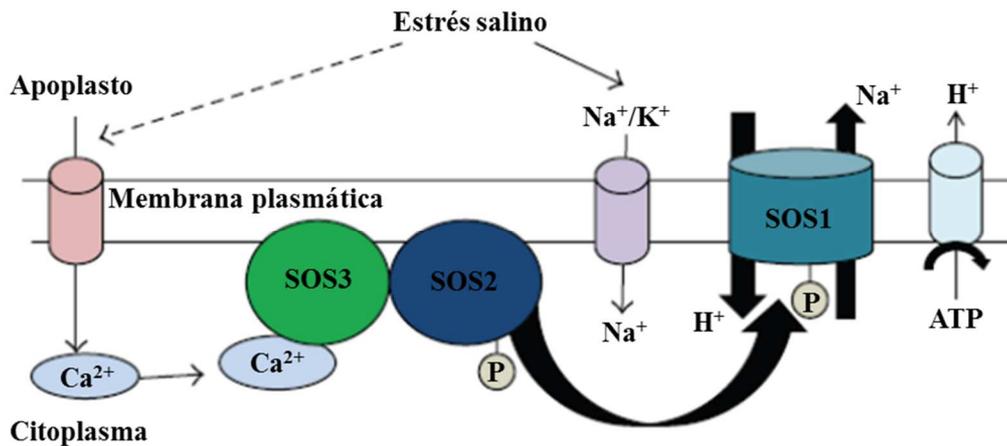
**Figura 5. Proteínas de transporte implicadas en la absorción, flujo y distribución de  $Na^+$  y  $K^+$  a lo largo de la planta y su compartimentación a nivel celular.** Las células de la raíz absorben  $Na^+$  y  $K^+$  desde el suelo a través de diferentes canales, transportadores y del apoplasto, y los distribuyen a lo largo de la planta. NSCC, canal no selectivo de cationes; AKT1, canal de entrada de  $K^+$ ; KUP/HAK/KT, transportadores de  $K^+$  de alta afinidad; HKT, transportador de  $K^+$  de alta afinidad; NHX, intercambiador vacuolar de  $Na^+$  :  $H^+$ ; CHX, intercambiador de catión :  $H^+$ ; SOS1, antiporte de membrana plasmática de  $Na^+$ : $H^+$ . (Modificado de Su *et al.*, 2015).

#### 4.2. Salida de $Na^+$ y transporte a la parte aérea

El exceso de  $Na^+$  que llega al citoplasma de las células se elimina por extrusión o por compartimentación vacuolar. En células maduras, ambos mecanismos se coordinan para que la entrada de  $Na^+$  no supere la capacidad de almacenamiento. Las células meristemáticas carecen de sistema vacuolar desarrollado, por lo que en ellas el mecanismo más eficiente de exclusión del  $Na^+$  es la extrusión. La expulsión del  $Na^+$  desde una célula podría ser perjudicial para las células de su alrededor, debiendo distribuirse

este catión por la planta a través del xilema y el floema de una forma coordinada para evitar sus efectos tóxicos (Tester y Davenport, 2003).

En base a ensayos de transporte, su patrón de expresión y el fenotipo de los mutantes de pérdida de función, se ha implicado al antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  *SOS1* en la expulsión y transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia (Wu *et al.*, 1996; Liu y Zhu, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2004). Este gen fue identificado por análisis de mutantes de *Arabidopsis* hipersensibles a estrés salino (*Salt Overly Sensitive, SOS*) y forma parte de una importante ruta reguladora de la homeostasis para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  bajo condiciones salinas (Zhu, 2002; Mahajan *et al.*, 2008). Esta ruta está constituida por un conjunto de proteínas entre las que se encuentra *SOS1*, un antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizado en la membrana plasmática (Shi *et al.*, 2000); *SOS2* del tipo CIPK que es una protein-quinasa 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 4*) (Ishitani *et al.*, 2000), de forma que la activación específica de esta ruta por sal conduce al control del eflujo y transporte de  $\text{Na}^+$  (Quintero *et al.*, 2002; Zhu, 2002). 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 protein-quinasa 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) (**Figura 6**). *SOS1* se expresa en muchos tejidos pero particularmente en la epidermis de la raíz y en las células del parénquima del xilema en raíces y tallos, y sus niveles de transcripción son elevados después de varias horas o días de aplicación del estrés salino. En el ápice de la raíz juega un papel crucial en la extrusión de  $\text{Na}^+$  para evitar su sobreacumulación, ya que las células epidérmicas están indiferenciadas y carecen de un sistema vacuolar desarrollado que les permita compartimentar el exceso de este catión, estando también implicado en la carga de  $\text{Na}^+$  en la savia del xilema durante un estrés salino moderado (Shi *et al.*, 2002) (**Figura 5**). Además de participar en la extrusión de  $\text{Na}^+$  al medio externo, los genes de la ruta SOS juegan un papel esencial en la regulación de la homeostasis del  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  y el desarrollo de la planta.



**Figura 6. Representación esquemática del funcionamiento de la ruta SOS.** Una alta concentración de sal externa dispara una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol que activa a SOS3, que interacciona específicamente con SOS2. Este complejo SOS2/SOS3 fosforila a SOS1 activando el eflujo de  $\text{Na}^+$  a través del plasmalema. La activación por fosforilación de SOS1 requiere el anclaje a la membrana plasmática del complejo SOS2/SOS3, a través de la miristoilación del extremo N-terminal de SOS3 (Zhu, 2002).

Por otra parte, la expresión de *SOS1* en las células del parénquima que bordean al xilema sugeriría su implicación en el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia. El mutante *sos1* acumula más  $\text{Na}^+$  que la línea silvestre a altas concentraciones de sal (100 mM NaCl), mostrando un mayor contenido de este catión en la savia del xilema (Shi *et al.*, 2002). Sin embargo, sometido a estrés salino moderado (25 mM NaCl), el mutante acumula menos  $\text{Na}^+$  (Ding y Zhu, 1997). A raíz de estos resultados aparentemente contradictorios se sugirió que *SOS1* actuaría cargando el  $\text{Na}^+$  en el xilema para su almacenaje en células del mesófilo ante estrés moderado. Posteriormente, la caracterización de HKT1;1 como transportador de  $\text{Na}^+$  implicado en la descarga de este catión a las células parenquimáticas del xilema (Rus *et al.*, 2001; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007), llevó al establecimiento de un modelo más completo en el que las proteínas SOS1 y HKT1;1 coordinarían sus flujos opuestos de carga y descarga de  $\text{Na}^+$  en el xilema para conseguir la homeostasis de este catión en la planta (Pardo *et al.*, 2006) (**Figura 5**). *AtHKT1;1*, único miembro de esta familia en *Arabidopsis* (Uozumi *et al.*, 2000; Mäser *et al.*, 2001), se expresa en las células parenquimáticas que cargan el xilema de raíces y hojas (Sunarpi *et al.*, 2005), y es un importante determinante de tolerancia a la sal en *Arabidopsis* al participar en la redistribución de  $\text{Na}^+$  en raíz/parte aérea, reduciendo su acumulación en hojas (Mäser *et al.*, 2002). El fenotipo de las líneas mutantes de *AtHKT1;1* (*athkt1*) se caracteriza por una alta sensibilidad a la sal asociada a una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea y una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en raíces (Rus *et al.*, 2004; Sunarpi *et al.*, 2005). Aunque la mutación en *AtHKT1;1* fue capaz

de rescatar el fenotipo sensible a la sal de plantas mutantes *sos* (Rus *et al.*, 2001; Rus *et al.*, 2004), este transportador no participa en la absorción de  $\text{Na}^+$  por las raíces, ya que el influjo unidireccional del catión no se afectó en los mutantes *athkt1* (Essah *et al.*, 2003; Davenport *et al.*, 2007). La función más aceptada de *AtHKT1;1* es la del control de la velocidad de transporte de  $\text{Na}^+$  de las raíces a la parte aérea, retirando o reabsorbiendo el ión desde los vasos xilemáticos a las células parenquimáticas del xilema de hojas y raíces (Sunarpi *et al.*, 2005; Davenport *et al.*, 2007), aunque también se ha sugerido su participación en procesos de recirculación de  $\text{Na}^+$  vía floemática (Berthomieu *et al.*, 2003). Si bien su sobreexpresión constitutiva tanto en arroz como en *Arabidopsis* produce plantas hipersensibles a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  y déficit en  $\text{K}^+$ , su sobreexpresión en tipos celulares específicos de la raíz como la estela o el periciclo mejoró la halotolerancia mediante la disminución del contenido en  $\text{Na}^+$  de la parte aérea y el aumento de  $\text{K}^+$  (Rus *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2009; Craig Plett y Møller, 2010; Xue *et al.*, 2011).

En tomate, líneas silenciadas de *SOS1* revelaron que este transportador participaba en el mecanismo de tolerancia a la salinidad, no solo evitando la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  por las raíces a través de su actividad extractora de  $\text{Na}^+$  al medio, sino también jugando un papel esencial en la distribución de  $\text{Na}^+$  en los órganos vegetales y en la capacidad de las plantas de tomate de retener  $\text{Na}^+$  en tejidos como el tallo, previniendo así que el  $\text{Na}^+$  alcance los tejidos en desarrollo (Oliás *et al.*, 2009). A este respecto, se ha propuesto que la función de transporte de *SOS1* en tomate debe de estar estrechamente coordinada con la de *HKT1* para el control de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Oliás *et al.*, 2009), como se había sugerido previamente en *Arabidopsis* (Pardo *et al.*, 2006). Así, *SISOS1* podría mediar la transferencia del  $\text{Na}^+$  desde el parénquima xilemático al xilema, preferencialmente en las raíces, mientras que otro transportador, *SIHKT1*, podría mediar el flujo inverso (por ejemplo, la descarga de  $\text{Na}^+$  del xilema en las partes proximales del tallo). La acción coordinada de ambos determinaría en último término la cantidad de  $\text{Na}^+$  que se almacena en las raíces, la que se retiene en el tallo o la que se transfiere a las hojas. También *SISOS1* podría contribuir en la exclusión de  $\text{Na}^+$  desde el citosol de las hojas jóvenes hacia el apoplasto, evitando la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  en células con un sistema vacuolar escasamente desarrollado. Mientras que *SIHKT1* podría actuar predominantemente en hojas expandidas o maduras, cuyas células presentan un sistema vacuolar bien desarrollado, que puede acumular  $\text{Na}^+$  retirado por *HKT1* del xilema o del

apoplasto. Recientemente se han identificado en tomate dos isoformas del gen *HKT1*, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*, y su función se ha relacionado con el transporte a larga distancia de  $\text{Na}^+$ . Concretamente el papel sugerido para la isoforma *SIHKT1;2* ha sido un papel similar al que se atribuye para *AtHKT1;1* (Asins *et al.*, 2013), eso significa que su función puede ser la de descargar  $\text{Na}^+$  desde el xilema a las células induciendo su acumulación en las vacuolas (Møller *et al.*, 2009; Craig Plett y Møller, 2010). En cuanto al papel de la isoforma *SIHKT1;1*, se ha sugerido que juega un papel importante en la recuperación de  $\text{Na}^+$  de xilema promoviendo su entrada en el floema y recirculándolo a la raíz (Berthomieu *et al.*, 2003; Asins *et al.*, 2015), aunque su función apenas es conocida hasta la fecha.

Otra proteína implicada en el transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia es el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  CHX21 (Hall *et al.*, 2006). Localizado en la membrana plasmática de células de la endodermis de la raíz, parece contribuir también, al igual que SOS1, a la carga de  $\text{Na}^+$  en el xilema (**Figura 5**), mostrando un menor contenido de este catión en xilema y parte aérea el mutante *chx21*. Según Evans *et al.* (2012) su homólogo *CHX23* también está involucrado en la homeostasis del  $\text{K}^+$ .

#### 4.3. Compartimentación vacuolar de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

Durante el estrés salino,  $\text{Na}^+$  puede acumularse fácilmente llegando a niveles tóxicos en el citosol de la célula. 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  $\text{Na}^+$ . Tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes existe una clara correlación entre compartimentación iónica vacuolar y tolerancia a la salinidad (Blumwald *et al.*, 2000). Ello reporta dos ventajas: la recuperación de la turgencia por el ajuste osmótico con sales (como osmótico barato) y la evitación de la toxicidad iónica en el citoplasma (Hasegawa, 2013; Maathuis, 2014). Esta capacidad está ligada directamente a la velocidad de crecimiento, más limitado en las raíces que en las hojas, de ahí, que una buena parte del  $\text{Na}^+$  sea dirigido a la parte aérea, vía xilema (transporte de  $\text{Na}^+$  a larga distancia) (Yeo, 2007). La inclusión de  $\text{Na}^+$  en la vacuola, constituye, por tanto, otro de los mecanismos importantes del mantenimiento de la alta relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  citosólica. Dicho proceso se lleva a cabo por la acción de sistemas antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que están acoplados a un gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  generado por la acción de la V-ATPasa y

V-PPasa de tonoplasto (Ballesteros *et al.*, 1997; Blumwald *et al.*, 2000; Gaxiola *et al.*, 2001; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009).

La familia de transportadores NHX, se identificó desde el principio como proteínas antiporter intercambiadoras de  $H^+$  por  $Na^+$  en el tonoplasto de la vacuola, siendo un elemento clave en esta estrategia (Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). Se ha sugerido que los principales antiportadores implicados en la acumulación de  $Na^+$  en vacuolas son las proteínas de la familia NHX (**Figura 5**). Sin embargo, se ha demostrado también que algunos transportadores NHX están claramente implicados en la regulación del pH vacuolar (Fukada-Tanaka *et al.*, 2000) y que en condiciones de crecimiento normal, con bajo contenido de  $Na^+$ , los transportadores NHX intercambian principalmente  $K^+$  por  $H^+$  en lugar de  $Na^+$  por  $H^+$  (Barragán *et al.*, 2012). Esta doble selectividad significa que la función exacta del NHX durante el estrés salino es a veces difícil de discernir debido a la dependencia que estas proteínas tienen de los niveles de  $Na^+$  y  $K^+$  en el citoplasma y de la actividad de los estomas (Barragán *et al.*, 2012), que puede afectar indirectamente la translocación de  $Na^+$  y  $K^+$ . Un ejemplo de esto lo constituye la tolerancia a la salinidad observada en el trigo como consecuencia de un aumento en la expresión de *NHX1*. En este caso, la tolerancia se debió a un incremento en los niveles de  $K^+$  en la parte aérea causado, indirectamente, por el aumento de la acumulación de  $Na^+$  en las vacuolas de raíz (Xue *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado que el incremento en la tolerancia a la salinidad de plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan el antiportador vacuolar de *Arabidopsis AtNHX1*, está fundamentalmente asociado al control de la homeostasis de  $K^+$  (Leidi *et al.*, 2010).

En plantas se han descrito varias isoformas de transportadores NHX. En *Arabidopsis* se han descrito 6 miembros, *AtNHX1* a *AtNHX6*, y en tomate, se identificaron 4 miembros, denominados *LeNHX1*, *LeNHX2*, *LeNHX3* y *LeNHX4* (Venema *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2012). *LeNHX2* ha resultado ser el primer antiportador  $K^+/H^+$  descrito en plantas (Venema *et al.*, 2003; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008). El análisis de expresión de los genes *LeNHX* en tomate mostró que la isoforma *LeNHX2* se expresaba de forma similar en raíces, tallos, hojas, flor y fruto de plantas de tomate; mientras que *LeNHX3* mostraba una expresión diferencial en tejidos vegetativos y *LeNHX4* se expresaba sobre todo en flor y fruto (Gálvez *et al.*, 2012). El efecto del estrés salino sobre los niveles de expresión de los genes *LeNHXs* ha sido estudiado en la especie silvestre tolerante a la

salinidad *S. pimpinelifolium* y en la especie cultivada, observándose que mientras que los niveles de expresión eran similares en ambas especies en ausencia de estrés, los tratamientos salinos inducían un incremento en la expresión de las isoformas *LeNHX3* y *LeNHX4*, especialmente en la especie tolerantes. Este incremento en la expresión de *LeNHX3* y *4* es consistente con el mayor contenido de  $\text{Na}^+$  en plantas de la especie tolerante respecto de la sensible cuando ambas se cultivan en condiciones salinas, lo que indica que los transportadores *NHX* son importantes determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate (Gálvez *et al.*, 2012).

### 5. Papel del $\text{Ca}^{2+}$ en el desarrollo y tolerancia a estrés

El  $\text{Ca}^{2+}$ , se absorbe por la raíz y se transporta fundamentalmente vía apoplasto (extracelular) hasta el xilema por donde llega a la parte aérea en función de la tasa de transpiración de la planta y de la velocidad de acumulación del mismo en las vacuolas de los tejidos aéreos (McAinsh y Pittman, 2009). Precisamente, es en las células de tallo y hoja superiores adultas donde el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en mayor cantidad dentro de las vacuolas, siendo estos depósitos los que la planta moviliza en función de sus necesidades fisiológicas o en situaciones de déficit de  $\text{Ca}^{2+}$ . En raíz y hojas basales, por el contrario, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  suele ser bastante menor, y además la mayoría se encuentra formando parte de la pared celular, y no es intercambiable, lo que confiere al  $\text{Ca}^{2+}$  una baja movilidad en planta (Conn y Gilliam, 2010). Por esta razón, los síntomas se manifiestan principalmente en los tejidos en crecimiento donde los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  son mayores (hojas en crecimiento, flores, frutos y meristemos apicales).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para el crecimiento, la densidad y longitud de los pelos radiculares los cuales son necesarios para la absorción de nutrientes (Jaunin y Hofer, 1988). Según Marschner (2011), el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel muy importante en la estabilización de la membrana celular, manteniendo la permeabilidad selectiva y la integridad. Las sales de  $\text{Ca}^{2+}$  actúan como agentes reafirmantes, debido a que los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  actúan sobre las cadenas de pectina para formar puentes entre éstas, aumentando la fuerza de la pared celular tanto en tomates como en otras frutas y hortalizas (Contreras-Angulo *et al.*, 2011). El  $\text{Ca}^{2+}$  es un importante componente de la pared celular y ayuda a mantener la firmeza de la fruta (Pérez y Quintero, 2015). Un síntoma clásico de deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en frutos de tomate es la podredumbre apical (BER, por sus siglas en inglés, de *Blossom End-Rot*) (Berthomieu *et al.*, 2003; White y Broadley, 2003). Otros

síntomas manifiestos son retraso en el crecimiento de la planta, tejidos necróticos y clorosis foliar marginal, poca biomasa reproductiva y también puede ocurrir la muerte de la yema terminal (Kennelly *et al.*, 2012; Robertson, 2013). La deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  también modifica el proceso de fotosíntesis, disminuyendo la eficiencia de la carboxilación, y, por tanto, la capacidad fotosintética global, lo que provoca reducciones en la producción de biomasa en las plantas afectadas (Atkinson *et al.*, 1989). El  $\text{Ca}^{2+}$  también desarrolla una función importante en la apertura y cierre de los estomas, no como un osmolito en las células guarda, pero sí en funciones de regulación de la apertura del estoma (Conn y Gilliam, 2010; Conn *et al.*, 2011; Gilliam *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  reduce estos síntomas, ya que se refuerza el crecimiento de plantas mediante el aumento de longitud de la raíz y les ayuda a resistir o recuperarse del estrés (Wu *et al.*, 2012). Suplementos con  $\text{Ca}^{2+}$  también se utiliza para mejorar la fruta y puede ayudar a retrasar la senescencia inducida por etileno (Aghdam *et al.*, 2012). También el  $\text{Ca}^{2+}$  se ha usado como enmienda cálcica para reducir los efectos negativos de la salinidad en las plantas, es decir, la aplicación al suelo de grandes cantidades de sulfato de  $\text{Ca}^{2+}$  con el fin de reemplazar los iones sodio del suelo por iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Munns, 2005).

El  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en el interior de la célula almacenado en orgánulos en su mayor parte o bien en el exterior de la célula (el apoplasto), mientras que en el citoplasma se encuentra en mínimas y rigurosamente mantenidas concentraciones (alrededor de 100-200 nM en condiciones de reposo) (Robertson, 2013). Su alto grado de compartimentación es una necesidad para evitar su precipitación en el citoplasma con el fosfato inorgánico (White y Broadley, 2003), y la competencia por los sitios de unión con el  $\text{Mg}^{2+}$  citosólico (Marschner, 1995). La gran diferencia de concentraciones entre el citoplasma, por una parte, y el apoplasto y los compartimentos intracelulares, por la otra, probablemente son la razón del uso de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  como vínculo entre los estímulos extracelulares y las respuestas intracelulares (Maathuis, 2004). Por esto, el estudio de los canales iónicos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , los componentes primarios que permiten la entrada y la elevación del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, es una de las principales tareas para el entendimiento del funcionamiento de la maquinaria llamada “señalización por calcio” (Robertson, 2013).

### **5.1. Absorción y acumulación de Ca<sup>2+</sup>**

El Ca<sup>2+</sup> penetra por el extremo de las raíces y se mueve por dos vías hacia los vasos del xilema, una vía simplástica o de célula a célula y una vía apoplástica (White *et al.*, 2002; Cholewa y Peterson, 2004). Por la vía apoplástica ocurre principalmente el movimiento de Ca<sup>2+</sup>, siguiendo el flujo de agua causado por la transpiración (Epstein y Bloom, 2005; Song *et al.*, 2008), ya que el apoplasto muestra muy poca resistencia eléctrica y permite el libre intercambio de la mayoría de los iones Ca<sup>2+</sup> (Robertson, 2013). La Banda de Caspary de la endodermis, que contiene suberina, restringe el paso de solutos a través del apoplasto, y promueve el paso por la vía simplástica. Hay aún un gran desconocimiento sobre el transporte de Ca<sup>2+</sup> vía simplasto, aunque recientemente se identificó un canal de resistencia al cadmio que facilita el movimiento radial de Ca<sup>2+</sup> en las raíces (Song *et al.*, 2011). Se considera que en esta ruta los iones de Ca<sup>2+</sup> entran al simplasto a través de canales permeables al Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática, siendo bombeados después a los tejidos de conducción por las Ca<sup>2+</sup>-ATPasas y los intercambiadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (White y Broadley, 2003), siendo estos los transportadores de Ca<sup>2+</sup> más importantes de las células vegetales, pero deben regularse cuidadosamente para evitar interferir con las vías de señalización. Según White *et al.* (2002), el transporte por la vía apoplástica puede ser suficiente para satisfacer la demanda de Ca<sup>2+</sup> en la parte aérea.

Dentro de la hoja, no todas las células tienen los mismos niveles de Ca<sup>2+</sup>. En los pastos, el Ca<sup>2+</sup> se encuentra principalmente en la epidermis superior (Conn y Gilliam, 2010). En las dicotiledóneas, los niveles de Ca<sup>2+</sup> son bajos en ambas epidermis de las hojas, superior e inferior, pero son más altos en el mesófilo, una distribución que facilita el control de Ca<sup>2+</sup> sobre la abertura de los estomas (Conn y Gilliam, 2010; Conn *et al.*, 2011). El Ca<sup>2+</sup> se encuentran principalmente en el apoplasto, vacuola, y retículo endoplásmico (RE) y en menor medida en las mitocondrias, cloroplastos, y el núcleo (Stael *et al.*, 2011). No obstante, son escasos los estudios sobre las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> libre presentes en estos compartimentos (Dietz *et al.*, 1992; Fricke *et al.*, 1995; Karley *et al.*, 2000).

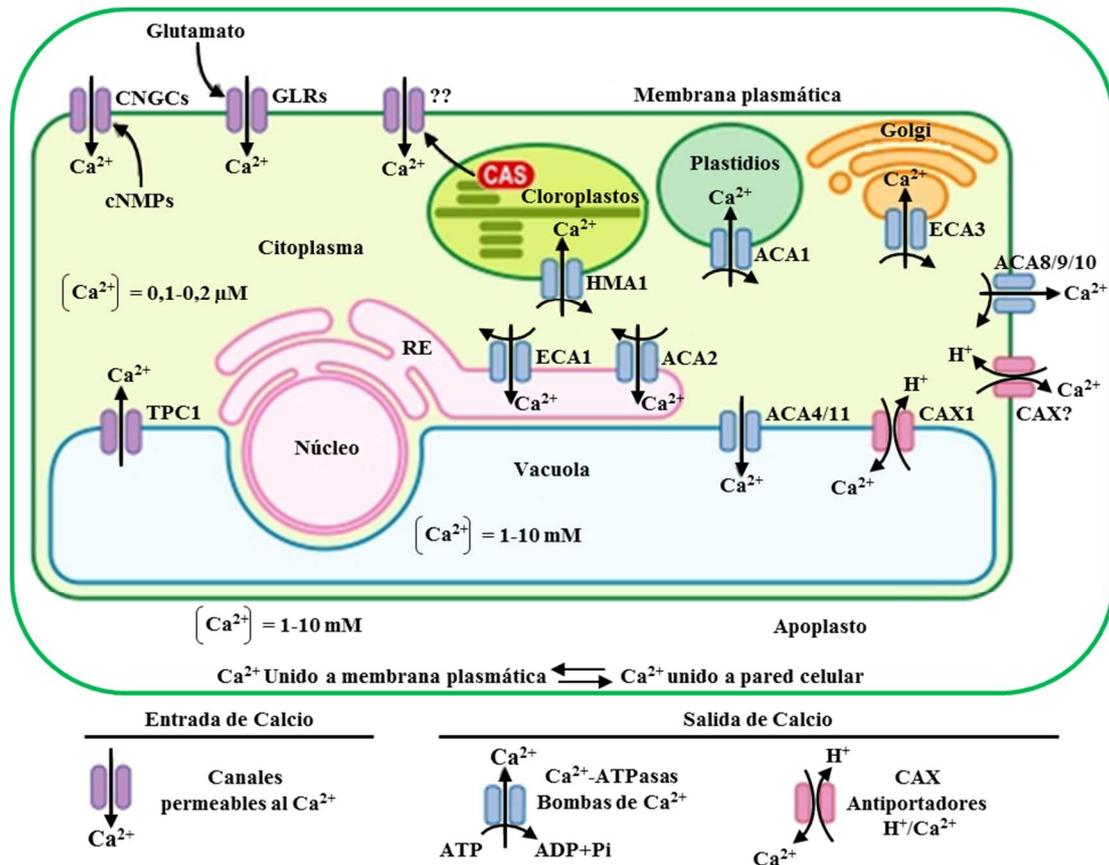
En las células vegetales la vacuola central es el mayor depósito (más del 80% del volumen de la célula) de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Sin embargo, hay pocas evidencias directas de que la vacuola sea una fuente de Ca<sup>2+</sup> para realizar la señalización (Hedrich y Marten, 2011; Peiter, 2011; Stael *et al.*, 2011). Se considera, que la mayor parte del Ca<sup>2+</sup> vacuolar

se encuentra ligado por aniones orgánicos (oxalato, citrato, isocitrato, malato) formando, en muchos casos, complejos de baja solubilidad precipitados en forma de cristales (principalmente en forma de oxalato de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Stael *et al.*, 2011). Las funciones primarias de estos complejos son la regulación de alta capacidad del  $\text{Ca}^{2+}$  vacuolar (tanto almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la precipitación de sus excedentes en una forma osmótica y fisiológicamente inerte), la defensa contra herbívoros, así como la detoxificación de  $\text{Al}^{3+}$  y metales pesados (Franceschi y Nakata, 2005). En las plantas conocidas como “precipitadoras de oxalato” (White y Broadley, 2003), en los tejidos en crecimiento se encuentran células especializadas (idioblastos) que precipitan en sus vacuolas el  $\text{Ca}^{2+}$  del apoplasto en forma de oxalato, impidiendo así que éste interfiera sobre el crecimiento de las células inmaduras, las cuales tienen una capacidad reducida para secuestrar el  $\text{Ca}^{2+}$  debido a su pobre vacuolación (Franceschi y Nakata, 2005). Los idioblastos poseen una densa red de retículo endoplasmático (RE), cuya principal actividad parece ser el rápido secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  entrante al citoplasma y su transporte a la vacuola central para su precipitación (Kostman *et al.*, 2003; Franceschi y Nakata, 2005). Estos datos pueden revelar las funciones en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  de los dos mayores depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  celulares: el RE (como secuestrador de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y la vacuola central (como su almacén).

El RE es el segundo depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  más importante en las células vegetales, después de la vacuola. Los meristemos, de importancia crítica para el crecimiento vegetal y la reproducción de las plantas, requieren altas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la deposición en las nuevas paredes celulares y la biogénesis de orgánulos, pero no está claro cómo se mueve el  $\text{Ca}^{2+}$  desde las áreas con altas tasas de transpiración (hojas) a las regiones protegidas de los meristemos. Se ha sugerido un mecanismo alternativo para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a los meristemos a través del RE (Heinlein, 2002; Bayer *et al.*, 2004). En otros orgánulos, como mitocondrias, cloroplastos y núcleo, la concentración libre de  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo determinada es menor que la estimada para la vacuola y RE, aunque presenta elevaciones en respuesta a diversos estímulos (Logan y Knight, 2003).

En general, los sistemas intracelulares de aislamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  realizan cuatro importantes tareas, necesarias para el funcionamiento normal de las células vivas (Sanders *et al.*, 2002): (1) Mantienen el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico al nivel de reposo y ayudan de esta forma a la extinción de señales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (2) acumulan el  $\text{Ca}^{2+}$  en compartimentos tales como el RE y la vacuola para liberarlo de forma regulada durante el proceso de

señalización; (3) suplementan  $\text{Ca}^{2+}$  a orgánulos específicos que requieren un alto nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  para el curso normal de sus reacciones bioquímicas, estas condiciones son necesarias para el procesamiento adecuado de las proteínas que van a ser secretadas desde el RE (Rudolph *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1996); y (4) aíslan el  $\text{Ca}^{2+}$ , evitando así su precipitación con el fosfato inorgánico (Pi) en complejos de baja solubilidad (Sanders *et al.*, 1999).



**Figura 7. Sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de *Arabidopsis thaliana*.** Las vías de flujo del catión  $\text{Ca}^{2+}$  que han sido identificadas a nivel molecular son: Canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGCs), Receptores de Glutamato (GLRs), Canales de dos poros 1 (TPC1), Receptor sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAS), ATPasa autoinhibida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Florida Bacallao y Bao Fundora), ATPasa de calcio tipo RE (ECA), ATPasa de metales pesados 1 (HMA1), y el intercambiador catiónico  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (CAX). (Modificado de Kudla *et al.*, 2010).

Aunque los almacenes internos de  $\text{Ca}^{2+}$  y el medio extracelular contienen concentraciones milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración nanomolar de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol se mantiene por la actividad de bombas, transportadores y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en la membrana plasmática y en las membranas de los orgánulos celulares (Gilroy *et al.*, 1993; Yang y Poovaiah, 2003). El  $\text{Ca}^{2+}$  entra en el citoplasma mediante canales iónicos (GLRs, CNGCs, anexas y TPC) permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, y dado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico es citotóxica, el nivel nanomolar del mismo en células en reposo se mantiene por la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas

o bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (ACA y ECA) y antiportadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (CAX, CCX y CHX); estas enzimas transportan el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico ya sea al apoplasto (espacio extracelular) o al lumen de orgánulos intracelulares (como la vacuola o el retículo endoplásmico) (White y Broadley, 2003) (**Figura 7**). Para el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en dirección opuesta a su gradiente, los CAX utilizan el gradiente de pH a través de la membrana, generado y mantenido por la actividad de la pirofosfatasa (PPiase) y las bombas de protones ( $\text{H}^+$ -ATPasas), mientras que las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas para este fin utilizan la energía del ATP. Dos  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas vacuolares, *ACA4* y *ACA11*, se ha demostrado experimentalmente que son importantes para eliminar el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma (Boursiac *et al.*, 2010).

## 5.2. Interacción CBLs - CIPKs

La entrada rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales catiónicos en la membrana plasmática, tonoplasto y/o retículo endoplasmático genera perturbaciones en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma, iniciándose las cascadas de señalización. Los aumentos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  son percibidos por proteínas efectoras reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  (CaBPs: *Calcium-binding proteins*), de las que existen tres tipos principales: calmodulinas (CaMs), proteínas tipo calcineurina B (CBLs; del inglés *Calcineurin B-Like protein*) y proteína quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs: del inglés *Calcium-Dependent Protein Kinases*) (White y Broadley, 2003; Cheong *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011). Las CaBPs, que funcionan como sensores de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , han evolucionado para mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a nivel basal y para acoplar estos cambios a una amplia variedad de respuestas fisiológicas. Estas proteínas se encuentran saturadas con  $\text{Ca}^{2+}$  durante el estado activo de la célula. Aunque son funcionalmente diversas, la mayoría de las CaBPs unen  $\text{Ca}^{2+}$  a estructuras plegadas como: las anexinas, el motivo EF-hand y el dominio C2 (Julenius *et al.*, 2002; Gerke *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2006; Laohavisit *et al.*, 2012).

Las CBLs (*Calcineurin B-Like protein*) muestran similitud con la subunidad reguladora B de la calcineurina y con los sensores neuronales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Liu y Zhu, 1998; Kudla *et al.*, 1999). Estas proteínas se caracterizan por la presencia de 4 módulos formados por un dominio hélice-bucle-hélice de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  llamado “EF-hand” (Guo *et al.*, 2001; Luan *et al.*, 2002). Tras el descubrimiento inicial de *Arabidopsis*, muchas CBLs fueron identificados a partir de diversas especies de plantas como el arroz, maíz, guisante, *pópulos* y tomate (Kolukisaoglu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014). Por lo tanto, se cree que las proteínas CBLs están presentes

en todo el reino vegetal. En el genoma de *Arabidopsis* existen 10 proteínas CBL distintas, que actúan como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de 25 kinasas con las que interactúan (llamadas CIPKs, del inglés *CBL-Interacting Protein Kinases*) (Guo *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2002; Hrabak *et al.*, 2003). Amplios estudios con mutantes de *Arabidopsis* han demostrado que los complejos CBL-CIPK están involucrados en la mediación de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  provocadas por diversos estímulos tales como frío, ABA, salinidad, estrés osmótico, baja concentración de  $\text{K}^+$  y pH alto (Kim, 2013). Por lo tanto, diferentes combinaciones del complejo CBL-CIPK pueden generar temporal y espacialmente diferentes señales específicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Guo *et al.*, 2001), aunque también se ha sugerido que una proteína CBL puede interactuar directamente con una proteína diana, de una manera independiente a CIPK, regulando negativamente su actividad (Ren *et al.*, 2013). Además de la activación de la actividad quinasa CIPK, las proteínas CBLs también determinan la localización de los complejos CBL-CIPK en las células (membrana plasmática, núcleo, membrana vacuolar, retículo endoplasmático, citoplasma, etc.) y por lo tanto contribuyen a la generación de especificidad espacial en reconocimiento del objetivo (D'Angelo *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007; Batistič *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014). En condiciones normales, las CIPKs se encuentran autoinhibidas mediante la interacción del dominio aminoterminal catalítico con el carboxiterminal regulador. Las CBLs activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  se unen al dominio FISL de las CIPKs, situado entre los dominios catalítico y regulador, liberando a la kinasa de su autoinhibición y permitiéndole activar a proteínas diana por fosforilación (Albrecht *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001).

La sobreexpresión de diferentes *CBLs* o *CIPKs* ha dado lugar a una mayor tolerancia a la sal en diferentes variedades de especies de plantas, mediante el aumento de la tasa de germinación, aumentó de la supervivencia de las plántulas y producción de biomasa, aunque los mecanismos de tolerancia aún se desconocen o no se entienden con exactitud (Xiang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2009; Cheong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013). El primer módulo funcional CBL-CIPK implicado en la mediación de la señal del estrés por sal inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y que da lugar a un aumento de la tolerancia a la salinidad fue identificado con mutantes SOS de *Arabidopsis*. Este módulo funcional está formado por *CBL4* (*SOS3*) y *CIPK24* (*SOS2*), el cual fosforila y activa aguas abajo una proteína antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *SOS1*, cuya función es eliminar el exceso de  $\text{Na}^+$  de la célula vegetal, confiriendo así tolerancia a la salinidad (Quintero *et al.*, 2002) (**Figura 6 y 8**).

Recientemente, se ha planteado la posibilidad de que sea CBL10, un homólogo a SOS3 (*CBL4*) el encargado de activar SOS1 en la parte aérea de las plantas. *CBL10*, a diferencia de *SOS3*, específico de raíces, se expresa predominantemente en la parte aérea y parece estar también implicado en la tolerancia a la sal regulando la acumulación de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea, a través de la formación del complejo CBL10-SOS2 (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007). Los módulos funcionales formados por CBL1-CIPK1 y CBL9-CIPK1, también se ha visto que participan en la respuesta al estrés osmótico que se produce en condiciones de salinidad y sequía, sin embargo mientras que el módulo funcional CBL9-CIPK1 es dependiente de ABA, es decir está implicado en la señalización de estrés por ABA, CBL1-CIPK1 actúa de forma independiente al ABA. CBL1 también puede formar complejo funcional con CIPK24 (*SOS2*), CIPK25 y CIPK26 para regular la homeostasis de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en *P. euphratica* en respuesta al estrés salino. En estudios recientes, se ha sugerido que *AtCBL1* y *PeCBL1* (*P. euphratica*) pueden influir negativamente en el flujo de salida de  $\text{Na}^+$  de la célula en condiciones salinas, aunque estos mecanismos aún no están muy claros (Zhang *et al.*, 2013). Aunque los mecanismos aún no son bien conocidos, se ha demostrado que *AtCBL9*, *AtCIPK16*, *TaCIPK14*, *TaCIPK29* (*T. aestivum*) y *ZmCIPK21* (*Z. mays*) están implicados en el transporte de  $\text{Na}^+$ , metabolismo de ROS, homeostasis de  $\text{K}^+$ , ABA y sensibilidad a la sal de las plantas (Pandey *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014).

La actividad de los transportadores de  $\text{K}^+$ , y por tanto el flujo de  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática, tonoplasto, etc., también está regulada por proteínas del tipo CBL y CIPK (Li *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007; Nieves-Cordonos *et al.*, 2012). Al parecer, *AtCIPK23* interactúa con *AtCBL1* o *AtCBL9* siendo capaz de fosforilar *AKT1* resultando en la entrada de  $\text{K}^+$  dentro las células (Li *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Cheong *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). *AtCIPK6* y *AtCIPK16* son otras CIPKs que parecen estar involucrados en la regulación de *AKT1*, aunque su capacidad de interactuar con *AKT1* todavía no se ha investigado a fondo (Lee *et al.*, 2007) (**Figura 8**). *AKT1* se expresa sobre todo en los tejidos de la raíz, participando en la entrada de  $\text{K}^+$  por la raíz, aunque a bajos niveles también se han observado su expresión en las hojas, particularmente en las células guarda de los estomas e hidátodos (Lagarde *et al.*, 1996; Lacombe *et al.*, 2000; Szyroki *et al.*, 2001; Pilot *et al.*, 2003). *AtCIPK23*, *AtCBL1* y *AtCBL9* también se expresan en los tejidos aéreos, en las células guarda y en los tejidos vasculares (Cheong *et al.*, 2007) y, por tanto, puede estar implicados en la regulación de la actividad de *AKT1* en el tejido aéreo,



Uno de los últimos miembros de la familia CBL identificados ha sido *SCaBP8/CBL10*. *CBL10* fué inicialmente descubierta en *Arabidopsis* en el año 2007. Recientemente se ha descrito que *CBL10*, una proteína similar a *SOS3*, interactúa y regula positivamente a *SOS2* afectando la homeostasis iónica y la tolerancia a la sal (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007). Una de las dianas del complejo *CBL10-SOS2* podría ser *SOS1* en células de la parte aérea (Quan *et al.*, 2007), aunque también se ha propuesto un papel en la compartimentación intracelular de  $\text{Na}^+$  (Kim *et al.*, 2007), lo que demuestra que *CBL10* está involucrando en la regulación de la homeostasis de iones protegiendo la parte aérea del estrés salino. Según Kim *et al.* (2007), la proteína *CBL10* interaccionaría físicamente con *SOS2*, formando un complejo que se asociaría con los compartimentos vacuolares responsables del almacenamiento de sales y detoxificación de las células vegetales, como proceso esencial en el mecanismo de tolerancia predominante en los tejidos de la parte aérea. Se sabe que *SOS2* regula indirectamente otros transportadores implicados en la compartimentación vacuolar de iones en condiciones de estrés salino, como la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar, y los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , *NHX1*, y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , *CAX1* (Cheng *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2004; Batelli *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009), por lo que sugiere que *CBL10* podría regular directa o indirectamente (interactuando con *SOS2*) alguno de los canales o transportadores iónicos del tonoplasto y, por tanto, jugar un papel importante en la tolerancia a diferentes estreses abióticos (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2014) sugieren que la interacción *CBL10-SOS2* podría correlacionarse con el mayor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en semillas de mijo, mediante la activación de la proteína *CAX*. En otro caso, se ha descrito que *CBL10* interactúa con *AKT1*, regulándolo negativamente y, por tanto, reduciendo la actividad en la captación de  $\text{K}^+$  de dicho canal (Ren *et al.*, 2013). Se ha planteado la hipótesis de que la reducción de la actividad en el canal *AKT1* fuera como resultado de una disminución de la interacción entre *CIPK23* y *AKT1*. Por lo tanto *CBL10* podría inhibir *AKT1* por un mecanismo dual, disminuyendo la actividad del canal *AKT1* en la membrana plasmática e inhibiendo la interacción entre la quinasa y el canal (Ren *et al.*, 2013). Tras el descubrimiento inicial de *CBL10* en *Arabidopsis*, genes ortólogos se han identificado en tomate y *populus* (de la Torre *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014). Mientras que en *populus* la función atribuida estaba relacionada con la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  para proteger el ápice del estrés salino (Tang *et al.*, 2014), en tomate se ha demostrado que una de las funciones de *CBL10* es su participación en la respuesta a patógenos, jugando un papel clave en la vía de señalización de ROS (de la Torre *et al.*, 2013). Cualquiera que

sea el mecanismo, parece muy probable que también en tomate deba existir un homólogo funcional de CBL10 que, o bien por si solo o interactuando con SOS2, ayude a proteger la parte aérea en respuesta al estrés salino.

### 5.3. Antiportadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.

La extracción del Ca<sup>2+</sup> desde el citosol contra su gradiente electroquímico ya sea al apoplasto o a orgánulos intracelulares requiere energía, es decir, transporte activo. Éste se cataliza por Ca<sup>2+</sup>-ATPasas y antiportadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (Schönknecht, 2013) (**Figura 7**). La importancia relativa de las Ca<sup>2+</sup>-ATPasas y los antiportadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> está siendo ampliamente estudiada en la actualidad, debido a la importancia del Ca<sup>2+</sup> en las plantas. Las Ca<sup>2+</sup>-ATPasas son enzimas que realizan el transporte activo de Ca<sup>2+</sup>, es decir, necesitan consumir ATP para realizar el transporte de Ca<sup>2+</sup>. Tienen alta afinidad pero baja capacidad de transportar Ca<sup>2+</sup> (Bose *et al.*, 2011; Huda *et al.*, 2013) y están involucradas en todas las etapas del ciclo de vida de la planta, incluyendo el crecimiento, el desarrollo, la inmunología y las respuestas a cambios ambientales (George *et al.*, 2008; Nemchinov *et al.*, 2008; Boursiac *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010; Shabala *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; dit Frey *et al.*, 2012). Los antiportadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (CAXs) tienen una menor afinidad por el Ca<sup>2+</sup>, pero alta capacidad de transportarlo, por lo que podrían extraer gran cantidad de Ca<sup>2+</sup> del citosol durante la señalización por Ca<sup>2+</sup> y, por tanto, modular las perturbaciones del Ca<sup>2+</sup> citoplásmico (Bose *et al.*, 2011; Huda *et al.*, 2013).

Los transportadores CAX (del inglés CAtion eXchanger) son antiportadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> vacuolares que utilizan la fuerza protón-motriz generada por la H<sup>+</sup>-ATPasa para transportar Ca<sup>2+</sup> en contra de gradiente (Sanders *et al.*, 1999; Pottosin y Schönknecht, 2007; McAinsh y Pittman, 2009) (**Figura 7**). La actividad de los intercambiadores H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ha sido demostrada en vesículas de tonoplasto de diferentes especies, por lo que se estima su amplia distribución en el reino vegetal (Blumwald y Poole, 1986; Blackford *et al.*, 1990; Chanson, 1991; Hirschi *et al.*, 1996; Ueoka-Nakanishi *et al.*, 2000). En el genoma de *Arabidopsis* existen 12 posibles transportadores CAX (CAX1-11 y MHX), habiéndose aislado algunos de ellos por su capacidad para suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a Ca<sup>2+</sup> de un mutante de levadura *pmc1 vcx1 cnb1*, carente de los sistemas endógenos de transporte de Ca<sup>2+</sup> e incapaz de compartimentar este catión en la vacuola (Hirschi *et al.*, 1996; Mäser *et al.*, 2001). El primer antiportador H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> de plantas clonado y expresado funcionalmente fue *AtCAX1* (Hirschi *et al.*, 1996). *CAX1*

exhibe baja afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , pero elevada capacidad de transporte y está implicado en el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  en la vacuola (Cheng *et al.*, 2003). La kinasa SOS2 es capaz de activar a CAX1 (Qiu *et al.*, 2004), suprimiendo su fenotipo de hipersensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Plantas transgénicas del mutante *cax1* de *Arabidopsis* sobreexpresando CAX1 mostraron cierta halosensibilidad, sugiriendo un incremento descontrolado de la compartimentación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la vacuola debida a la desregulación de CAX1. Asimismo se propone que el aumento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea de estas plantas transgénicas es el resultado de la hiperactividad de CAX1, causando una mayor acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la vacuola. Si el  $\text{Ca}^{2+}$  es acumulado en las vacuolas en un ritmo más rápido de lo normal (como ocurre en la sobreexpresión de CAX1), no se pueden alcanzar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico necesarios para activar las vías de tolerancia a la salinidad, mostrando sensibilidad al estrés salino. Los mutantes que sobreexpresan CAX1 también mostraron anomalías en el desarrollo, reducción en la longitud de la raíz y retraso en la floración (Cheng *et al.*, 2003). Conn *et al.* (2011) encontraron que la capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  en las células del mesófilo se redujo en plantas que carecían de expresión de CAX1, resultando en un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  apoplástico, cambios en la fisiología de la hoja, reducción en la apertura estomática y menor tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ .

El tomate es especialmente sensible al BER causado por la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sorprendentemente, la sobreexpresión de CAX1 en tomate dio lugar a un 100% de BER en los frutos de tomate en desarrollo, lo que puede ser debido a la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el apoplasto, donde es probable que ayude a estabilizar la estructura de la membrana (De Freitas *et al.*, 2011). CAX2 es altamente afín y altamente específico en su capacidad antiportadora  $\text{H}^+$ /[catión de metal pesado]. CAX3 es un 77% idéntico a CAX1, pero aparentemente no transporta al  $\text{Ca}^{2+}$  tan eficientemente como CAX1, aunque ha sido propuesto para desempeñar un papel similar a CAX1 en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que la expresión de CAX1 y CAX3 aumenta al suministrar cantidades elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  a las plantas (Zhao *et al.*, 2008). Respecto a CAX4, en *Arabidopsis* se demostró que su expresión se limita únicamente a la raíz, necesitándose para el crecimiento normal de las raíces (Mei *et al.*, 2009). Además de la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , varios estudios han determinado que la función de la familia de los genes CAX es fundamental para la adaptación de las plantas al estrés salino (Hirschi, 1999; Cheng *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2013).

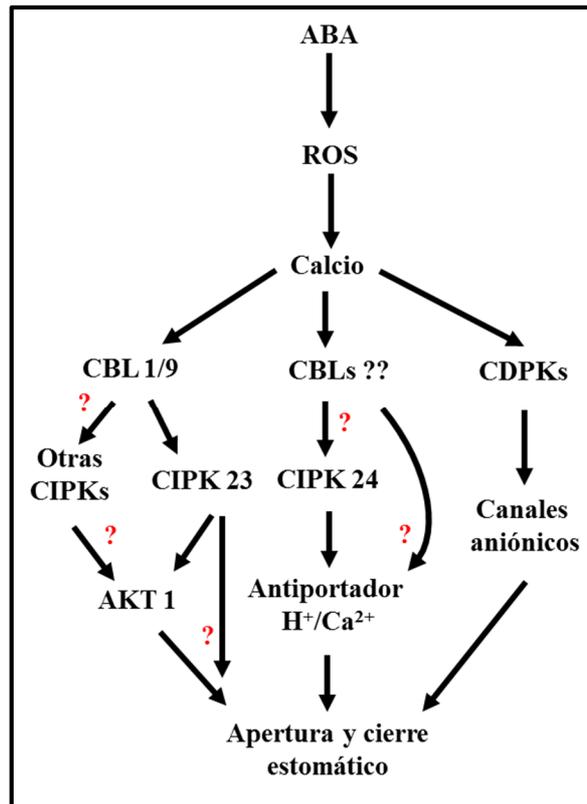
## **6. Regulación de la transpiración mediante apertura y cierre estomático**

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 situadas en la epidermis foliar rodeados de cutícula y compuestos 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 (Casson y Gray, 2008). 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). 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 incidencia e intensidad de la luz, la concentración de CO<sub>2</sub>, los niveles de hormonas vegetales, especialmente el ácido abscísico (ABA), la disponibilidad de agua (Araújo *et al.*, 2011), la entrada y salida de K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y malato (MacRobbie, 1998; Hedrich *et al.*, 2001) y las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Gilliham *et al.*, 2011). Mientras el Ca<sup>2+</sup> activa a los canales de entrada de aniones, los canales de entrada/salida de K<sup>+</sup> se activan por la acidificación/alcalinización del pH e hiperpolarización/despolarización de la membrana. El control de la apertura y cierre estomáticos es muy importante para controlar las relaciones hídricas de la planta así como la fijación de CO<sub>2</sub> (MacRobbie, 1998; Hedrich *et al.*, 2001).

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

*et al.*, 2002; Chater *et al.*, 2014). Otras hormonas como auxinas, citoquininas y jasmonatos también influyen en la función estomática (Kim y Wang, 2010; Pillitteri y Torii, 2012). Cuando las células oclusivas perciben niveles altos de ABA, reducen su turgor y volumen mediante la salida de aniones y de iones  $K^+$ , así como a través de la conversión gluconeogénica de malato en almidón, produciendo el cierre estomático (MacRobbie, 1998; Guo *et al.*, 2008) (**Figura 10**). El ABA conduce a un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico y eleva la sensibilidad hacia el mismo (Siegel *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas CBL actúan como sensores de  $Ca^{2+}$  y cumplen funciones muy importantes en diversos procesos dependientes del mismo (Kolukisaoglu *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005; Cheong *et al.*, 2007). Estos sensores se unen a diversas CIPKs (Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001; Hrabak *et al.*, 2003) para regular diversas rutas metabólicas. Así, se ha identificado a *CIPK23* como un componente mayoritario en la regulación de la tolerancia a sequía en *Arabidopsis* mediada por ABA (Cheong *et al.*, 2007). Esta quinasa cumple su función mediante la interacción con los sensores de  $Ca^{2+}$  *CBL1* y *CBL9*, los cuales parecen ser los encargados de su regulación. También se ha visto, en puntos anteriores, que los complejos *CBL1/CBL9-CIPK23* tienen relación con la absorción de  $K^+$  en la raíz, regulando el canal de  $K^+$  *AKT1* (Li *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006), al igual que *CBL10* que parece que compite con *CIPK23* por la unión a *AKT1*, regulando negativamente su actividad (Ren *et al.*, 2013). Teniendo todo esto en cuenta, se podría sugerir que esta ruta *CBL1/CBL9-CIPK23* regula la respuesta estomática tanto a sequía como a salinidad, aunque no se puede descartar que otros CBLs intervenga en la apertura/cierre estomático, bien regulando *AKT1* o algún antiportador  $H^+/Ca^{2+}$  (**Figura 9**).

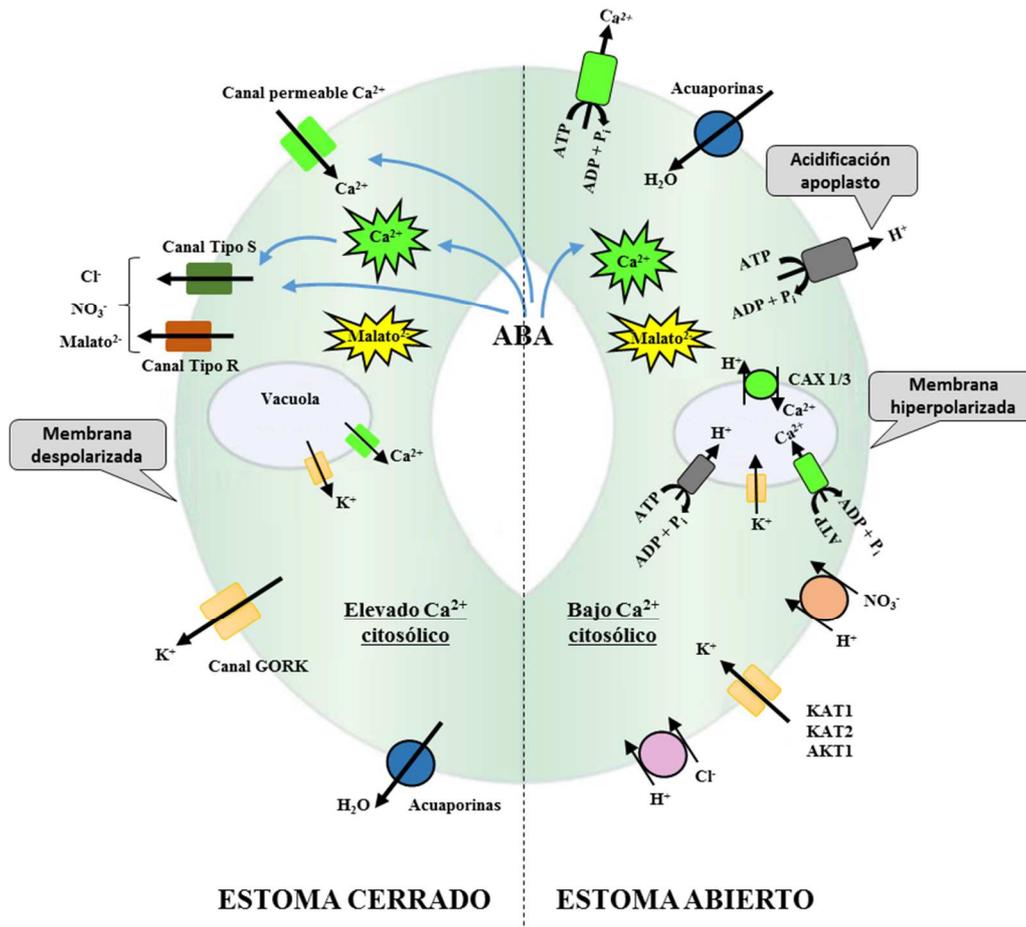


**Figura 9. La ruta CBL - CIPK regula los movimientos estomáticos, controlando el flujo de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  de las células guarda.** El ABA (con el estrés hídrico como factor desencadenante) produce especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a fluctuaciones en los niveles de  $Ca^{2+}$ . Este  $Ca^{2+}$  se une a CBL 1/9, interaccionando con CIPK23 y activando al canal AKT1 (y posiblemente a otros canales “?”) relacionados con la absorción de  $K^+$  y la regulación del turgor de las células. Otras CIPKs podrían estar también relacionadas con la regulación de AKT1. Otras CBLs podrían regular los antiportadores  $H^+/Ca^{2+}$ , bien directamente o interactuando con la CIPK24 (SOS2), regulando la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico de las células oclusivas y modulando la respuesta estomática. La otra rama de la señalización por  $Ca^{2+}$  en las células oclusivas de la figura está relacionada con las CDPKs, las cuales activan canales aniónicos, inhibiendo la apertura estomática (Modificado de Cheong *et al.*, 2007).

Tanto el aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico como el aumento de sensibilidad hacia el mismo activan dos canales de aniones distintos: los canales de tipo S (de activación lenta: slow-activating) y de tipo R (de activación rápida: rapid-transient) (Schroeder y Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990; Schroeder y Keller, 1992). La activación de estos canales en la membrana plasmática de las células oclusivas ha sido señalada como un paso crítico en el mecanismo de cierre estomático (Schmidt *et al.*, 1995; Grabov *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1997). La salida de aniones mediante los canales aniónicos causa una despolarización de la membrana, lo que conduce a una salida de  $K^+$  de las células oclusivas a través de los canales GORK de salida de  $K^+$  (Schroeder *et al.*, 1984; Schroeder *et al.*, 1987; Thiel *et al.*, 1992; Hosy *et al.*, 2003). De todos los solutos liberados de las células oclusivas, más del 90% proceden de las vacuolas (MacRobbie, 1998), siendo los

canales vacuolares activados por  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Yadav *et al.*, 1996) parte importante en la salida de  $\text{K}^+$  de la vacuola (Ward y Schroeder, 1994; Gobert *et al.*, 2007) (**Figura 10**). La apertura estomática requiere la activación de las ATPasas de  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática de las células oclusivas. La hiperpolarización de la membrana producida por las ATPasas de  $\text{H}^+$  induce la absorción de  $\text{K}^+$  a través de los canales de entrada de  $\text{K}^+$  (Kwak *et al.*, 2001; Lebaudy *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). Así, la entrada de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , y la producción de malato a partir de almidón osmóticamente inactivo aumenta el turgor y el volumen de la célula oclusiva por la entrada de agua e induce la apertura estomática. En estas células, el  $\text{K}^+$  se acumula en las vacuolas mediante la actividad antiportadora  $\text{H}^+/\text{K}^+$ , mientras que los aniones se transportan hacia las vacuolas a través tanto de canales aniónicos de baja afinidad como de mecanismos intercambiadores  $\text{H}^+/\text{anión}$  (Hafke *et al.*, 2003; De Angeli *et al.*, 2006; Kovermann *et al.*, 2007). El ABA inhibe la apertura estomática a través de la reducción de la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  y de las ATPasas de  $\text{H}^+$  (Schroeder y Hagiwara, 1989; Kinoshita *et al.*, 1995) (**Figura 10**).

Las oscilaciones de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pueden determinar la eficacia con la que se induce la apertura y cierre estomático (Cosgrove y Hedrich, 1991; Desikan *et al.*, 2002; Covington y Harmer, 2007). En las células guarda, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  regulan la apertura de los estomas. Se ha demostrado experimentalmente que el cierre estomático no solo depende de la frecuencia y la amplitud de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también en gran medida de la duración y el número de picos de  $\text{Ca}^{2+}$  (White, 2000; Allen *et al.*, 2001). En particular, la larga duración del cierre estomático depende de la cantidad de picos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Li *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004). En general, se acepta que un rápido incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol está mediado por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentran en la membrana plasmática y las endomembranas, como la membrana vacuolar y las membranas del retículo endoplasmático (Miles *et al.*, 2004; Cvetkovska *et al.*, 2005). Las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  con tintes indicadores han mostrado que el ABA puede provocar una elevación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de las células guarda. Una característica adicional del ABA en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  es que puede activarse y desactivarse varias veces dentro de la célula, dando lugar a elevaciones transitorias de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.



**Figura 10. Regulación de los canales, bombas y transportadores iónicos localizados en las células guarda durante la apertura y cierre de los estomas.** Durante el cierre de los estomas (Izda.), se produce una elevada biosíntesis de ABA que activa el flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes internos y de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el apoplasto, produciéndose una elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Como consecuencia se inhibe la bomba  $\text{H}^+$ -ATPasas (membrana despolarizada) y se produce la activación de los canales de aniones tipo S y tipo R que conducen a la salida de  $\text{Cl}^-$ , malato $^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ . También se produce la activación del canal de GORK, que conduce a la salida de  $\text{K}^+$  y, en consecuencia, el cierre de los estomas. Durante la apertura de los estomas (dcha.), se inhibe la biosíntesis de ABA en las células guarda y las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas y antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  mantienen bajo el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (acumulándolo en vacuola o extrayéndolo al apoplasto). Como consecuencia se activa la bomba  $\text{H}^+$ -ATPasas e hiperpolarizada la membrana de las células guarda, lo que conduce a la activación de las canales de entrada de  $\text{K}^+$  (KAT1, KAT2 y AKT1). Al mismo tiempo, especies aniónicas tales como malato $^{2-}$  (procedente de la descomposición del almidón) y el transporte de iones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  contribuyen a la acumulación de solutos intracelulares. Los iones suministrados a las células guarda, junto con el agua suministrada por las acuaporinas generan la turgencia necesaria para mantener los estomas abiertos.

Las señales que determinan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  incluyen principalmente los canales de iones permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ , intercambiadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  y las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, además de regular la eficiencia del uso del agua de las plantas a través de la participación del ABA en la apertura y cierre estomático (Shao *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Conn *et al.* (2011), observaron que las plantas mutantes que tenían anulada la

expresión de *CAX1* y *CAX3* presentaban una reducida capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  en el mesófilo de la hoja, mostrando a su vez reducción en la pared celular, alteraciones en el crecimiento de la hoja, menor apertura estomática y baja transpiración y tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ ; estas alteraciones fenotípicas pueden ser debidas a la alteración en el  $\text{Ca}^{2+}$  libre del apoplasto, mostrando tres veces más  $\text{Ca}^{2+}$  en el apoplasto que las plantas que expresan *CAX1* y *CAX3*. En otro estudio realizado recientemente, Cho *et al.* (2012) demostraron que los mutantes nulos de *CAX1* y *CAX3* tenían un pH apoplástico más alto que las plantas sin transformar, perturbando a otros intercambiadores vacuolares y, por tanto, afectando a la regulación estomática, por lo que el mantenimiento de un correcto pH apoplástico juega un papel crucial en todos los procesos celulares (Cho *et al.*, 2012).

## **7. Interés del tomate y especies silvestres afines en los estudios de tolerancia a salinidad**

A pesar de los grandes esfuerzos para mejorar el grado de tolerancia a estrés abiótico en especies de interés agronómico, los resultados obtenidos a través de métodos convencionales de mejora han sido más bien escasos (Schwarz *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2011; Peleg *et al.*, 2011). La situación actual aconseja reconsiderar lo que sabemos realmente sobre las bases genéticas de los mecanismos de adaptación que inducen tolerancia a la salinidad y la sequía, y plantearse la pregunta de cuál sería el material vegetal más adecuado para realizar la disección genética de estos caracteres complejos. Por tanto, sería de gran interés aprovechar la variación genética existente en las especies silvestres relacionadas. Tras la revisión de los mecanismos de tolerancia en diferentes halófitas (Flowers y Colmer, 2008; Shabala, 2013), se ha propuesto que la investigación futura se centre en un número limitado de halófitas "modelo" que son representativas de los diferentes mecanismos involucrados en la tolerancia, lo que ayudaría a desvelar algunos de los mecanismos de adaptación fisiológica que conduce a la tolerancia al estrés abiótico y la base genética de esos mecanismos en plantas tolerantes.

El tomate se considera como moderadamente tolerante a la sal (Cuartero *et al.*, 2006), pero su nivel de tolerancia no es suficiente para mantener el rendimiento en las zonas afectadas por procesos de salinización secundaria y, además, no muestran un nivel notable de tolerancia al estrés por déficit de agua. Por el contrario, hay accesiones de especies silvestres relacionadas con tomate, tanto de frutos rojos (por ejemplo, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium*) y de fruto verde (por ejemplo, *S. pennellii*), con un alto

grado de tolerancia a la salinidad o la sequía (Bolarin *et al.*, 1991; Cano *et al.*, 1996; Bolarin *et al.*, 2001). Además, los mapas moleculares derivados de cruzamientos interespecíficos entre *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. pimpinellifolium* y otras especies silvestres relacionadas con tomate también están disponibles (Foolad, 2007). Por lo tanto, el hallazgo de mutantes con elevados niveles de tolerancia/sensibilidad a diferentes estreses podría llevar a la identificación y etiquetado de los genes clave responsables de la tolerancia al estrés abiótico. Con este fin, se está llevando a cabo un programa de mutagénesis insercional mediante el empleo de una trampa de intensificadores en el cv. de tomate Moneymaker y en la accesión (PE47) perteneciente a la especie silvestre *S. pennellii*. La mutagénesis insercional ha supuesto un gran avance para la detección y clonación de genes y elementos reguladores implicados en diversos procesos (O'Malley y Ecker, 2010). Para poder emplear este abordaje es necesario obtener una cantidad considerable de plantas transformadas para poder detectar un alto número de mutantes y, como consecuencia, etiquetar los genes implicados en el carácter analizado.

Los programas de genómica funcional en especies de interés agronómico o especies silvestres relacionadas no sólo conducirán a importantes avances del conocimiento, sino también a un salto cualitativo en el campo de la mejora. Entre las vías para lograr tales objetivos, destaca la mutagénesis insercional por T-DNA, que en los últimos años se ha convertido en una herramienta básica para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función. En efecto, la disrupción de un gen endógeno o la integración del T-DNA en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de función, dando una valiosa información sobre el papel de un cierto gen en un carácter dado. Otra aplicación de la mutagénesis insercional por T-DNA estriba en la detección de elementos de regulación mediante el empleo de los denominados “sistemas trampa” (trapping) que permiten detectar secuencias reguladoras y asignar una función a partir de datos de expresión del delator que mimetiza la expresión del gen endógeno.

## **8. Mutagénesis insercional. Etiquetado de genes por inserción de elementos de transposición: transposones o T-DNA**

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; O'Malley y Ecker, 2010). En resumen, 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. 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 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 *ANTI*, 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).

### **8.1. 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 (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 B., 2012). 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.

Utilizando una trampa de intensificadores, Atarés *et al.* (2011) han generado una amplia colección de líneas T-DNA de dos accesiones de la especie silvestre de tomate (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. 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).

## 9. Análisis de mutantes como herramienta para la identificación de genes

El análisis detallado de un mutante representa uno de los caminos más exitosos para determinar la función de un gen (Kuromori *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010; Atkinson y Urwin, 2012). Desde un punto de vista metodológico, los mutantes pueden ser generados a través de mutagénesis química (e.g. EMS), física (irradiación) o insercional (transposones o T-DNA). En tomate existen colecciones de mutantes espontáneos y generadas por métodos químicos (Bergougnoux, 2014; Schwarz *et al.*, 2014), como la colección TOMATOMA generada a partir del cv. Micro-Tom (Saito *et al.*, 2011). También hay una colección de líneas T-DNA generadas a partir del cv. Micro-Tom (Mathews *et al.*, 2003), pero hasta ahora no existía ninguna colección de mutantes insercionales generados a partir del tomate cultivado y silvestre.

Esta tesis se enmarca en un proyecto coordinado entre tres grupos de investigación, el grupo dirigido por el Prof. Vicente Moreno (IBMCP-UPV), el dirigido por el Prof. Rafael Lozano y la Dra. Trinidad Angosto (Universidad de Almería) y el grupo del CEBAS dirigido por la Prof. Mari Carmen Bolarín. En este proyecto coordinado se utiliza como herramienta genómica la mutagénesis insercional para la identificación y caracterización de mutantes alterados en procesos del desarrollo y tolerancia a estreses abióticos con el fin de llegar a identificar genes clave implicados en estos procesos. La identificación de los genes implicados en la tolerancia a la salinidad puede proporcionar la base científica para abordar los programas de mejora genética en los años venideros. Desde hace varios años se han venido generando colecciones de líneas T-DNA de tomate cultivado y de especies silvestres, una de ellas a partir del cv. de tomate MoneyMaker y otra colección generada a partir de una accesión (PE47) perteneciente a la especie silvestre *S. pennellii* (Atares *et al.*, 2011; Pineda B., 2012), que son las colecciones con las que se ha trabajado en esta Tesis Doctoral. El importante número de líneas ya obtenidas para ambas especies está permitiendo abordar un programa de este tipo no solo en una especie de interés agronómico como tomate sino en una especie silvestre con alto grado de tolerancia al estrés salino e hídrico, lo que puede ser de gran interés para avanzar en este complejo objetivo. Así, recientemente se ha comprobado que el tamaño del genoma es mayor en *S. pennellii* que en el tomate cultivado, con aproximadamente 1200 Mb y 950 Mb, respectivamente (Aflitos *et al.*, 2014). En este contexto, el empleo de una especie de interés agronómico como tomate conjuntamente con una especie silvestre como *S. pennellii*, filogenéticamente relacionada con tomate y que presenta altos niveles

de tolerancia a estreses abióticos, puede permitir importantes avances en la identificación de los procesos clave de la tolerancia a salinidad y, finalmente, llegar a la identificación de genes relacionados con estos caracteres y que pueden aportar las pautas a seguir en la mejora del tomate cultivado.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha centrado en una primera etapa en la identificación y caracterización de mutantes de la colección de la especie silvestre *S. Pennellii*. En una segunda etapa, se ha realizado la caracterización fenotípica, fisiológica y molecular de dos mutantes de tomate hipersensibles al estrés salino.





# **OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

Esta tesis se enmarca en un proyecto coordinado entre tres grupos de investigación (IBMCP-UPV, UAL y CEBAS) donde se utiliza como herramienta genómica la mutagénesis insercional para la identificación y caracterización de mutantes alterados en procesos del desarrollo y tolerancia a estreses abióticos, con el fin de llegar a identificar genes clave implicados en estos procesos. Se están generando colecciones de líneas T-DNA de tomate cultivado y de especies silvestres desde hace varios años, una de ellas a partir del cv. de tomate Moneymaker y otra colección generada a partir de una accesión (PE47) perteneciente a la especie silvestre *S. pennellii*, con alto grado de tolerancia a los estreses salino e hídrico. El trabajo de esta Tesis Doctoral se ha realizado con ambas colecciones, y los objetivos abordados han sido:

### 1. Identificación y caracterización de mutantes

1.1. Identificación de mutantes afectados en el desarrollo y/o tolerancia a estreses abióticos en la colección de líneas T-DNA de la especie silvestre *S. pennellii*.

1.2. Caracterización de dos mutantes de *S. pennellii* que muestran mecanismos de respuesta muy diferentes frente al estrés salino.

1.3. Caracterización del mutante de tomate *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*), con alta sensibilidad a sal debido al efecto tóxico provocado por el transporte de sodio a la parte aérea.

### 2. Caracterización de un mutante de tomate que tiene anulada la expresión del gen *SICBL10*

El mutante *cbll0* es hipersensible a la salinidad a pesar de reducir la absorción y transporte de  $\text{Na}^{2+}$  a la parte aérea en estas condiciones. Los objetivos parciales que se han abordado en este trabajo con el fin de dilucidar el papel del gen *SICBL10* en la tolerancia al estrés salino en tomate han sido los siguientes:

2.1. Análisis del patrón de expresión del gen *SICBL10* en tomate, con el fin de identificar el tejido o los tejidos en los que su función es importante en condiciones de salinidad.

## *II. Objetivos*

---

2.2. Comprobar si la funcionalidad del gen *SICBL10* podría estar relacionada con la regulación de la homeostasis iónica o del estrés osmótico en condiciones de salinidad, procesos claves en los mecanismos de tolerancia al estrés.

2.3. Analizar la posible interrelación del gen *SICBL10* con otros genes implicados en los mecanismos de tolerancia al estrés salino, fundamentalmente en la regulación de la homeostasis iónica.

2.4. Comprobar, mediante el uso de la técnica de injertos, la existencia de una posible funcionalidad diferente del gen *SICBL10* en raíz y parte aérea de tomate, identificando cuál de ellas sería clave para la tolerancia al estrés salino.



**MATERIAL  
Y  
MÉTODOS**



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. Material vegetal

El material vegetal utilizado para la realización de los diferentes ensayos de esta tesis ha sido:

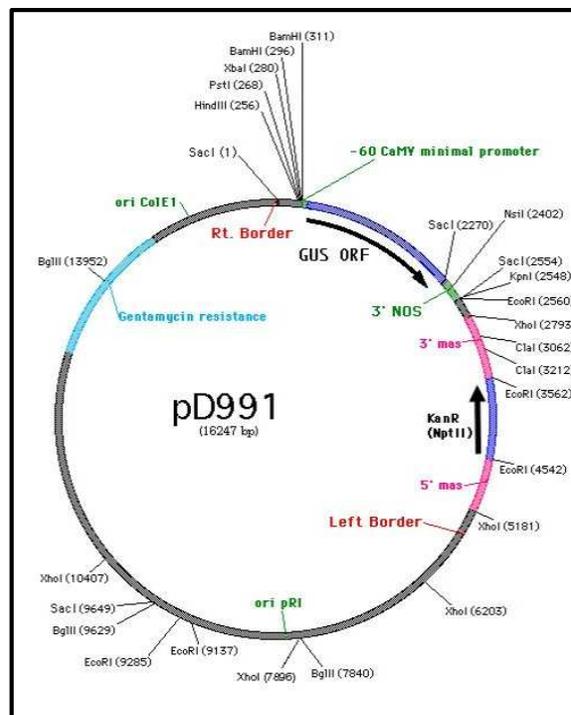
- Tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Moneymaker: Se trata de un cultivar de tomate con porte generalmente indeterminado. Frutos lisos, redondos y con buena formación en ramillete. Una de las principales variedades cultivadas en la Región de Murcia.

- Especie silvestre *S. pennellii* accesión PE47: Es una especie de fruto verde usada frecuentemente en programas de mejora por su cercanía filogenética a tomate y sus características favorables en cuanto a tolerancia a sequía (Rick, 1973), salinidad (Dehan y Tal, 1978; Tal y Shannon, 1983; Taleisnik, 1987; Saranga *et al.*, 1991), resistencia a insectos (Goffreda y Mutschler, 1989) y enfermedades (Bournival *et al.*, 1990).

#### 2. Generación de líneas T-DNA de tomate y *S. pennellii* con una trampa de intensificadores

Sobre el cultivar Moneymaker de tomate y la accesión PE47 de tomate silvestre se llevó a cabo la transformación genética para la obtención de las colecciones T-DNA y las posteriores evaluaciones. Las plantas transgénicas han sido obtenidas en el laboratorio de Cultivo in Vitro y Mejora Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia, dirigido por el Profesor Vicente Moreno. Las líneas T-DNA han sido generadas utilizando una trampa de intensificadores proporcionada por el Dr. Thomas Jack, del departamento de Biología del *Dartmouth College* (Estados Unidos). Este vector pD991 contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA*. El promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su integración en el área de actuación de un determinado intensificador debería activar la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno.

Como fuente de material vegetal para la transformación génica se utilizaron cotiledones de plántulas de tomate del cultivar MoneyMaker y de tomate silvestre *S. pennellii* de la accesión PE47 con 7-10 días desde la germinación realizada *in vitro*, de acuerdo con el protocolo descrito por Atarés *et al.* (2011). Para la transformación genética se ha utilizado la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 con tres vectores. Dos vectores convencionales (plásmidos pBin19sgfp, y pBin19GUS), portan un gen marcador (*nptII*) bajo el control del promotor y del terminador nos y un gen delator (GUS o *uidA*) bajo el control de promotor 35S con el terminador nos. El tercer vector, pD991 contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* (**Figura 11**).



**Figura 11.** Esquema del vector pD991 utilizado para la transformación y generación de los mutantes T-DNA.

Una vez obtenidas las plantas transgénicas, es necesario asegurar que la nuevas líneas T-DNA son diploides, ya que es frecuente obtener plantas triploides durante el proceso de transformación en tomate (25% en el cv. MoneyMaker) (García Abellán, 2011). El nivel de ploidia ha sido analizado mediante citometría de flujo por el grupo del IBMCP, mediante la técnica de cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células a partir de fragmentos de hoja joven, según el método de Smulders *et al.* (1994).

## 2.1. Multiplicación y mantenimiento *in vitro* de líneas T-DNA

Una vez que se ha comprobado que las nuevas líneas T-DNA son diploides, es necesario la multiplicación clonal en medio de enraizamiento (**Tabla 4**) de las líneas y su mantenimiento en nuestra colección *in vitro*. La propagación clonal de plantas tiene como fin la obtención de genotipos idénticos (clones), por medio de la multiplicación vegetativa a partir del cultivo de yemas axilares y ápices meristemáticos. Es necesario obtener un número de copias suficiente para que algunas de ellas se mantengan en la colección *in vitro* y otras se aclimaten y se lleven a las cámaras de cultivo o al invernadero para su posterior cultivo y evaluación. Se utilizan botes de 150 mm de altura x 60 mm de diámetro y medio de enraizamiento.

**Tabla 4. Composición del medio de enraizamiento y crecimiento.**

Componentes	g L <sup>-1</sup>
Solución mineral	MS*
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCL	0,001
Ácido indol acético	0,0001
Agar	8

\* MS: Murashige y Skoog (1962).

El pH del medio se ajusta a 5,7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante.

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

## 3. Técnicas básicas utilizadas en el cultivo *in vitro*

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

Los estudios se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz y 76  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa, y 8 h de oscuridad con 25°C durante todo el ciclo. Para la iluminación se emplearon tubos fluorescentes GroLux de 58 W (Sylvania).

### 3.2. Esterilización de semillas y germinación *in vitro*

Las plántulas de la población mutante y WT se obtienen a partir de semillas que previamente han pasado por un proceso de esterilización. Las semillas se esterilizan superficialmente por inmersión durante 30 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 20%, a la cual se añaden 3 gotas de Triton X-100 para romper la tensión superficial, mejorando el contacto entre el tejido y el esterilizante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril. Una vez esterilizadas, estas se depositan en tubos y/o frascos estériles, donde previamente se ha depositado el medio de germinación (Tabla 5), suplementado con sacarosa y adicionando agar, necesario para el correcto desarrollo de las plántulas.

Tabla 5. Composición del medio de germinación de semillas.

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

\* MS: Medio Murashige y Skoog (1962).

### 3.3. Aclimatación de plantas *in vitro*

Tanto las plantas de la progenie TG1 de la colección *in vitro*, como las plantas germinadas *in vitro* a partir de semillas, deben pasar por un periodo de aclimatación para poder cultivarlas adecuadamente en condiciones *in vivo* (cámara de cultivo e invernadero). Una vez que las plantas cultivadas *in vitro* han alcanzado el desarrollo adecuado es posible realizar la aclimatación. Esta consiste en trasladar la planta desde el cultivo *in vitro* con unas condiciones de 100 % humedad relativa y baja iluminación hasta unas condiciones de cultivo *in vivo* donde la humedad ambiental varía entre el 50 y 80 % de HR y una iluminación mucho más alta. Este proceso se realiza pasando las plantas desde el medio *in vitro* con agar (que hay que retirar de las raíces lavándolas suavemente en agua destilada) a macetas llenas con una mezcla de turba y perlita (8 partes de turba por 3 de perlita) previamente esterilizada y humedecida, las plantas en las macetas se mantienen en un ambiente con alta humedad tapándolas con un vaso de plástico, con el objetivo de mantener una alta humedad relativa en el ambiente que rodea a las plantas.

Paulatinamente se disminuye la humedad relativa retirando el vaso primero durante cortos periodos de tiempo que se van aumentando hasta que las plantas quedan expuestas a las condiciones ambientales típicas de la cámara. Este proceso tiene una duración aproximada de 8-10 días. Una vez transcurrido este periodo, se elimina el vaso, dándose por concluida la etapa de aclimatación.

#### **4. Obtención de progenies TG2 y TG3**

Varias réplicas clonales TG1 de cada línea T-DNA se cultivaron en invernadero con el fin de obtener por autopolinización las semillas TG2 de cada línea. Esta progenie TG2 contiene una mezcla de plantas acigotas, homocigotas y heterocigotas. De la misma manera se obtiene la progenie TG3 en la cual se procederá a identificar las líneas homocigotas y acigotas con las cuales se continuara con la caracterización de la línea T-DNA. La identificación de las líneas homocigotas se realiza tanto mediante el test de kanamicina como determinando la presencia del gen marcador *nptII* por PCR (ver apartado 8.6).

##### **4.1. Selección de plantas por tolerancia a Kanamicina**

El T-DNA contiene en su interior el gen bacteriano *nptII* proveniente de *Escherichia coli* que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a los antibióticos aminoglicósidos como kanamicina, neomicina y geneticina. Este gen se usa como marcador de selección ya que la kanamicina resulta toxica para las células vegetales por lo que solo las plantas que contengan el T-DNA serán capaces de desarrollarse en un medio de cultivo con kanamicina. Esta prueba de resistencia a kanamicina se usa para seleccionar plantas que contengan el T-DNA asegurándonos por ello que sean transgénicas y también se puede utilizar para realizar análisis de segregación del T-DNA.

La evaluación del grado de inhibición del enraizamiento y desarrollo en semillas de líneas transgénicas se realizó a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina en el medio de germinación.

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

Para estudiar la respuesta de las plantas al estrés salino se llevaron a cabo ensayos a corto y medio plazo (en cámara de cultivo de condiciones controladas y de una semana de duración) y a largo plazo (en invernadero y llegando a la fase de producción). La respuesta de las plantas al estrés hídrico se estudió en ensayos a corto plazo en cámara de cultivo y condiciones controladas.

### 5.1. Condiciones de cultivo para los ensayos a corto y medio plazo de salinidad

Todas las semillas para realizar los diferentes ensayos en las cámaras de cultivo se pre-germinaron durante 48 horas en agua destilada y en agitación, con el fin de hidratar al máximo las semillas y facilitar su germinación, ya que la disponibilidad de agua es una condición esencial para la germinación de las semillas. Una vez que las semillas estaban bien hidratadas, estas se germinaron en semilleros de plástico de dimensiones 60x40x12 cm y 96 pocillos por bandeja. La germinación se realizó en una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 y unas condiciones de temperatura y humedad de 28°C y 80%, respectivamente. Las semillas se mantuvieron en oscuridad durante las primeras 48-72 horas después de la siembra para facilitar la germinación.

Las condiciones de cultivo utilizadas para los diferentes experimentos fueron de una humedad relativa entre el 50 y 80%, con una temperatura que oscilaba entre los 26°C por el día y 18°C por la noche con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad de luz y la temperatura durante el ciclo de cultivo fueron variables con el fin de intentar reproducir en lo posible un ciclo natural. Las condiciones del cultivo, descritas en la tabla 6, fueron controladas mediante un programa informático.

Tabla 6. Condiciones ambientales controladas de la cámara de cultivo

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

La disolución nutritiva utilizada (**Tabla 7**), tanto para el riego de los semilleros como para el posterior cultivo hidropónico, fue Hoagland diluida al 50% (Hoagland, 1950). La disolución consta de tres componentes preparados por separado que son mezclados y diluidos en agua destilada para obtener la disolución de riego.

**Tabla 7. Composición de la solución nutritiva utilizada para el riego en cámara de cultivo.**

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

Las plantas se mantenían en los semilleros hasta que alcanzaban un desarrollo de 1-2 hojas, momento en el cual se transferían al medio de cultivo definitivo donde se realizaba el ensayo. Se han utilizado dos medios de cultivo definitivos: 1) sustrato en maceta de plástico con capacidad para 1,1 litros ó 4,3 litros utilizando una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3; 2) hidropónico en cubetas con capacidad para unos 50 litros de solución nutritiva (Hoagland diluida al 50%).

### 5.1.1. Ensayos en sustrato

Las plántulas con estado de desarrollo de 2-3 hojas verdaderas se trasplantan a macetas usando como sustrato la mezcla de turba y perlita antes descrita para la germinación de las semillas. El sustrato se humedece completamente antes del trasplante y una vez realizado, y con el fin de amortiguar el estrés sufrido, así como permitir el desarrollo de la raíz, se dejan aclimatar durante una semana antes de iniciar el tratamiento salino. La frecuencia de riego variará acorde al estado de desarrollo de las plantas y se realiza a demanda para mantener las condiciones óptimas de crecimiento homogéneo para la población de estudio, evitando tanto la desecación como el exceso de riego. Se utiliza la

solución Hoagland al 50% que a su vez sirve de base para formar las soluciones de los tratamientos salinos realizados.

### **5.1.2. Ensayos en cultivo hidropónico**

El sistema de cultivo hidropónico es un sistema idóneo para la evaluación de la respuesta a corto y medio plazo de tratamientos salinos bajo condiciones controladas de cultivo, que permite además examinar el sistema radicular de las plantas y muestrearlo sin interferencias de sustrato sólido.

El sistema de cultivo hidropónico (**Figura 12**) constaba de varias cubetas de fibra de vidrio con una capacidad de 50 litros de disolución nutritiva aproximadamente. Las cubetas estaban cubiertas por unas tapaderas perforadas, también de fibra de vidrio, donde se situaban hasta 40 plantas sobre unos soportes de plástico perforados rellenos de algodón acrílico o miraguano sintético con el fin de sujetar las plantas y mantenerlas erguidas. Cuando las plantas presentaban un mayor desarrollo eran entutoradas con hilo de rafia y anillas en unos soportes situados sobre las cubetas. Una vez que las plantas se trasplantaban al cultivo hidropónico se mantenían en condiciones control durante un mínimo de 8-10 días, antes de iniciar el ensayo, con el fin de facilitar la aclimatación de las plantas y un correcto desarrollo del sistema radicular.

Los tratamientos salinos se aplicaban utilizando la misma disolución Hoagland al 50% utilizada para el riego (sin sal), a la que se le añadía distintas concentraciones de NaCl en función del ensayo, para producir el estrés salino (100 mM, 150 mM o 200 mM de NaCl). La aplicación del tratamiento salino se realizaba de forma gradual añadiéndola en 2 o 3 veces, para que las plantas se aclimataran poco a poco al estrés, y se realizaba en los periodos de baja iluminación, ya que las plantas en esta fase tienen una menor transpiración, y así se reduce en lo posible el choque osmótico. En los ensayos en hidropónico, tanto en ausencia de sal como durante el tratamiento salino, las condiciones de cultivo se sometían a control mediante seguimiento del pH, la conductividad eléctrica (CE) y la realización de análisis químicos periódicos, procediéndose al cambio de la disolución nutritiva cada vez que fuera necesario y mínimo una vez por semana. La disolución nutritiva era convenientemente aireada mediante un burbujeo continuo suministrado por un compresor Puska N-150-50, con un caudal de 115 L min<sup>-1</sup>, presión máxima 10 Kg cm<sup>-2</sup> y capacidad de 50 litros.



Figura 12. Sistema de cultivo hidropónico.

### 5.2. Condiciones de cultivo para los ensayos de salinidad a largo plazo en invernadero

Los experimentos a largo plazo se realizaban en un invernadero situado en la finca experimental “Tres caminos” del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), situada en La Matanza, término municipal de Santomera (Murcia). El invernadero poseía una superficie de unos 1000 m<sup>2</sup> completamente cerrado y un sistema de refrigeración tipo “cooling” para la regulación de la temperatura, formado por un módulo de humectación en un extremo del invernadero y 6 extractores en el otro extremo con persianas de apertura-cierre automático por sistema mecánico (centrifugo de empuje), activándose estos cuando la temperatura supera los 24°C. También cuenta con malla antitrips. El sustrato utilizado para el cultivo en invernadero era fibra de coco en contenedores de poliestireno expandido (**Figura 13**) con un volumen de 32 litros con espacio para 6 plantas en cada contenedor. La solución nutritiva (**Tabla 8**) era suministrada por riego a goteo, usándose goteros de 3 L h<sup>-1</sup>. El marco de plantación era de 0,5x2 m<sup>2</sup> con un gotero cada dos plantas. Las plantas eran cultivadas a un solo tallo, eliminándose periódicamente las yemas laterales, antes de comenzar los ensayos, siendo entutoradas con hilo de rafia y anillas, y enfrentadas las plantas de un mismo gotero a cada lado del contenedor. La fertilización se ajustaba para conseguir unos niveles óptimos de nutrientes para el cultivo del tomate (Cadahia, 1995).

El invernadero incluía un sistema de sensores de temperatura y de humedad relativa colocados a una altura de 1.5 m. Todos los valores se registraban periódicamente y eran almacenados en una base de datos.

Tabla 8. Composición de la solución nutritiva usada para el riego de las plantas en el invernadero.

<b>Macronutrientes (mM)</b>					
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 (µM)</b>				
Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	B <sup>3+</sup>
12,0	0,5	7,0	4,0	2,0

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

Periódicamente se realizaba el análisis químico tanto del agua, como de la disolución de riego y del lixiviado producido por el riego para comprobar que las condiciones de cultivo eran las deseadas. El control del riego lo realizaba un autómata que variaba sus condiciones según la edad de la planta y las condiciones ambientales. El agua de riego tenía una conductividad eléctrica alrededor de 1 dS m<sup>-1</sup>, la disolución de riego en control tenía 2 dS m<sup>-1</sup>, mientras que en el tratamiento salino 100 mM de NaCl la disolución tenía una conductividad eléctrica de 12 dS m<sup>-2</sup>.

Las plantas, germinadas en condiciones controladas en la cámara de cultivo, eran llevadas al invernadero y trasplantadas cuando habían desarrollado 7-8 hojas verdaderas. Después del trasplante, las plantas necesitaban un periodo de aclimatación a las nuevas condiciones de cultivo que solía durar entre 10 y 15 días, tras el cual se iniciaba el tratamiento salino. Dicho tratamiento era adicionado gradualmente para minimizar el choque osmótico. El nivel salino utilizado para los experimentos en invernadero era de 100 mM de NaCl.



Figura 13. Aspecto general del sistema de riego y del invernadero donde se han realizado los experimento a largo plazo.

### 5.3. Condiciones de cultivo de las plantas para los ensayos de estrés hídrico

Todos los ensayos de estrés hídrico se realizaban en las cámaras de cultivo de condiciones controladas, con las condiciones medioambientales descritas en el apartado 5.1.

En la cámara de cultivo, cuando las plantas habían desarrollado las 2 primeras hojas en el semillero, se trasplantaban a macetas de plástico de 15 cm de diámetro, que contenían turba y perlita como sustrato (8:3). En la misma maceta se colocaba una planta WT y una planta mutante con el fin de asegurarnos que ambas plantas se sometían a las mismas condiciones de estrés hídrico. Se utilizaban 8 parejas mutante-WT para el tratamiento de estrés hídrico y otras 8 para el tratamiento control. Las plantas se regaban con disolución nutritiva de Hoagland diluida al 50%, antes de iniciar el estrés hídrico, durante el periodo de rehidratación y las plantas utilizadas como control. El estrés hídrico consistía en dejar de regar las plantas y se comenzaba a aplicar cuando las plantas tenían 7-8 hojas completamente desarrolladas. En cada ensayo se aplicaban dos ciclos de deshidratación/rehidratación donde el periodo de privación de riego era de 10 días, después del cual se reiniciaba el riego durante tres días antes de comenzar el siguiente ciclo.

### 5.4. Generación de plantas injertadas

Con el fin de dilucidar cuál era el principal órgano responsable de la sensibilidad a la sal mostrada por los mutantes, o bien si contribuían ambos órganos, se realizó un experimento comparando la respuesta a sal de los injertos recíproco entre WT y dos líneas mutantes. Todo el proceso de germinación de las semillas de WT y de los mutantes, la

realización de los injertos y su posterior cultivo hasta que estaban preparadas para el trasplante fue realizado en las instalaciones de *Viveros La Sala* (Crta. Lo Romero. Km. 5, San Pedro del Pinatar, Murcia). Los injertos se realizaban cuando las plantas tenían 2 hojas en desarrollo, el corte se realizaba por debajo de los cotiledones en el portainjerto y por encima de los cotiledones en la parte aérea de forma oblicua para que las dos partes tuvieran una mayor superficie de contacto a la hora de regenerar los tejidos. Los injertos se realizaban inmediatamente después de cortar las plantas y la unión del injerto se realizaba por medio de una pinza para injertos. Puesto que hay un desfase en el desarrollo entre las plantas no injertadas e injertadas, ya que tiene que producirse la unión de los haces vasculares para volver a reanudar el desarrollo, los injertos recíprocos se comparaban con los autoinjertos (**Figura 14**).

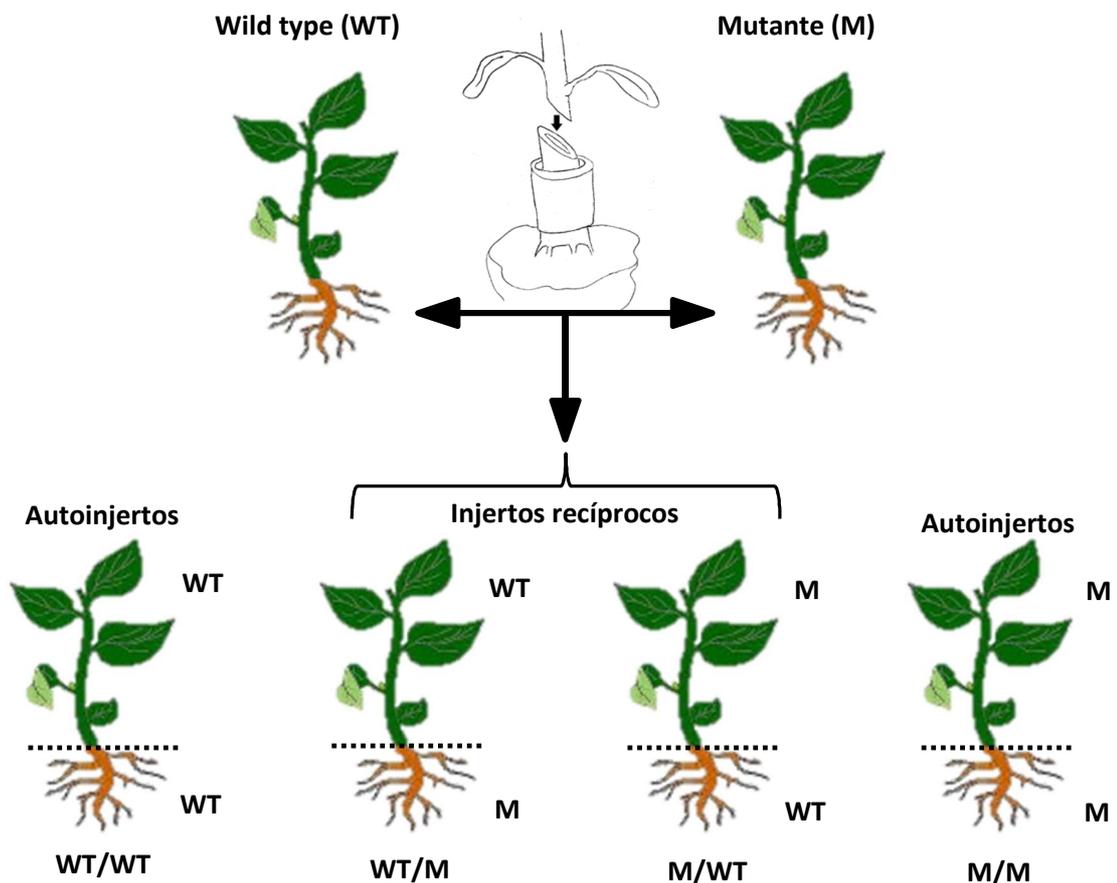


Figura 14. Esquema de diseño del injerto.

Después de realizar el injerto, las plántulas se cubrían con una tapa de plástico transparente para mantener un alto nivel de humedad y facilitar la formación del injerto, y se mantenían con baja iluminación durante 24 horas. El plástico se abría un poco todos

los días para permitir una reducción de la humedad, hasta devolver a las plantas a sus condiciones normales de humedad. Según Fernandez-Garcia *et al.* (2004) la formación del xilema y del floema en injertos de tomate ocurre después de 8 días de la realización del injerto. Transcurrido este periodo, y una vez que la unión del injerto era completa, las plantas eran trasplantadas a cultivo hidropónico y regadas con solución Hoagland diluida al 50% hasta que se les aplicaba el tratamiento salino con 150 mM de NaCl con un desarrollo de 10-11 hojas completamente desarrolladas.

## 6. Determinaciones para la caracterización fisiológica de las plantas

### 6.1. Desarrollo de la planta

A medida que avanzaban los diferentes ensayos, se realizaba el seguimiento del desarrollo de las plantas, tanto en condiciones no estresantes como bajo algún tipo de estrés, ya sea estrés hídrico o salino. Para ello se observaba la evolución del peso fresco de la planta completa, así como el peso por separado de la parte aérea y de la raíz. También se medía la altura de las plantas, la longitud de las raíces y el número de hojas.

También se estimó el crecimiento vegetativo de las plantas en base al incremento en longitud en el tiempo tanto para plántulas como plantas adultas, así como para raíces y hojas:

$$\text{Incremento de longitud} = \frac{(D1 - D2)}{(t1 - t2)}$$

Donde D1 y D2 son la longitud a evaluar en el tiempo 1 y 2, respectivamente, y donde t1 y t2 corresponden al tiempo en el que se llevó a cabo el primer y último muestreo respectivamente.

### 6.2. Determinación del peso fresco y peso seco de las plantas

Durante los muestreos de material vegetal, la planta se separaba en hojas, tallos y raíces, y se pesaban en peso fresco (PF) con una balanza de precisión. A continuación se introducían en una estufa a 70°C durante 48-72 horas y una vez habían perdido todo el contenido en agua, se pesaban en peso seco (PS) y se molían en un molinillo de aspas hasta la obtención de un polvo homogéneo. Las muestras se almacenaban en envases de

plástico guardados en desecadores con el fin de impedir la rehidratación de las mismas, hasta la realización de análisis posteriores.

### 6.3. Contenido de agua (CW)

El contenido de agua de los diferentes tejidos de las plantas se obtenía mediante la siguiente relación:

$$\text{Contenido de agua (g) (CW)} = \frac{(\text{Peso fresco (g)} - \text{Peso seco (g)})}{\text{Peso seco (g)}}$$

### 6.4. Pérdida de agua en hoja escindida

Para analizar la capacidad de pérdida de agua de los folíolos del mutante se procedía a cortar 12 folíolos de la 1ª hoja desarrollada pertenecientes a 6 plantas mutantes cultivadas en cámara en tratamiento control y otros 12 folíolos similares de plantas WT en las mismas condiciones y se seguía la evolución de la pérdida de peso de los folíolos durante 48 horas. La pérdida de peso se expresaba en porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial del folíolo.

### 6.5. Conductancia estomática (gs) y tasa de transpiración foliar (E)

La conductancia estomática y la transpiración foliar son importantes indicadores del estrés de las plantas, siendo un reflejo de la pérdida de agua de la hoja a través de los estomas y de la cutícula, aportando información sobre el funcionamiento de los estomas.

Para la medida de estos parámetros fisiológicos se empleaba una técnica no destructiva utilizando un sistema portátil de medida de fotosíntesis (CIRAS-2, PP-system, Amesbury, MA 01913 U.S.A.) en plantas intactas donde se determinaba en la 1ª hoja completamente desarrollada: la conductancia estomática (gs:  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), parámetro que mide el grado de apertura/cierre estomático por la tasa de entrada de  $\text{CO}_2$ /salida de  $\text{H}_2\text{O}$  por los estomas, y la tasa de transpiración foliar (E:  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Las medidas se realizaban siempre a la misma hora cada día, con el fin de eliminar las posibles variaciones en estos parámetros debidas al ciclo circadiano de las plantas y no a la condición experimental control vs. estrés, y se llevaba a cabo sobre hojas con un grado

de desarrollo similar. Las condiciones de trabajo del equipo CIRAS-2 eran las siguientes: la superficie foliar de medida fue de 1,7 m<sup>2</sup>, 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 era de 195 mL·min<sup>-1</sup>, se trabajaba a presión ambiental (1.010 mb) y la densidad del flujo de fotones (energía de la radiación fotosintéticamente activa o PAR) era de 500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### **6.6. Determinación del contenido en clorofila**

Las medidas del contenido en clorofila se realizaban en la 1<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada con un medidor SPAD-502 (Minolta®, Japón) que permitía calcular semi-cuantitativamente el contenido en clorofila mediante la medida de la fluorescencia de la clorofila a dos longitudes de onda distintas, una a la que absorbe la clorofila (650 nm, longitud de onda fotosintéticamente activa) y a otra longitud a la que no absorbe (940 nm) que permite compensar el grosor de la hoja (Ling *et al.*, 2011). El contenido en clorofila se expresaba en unidades relativas denominadas SPAD (Soil Plant Analysis Development, units) descrito por Hoel y Solhaug (1998) que correlacionan con el contenido en clorofila de la planta.

#### **6.7. Tinción DAB en folíolos**

La tinción DAB se utilizaba para detectar daño oxidativo secundario en los tejidos vegetales, ya que tras su aplicación las zonas de la planta con daño oxidativo aparecían con una coloración parda. La tinción se realizaba antes de aplicar el estrés (día 0) y después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl). La solución de tinción se preparaba disolviendo previamente 1,0 g del reactivo DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) en 1,0 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y posteriormente completando hasta un 1,0 L con tampón Tris-Acetato pH= 5,0 50 mM.

Para realizar la tinción, cortaba un foliolo de la 1<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada de la planta el cual se sumergía en un tubo Falcon con 40 mL de la solución DAB y se dejaba en incubación durante 24h en oscuridad a temperatura ambiente sin agitación. Una vez teñido se eliminaba la clorofila mediante lavados sucesivos con acetona al 40% (v/v), aumentando la concentración progresivamente hasta llegar al 80% y manteniendo la

solución en agitación. Una vez desteñidos los folíolos se almacenaban en solución tampón Tris-Acetato pH= 5,0 50 mM a temperatura ambiente hasta tomar las fotografías.

### **6.8. Obtención de extractos de las plantas para análisis químicos**

Los extractos de las muestras vegetales se obtenían mediante dos técnicas diferentes: 1) por digestión con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>)/ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) (2:1 v/v) para el análisis de cationes y 2) por centrifugación del material fresco para el análisis de todos los solutos y potencial osmótico.

- Digestión de muestras:

Para analizar la concentración de los distintos iones, se realizaban digestiones de material vegetal seco y molido (raíces, tallos y hojas) mediante el siguiente protocolo: En un tubo de vidrio se depositaban 100 mg del materia vegetal al que se le añadían 3 mL de una disolución HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> en proporción 2:1 y se introducía en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante un mínimo de 6 horas a 190°C. Cuando el material estaba totalmente digerido (transparente) se retiraban las muestras del digestor y, una vez enfriadas a temperatura ambiente, se enrasaban los tubos a 25 mL con agua destilada, se agitaba la muestra y se transferían a un recipiente limpio donde se almacenaban en refrigeración (4°C) hasta su posterior análisis.

- Obtención del extracto crudo por centrifugación:

Para la obtención del extracto crudo del material vegetal fresco (raíz y hoja) se llenaba una punta de pipeta de 5 mL con aproximadamente 8-10 gramos de tejido vegetal, a la que previamente se había colocado en la punta una pequeña cantidad de fibra de vidrio que actuaba como filtro del extracto. Las puntas eran congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaban a -20°C hasta que se continuaba el proceso de obtención de los extractos.

Cuando se iban a realizar los análisis, las puntas se dejaban descongelar a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de introducirlas en la centrifuga, este proceso de congelación-descongelación permitía la rotura de las células liberando su contenido al exterior. A continuación, las puntas se metían en tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaban en una centrífuga Heraeus labofuge II (Heraeus, Alemania) durante

15 minutos a 1.000 g y 4°C. El extracto obtenido se cuantificaba y alicuotaba en dos tubos de 1,5 mL los cuales se volvían a centrifugar a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C en una centrífuga Sigma 2k15 (B. Braun, Alemania), recogiendo el sobrenadante y quedando en el precipitado todas las impurezas, macromoléculas y restos celulares. Este extracto se conserva a -20°C hasta su posterior análisis.

### 6.9. Determinación de cationes

La medida de los cationes sodio (Na<sup>+</sup>), calcio (Ca<sup>2+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) se realizaba a partir del extracto vegetal crudo obtenido por centrifugación o bien a partir del material seco, molido y posteriormente digerido con HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> (2:1 v/v), descrito en el apartado 6.8. Las medidas se realizaban en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-óptico, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

### 6.10. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos

Para la determinación individual de los azúcares y los distintos ácidos orgánicos se siguió el protocolo descrito en Sánchez-Bel *et al.* (2012). La determinación individual de los azúcares y los ácidos orgánicos se realizaba mediante el equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC modelo LC-10Atvp (Shimadzu, 604-8511 Kyoto, Japón). Una dilución del extracto crudo obtenido por centrifugación se filtraba primero con un filtro de 0,45 µm (Syringe Filters PTFE, Macherey-Nagel CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra, Germany) y posteriormente con un filtro Spe-ed SPE Octadecyl C18/18% (Mini Spe-ed Cartridge, Macherey-Nagel CHROMABOND<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ec, Germany). Este extracto purificado era utilizado para las medidas en el HPLC 10A (Shimadzu, Japón) equipado con una bomba, un inyector automático, un horno, un detector de índice de refracción (RID) (modelo RID-10A de Shimadzu) para el análisis de carbohidratos y un espectrofotómetro UV/visible para la detección de ácidos orgánicos (modelo SPD-10Avvp de Shimadzu). Para la separación de los distintos elementos se utilizaba una columna de intercambio iónico ICE Coregel 87H3 (Transgenomic, EE.UU.). Las condiciones de trabajo del HPLC se especifican en la tabla 9. El área de los cromatogramas se integró y cuantificó utilizando el software de análisis DataAnalysis LC/MSD Trap Version 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania). La identificación y cuantificación de los azúcares y ácidos orgánicos se llevó

a cabo mediante curvas de calibración con patrones de 3000, 2400, 1200, 600, 300 y 150 ppm para cada metabolito analizado.

**Tabla 9. Condiciones de trabajo del HPLC tanto para azúcares como para ácidos.**

Fase móvil (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,1 N
Flujo	0,4 mL·min <sup>-1</sup>
Presión de la bomba	0,745 psi
Temperatura de la columna	37°C
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de cromatograma	30 min

### 6.11. Potencial hídrico

El potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) de las plantas se estimaba mediante una cámara de presión tipo Scholander modelo 3000 (PMS Instrument Company, Corvallis, OR). El método estaba basado en la medida de la salida de la savia del xilema de una hoja o tallo cuando la presión aplicada es suficiente para forzar la salida del agua de las células vasculares (Scholander *et al.*, 1964).

En esta técnica, se escinde el órgano a medir (generalmente se usa para hojas o pequeños brotes) y se sella en una cámara de presión. Antes de la escisión, la columna de agua en el xilema está bajo tensión. Cuando la columna de agua se rompe por la escisión del órgano (es decir, su tensión se alivia permitiendo que su presión hidrostática, que es negativa, se eleve a cero), el agua sale rápidamente del xilema hacia las células vivas que rodean el xilema, por ósmosis. La superficie de corte, en consecuencia se torna más opaca y seca. Para realizar una medición, el investigador presuriza la cámara con gas comprimido hasta que la distribución de agua entre las células vivas y los conductos del xilema retorna a su estado inicial, antes de la escisión. La presión necesaria para llevar el agua de nuevo a su distribución inicial se llama la presión de equilibrio y se detecta fácilmente por el cambio en el aspecto de la superficie de corte, que deviene húmedo y brillante cuando se alcanza esta presión (Taiz y Zeiger, 2007). Para el cálculo del potencial hídrico de cada planta se realizaban tres medidas en folíolos de la tercera o cuarta hojas completamente desarrolladas. Las medidas siempre se realizan en el mismo periodo de tiempo, tres horas a partir del inicio de la fase luminosa. Los resultados obtenidos vienen expresados en bares y se transforman a MPa (1 bar=0,1MPa).

### 6.12. Potencial osmótico

El potencial osmótico se determinó por el método crioscópico de depresión del punto de congelación, utilizando un osmómetro Osmometer Automatic (Roebing, Alemania) a partir de extracto crudo fresco (muestras obtenidas por centrifugación). El osmómetro crioscópico determina el potencial osmótico de una solución mediante la medición de su punto de congelación. Las soluciones tienen propiedades coligativas que colectivamente dependen del número de partículas disueltas y no de la naturaleza del soluto. Una de las propiedades coligativas de las soluciones es la disminución en el punto de congelación a medida que la concentración de soluto aumenta. Así, una solución que contiene 1 mol de solutos por kilogramo de agua tiene un punto de congelación de  $-1,86^{\circ}\text{C}$ , en comparación con el agua pura, cuyo punto de congelación es  $0^{\circ}\text{C}$  (Taiz y Zeiger, 2007).

Las medidas se realizaron a partir de extractos crudos individuales de folíolos (pool de folíolos de la misma hoja) y extractos de raíz (formando un pool) obtenidos por centrifugación y previamente congelados en nitrógeno líquido. Se realizan 3 medidas por individuo. El equipo se calibra en dos puntos: 1) agua destilada (que marca el valor 0) y 2) solución de NaCl de 300 mOsmol. Las medidas se realizan en 100  $\mu\text{L}$  de extracto. La transformación desde unidades mOsmol ( $\text{mmol de soluto osmóticamente activo} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) que proporciona el equipo a MPa se realiza por la equivalencia tal y como se describe en las especificaciones del fabricante:

$$\Psi_{\pi} \text{ (MPa)} = \left[ \frac{(-2 \times \text{mmol Kg}^{-1})}{1000} \right] \times \text{factor de dilución}$$

### 6.13. Potencial de turgor

Se calculó en base a la modificación de la ecuación que rige el potencial hídrico para el transporte del agua a nivel celular (Taiz y Zeiger, 2007). Se omite el componente gravitacional debido a que es despreciable en comparación con el potencial osmótico y el potencial hídrico. El potencial de turgor ( $\Psi_p$ ) se calculaba como la diferencia entre el hídrico ( $\Psi_w$ ) y el potencial osmótico ( $\Psi_{\pi}$ ). Todos los parámetros se expresaron en unidades de presión MPa.

$$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_{\pi}$$

## **7. Determinación de la densidad y apertura estomática por microscopía**

El número de estomas así como el grado de apertura de los mismos se determinaba sobre una sección de tejido epidérmico despojado de la superficie adaxial de la 1ª hoja completamente desarrollada de la planta, como es descrito por Driscoll *et al.* (2006). Las secciones epidérmicas eran sumergidas en tampón fosfato citrato (citrato de sodio 0,1 M, fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,5), montadas sobre un portaobjetos con tapa de vidrio y examinadas bajo un microscopio óptico Leica DMR. La densidad y apertura de los estomas se calculaban a partir de 15 imágenes digitalizadas seleccionadas al azar de las secciones de la epidermis tomadas en cada caso, utilizando el software de análisis fotográfico Sigma ScanPro, versión 5 (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.).

## **8. Técnicas de biología molecular**

### **8.1. Extracción de ADN genómico**

Para realizar la extracción de ADN genómico se usaba una modificación del protocolo de extracción descrito por (Rogers y Bendich, 1985). Para ello 100 mg de material vegetal congelado con N<sub>2</sub> líquido se trituraba en un tubo de 1,5 mL mediante un pistilo estéril y en tampón de extracción (0,2% β-mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS). El macerado se incubaba a 65°C durante 5 minutos, tras los cuales se añadían 150 μL acetato potásico 5 M, se agitaba, se dejaba incubarse en hielo durante 15 minutos y se centrifugaba a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El ADN situado en el sobrenadante era recuperado precipitándolo con isopropanol a -20°C y centrifugando durante 10 minutos a 14.000 rpm, 4°C. El precipitado se lavaba varias veces con etanol al 70% a -20°C. Por último el precipitado de ADN se resuspendía en agua destilada estéril y se almacenaba a -20°C hasta su análisis.

### **8.2. Extracción de ARN**

Para la extracción del ARN total se utilizaba material vegetal congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta el momento de la extracción. El material vegetal se trituraba con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido hasta la obtención de un fino polvo homogéneo. La extracción de ARN se llevaba a cabo con el kit comercial RNeasy Plant Mini (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para ello a 100 mg de material vegetal homogeneizado y congelado se

añadía 450  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis RLT que contenía tiocianato de guanidina, cuya principal función era la de provocar la lisis celular pero también la desnaturalización de proteínas y por tanto la inhibición de ARNasas y ADNasas del extracto. El buffer RLT se acondicionaba previamente con  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -ME por 1 mL tampón RLT) para inactivar eficazmente las ARNasas del lisado. El lisado se transfería posteriormente a una columna QIAshredder y se centrifugaba a 14.000 rpm durante 2 min para eliminar el material insoluble y homogenizar el extracto. Al sobrenadante resultante se añadía 0,5 volúmenes de etanol para clarificar y crear unas condiciones óptimas que promovieran la unión selectiva del ARN a la membrana de sílice de la segunda columna del Kit RNeasy. Una vez que el ARN se unía a la membrana de sílice de esta columna se realizaba un primer lavado con 350  $\mu\text{L}$  del tampón RW1, que contenía sales de guanidina y etanol, las cuales se utilizan para eliminar eficientemente biomoléculas contaminantes como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos etc., que no se unen específicamente a la membrana de sílice. Tras este primer lavado, y antes de continuar con el resto de lavados, se procedía al tratamiento de la membrana con ADNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen), con el objetivo de degradar el ADN genómico que pudiera haberse unido a la membrana. Posteriormente, la membrana se lavaba primero con 350  $\mu\text{L}$  de tampón RWI y posteriormente con dos lavados sucesivos con 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE. El tampón RPE contiene etanol y tenía como principal función eliminar cualquier traza de sal de la membrana proveniente de los tampones utilizados. Una vez purificado el ARN, se procedía a la elución del mismo con 30  $\mu\text{L}$  de agua pura libre de ARNasa y ADNasa (Qiagen), conservando la elución a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Para cada muestra se realizaban tres extracciones independientes de ARN (réplicas biológicas). 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 siguiendo los protocolos descritos en los apartados 8.3 y 8.4.

### **8.3. Cuantificación y pureza del ADN y ARN extraído**

La concentración y la pureza del ADN y ARN extraído se analizaban por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.) tomando los valores de absorbancia (Abs) a las longitudes de onda de 280 nm y 260 nm. Las relaciones  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$  y  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{230}$  se usaban para

estimar la contaminación del extracto de ARN por proteínas y fenoles ( $Abs_{260}/Abs_{280}$ ) y por polisacáridos ( $Abs_{260}/Abs_{230}$ ). Generalmente, se consideraba que una extracción de ARN era de alta pureza cuando el valor del ratio  $Abs_{260}/Abs_{280}$  se encontraba próximo a 2,0 pero no inferior a 1,8 y el del ratio  $Abs_{260}/Abs_{230}$  se encontraba entre 2,0-2,2.

#### 8.4. Determinación del estado de integridad y pureza del ARN por electroforesis en gel de agarosa

La ausencia de degradación y de contaminación por ADN genómico se comprobaba mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón SB 1x (10 mM NaOH, 48 mM  $H_3BO_3$ , pH 8,2). Para ello en el gel se cargaban 500 ng de ARN que se preparaba en tampón de carga (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific) y la separación electroforética se realizaba en tampón SB 1x a 100V durante 45 minutos. Para marcar los ácidos nucleicos el gel era sumergido durante 15 min en un baño de bromuro de etidio (43  $\mu$ M) en tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA, pH 8,5). Finalmente las bandas de ARN del gel se visualizaba a luz ultravioleta (UV) en un analizador de geles y fluorescencia G:BOX (Syngene, USA).

#### 8.5. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizaba a partir del ARN extraído, utilizando el Kit comercial iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Super Mix para RT-qPCR (BioRad) el cual contiene en un solo mix todos los componentes necesarios, excepto el ARN, para la síntesis de la primera hebra de ADNc: transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus Retro Transcriptase; M-MLV-RT), inhibidor de ARNasa, dNTps, oligo (dT), cebadores randomizados, tampón,  $MgCl_2$  y estabilizadores. La reacción se llevaba a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de ADNc es el descrito en la tabla 10.

Tabla 10. Mezcla de reacción final para una reacción simple de síntesis de ADNc.

Componentes	Volumen de reacción ( $\mu$ L)
5x iScript Supermix	4
ARN (200ng/ $\mu$ L)	5 (1 $\mu$ g de ARN)
Agua libre de ARN-ADNasa	11
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>

La mezcla de reacción se incubaba en un termociclador (Corbett Research PCR Palm Cycler; Qiagen, Sydney (Australia)) utilizando el programa descrito en la tabla 11.

**Tabla 11. Programa utilizado en el termociclador para la síntesis de ADNc.**

<b>Pasos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Hibridación de cebadores	25°C	5 min
Transcripción inversa	42°C	30 min
Inactivación de la RT	85°C	5 min
Mantenimiento	4°C	∞

El ADNc sintetizado se conservaba a 4°C hasta su posterior análisis.

### 8.6. PCR comprobativa

La presencia o ausencia de los genes marcadores (*nptII*) y delator (*uidA*) se identificaba mediante PCR comprobativa (reacción en cadena de la polimerasa) de ADN genómico. Para la amplificación de los distintos genes se utilizaba el esquema de reacción descrito en la tabla 12. La mezcla de reacción se incubaba en un termociclador (Corbett Research PCR Palm Cycler; Qiagen, Sydney (Australia)) utilizando el programa descrito en la tabla 13.

**Tabla 12. Mezcla de reacción final para una PCR comprobativa.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen de reacción (μL)</b>	<b>Concentración</b>
Agua destilada-esterilizada	15	
Tampon 10x (con Mg <sup>2+</sup> )	2	1X
dNTP (10 mM)	0,8	400 μM
Cebador A (20 μM)	0,5	0,5 μM
Cebador B (20 μM)	0,5	0,5 μM
<i>Taq</i> polimerasa (5U μL <sup>-1</sup> )	0,2	1U
Muestra ADN	1	< 100 ng/reacción
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>	

Tabla 13. Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR comprobativa.

Pasos		Temperatura	Tiempo
Iniciación		95°C	6 min
Síntesis de ADN (35X)	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Alineamiento	55°C/60°C*	30 seg
	Extensión	72°C	2 min
Elongación final		72°C	5 min
Conservación		4°C	

\* La temperatura de apareamiento para *nptII* es 60°C y para *uidA* es 55°C.

Entre paréntesis (35X) el número de ciclos.

Después de la amplificación en el termociclador el producto de PCR se corre en un gel para ver si ha amplificado y por tanto hay presencia de inserto. Para separar los fragmentos de ADN se han utilizado geles horizontales de agarosa al 0,8% (p/v) preparados en tampón SB 1x (12 mM NaOH, 38 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,2). Para ello el gel se cargaba con <100 ng de ADN (10µL) que se preparaba en tampón de carga (sacarosa 8,33% (p/v) Azul de bromofenol 0,04%, EDTA 0,017 M) y la separación electroforética se realizaba en tampón SB1x a 100V durante 40 minutos. Para marcar los ácidos nucleicos el gel era sumergido durante 15 min en un baño de bromuro de etidio (43 µM) en tampón TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA, pH 8,5). Finalmente las bandas de ADN del gel se visualizaba a luz UV en un analizador de geles y fluorescencia G:BOX (Syngene, USA). El tamaño de los fragmentos de interés se estimaba por comparación con un marcador comercial (GeneRuler™ 100pb ADN lader, Thermo Scientific).

Para cada gen se diseñaron cebadores específicos representados en la figura 15. En nuestro caso para el gen *uidA* se usaron los cebadores pD991-F y pD991-G, y para el gen *nptII* se usaron los cebadores pD991-I y pD991-J (Tabla 14).

Tabla 14. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes marcador (*nptII*) y delator (*uidA*).

Gen	Cebadores	Secuencia	Amplión
<i>uidA</i>	pD991-F	Sentido: 5'-GATCGCGAAAACGTGGAAT- 3' Antisentido: 5'-TTTTTGTACGCGCTATCAG- 3'	1103 pb
	pD991-G	Sentido: 5'-GATCGCGAAAACGTGGAAT- 3' Antisentido: 5'-TTTTTGTACGCGCTATCAG- 3'	838 pb
<i>nptII</i>	pD991-I	Sentido: 5'-GTCGGGTCACACTACGCATCAT- 3' Antisentido: 5'-TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT- 3'	986 pb
	pD991-J	Sentido: 5'-GCTCTTCGTCCAGATCATCC- 3' Antisentido: 5'-TTCAAATCAGTGCGCAAGAC- 3'	892 pb

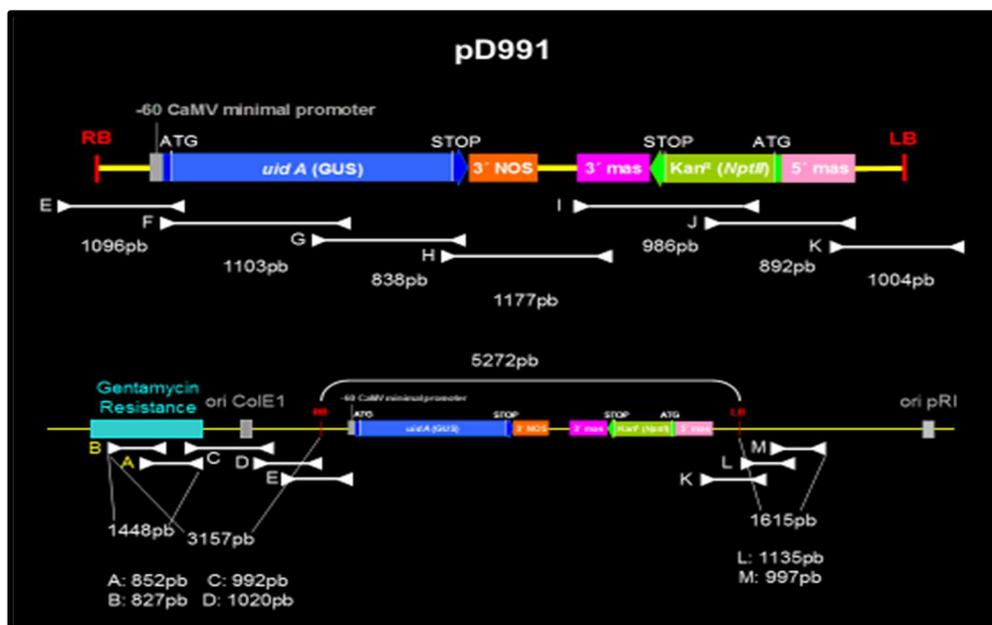


Figura 15. Cebadores diseñados para el vector pD991.

### 8.7. PCR cuantitativa a tiempo real

El nivel de expresión relativa de los genes de interés (Tabla 17) se analizaba mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). En esta técnica, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado sin necesidad del procesamiento post PCR de los productos amplificados, lo que incrementa el rendimiento y reduce la posibilidad de contaminación (Bustin y Nolan, 2004). El análisis por PCR a tiempo real está basado en la detección y cuantificación de ADN utilizando una sonda fluorescente. Mediante la detección de fluorescencia se puede medir, durante la

amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, lo que permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). Las sondas fluorescentes utilizadas pueden ser agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos (Bustin y Nolan, 2004). El fluoróforo específico de ADN bicatenario más usado en la RT-qPCR es el SYBR Green PCR (Qiagen, Holanda), y es el que hemos utilizado en esta tesis.

La PCR a tiempo real se realizaba en un RotorGen 3000 (Qiagen, Holanda). La mezcla de reacción final, descrita en la tabla 15, se llevaba a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

Tabla 15. Mezcla de reacción final para una PCR comprobativa.

Componentes	Volumen de reacción ( $\mu\text{L}$ )	Concentración
MasterMix 2x *	11,5	1X
Cebador A (20 $\mu\text{M}$ )	2	0,47 $\mu\text{M}$
Cebador B (20 $\mu\text{M}$ )	2	0,47 $\mu\text{M}$
Muestra ADNc	1	(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Agua libre de ARN-ADNasa	8,5	
<b>Volumen total</b>	<b>25</b>	

\* Rotor-Gene SYBR Green Mix (Qiagen)

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

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

Siendo Ct el ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra excede un valor umbral elegido, es decir, el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal asociada con un aumento exponencial del producto de PCR durante la fase

lineal logarítmica, y cuyo valor será inversamente proporcional a la cantidad de ADNc inicial. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por comparación con la muestra de referencia de WT en cada caso (generalmente raíz WT en ausencia de sal) a cuyo nivel de expresión se le daba el valor de 1. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y para cada ensayo de PCR se obtuvieron las curvas de *Melting* de los productos amplificados con el fin de identificar las posibles amplificaciones inespecíficas.

El protocolo de amplificación utilizado es el que se describe en la tabla 16:

**Tabla 16. Programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR comprobativa.**

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

Como gen normalizador se utilizaba el factor de elongación 1 alfa (*SIEF1a*, Elongation Factor 1 $\alpha$  accesión de GenBank AB061263), cuya expresión era constitutiva en el tomate y no se veía modificada por los tratamientos de estrés aplicados a las plantas. De cada ADNc, se utilizaron tres repeticiones analíticas, de esta forma, cada muestra venía representada por nueve repeticiones en total. Los cebadores se diseñaban a partir de las secuencias de unigenes disponibles para tomate en Sol Genomics Network (<http://solgenomisc.net/>). Las secuencias de los cebadores utilizados se recogen en la tabla 17.

**Tabla 17: Parejas de cebadores utilizados en los ensayos de PCR a tiempo real para cuantificar los niveles de expresión y tamaño del fragmento amplificado.** Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados y purificados por filtración en gel por la compañía Life Technologies (Reino Unido).

Gen	Cebadores	Amplificación	Eficiencia
<i>SICBL10</i>	Sentido: 5'-CCATTATTGCACTCATTGAAGC-3' Antisentido: 5'-AGCAAGGTCCGTGTATTCGT-3'	104 pb	100%
<i>SICAX1</i>	Sentido: 5'-GACTTGCACCTCTTGCTGAA-3' Antisentido: 5'-ATCTCAGTTGCATTCCCACA-3'	112 pb	105%
<i>SISOS1</i>	Sentido: 5'-TCGAGTGATGATTCTGGTGG-3' Antisentido: 5'-ATCACAGTGTGAAAGGCTC-3'	129 pb	107%
<i>SISOS2</i>	Sentido: 5'-CTGCTTAGGACAAGGACTCG-3' Antisentido: 5'-GCAGTTACACACTATAACC-3'	112 pb	109%
<i>LeNHX1</i>	Sentido: 5'-GACAGTCCTGGAAAATCT-3' Antisentido: 5'-GGTTATCAGCCCAAACACC-3'	291 pb	99,8%
<i>LeNHX3</i>	Sentido: 5'-CTCAAGAGTCACCACCAAGCA-3' Antisentido: 5'-CCAACCAAACAAGACCCAACA-3'	153 pb	93,3%
<i>SIHKT1;1</i>	Sentido: 5'-TCTAGCCCAAGAACTCAAAT-3' Antisentido: 5'-CTAATGTTACAACCTCCAAGGAATT-3'	178 pb	98,5%
<i>SIHKT1;2</i>	Sentido: 5'-TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG-3' Antisentido: 5'-AGAGAGAACTAACGATGAACC-3'	188 pb	106,8%
<i>SIEF1a</i>	Sentido: 5'-GACAGGCGTTCAGGTAAGGA-3' Antisentido: 5'-GGGTATTCAGCAAAGGTCTC-3'	119 pb	99,8%

### 8.8. Genotipado

El grupo de Biología Molecular dirigido por el profesor Rafael Lozano (Universidad de Almería) realizaba en primer lugar un análisis *Southern blot* para determinar el número de insertos T-DNA que presentaba cada línea mutante, y seguidamente identificaba por *Anchor PCR* el lugar de inserción del T-DNA y la clonación de las regiones del genoma de tomate flanqueantes al T-DNA (Giménez *et al.*, 2010).

Una vez se conocían por *anchor PCR* las secuencias del genoma del tomate flanqueantes al T-DNA era posible detectar mediante PCR si la inserción de T-DNA se encontraba en homocigosis o en heterocigosis en el genoma de la planta. De esta manera, se podía además, correlacionar la presencia/ausencia de un T-DNA con el fenotipo mutante. Para ello, se diseñaban cebadores que permitían amplificar una parte del genoma

de la planta y un fragmento del T-DNA, y otros cebadores que amplificaban solamente genoma de la planta cuando no está presente el T-DNA. De esta forma se podía detectar la presencia del T-DNA en acigosis, heterocigosis u homocigosis. Esta técnica era realizada por el grupo de Biología Molecular dirigido por el profesor Rafael Lozano (Universidad de Almería).

## 9. Tratamiento estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo aplicando los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 19.0. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (ES) y se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si había diferencias entre medias. Para estudiar si había diferencias significativas entre pares de medias se aplicó el test estadístico de t de Student considerando un nivel de confianza de  $p < 0,05$ . Para el análisis genético de las poblaciones segregantes, con el fin de comprobar si la mutación responsable del fenotipo es monogénica y dominante o recesiva, se aplicó el test  $\chi^2$ . Se realizaron un mínimo de 6 medidas por línea y tratamiento y siempre en las mismas plantas durante todo el tratamiento.





# **CAPÍTULO I. RESULTADOS**



## IV. CAPÍTULO I.

### IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES

#### RESULTADOS

##### 1. Identificación y caracterización de mutantes de la especie silvestre *S. pennellii*.

*Solanum pennellii* es una especie de tomate silvestre endémica de las regiones andinas de América del Sur, donde ha evolucionado para prosperar en hábitats áridos. Debido a su tolerancia al estrés extremo y morfología inusual, es un donante importante de germoplasma para el tomate cultivado (Koenig *et al.*, 2013; Bolger *et al.*, 2014). La colección de líneas T-DNA se generó a partir de una accesión (PE47) con mecanismos de tolerancia a la salinidad que difieren de los que normalmente presenta el tomate cultivado (Bolarin *et al.*, 1991; Alarcon *et al.*, 1993; Cano *et al.*, 1996; Santa-Cruz *et al.*, 1999). La caracterización fenotípica de líneas T-DNA procedentes de la transformación genética de *S. pennellii* en la primera generación (TG1) permitió identificar en nuestro laboratorio algunos mutantes dominantes afectados en el desarrollo vegetativo y en el grado de tolerancia a salinidad (Moyano Solera, 2014).

Tras obtener una línea T-DNA, fue necesario conseguir réplicas clonales TG1 con el fin de poder mantener un número mínimo de copias en la colección *in vitro* y llevar plantas a invernadero, así como disponer de suficientes réplicas para identificar mutaciones dominantes mediante el cultivo en medio salino. Por consiguiente, al menos 4-5 plantas de cada línea se trasplantaron al invernadero para obtener semillas de la segunda generación (TG2) y así poder identificar mutaciones recesivas (Ver esquema de trabajo: **figura 16**). En el presente trabajo, se han evaluado alrededor de 100 líneas de *S. pennellii* en la población TG1, para identificar mutaciones dominantes, y en la población segregante TG2, para identificar mutaciones recesivas. Uno de los mutantes identificados en la población TG2 estaba afectado en el desarrollo vegetativo (4607-ETSP), y otros tres mutantes estaban afectados en la tolerancia a la salinidad, uno de ellos fue identificado en la población TG1 (4706-ETSP) y otros dos identificados en la población segregante TG2 (4762-ETSP y 4656-ETSP). El protocolo de identificación de mutantes consistió en cultivar plantas de la población segregante TG2 tanto en condiciones control como en medio salino (200 mM de NaCl), aplicado cuando las plantas habían desarrollado 2 hojas

verdaderas. De esta manera se pudo llegar a identificar simultáneamente mutantes de desarrollo y mutantes de estrés, e incluso mutantes afectados en ambos procesos, desarrollo y estrés.

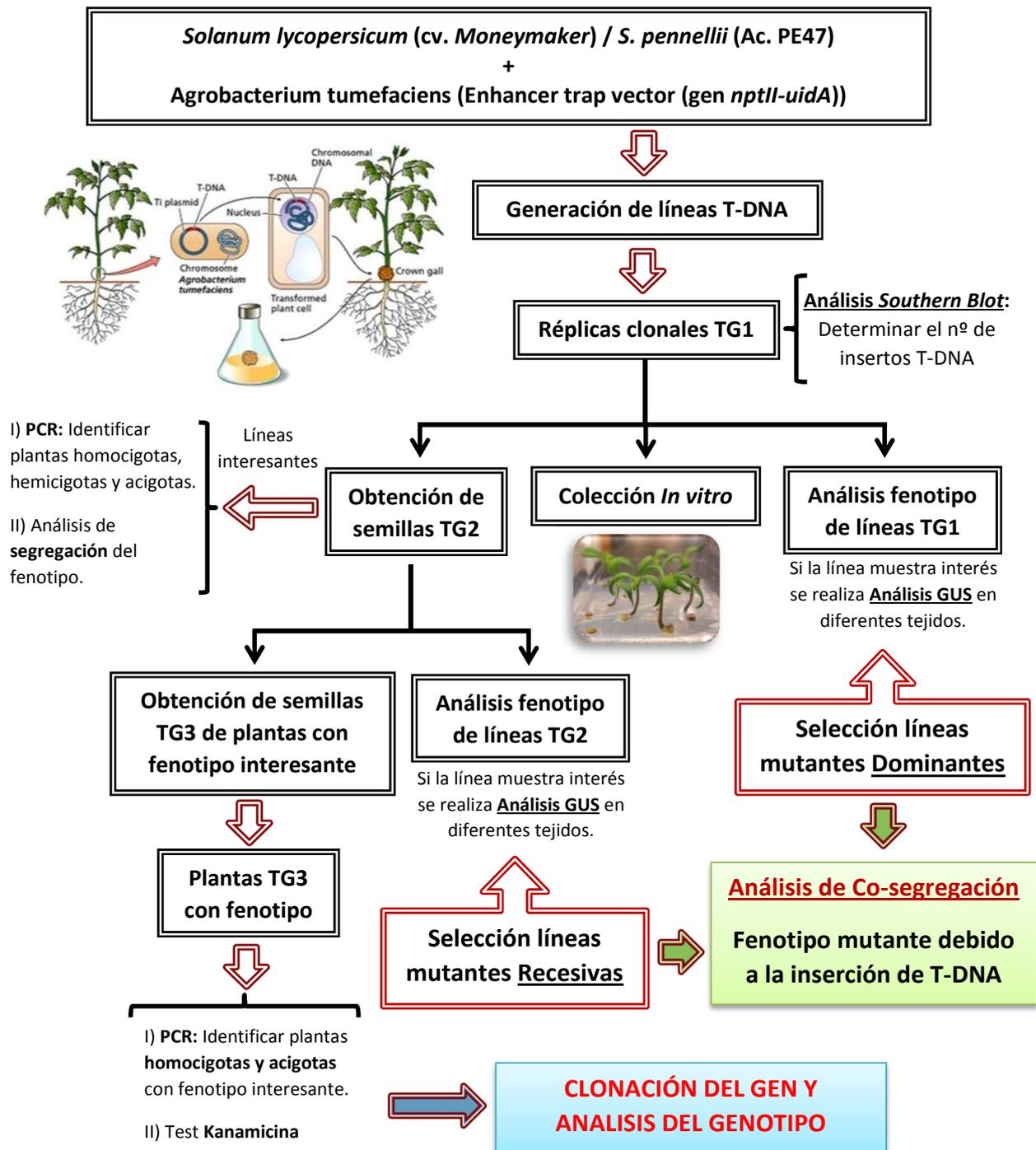
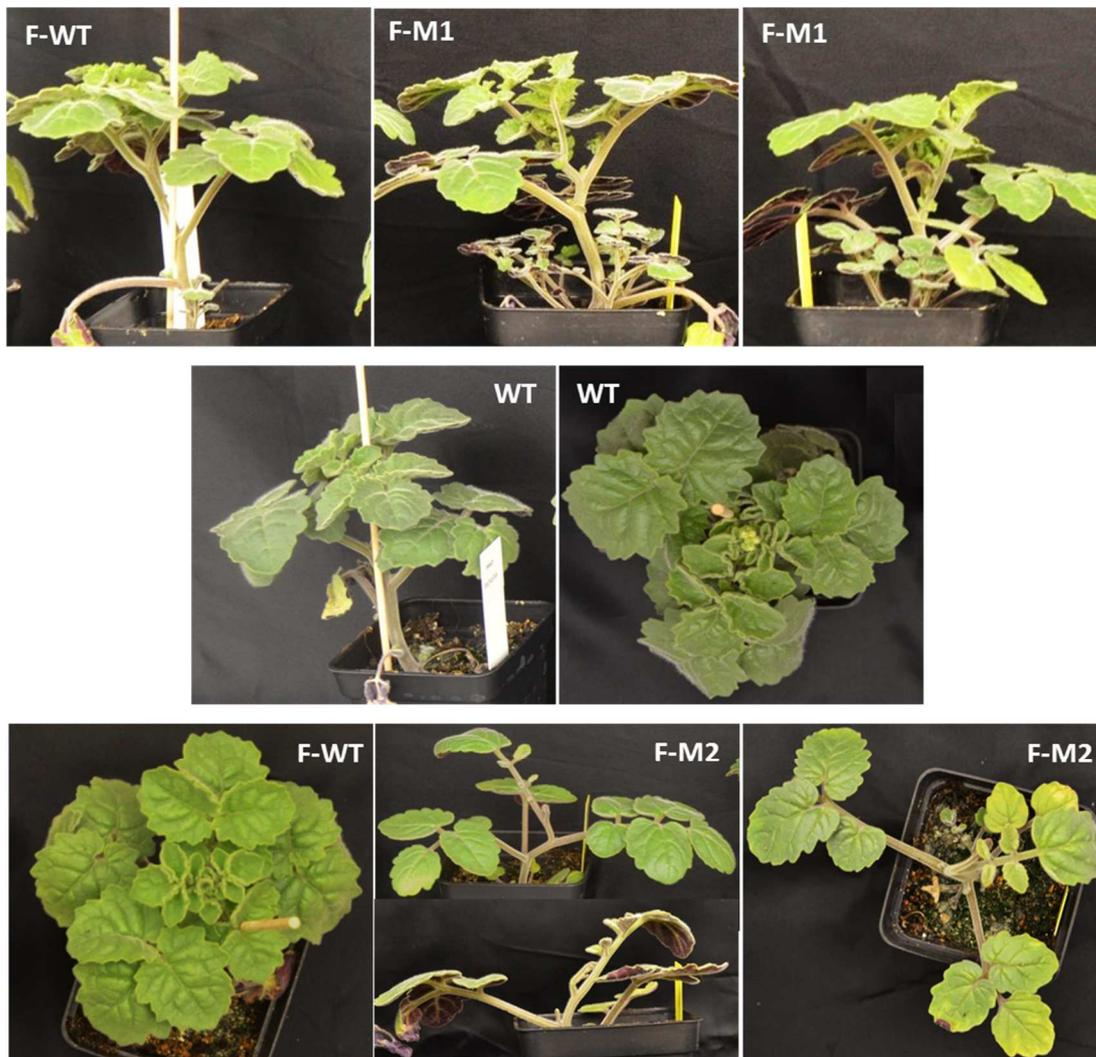


Figura 16: Esquema de trabajo

### 1.1. Identificación del mutante 4607-ETSP de *S. pennellii* afectado en el desarrollo vegetativo

Un ensayo con 87 plantas TG2 de la línea 4607-ETSP permitió observar que la línea segregaba para dos fenotipos mutantes. El denominado fenotipo mutante 1 mostraba una muy alta brotación lateral (40 plantas con este fenotipo) mientras que el fenotipo mutante 2 estaba asociado al crecimiento determinado (15 plantas con este fenotipo), ya que el ápice se atrofiaba después del desarrollo de la 2ª – 3ª hoja y por último plantas que mostraban un fenotipo silvestre o Wild Type (WT) (30 plantas de la línea mutante con fenotipo WT) (**Figura 17**).



**Segregación: 32 fenotipo WT : 40 fenotipo mutante 1 : 15 fenotipo mutante 2**

**Figura 17. Fenotipos mutantes identificados en la población segregante TG2 de la línea 4607 ETSP.** Plantas de la línea 4607 ETSP con fenotipo WT (F-WT), plantas con fenotipo mutante 1 (F-M1), plantas con fenotipo mutante 2 (F-M2) y plantas sin transformar (WT).

Con el fin de identificar el número de insertos T-DNA que podrían provocar los fenotipos mutantes observados se llevó a cabo la técnica de *Southern blot*. Para ello, se tomó material vegetal por separado de las plantas con fenotipo WT (F-WT), plantas con fenotipo mutante 1 (F-M1) y plantas con fenotipo mutante 2 (F-M2) que se congeló y envió al departamento de Biología Molecular dirigido por el profesor Rafael Lozano (Universidad de Almería) donde se realizó el *Southern blot*. El análisis por *Southern blot* indicó la presencia de dos insertos T-DNA en tándem y actualmente este mutante está siendo estudiado por los grupos especialistas en desarrollo. El hecho de que aparezcan 2 mutaciones en una misma línea no es puntual, ya que en otros laboratorios también se han identificado líneas con más de una mutación de desarrollo vegetativo y/o reproductivo.

En relación con los mutantes afectados en tolerancia a salinidad, este trabajo se ha centrado en primer lugar en llevar a cabo la caracterización de un mutante dominante (seleccionado en la primera generación TG1) denominado *sl-1* (*succulent leaves-1* mutant) por presentar hojas muy suculentas y de color verde oscuro, aspectos fenotípicos que pueden ser interesantes al enfrentarse al estrés salino (Atarés *et al.*, 2011). También se han identificado dos mutantes recesivos en la segunda generación (TG2) que están afectados en la tolerancia a la salinidad, lo que es de gran interés ya que dada la tolerancia de esta especie es previsible que haya tenido lugar la disrupción de un gen clave en la tolerancia a salinidad.

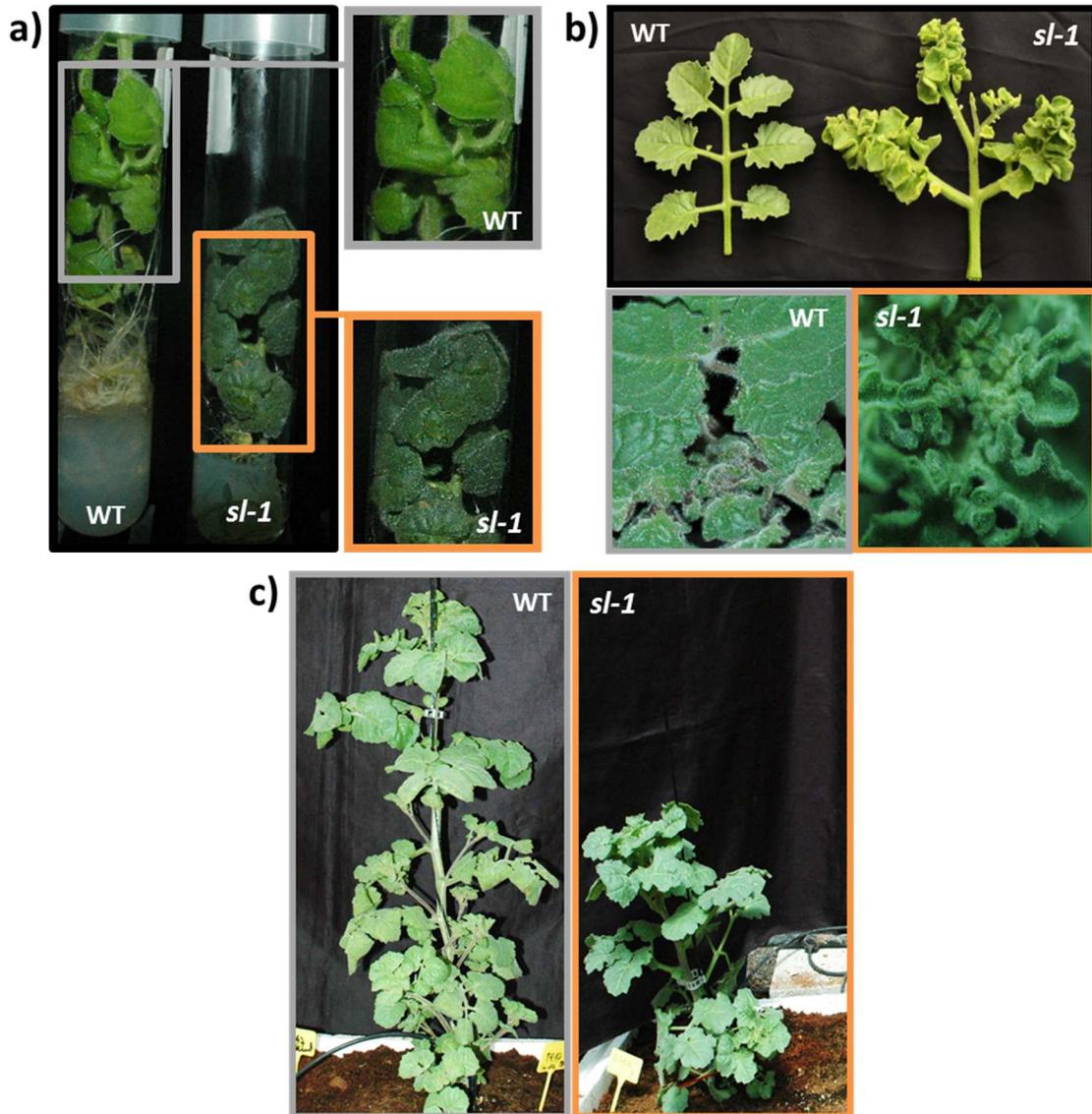
## 1.2. Caracterización del mutante *sl-1* (*succulent leaves-1*)

### 1.2.1. Caracterización fenotípica y fisiológica en condiciones control

El interés de llevar a cabo la caracterización del mutante *sl-1* se debió a que las alteraciones observadas en el desarrollo vegetativo del mismo podrían modificar los mecanismos de tolerancia a la salinidad, es decir, que fuera un mutante de desarrollo y de estrés. El fenotipo mutante se caracterizó inicialmente *in vitro*. Las 6 réplicas clonales cultivadas en medio MS fueron de menor tamaño que las plantas sin transformar (WT), presentaron un porte compacto y hojas de color verde oscuro (**Figura 18a**).

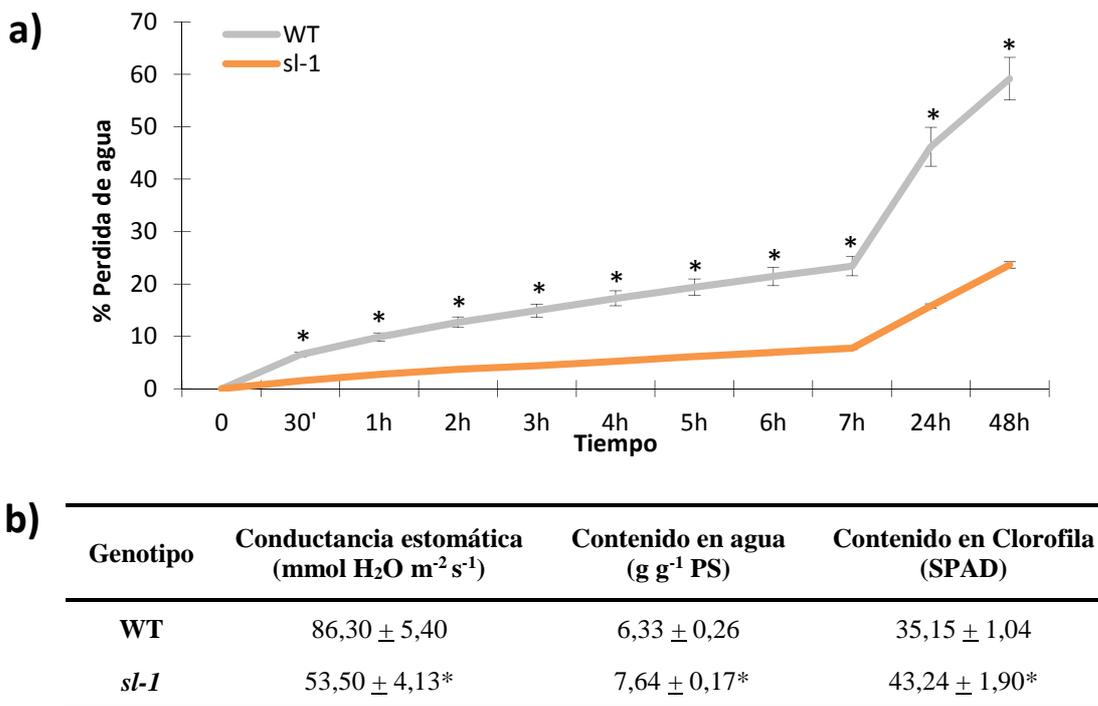
Tras la identificación del fenotipo mutante *in vitro*, se procedió a llevar a cabo la caracterización fenotípica y fisiológica del mutante *in vivo*. Para ello, réplicas clonales de plantas sin transformar (WT) y plantas mutantes *sl-1* se cultivaron a medio plazo en

condiciones controladas (30 días después de la aclimatación de *in vitro*) y se trasladaron al invernadero para completar el ciclo de cultivo y obtener semillas (**Figura 18b y c**). Las plantas mutantes presentaron un fenotipo compacto en comparación a las plantas sin transformar, con entrenudos más cortos y hojas crasas, siendo por tanto el fenotipo *in vivo* similar al observado previamente *in vitro*. En el detalle del ápice del mutante se observa el grosor de las hojas y los folíolos como aserrados debido a su compacidad.



**Figura 18: Fenotipo *in vitro* e *in vivo* del mutante *sl-1* (*succulent leaves-1*).** a) Seis réplicas clonales de plantas sin transformar (WT) y plantas mutantes *sl-1* eran desarrolladas en medio MS durante 30 días. A la derecha, ampliación de la zona marcada. b) Detalle de la hoja y ápice donde se observa el alto grado de compacidad y las hojas crasas o succulentas de las plantas mutante desarrolladas en cámara de condiciones controladas durante 30 días (desde la aclimatación). c) Fenotipo representativo de plantas WT y mutantes después de 30 días de su trasplante al invernadero.

De acuerdo con el aspecto craso de las hojas, este mutante podría ser capaz de evitar, al menos parcialmente, la deshidratación ante una situación de estrés osmótico, provocado tanto por estrés hídrico como salino. Para comprobar la velocidad de deshidratación de los folíolos, se determinó el porcentaje de pérdida de peso durante 48 horas de folíolos escindidos de plantas WT y mutante desarrolladas sin estrés (**Figura 19**). Se comprobó que los folíolos de las plantas de la línea mutante perdían agua mucho más lentamente que los folíolos de las plantas WT. Estas diferencias se observaron desde 30 minutos después de cortarse los folíolos, aumentando progresivamente a lo largo del tiempo. Durante las primeras 7 horas los folíolos del mutante solo redujeron su peso un 8%, mientras que los folíolos del WT perdieron un 24% de su peso, llegando a una diferencia del 35% a las 48 horas. Estos resultados sugieren que podríamos estar ante un mutante con mayor capacidad para evitar la deshidratación ante una situación de estrés.



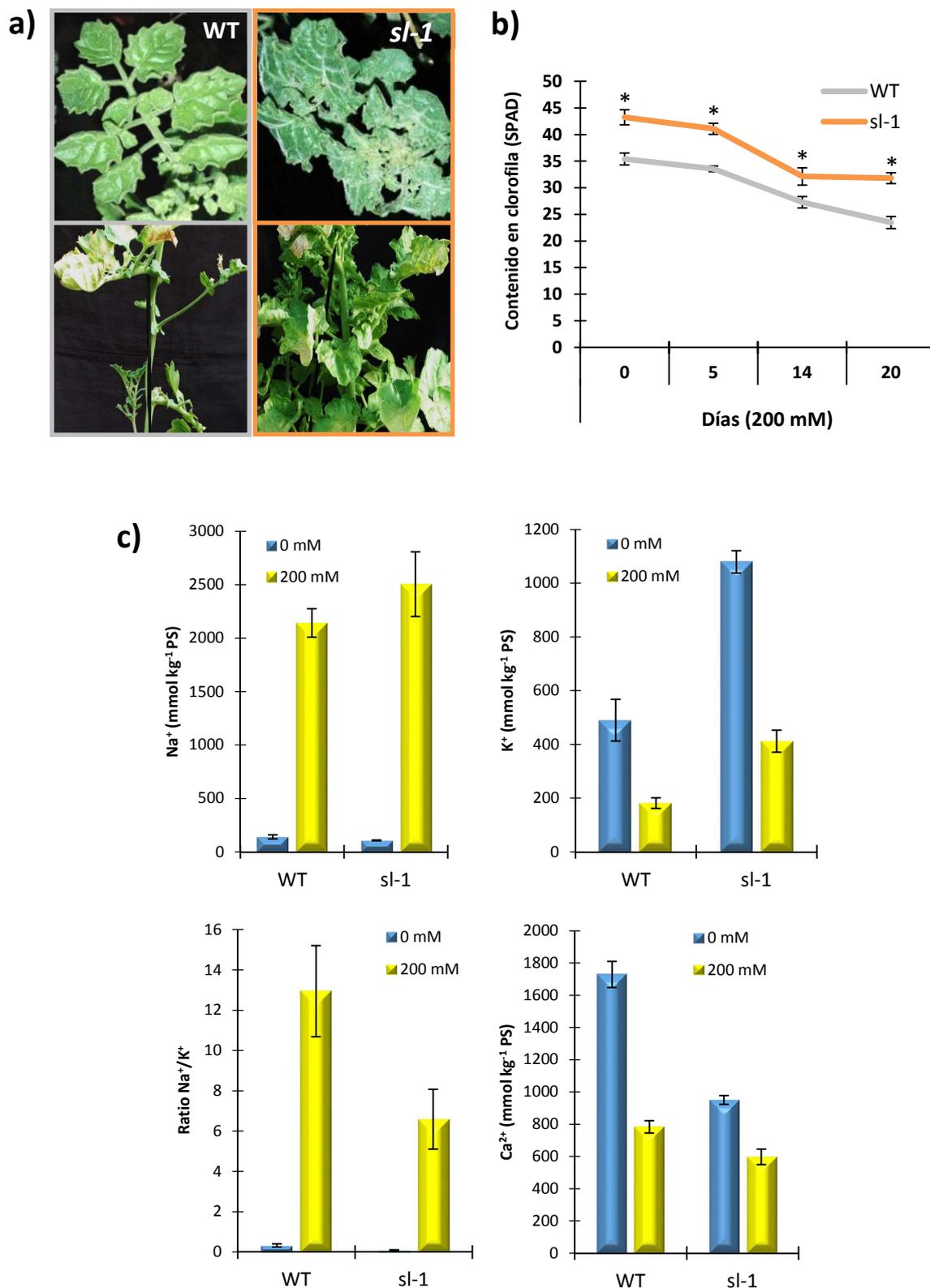
**Figura 19: El mutante *sl-1* tiene mayor contenido de agua en hoja en condiciones control.** a) Evolución del porcentaje de pérdida de agua durante 48 horas en hojas escindidas de plantas WT y mutante desarrolladas en condiciones control. Los valores son expresados como porcentaje de pérdida de agua relativa a cada tiempo respecto al peso fresco inicial al tiempo 0. b) Valores medios de conductancia estomática, contenido de agua y contenido de clorofila de hojas WT y mutante (6 réplicas clonales) de las mismas plantas. (n = 6, valores medios ± ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

También se midió la conductancia estomática ( $g_s$ ) y el contenido de agua en las hojas de estas plantas con el objetivo de comprobar si la mayor capacidad del mutante

para evitar la deshidratación estaba asociada con cambios en  $g_s$  y se reflejaba en un mayor contenido de agua de la hoja (**Figura 19b**). Efectivamente,  $g_s$  fue un 38% menor en las hojas del mutante *sl-1* que en las del WT. Si se tiene en cuenta que la medida de conductancia engloba la estomática y la cuticular, el menor valor de conductancia en el mutante se pudo deber a una alteración en la densidad estomática y/o apertura estomática o bien puede deberse a una menor pérdida de agua por la cutícula, e incluso a ambas. Por otro lado, el mutante además presentó mayor contenido de agua en las hojas en comparación con WT lo que concuerda con los datos fisiológicos obtenidos de conductancia y porcentaje de pérdida de agua. Finalmente, el mayor contenido de clorofila del mutante reflejó el color verde intenso de sus hojas en comparación con las hojas WT (**Figura 19b**).

### 1.2.2. Caracterización fenotípica y fisiológica en condiciones de salinidad

La respuesta del mutante al estrés salino se estudió en plantas adultas, en cultivo de verano en invernadero, donde se alcanzaron temperaturas superiores a 35°C y la tasa de transpiración fue muy alta, y se aplicó un alto nivel de estrés durante 30 días (200 mM de NaCl). Durante los primeros 14 días de tratamiento salino (14 DTS) ya se empezaron a observar diferencias entre las plantas WT y mutantes, observándose como las plantas WT mostraban mayor clorosis que el mutante y síntomas de engrosamiento de las hojas provocado por la toxicidad de iones salinos. A partir de los 20 DTS las plantas WT empezaron a mostrar zonas necróticas en los folíolos, y este síntoma fue mucho más severo al final del ensayo (30 DTS), mientras que la extensión de las zonas con pérdida de clorofila y necróticas en las hojas del mutante fue mucho menor (**Figura 20a**). La evolución del contenido de clorofila en hojas se midió hasta los 20 DTS, puesto que posteriormente las hojas del WT estaban muy afectadas por la salinidad. Se observó que las diferencias que muestran las hojas WT y mutante en condiciones control (día 0) se mantienen a lo largo del periodo de estrés (**Figura 20b**), lo que podría ser uno de los motivos por los que el mutante presenta menos clorosis con respecto a WT. Estos resultados sugieren que la alteración en el desarrollo mostrada en la planta mutante *sl-1* podría contribuir a mejorar su tolerancia a la salinidad.



**Figura 20. Respuesta del mutante *sl-1* a la salinidad.** a) Fenotipo de las plantas WT y mutante *sl-1* después de 30 días de tratamiento salino (200 mM de NaCl) en invernadero. b) Evolución del contenido en clorofila durante los primeros 20 días de tratamiento salino. c) Concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, y relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en hoja después de 30 DTS (valores medios ± ES). \* Diferencia entre medias (LSD 5%).

En cuanto al contenido de agua en hoja, aunque fué significativamente superior en las plantas mutantes con respecto al WT en ausencia de estrés (**Figura 19b**), después de 20 DTS estas diferencias desaparecieron ( $9,0 \pm 0,3$  y  $8,3 \pm 0,4$  g g<sup>-1</sup> PS en WT y mutante, respectivamente). Antes de aplicar el tratamiento salino (día 0) y al final del experimento (30 DTS), se tomaron folíolos de la 2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante (6 plantas por línea), y se analizaron las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (**Figura 20c**). Mientras que no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de Na<sup>+</sup> de WT y mutante, los niveles de K<sup>+</sup> fueron mucho más elevados en las hojas de las plantas mutante que en las WT. Es interesante señalar que ya antes de aplicar el estrés salino (día 0) la concentración de K<sup>+</sup> fué más del doble en el mutante que en WT, y estas diferencias se mantuvieron, aunque en menor medida durante todo el tratamiento salino, al igual que ocurrió con el contenido en clorofila. El mayor contenido de K<sup>+</sup> en hoja fué el responsable de que la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> fuera menor en las plantas mutantes que en WT durante el tratamiento salino. Concretamente, la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en hojas de las plantas desarrolladas en sal fué más del doble en WT que en el mutante (**Figura 20c**). Estos resultados sugieren que la mayor capacidad del mutante para mantener valores menores de la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> podría ser otro de los factores por los cuales el mutante toleró mejor el estrés salino en condiciones de alta transpiración (cultivo primavera-verano).

Sin embargo, la concentración de Ca<sup>2+</sup> fue mucho más elevada en las hojas de plantas WT que en el mutante *sl-1* en condiciones control (**Figura 20c**). La menor concentración de Ca<sup>2+</sup> en hoja podría estar relacionado con la menor conductancia estomática que se observó en el mutante en control, ya que algunos autores han sugerido que el Ca<sup>2+</sup> es un factor clave en la regulación de los movimientos de los estomas (Conn y Gilliam, 2010; Conn *et al.*, 2011). A los 30 DTS, la reducción en la concentración de Ca<sup>2+</sup> fué importante en ambos genotipos, aunque superior en WT (el Ca<sup>2+</sup> desciende un 55% y un 38% en plantas WT y mutante, respectivamente).

El conjunto de resultados obtenidos en la caracterización del mutante *sl-1* muestra que las características diferenciales del mutante en condiciones control, tales como mayor contenido en agua, clorofila y K<sup>+</sup> en hoja, así como una menor conductancia, podrían predisponer al mutante para tolerar mejor el estrés salino, a pesar de que la respuesta fisiológica a la salinidad fue similar a la observada en WT. En este sentido a pesar de que el mutante también perdió clorofila durante el tratamiento salino, la mayor concentración

en la misma pudo impedir la aparición de clorosis en las hojas durante el tratamiento salino. Del mismo modo, la mayor concentración de  $K^+$  en hoja en el mutante pudo ser el responsable de que, a pesar de que el aumento de  $Na^+$  en hoja fue similar en ambos genotipos, y que tanto mutante como WT perdieron  $K^+$  durante el tratamiento salino, la relación  $Na^+/K^+$  fuera mucho menor en el mutante. La mayor concentración de  $K^+$  en el mutante pudo estar relacionado con un mejor mantenimiento de sus funciones metabólicas en condiciones de salinidad. Algunos estudios han sugerido que la mayor tolerancia a la salinidad de *S. pennellii* no se correlaciona únicamente con una elevada relación  $Na^+/K^+$  sino con un uso más eficiente del  $K^+$  (Tahal *et al.*, 2000; Rengel y Damon, 2008).

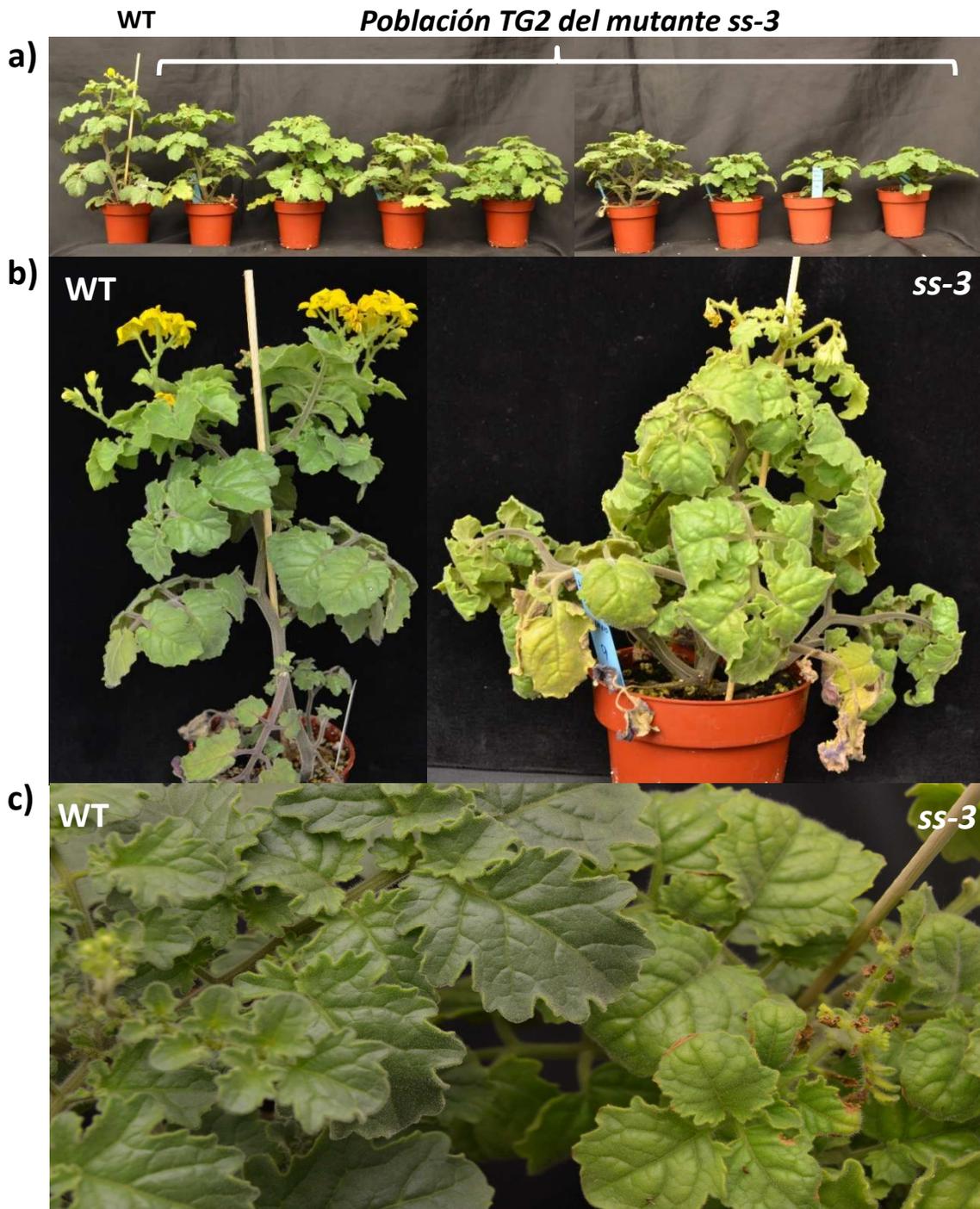
El problema para avanzar con este mutante es que las plantas TG1 no producen polen y, por tanto, no se ha podido obtener semillas de la siguiente generación (TG2), a pesar de los grandes esfuerzos realizados para conseguir o bien TG2 o bien cruces con tomate (modificación de épocas de cultivo, tipo de poda, polinización manual, etc).

### 1.3. Identificación y caracterización del mutante *ss-3* (*salt sensitive-3*)

El mutante 4762-ETSP se denominó *ss-3* (*salt-sensitive-3*) siguiendo la nomenclatura propuesta por Atarés *et al.* (2011) para los mutantes de *S. pennellii* afectados en la tolerancia a salinidad. Se realizaron dos ensayos en cámara de cultivo utilizando 12 plantas (TG2) de la línea mutante *ss-3* y 5 plantas sin transformar (WT). En ausencia de estrés salino, se observó una segregación recesiva 3:1 para desarrollo de esta línea, mostrando 3 plantas un desarrollo muy inferior a WT y 9 plantas TG2 un desarrollo mayor aunque sin llegar al estado de desarrollo de las plantas WT. Es de resaltar que, en ausencia de estrés salino, todas las plantas TG2 de esta línea presentaban un fenotipo más compacto que el WT (**Figura 21a**).

El tratamiento salino (200 mM de NaCl durante 15 días) se aplicó cuando las plantas tenían 5-6 hojas verdaderas. Las plantas WT no mostraron síntomas de sensibilidad tras el tratamiento salino aplicado, y todas ellas tenían flores completamente desarrolladas, mientras que 9 de las 12 plantas de la población TG2 mostraron síntomas de mayor sensibilidad al estrés salino, con clorosis generalizada en toda la planta, quemaduras en los folíolos, sobre todo en los de las hojas jóvenes, y necrosis en los botones florales (**Figura 21b y c**). De estos resultados se deduce que la línea presentaba una segregación

dominante (1:3) para la sensibilidad al estrés salino. Por otro lado, de las 3 plantas mutantes identificadas con un menor tamaño en condiciones control, solo 1 de ellas mostró fenotipo sensible a la salinidad, lo que parece apuntar que en el mutante no hubo correlación entre el fenotipo de desarrollo y la sensibilidad a la sal.



**Figura 21. Identificación del mutante *ss-3* (*salt-sensitive-3*).** a) Fenotipo de las plantas TG2 de la línea 4762-ETSP desarrolladas en ausencia de sal, en comparación con el fenotipo del WT (Izquierda). b) Planta WT y mutante tras 15 días de tratamiento salino (DTS) a 200 mM de NaCl. Además de la clorosis inducida por la salinidad en las hojas, el rasgo fenotípico más evidente en el mutante fue el retraso en la floración y la necrosis de los botones florales (c).

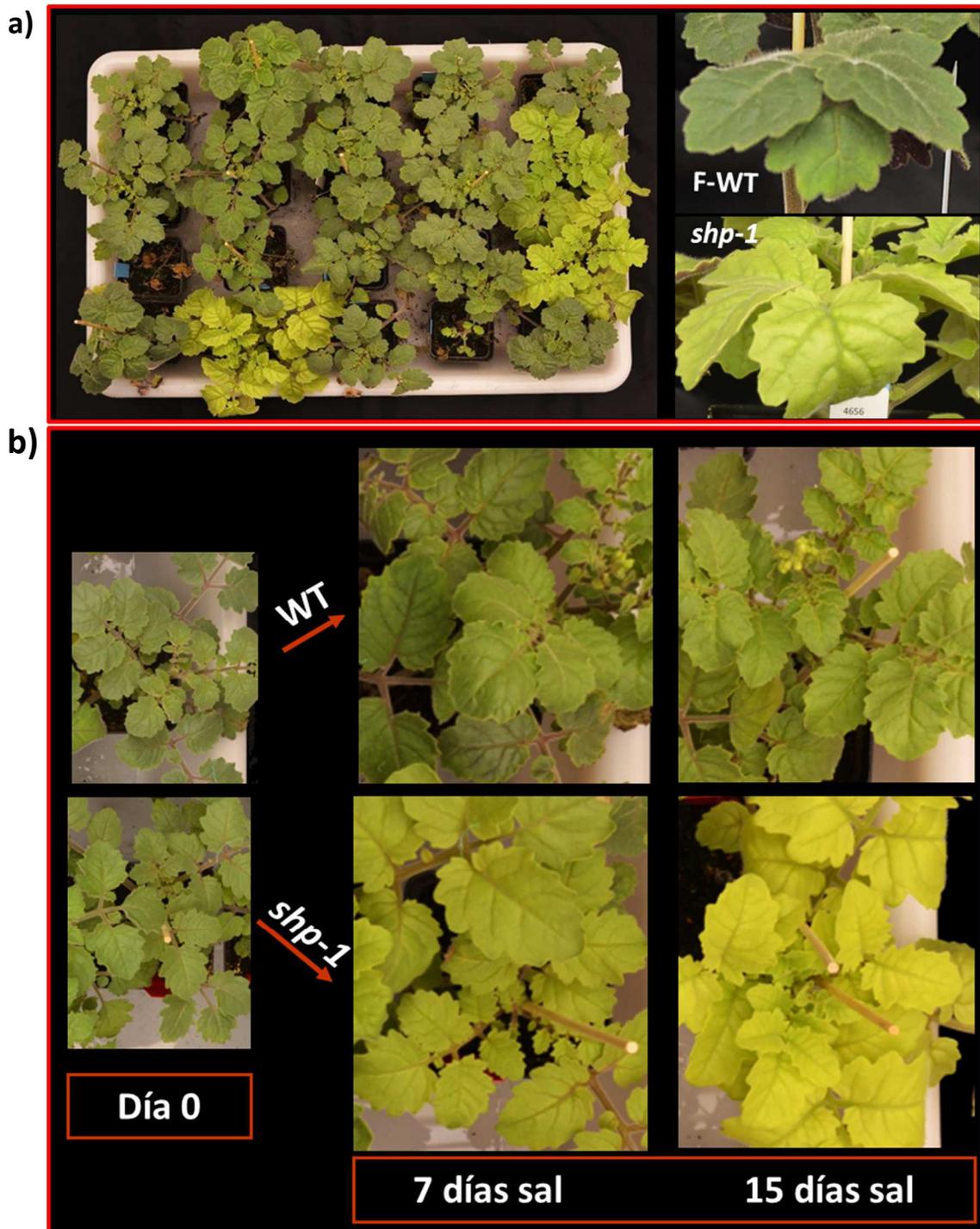
En un tercer ensayo realizado con esta línea, en el que se utilizaron 113 plantas TG2 y 55 plantas sin transformar (WT), se confirmaron los resultados anteriores sobre el retraso de la floración en esta línea y la necrosis inducida por la salinidad en los botones florales. Actualmente se está avanzando en la caracterización de esta línea para determinar si es un mutante insercional, es decir, si todas las plantas mutantes que presentan sensibilidad al estrés salino contienen en su genoma el inserto T-DNA.

#### **1.4. Identificación y caracterización del mutante *shp-1* (*salt hypersensitive pennellii-1*)**

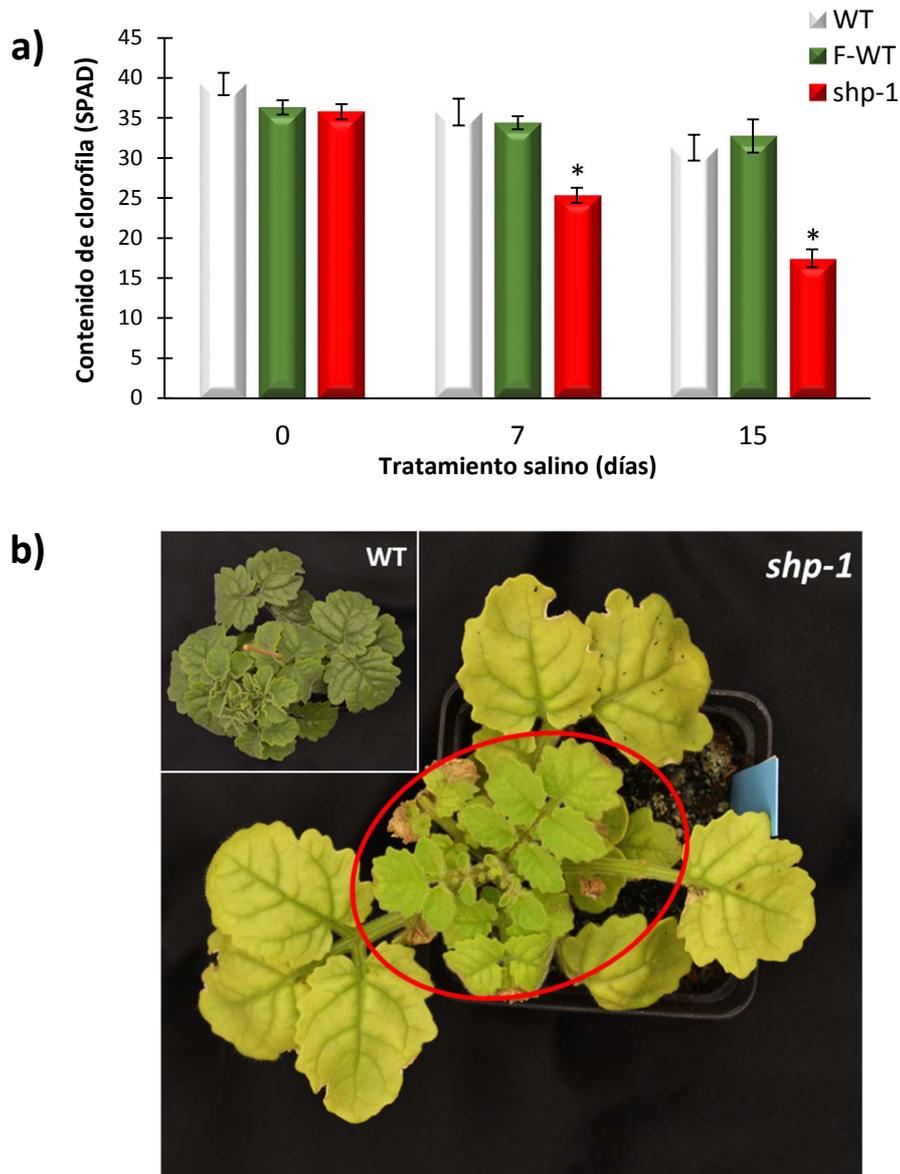
##### **1.4.1. Caracterización fenotípica, genética y molecular**

Este mutante se identificó en la segunda generación (TG2) al observarse una segregación para tolerancia a salinidad. El fenotipo de sensibilidad y la segregación fenotipo WT – fenotipo mutante se comprobó en 4 ensayos en cámara de cultivo de condiciones controladas, en los que se ha utilizado un nivel salino de 200 mM de NaCl. Uno de los aspectos más destacables de este mutante y que no se había observado en ninguno de los mutantes de la especie silvestre *S. pennellii* fué la rapidez con la que aparecía la clorosis foliar tras la imposición del estrés salino. Así, en el primer ensayo realizado con 38 plantas TG2, se observó desde los primeros días de tratamiento salino que algunas de las plantas empezaron a mostrar clorosis (**Figura 22**). Esta clorosis fué más acentuada a medida que avanzaban los días de tratamiento salino, mientras que entre las plantas sin transformar (WT) y las plantas TG2 con fenotipo WT (F-WT) no se observaron diferencias fenotípicas a lo largo de todo el ensayo (**Figura 22**). Las medidas de clorofila confirmaron los cambios fenotípicos observados en el mutante durante el periodo de tratamiento salino (**Figura 23a**).

Es interesante señalar que durante la etapa de recuperación (ausencia de sal) se redujo en un periodo relativamente corto de tiempo la clorosis foliar en las hojas nuevas en desarrollo, como se observa en la figura 23b que muestra una de las plantas mutantes después de 12 días sin sal. Estos resultados reflejan la importancia de la mutación en la tolerancia/sensibilidad a sal, ya que el efecto de la salinidad es aparente en un corto plazo tanto en un sentido como en el otro.



**Figura 22. Hipersensibilidad a la sal del mutante recesivo *shp-1* (*salt hypersensitive pennellii-1*).** En la población TG2 se observó desde los primeros días de tratamiento salino (200 mM NaCl) el fenotipo mutante caracterizado por clorosis en todas las hojas de la planta. a) Segregación para clorosis en la población TG2 y detalle de las hojas con fenotipo WT y mutante después de 9 días de estrés salino. b) El grado de clorosis incrementaba con el periodo de tratamiento (15 días), mientras que aún no eran evidentes los síntomas de sensibilidad en WT.



**Figura 23.** El fenotipo clorótico mostrado por el mutante *shp-1* en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días) revierte durante la etapa de recuperación (12 días regadas con disolución nutritiva control). a) Contenido de clorofila en plantas WT, plantas TG2 con fenotipo WT (F-WT) y mutante (*shp-1*). Los datos representan los valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencia entre medias (LSD<sub>5%</sub>). b) Disminución del grado de clorosis durante la etapa de recuperación (12 días sin sal).

El ajuste de segregación se elaboró en los 4 ensayos realizados con plantas TG2: el primero con 38 plantas, el segundo con 52 plantas, el tercero con 35 plantas y el cuarto con 199 plantas. La distribución de plantas con fenotipo WT – fenotipo mutante, su grado de ajuste a 3:1, así como las correspondientes  $\chi^2$  de homogeneidad se muestran en la tabla 18.

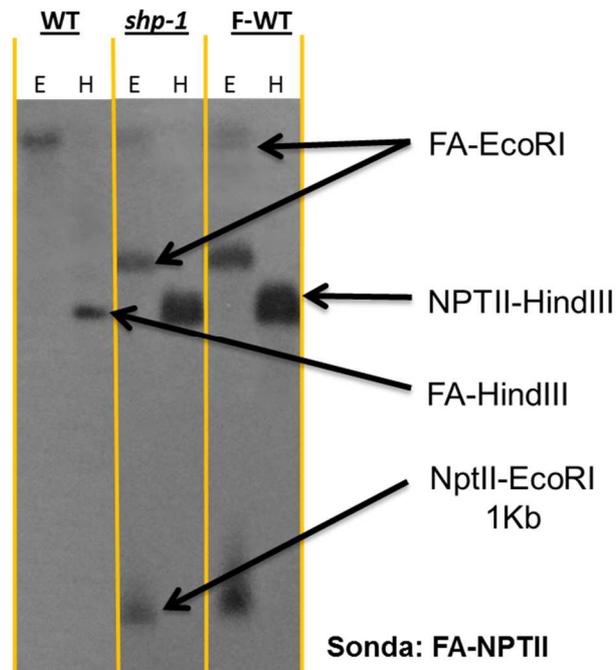
**Tabla 18.** Análisis de segregación de plantas con fenotipo WT (F-WT) y fenotipo mutante (M) en los 4 ensayos diferentes llevados a cabo con plantas TG2 y en la suma de ellos. Ajuste a los modelos de segregación.

Segregación 3:1	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		SUMA	
	F-WT	M	F-WT	M	F-WT	M	F-WT	M	F-WT	M
<b>M (3:1)</b>	27	11	39	13	25	10	155	44	246	78
<b>O</b>	28,5	9,5	39	13	26,25	8,75	149,25	49,75	243	81
$\chi^2$ 1 gl	0,32		0,00		0,24		0,89		0,15	
$\chi^2$ H 3 gl	1,29									
	$\chi^2$ 1 gl (5 %)		3,84		$\chi^2$ 3 gl (5 %)		7,82			
	$\chi^2$ 1 gl (1 %)		6,64		$\chi^2$ 3 gl (1 %)		11,35			

En principio, la hipótesis más sencilla era que el fenotipo de hipersensibilidad estuviera causado por una copia en homocigosis, en cuyo caso la segregación debería ajustarse a 3 fenotipo WT : 1 mutante. Para esta hipótesis (3:1), el análisis de homogeneidad indicó que no hay motivo para dudar de que las muestras fueran homogéneas ( $\chi^2$  de homogeneidad = 1,29). El análisis de datos acumulados reveló que tampoco había motivos para dudar de la hipótesis de partida, ya que el valor de la  $\chi^2$  (0,15) fue muy inferior al del nivel de significación ( $\chi^2$  1 g.l. (5 %) = 3,84), es decir una segregación fenotípica acorde con una distribución 3 WT : 1 mutante.

Una vez confirmada la segregación 3:1 se procedió a averiguar si la mutación que originaba el fenotipo de sensibilidad estaba ocasionada por el inserto de T-DNA, en cuyo caso estaríamos ante un mutante insercional. Para ello todas las plantas con fenotipo mutante deberían contener el inserto T-DNA en su genoma. Sin embargo, en caso de que alguna de las plantas con fenotipo mutante no contenga el inserto de T-DNA estaríamos ante un mutante no insercional y sería más complicado identificar la parte del genoma alterada.

El número de insertos T-DNA del mutante *shp-1* fue analizado en el departamento de Biología Molecular dirigido por el profesor Rafael Lozano de la UAL mediante análisis *Southern blot*. Para realizar este análisis la progenie TG2 se separó en 2 lotes diferentes: las plantas con fenotipo WT y las plantas con fenotipo mutante (*shp-1*), usando como sonda un fragmento del gen *nptII* presente en el T-DNA. El Southern indicó la presencia de un único inserto T-DNA en el mutante *shp-1* (**Figura 24**).



**Figura 24.** Análisis *Southern blot* realizado en dos lotes de plantas de la población TG2 de la línea mutante *shp-1*. WT: Plantas sin transformar, *shp-1*: Plantas TG2 con fenotipo mutante y F-WT: Plantas TG2 con fenotipo WT. E: EcoRI, H: HindIII. El análisis se ha realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la UAL.

A raíz de estos resultados, se decidió realizar la clonación de las secuencias flanqueantes aguas arriba del T-DNA utilizando la estrategia denominada *Anchor PCR*. Esta estrategia ha sido utilizada con éxito por el grupo de la UAL dirigido por el Profesor Rafael Lozano para clonar regiones adyacentes a secuencias repetidas o de copia única (Giménez *et al.*, 2010). Con esta estrategia, el T-DNA se localizó en el cromosoma 3, aproximadamente a 450 pb del gen Solyc03g118460.1.1 que tiene función desconocida hasta ahora. Tras la clonación del gen, se comprobó si existía correlación genotipo-fenotipo realizando un genotipado mediante PCR. En treinta y cuatro plantas TG2 sometidas a tratamiento salino (200 mM de NaCl) durante 15 días, se identificaron 25 plantas con fenotipo WT y 9 plantas con fenotipo mutante. Sin embargo, en el estudio de co-segregación mediante PCR, de las 34 plantas genotipadas había 7 acigotas, 21 hemicigotas y 6 homocigotas para el fragmento clonado, presentando co-segregación entre la región clonada del cromosoma 3 y el *nptII*, pero el fenotipo mutante de hipersensibilidad a la sal no co-segregó con el inserto T-DNA (**Tabla 19**).

**Tabla 19: Correlación fenotipo-genotipo en la población segregante TG2. Presencia del gen marcador *nptII* y genotipado para la secuencia clonada.**

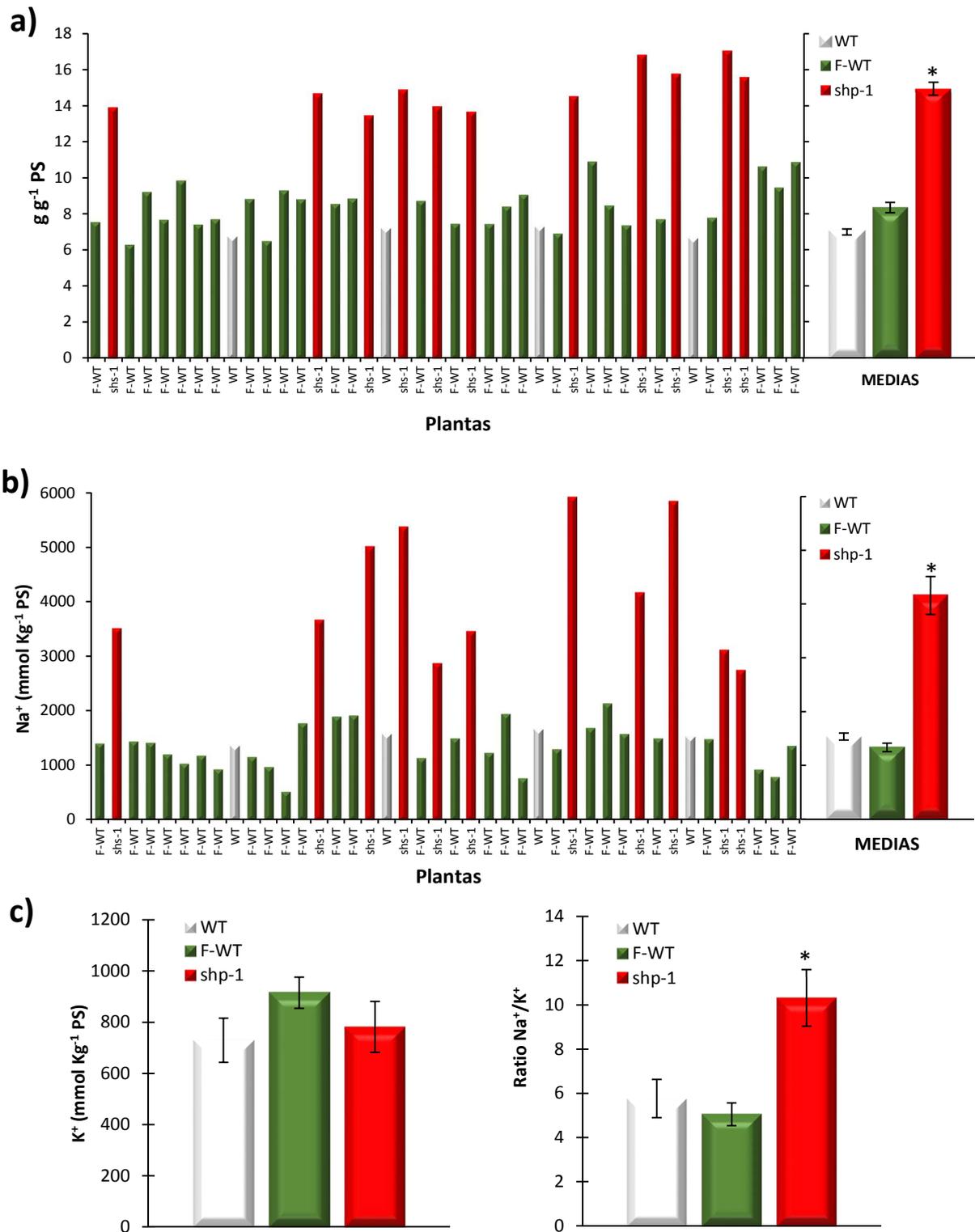
Planta	Fenotipo	Genotipado	Alelo WT	Alelo mutante	<i>nptII</i>
1	F-WT	Acigota	+	-	-
2	Mutante	Hemicigota	+	+	+
3	F-WT	Homocigota	-	+	+
4	Mutante	Hemicigota	+	+	+
5	F-WT	Hemicigota	+	+	+
6	Mutante	Hemicigota	+	+	+
7	F-WT	Homocigota	-	+	+
8	F-WT	Hemicigota	+	+	+
9	F-WT	Hemicigota	+	+	+
10	F-WT	Hemicigota	+	+	+
11	F-WT	Hemicigota	+	+	+
12	F-WT	Hemicigota	+	+	+
13	F-WT	Homocigota	-	+	+
14	Mutante	Hemicigota	+	+	+
15	Mutante	Hemicigota	+	+	+
16	F-WT	Acigota	+	-	-
17	F-WT	Hemicigota	+	+	+
18	F-WT	Hemicigota	+	+	+
19	F-WT	Acigota	+	-	-
20	F-WT	Hemicigota	+	+	+
21	F-WT	Acigota	+	-	-
22	F-WT	Hemicigota	+	+	+
23	F-WT	Hemicigota	+	+	+
24	Mutante	Homocigota	-	+	+
25	F-WT	Homocigota	-	+	+
26	F-WT	Acigota	+	-	-
27	F-WT	Hemicigota	+	+	+
28	F-WT	Hemicigota	+	+	+
29	F-WT	Hemicigota	+	+	+
30	F-WT	Homocigota	-	+	+
31	Mutante	Hemicigota	+	+	+
32	F-WT	Acigota	+	-	-
33	Mutante	Acigota	+	-	-
34	Mutante	Hemicigota	+	+	+

Estos resultados confirman que la inserción T-DNA no era la responsable de la mutación. Actualmente, se continúa con este trabajo para llegar a identificar la secuencia del genoma responsable del fenotipo mutante tanto por clonaje posicional como por secuenciación masiva o la combinación de ambas.

#### 1.4.2. Caracterización fisiológica en condiciones de salinidad

El contenido de agua en hoja se analizó en la población segregante TG2 de 3 experimentos diferentes realizados en cámara de cultivo de condiciones controladas, determinando el contenido de agua individual de cada planta. En condiciones control, no se observaron diferencias significativas en el contenido de agua de las plantas WT, las plantas TG2 de fenotipo WT y las de fenotipo mutante ( $11,54 \pm 0,87$ ,  $11,32 \pm 0,29$  y  $10,68 \pm 0,87$  g g<sup>-1</sup> PS, respectivamente). En medio salino (200 mM NaCl), el contenido de agua en hoja de las plantas WT y de las plantas TG2 de fenotipo WT (F-WT) fué muy similar, mientras que fué significativamente superior en las hojas de las plantas con fenotipo mutante (*shp-1*), como se observa en la figura 25a. Cuando se comparó el valor medio del contenido de agua de las hojas de las plantas WT, plantas TG2 de fenotipo WT y plantas mutantes (**Figura 25a, derecha**) se observó que el mutante presentaba alrededor de un 60% más de contenido de agua en hoja que el WT.

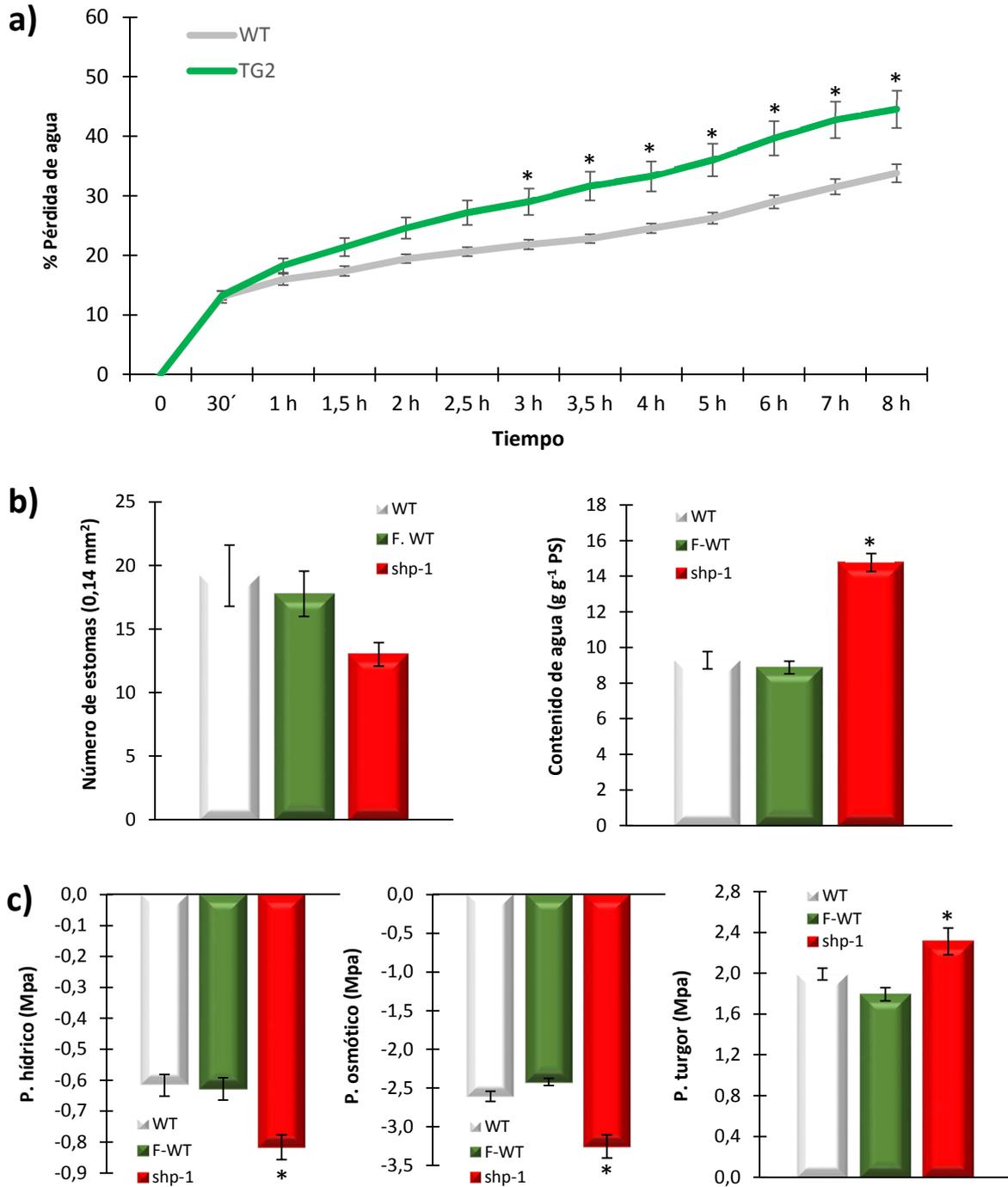
Las concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> también fueron analizadas en los diferentes ensayos llevados a cabo en TG2. Respecto al contenido de Na<sup>+</sup>, todas las plantas de fenotipo mutante presentaron una concentración de Na<sup>+</sup> mucho mayor que las plantas TG2 de fenotipo WT y que las plantas WT. En la figura 25b se muestran los valores individuales de la concentración de Na<sup>+</sup> en hoja de las plantas tratadas con 200 mM NaCl durante 15 días, donde se observa que las plantas mutantes no solo acumularon más agua en sus hojas sino también el ion salino Na<sup>+</sup>, lo que sugiere que este mutante podría estar afectado en el transporte de agua y solutos a la parte aérea. Así, mientras que la media de las concentraciones de Na<sup>+</sup> fueron similares en las plantas WT y las TG2 de fenotipo WT, la media de concentración de Na<sup>+</sup> en las hojas de las plantas mutantes fué más del doble con respecto a estas (**Figura 25b, derecha**), lo que explicaría los claros síntomas de clorosis observados en el mutante durante el tratamiento salino. La mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en el mutante no supuso sin embargo, una mayor pérdida de K<sup>+</sup> en hoja, cuya concentración fue similar a la de las plantas WT y plantas TG2 con fenotipo WT, reflejando la elevada relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> la mayor acumulación de Na<sup>+</sup> (**Figura 25c**).



**Figura 25.** El mutante *shp-1* incrementa el contenido de agua y la concentración de  $\text{Na}^+$  en las hojas de las plantas desarrolladas en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días). Se presentan los valores individuales de cada planta en la población segregante TG2 (Izquierda) y los valores medios  $\pm$  ES (Derecha) del contenido de agua (a) y concentración de  $\text{Na}^+$  (b) en hoja de plantas sin transformar (WT), plantas TG2 de fenotipo WT (F-WT) y plantas mutantes (*shp-1*). c) Valores medios  $\pm$  ES de la concentración de  $\text{K}^+$  y la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . \* Diferencias entre medias ( $\text{LSD}_{5\%}$ ).

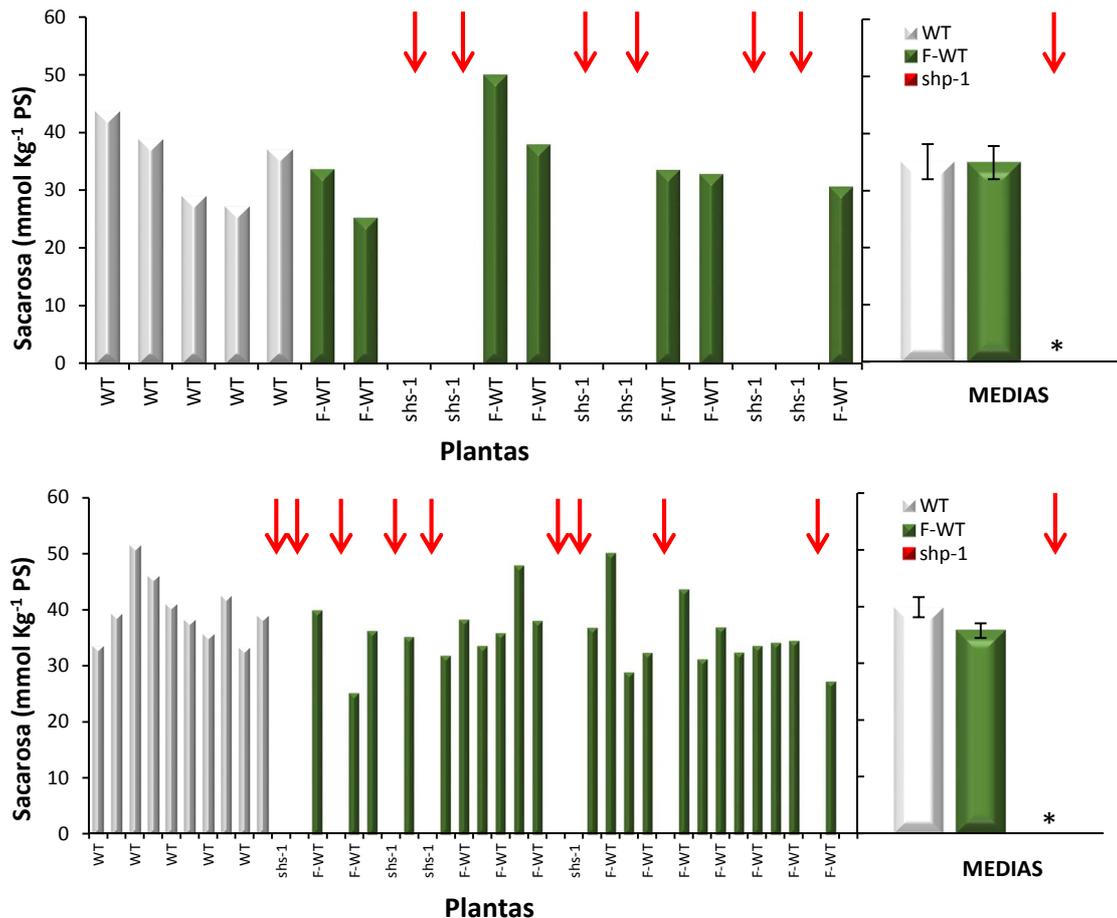
El paralelismo observado entre la acumulación de agua y  $\text{Na}^+$  en hojas del mutante podría estar relacionado con una mayor pérdida de agua de las hojas por transpiración (cuticular o estomática). En primer lugar, se tomó una muestra representativa de la población TG2 para medir la pérdida de agua de hojas escindidas antes de aplicar el tratamiento salino. Si bien, en este ensayo se englobaron las hojas de plantas TG2 con fenotipo WT y fenotipo mutante (aproximadamente en una relación 3:1), ya que antes de aplicar el estrés no había diferencias fenotípicas entre ellas. A pesar de ello, se pudo observar que la pérdida de agua de las hojas fue mayor en la población TG2 de la línea mutante que en las plantas WT (**Figura 26a**). Seguidamente, a estas plantas se aplicó un tratamiento salino durante 15 días (200 mM NaCl) y tras identificar las plantas de fenotipo WT y mutante se midió la densidad estomática, ya que la mayor pérdida de agua de la hoja puede deberse a un mayor número de estomas que esté provocando una mayor pérdida de agua por transpiración estomática. Sin embargo, el número de estomas no solo no incrementaba en el mutante sino que incluso había una tendencia a reducirse en el mutante (**Figura 26b**), lo que indicó que la pérdida de agua no está relacionada con la densidad estomática.

En este ensayo se midió de nuevo el contenido de agua en hoja y los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente, ya que el contenido en agua de la hoja fue significativamente superior en las plantas mutantes que en el resto de plantas al final del tratamiento (**Figura 26b**). También se analizó el estado hídrico mediante las medidas de potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), potencial osmótico ( $\Psi_\pi$ ) y potencial de turgor ( $\Psi_p$ ). Estas medidas se realizaron en 7 plantas WT, 7 plantas TG2 de fenotipo WT y otras 7 plantas de fenotipo mutante (**Figura 26c**). Los valores de  $\Psi_w$  y  $\Psi_\pi$  mostraron un comportamiento muy similar, ya que las plantas WT y de fenotipo WT presentaron valores similares, mientras que las plantas mutantes redujeron significativamente ambos potenciales ( $\Psi_w$  y  $\Psi_\pi$ ). La significativa reducción en el  $\Psi_\pi$  podría estar relacionada con mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas del mutante, ya que los iones salinos son los que contribuyen principalmente a la reducción de  $\Psi_\pi$  en medio salino (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008). De acuerdo con la mayor reducción del  $\Psi_\pi$ , el potencial de turgor en el mutante también fue mayor, lo que sugiere que el mutante fue capaz de mantener el turgor de manera más eficaz que el WT en condiciones salinas.



**Figura 26. Las hojas del mutante hipersensible *shp-1* son capaces de mantener el turgor y mejorar el estado hídrico en condiciones salinas.** a) Evolución del porcentaje de pérdida de agua durante 8 horas en hojas escindidas de plantas desarrolladas en condiciones control del WT y una muestra representativa de la población TG2 (incluyendo las plantas de fenotipo WT y mutante). Los valores son expresados como porcentaje de pérdida de agua relativa a cada tiempo respecto al peso fresco inicial al tiempo 0. b) Valores medios del número de estomas, contenido de agua y c) potenciales hídrico, osmótico y de turgor en hojas de plantas WT, de plantas TG2 con fenotipo WT (F-WT) y mutante (*shp-1*) en un segundo experimento realizado en medio salino (15 días a 200 mM de NaCl). Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Finalmente se analizó la concentración de sacarosa en las plantas TG2, observando que en condiciones salinas los niveles de sacarosa en las hojas de las plantas de fenotipo mutante eran nulos (**Figura 27**), mientras que en las plantas WT y TG2 con fenotipo WT sí se detectó sacarosa sin diferencias significativas entre ellos. En el primer experimento se observó que no aparecía el pico correspondiente a sacarosa en las hojas de las 6 plantas analizadas de fenotipo mutante, mientras que se detectaban perfectamente en 5 plantas WT y en 7 plantas TG2 de fenotipo WT. Esta alteración metabólica se corroboró en el siguiente experimento, donde nuevamente los valores medios de las 10 plantas WT y 21 de fenotipo WT eran similares y nuevamente las hojas de las plantas mutantes no contenían sacarosa. La sacarosa es el vehículo que las plantas tienen para transportar los carbohidratos producidos en las hojas fuente hacia los sumideros (semillas, raíces, tubérculos) a través del floema, vía simplasto/apoplasto (Koch, 2004; Chen y Kim, 2006). La falta de sacarosa en el mutante *shp-1* podría ser un síntoma de la elevada sensibilidad mostrada al tratamiento salino, ya que al tener dañado el aparato fotosintético (debido a la reducción del contenido en clorofila bajo tratamiento salino, **figura 25a**) las plantas mutantes no podrían realizar correctamente la fotosíntesis, y por tanto se reduciría la síntesis de carbohidratos. En principio, se descarta que la mutación afecte a algún gen implicado en la biosíntesis de sacarosa, ya que el contenido de sacarosa en las plantas mutantes es similar al de las plantas WT y las TG2 de fenotipo WT en ausencia de sal (datos no mostrados).



**Figura 27. La concentración de sacarosa se anula en las hojas del mutante *shp-1* en medio salino (200 mM NaCl durante 15 días).** Se presentan los valores individuales de cada planta en la población segregante TG2 (Izquierda) y los valores medios (Derecha) de los resultados obtenidos en dos experimentos. Se incluyen los valores de plantas WT (gris), plantas TG2 de fenotipo WT (verde oscuro) y las flechas rojas señalan los valores 0 obtenidos para todas las plantas mutantes (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

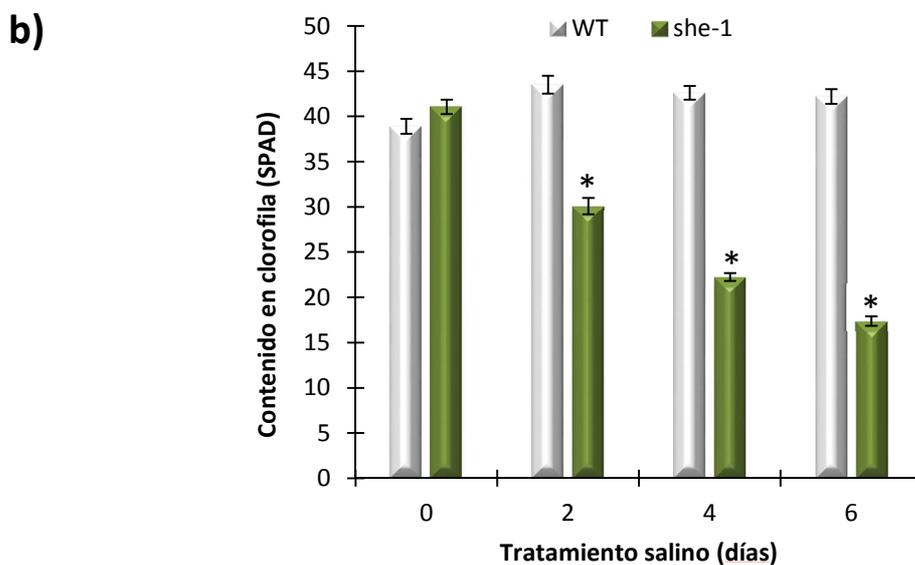
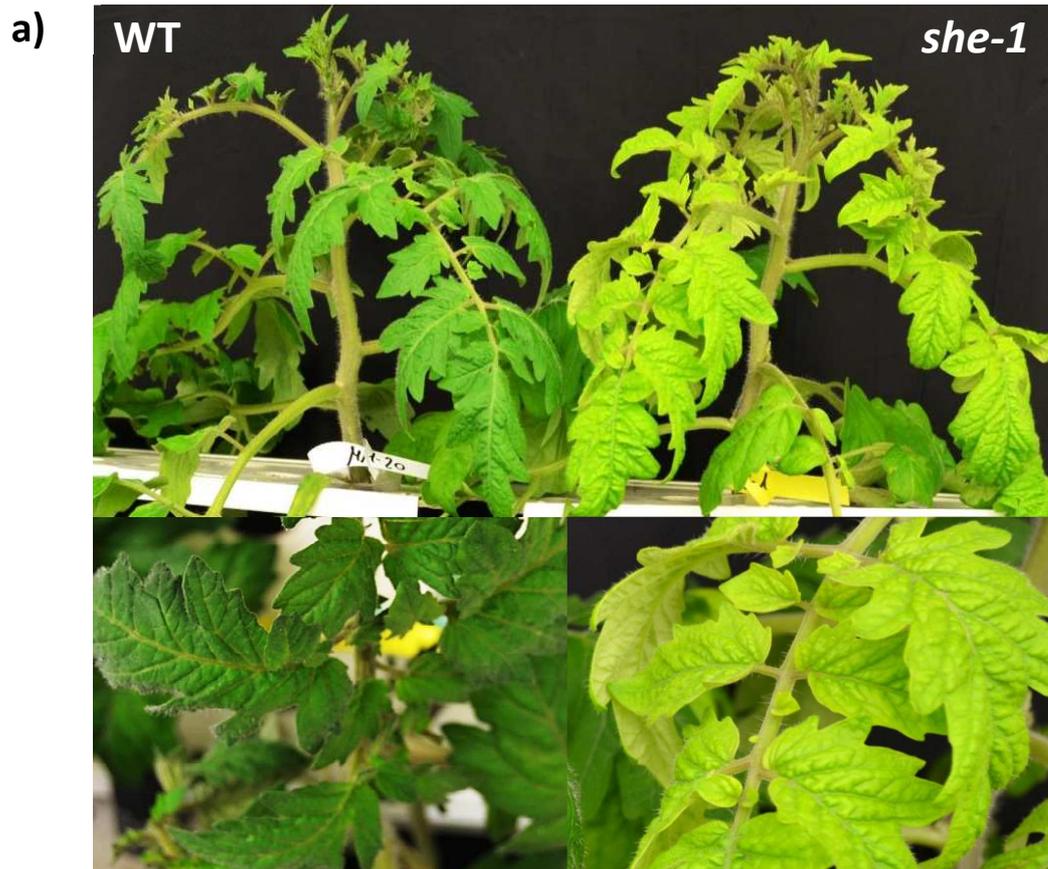
## 2. Caracterización del mutante de tomate *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*)

Dentro del programa de mutagénesis insercional de tomate, se han generado más de 3000 líneas T-DNA a partir del cultivar de tomate MoneyMaker, donde la mayoría de las líneas han sido ya fenotipadas por los grupos del IBMCP y del CEBAS. Uno de los mutantes identificados *in vitro* por el grupo del IBMCP fue el mutante *she-1* con alta sensibilidad a la salinidad. En la progenie segregante TG2 cultivada *in vitro* en medio salino, este grupo observó que algunas de las plántulas eran hipersensibles a la sal, con una segregación aproximada 3:1. Una vez que el grupo del IBMCP obtuvo las semillas TG2, se llevaron a cabo evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo* de la población segregante en condiciones salinas. A partir de las plantas TG2 con fenotipo mutante se obtuvieron semillas (TG3) para identificar líneas homocigotas para la mutación, identificando el

grupo del IBMCP finalmente 3 líneas homocigotas para el fenotipo de hipersensibilidad. La etapa siguiente realizada por el grupo de Valencia fue analizar la segregación de resistencia a kanamicina (*Kan*) en estas líneas TG3 homocigotas para fenotipo, con el fin de comprobar si había co-segregación entre el fenotipo de sensibilidad a sal y el inserto T-DNA. Los resultados mostraron la ausencia de correlación entre el inserto y el fenotipo de hipersensibilidad a sal, ya que las 3 líneas homocigotas para fenotipo si segregaban para kanamicina. Debido a que el T-DNA no era el responsable de la mutación, el grupo del IBMCP obtuvo una línea homocigota para el fenotipo de sensibilidad a la sal y acigota para la presencia del T-DNA (no hay presencia del T-DNA en su genoma), y esta fué la línea TG4 que se utilizó en todos los ensayos de caracterización fisiológica presentados en este trabajo. Debido a su alta sensibilidad a la sal, este mutante se ha denominado *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*).

### 2.1. Caracterización fisiológica en condiciones de salinidad

Para la caracterización fisiológica del mutante *she-1*, se realizaron tres ensayos independientes en las mismas condiciones de cultivo en la cámara de condiciones controladas. Las plantas WT y mutantes se pasaron a cultivo hidropónico al estado de 2 hojas verdaderas (con disolución nutritiva control), y cuando las plantas tenían entre 4-6 hojas completamente desarrolladas se aplicó el tratamiento salino. El nivel de estrés fue 100 mM de NaCl y se aplicó durante 6 días, ya que las plantas morían rápidamente después de este tiempo debido probablemente a que el desarrollo de la raíz es mayor en cultivo hidropónico y, por consiguiente, también es mayor la absorción y transporte de iones salinos a la parte aérea. El fenotipo mutante se caracterizó por clorosis en las hojas, especialmente en las zonas internerviales, así como enrollamiento y engrosamiento de los folíolos (**Figura 28a**). A los 2 días de tratamiento ya se observaba claramente la clorosis foliar, lo que se correlacionó con la reducción significativa de clorofila a este tiempo en el mutante con respecto WT, reducción que continuó incrementando durante el tratamiento (**Figura 28b**).

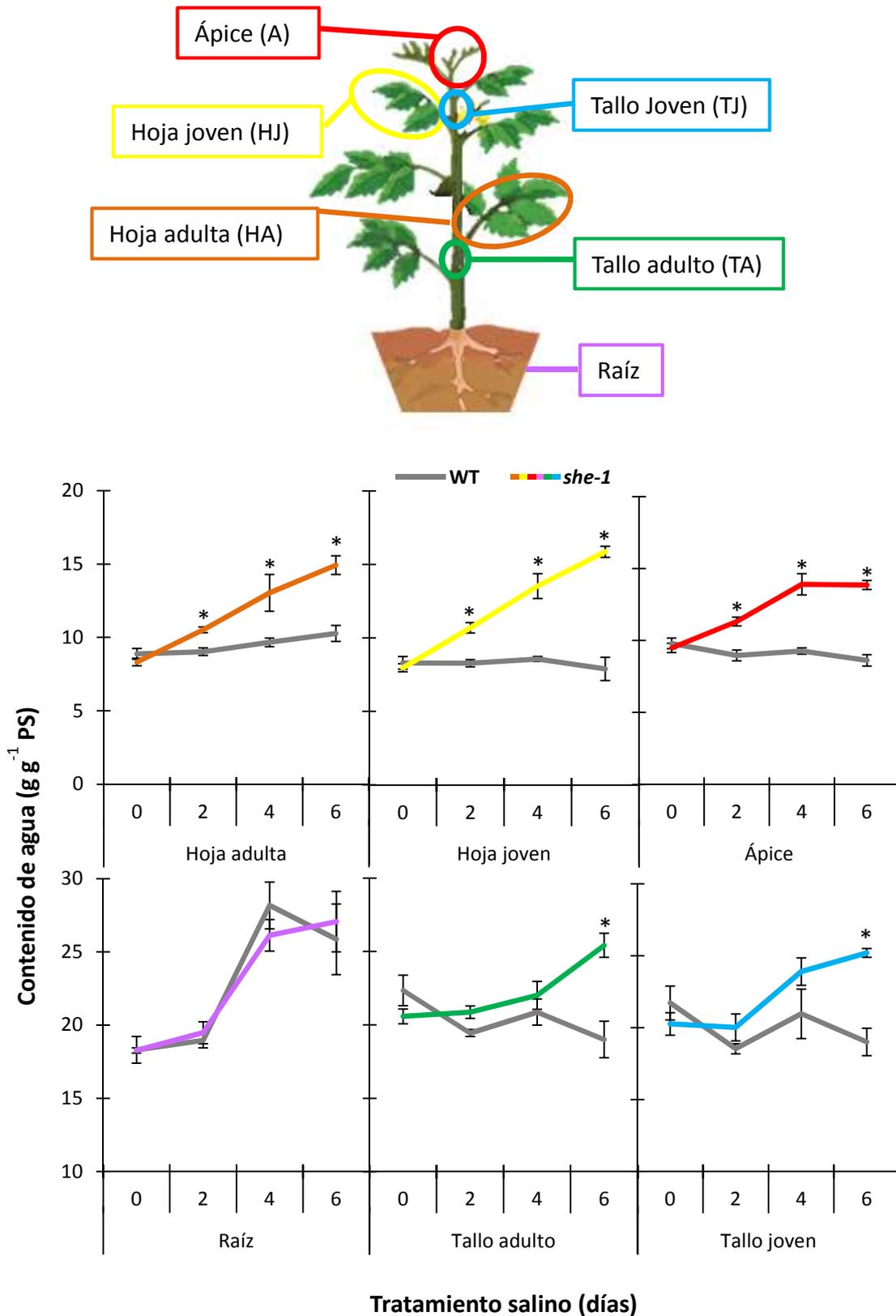


**Figura 28. Hipersensibilidad a la sal del mutante *she-1* después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl).** a) El fenotipo mutante se caracteriza por clorosis en sus hojas, especialmente en las zonas internerviales, enrollamiento y engrosamiento de los folíolos (ver imagen ampliada de los folíolos). b) Contenido de clorofila en hoja de las plantas WT y mutante tras 0, 2, 4 y 6 días de tratamiento salino (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

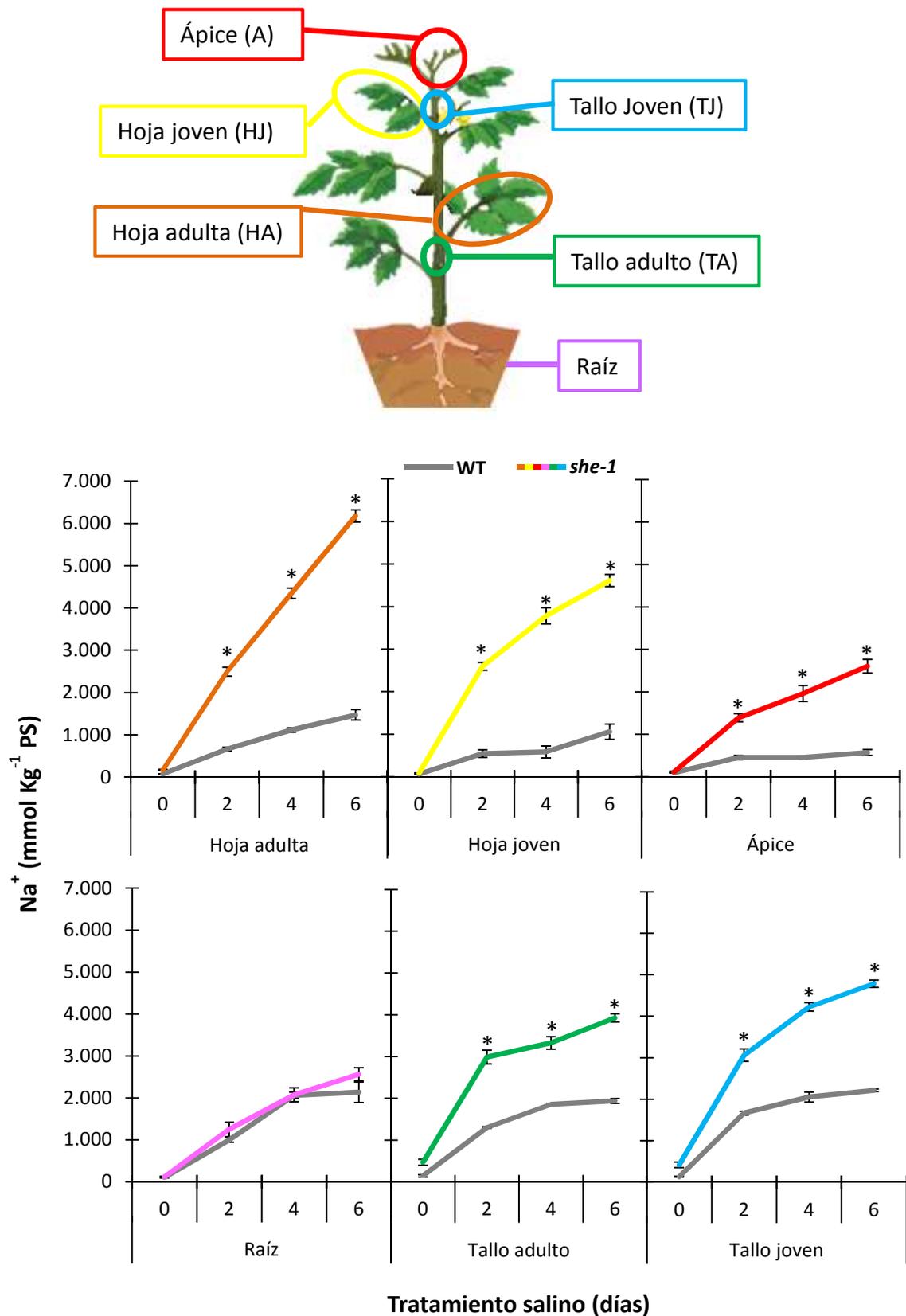
En el primer experimento, se analizó el contenido de agua y las concentraciones de iones en hoja desarrollada y raíz al final del tratamiento salino (6 días a 100 mM NaCl), mientras que en los dos experimentos sucesivos se analizó la evolución tanto espacial

como temporal de estos parámetro, durante el periodo del tratamiento salino como se detalla en la figura 29, correspondiendo los resultados a los valores medios obtenidos en ambos experimentos. Tanto el ápice como las hojas jóvenes y adultas del mutante presentaron un contenido de agua significativamente mayor que el WT desde los 2 días de tratamiento, y estas diferencias fueron incrementando con el tiempo de tratamiento salino. Es interesante resaltar que la mayor diferencia en el contenido de agua al final del tratamiento salino (6 días) se observó en las hojas jóvenes, donde el contenido en agua incrementó el doble durante el tratamiento (desde  $7,9 \text{ g g}^{-1}$  PS inicial a  $15,9 \text{ g g}^{-1}$  PS final), mientras que en WT se mantuvo constante en torno a 7,9. Un comportamiento similar se observó en ápice y hoja adulta. En tallo (joven y adulto), el contenido de agua fue significativamente mayor en el mutante que en WT solo tras 6 días de tratamiento, cuando las hojas tienen ya un elevado estado de hidratación. En raíz, no se observaron diferencias significativas entre WT y mutante a lo largo del periodo de tratamiento salino, incrementando de manera similar el contenido de agua a medida que avanzó el periodo de tratamiento.

Respecto a la distribución de  $\text{Na}^+$  en la planta, se observó que el incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea del mutante fue significativamente superior con respecto al WT desde los 2 días de la aplicación del estrés (**Figura 30**). Aunque la acumulación de  $\text{Na}^+$  aumenta en el mutante desde ápice a la hoja adulta, los incrementos respecto al WT son similares en ápice, hoja joven y hoja, siendo la acumulación más de 4 veces mayor en el mutante que en el WT. Estas diferencias en la acumulación de  $\text{Na}^+$  se observaron también en el tallo (tanto joven como basal), siendo el incremento de  $\text{Na}^+$  dos veces mayor en el mutante que en WT durante el tratamiento salino. Es interesante señalar que la distribución de  $\text{Na}^+$  en las plantas WT reflejó el mecanismo típico de tomate frente al estrés salino, acumulando mayor cantidad de  $\text{Na}^+$  en raíz y tallo (donde se alcanzan los mismos niveles después de 6 días de tratamiento) seguido de hoja adulta, con el fin de proteger los tejidos jóvenes en desarrollo de la llegada masiva de  $\text{Na}^+$ ; así, la concentración de  $\text{Na}^+$  que se alcanzó en hoja joven después de 6 días de tratamiento fue  $1059 \text{ mmol kg}^{-1}$  PS, frente a  $2211 \text{ mmol kg}^{-1}$  PS en el tallo joven. Sin embargo, las concentraciones en hoja y tallo joven del mutante eran similares ( $4613$  y  $4784 \text{ mmol kg}^{-1}$  PS, respectivamente), lo que explica la rapidez en alcanzar niveles tóxicos en las hojas jóvenes del mutante tras la aplicación del estrés y, finalmente, la muerte celular, como se observó en el mutante que no fue capaz de soportar más de una semana la salinidad.



**Figura 29.** El mutante *she-1* incrementa el contenido de agua de la parte aérea con la salinidad (100 mM NaCl). Las plantas se desarrollaron en cultivo hidropónico y el tratamiento se aplicó en el mismo cuando las plantas habían desarrollado 5 hojas verdaderas. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).



**Figura 30. La hipersensibilidad del mutante *she-1* a la salinidad está relacionada con un alto transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea.** Las plantas se desarrollaron en cultivo hidropónico y el tratamiento salino (100 mM NaCl) se aplicó cuando las plantas habían desarrollado 5 hojas verdaderas. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

En cuanto al contenido en  $K^+$ , en condiciones control (día 0) el mutante mostró una ligera menor concentración de  $K^+$  en todos los tejidos analizados de la parte aérea con respecto al WT, aunque sin diferencias significativas (**Tabla 20**). Sin embargo, tras 6 días de tratamiento salino (100 mM) la reducción de la concentración de  $K^+$  en el mutante, respecto a WT, fue significativamente superior en todos los órganos analizados, desde la raíz hasta el ápice, que en WT, lo que puede estar relacionado con el antagonismo existente entre los iones  $Na^+$  y  $K^+$ , de modo que una alta concentración de  $Na^+$  reduce el transporte de  $K^+$  a la parte aérea (Chen *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005; Tavakkoli *et al.*, 2011).

**Tabla 20. Concentración de  $K^+$  en diferentes tejidos de plantas WT y mutante en condiciones control (día 0) y después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl) (valores medios  $\pm$  ES). \* Valores medios de WT y mutante significativamente diferentes para el mismo tiempo y parte de la planta analizada (\* Diferencias entre medias,  $LSD_{5\%}$ ).**

Concentración de $K^+$ (mmol Kg <sup>-1</sup> PS)			
Tejido	Genotipo	Control	Sal
Ápice	WT	1.253,7 $\pm$ 100,1	1.027,8 $\pm$ 49,3 *
	<i>she-1</i>	1.052,1 $\pm$ 50,7	810,3 $\pm$ 30,0
Hoja joven	WT	840,6 $\pm$ 50,9	528,1 $\pm$ 47,7 *
	<i>she-1</i>	743,6 $\pm$ 48,4	386,0 $\pm$ 12,1
Hoja adulta	WT	913,2 $\pm$ 97,9	375,7 $\pm$ 25,5 *
	<i>she-1</i>	783,0 $\pm$ 49,3	248,8 $\pm$ 17,6
Tallo joven	WT	1.442,3 $\pm$ 224,2	1.336,0 $\pm$ 78,6 *
	<i>she-1</i>	1.216,7 $\pm$ 120,8	1.104,1 $\pm$ 53,3
Tallo adulto	WT	1.388,3 $\pm$ 219,5	1.049,8 $\pm$ 41,8 *
	<i>she-1</i>	1.117,5 $\pm$ 91,0	662,8 $\pm$ 88,4
Raíz	WT	1.421,2 $\pm$ 89,6	1.279,1 $\pm$ 89,5 *
	<i>she-1</i>	1.491,8 $\pm$ 167,1	989,5 $\pm$ 60,9

La evolución de la relación  $Na^+/K^+$  en todos los tejidos de la parte aérea de las plantas mostró una tendencia bastante similar a la observada en la concentración de  $Na^+$ , con un aumento desde el primer muestreo (2 días de salinidad) hasta el fin del tratamiento (6 días) en el mutante respecto al WT (**Figura 31**). Destaca el importante aumento de la relación  $Na^+/K^+$  en las hojas jóvenes y adultas, alcanzando en las primeras un valor de 11,5 respecto a 2,2 en WT y en las segundas un valor de 25,4 respecto a 4,1 en WT, lo que nuevamente demuestra la incapacidad del mutante para evitar la citotoxicidad en los órganos en desarrollo.

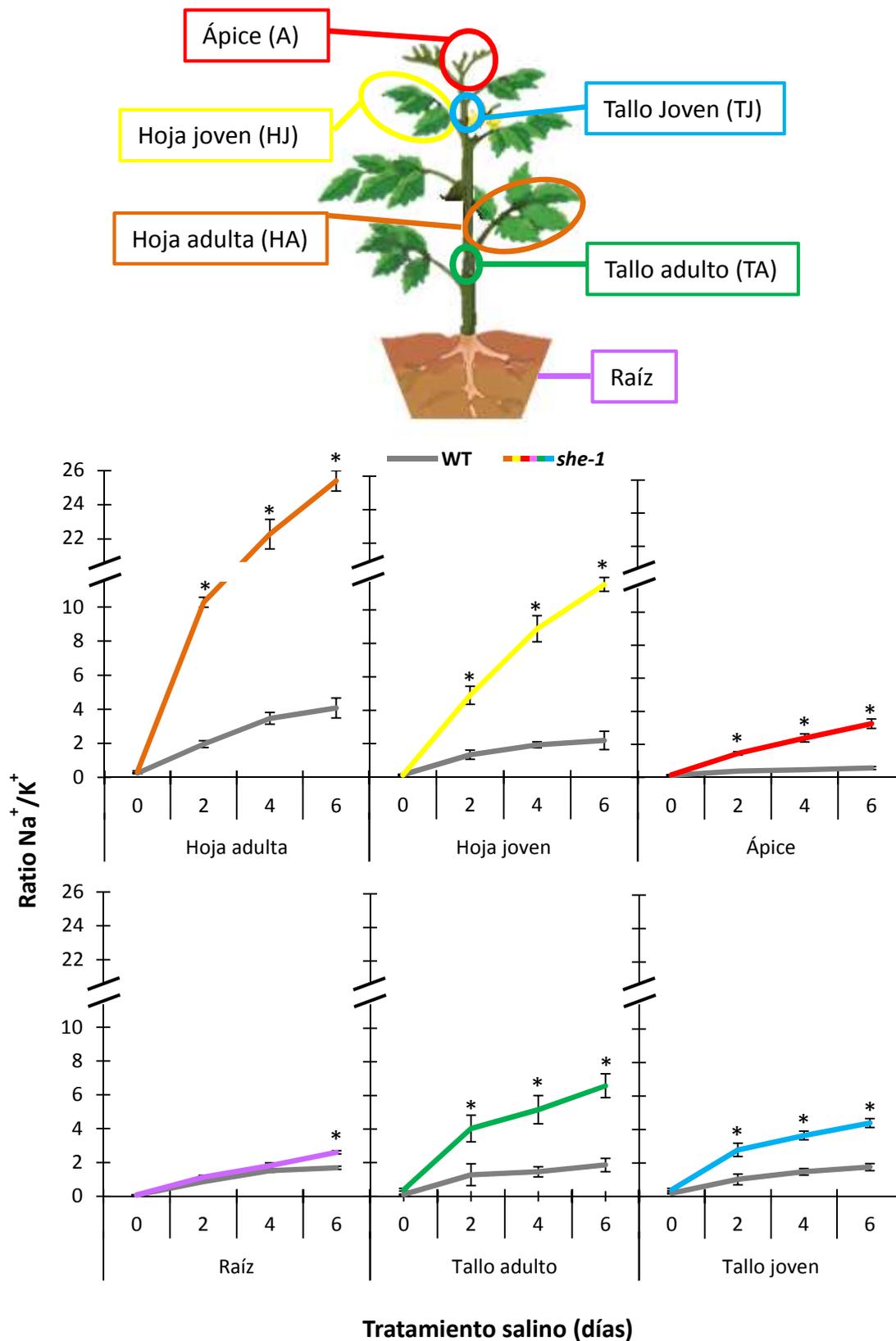
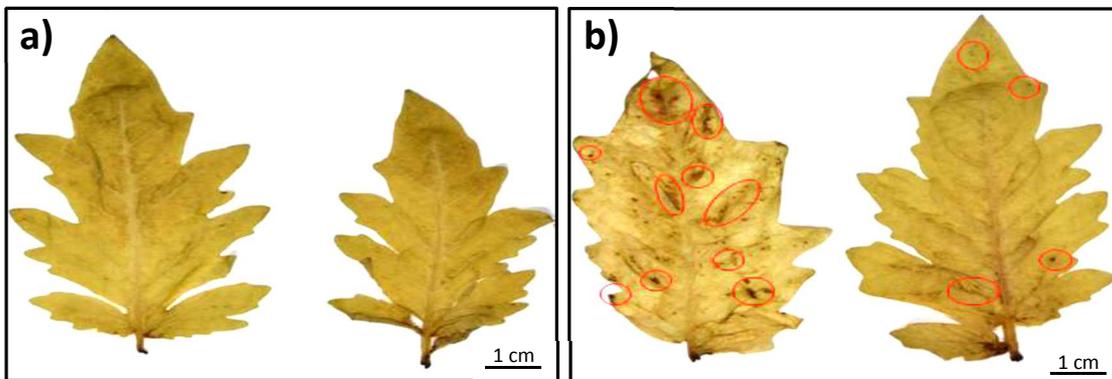


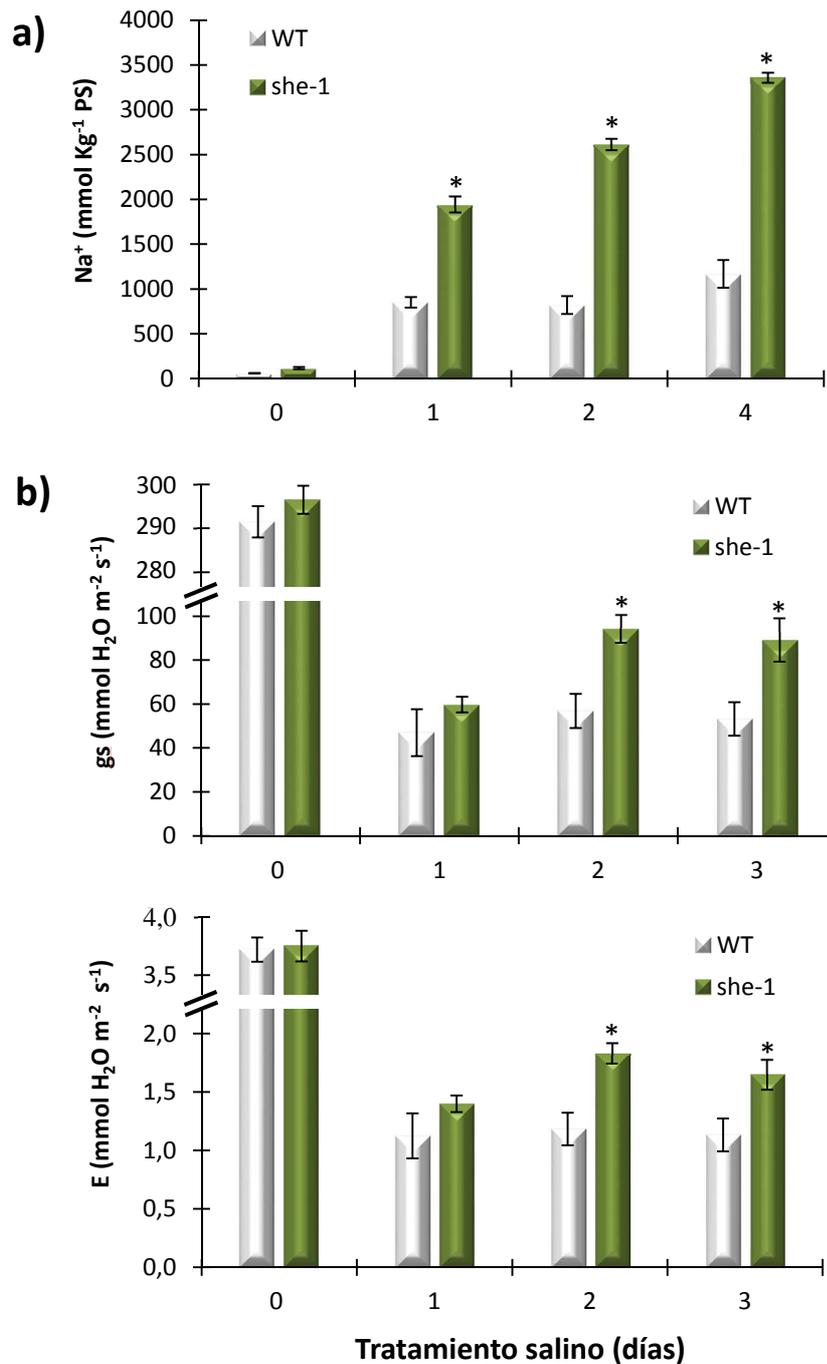
Figura 31. La hipersensibilidad del mutante *she-1* a la salinidad está relacionada con valores muy elevados en la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en hojas jóvenes y adultas. Las plantas se desarrollaron en cultivo hidropónico y el tratamiento salino (100 mM NaCl se aplicó cuando las plantas habían desarrollado 5 hojas verdaderas. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias,  $\text{LSD}_{5\%}$ ).

Finalmente, el grado de daño oxidativo se analizó en la primera hoja desarrollada mediante tinción DAB (3,3 diaminobenzidina) antes de aplicar el estrés (día 0) y después de 6 días de tratamiento salino (100 mM de NaCl). Las hojas control de WT y mutante no mostraron áreas de color marrón, indicativas de la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que si aparecieron en condiciones de salinidad, siendo el área de las manchas detectadas en las hojas del mutante significativamente mayor que el de las plantas WT (**Figura 32**). Este resultado sugiere que el estrés salino induce un mayor estrés oxidativo en el mutante, debido probablemente al deterioro del aparato fotosintético como consecuencia del efecto tóxico provocado por la alta acumulación de Na<sup>+</sup> en estos tejidos (Chen y Murata, 2011; Saleem *et al.*, 2012; Shaheen *et al.*, 2012).



**Figura 32.** El grado de estrés oxidativo inducido por la salinidad es mayor en el mutante *she-1* como refleja la tinción de DAB. Los círculos rojos indican el grado de daño oxidativo detectado en folíolos de plantas WT (Derecha) y mutante (Izquierda) el día 0 (a) y después de 6 días de tratamiento salino con 100 mM de NaCl (b).

Para completar la caracterización fisiológica del mutante, se realizó un último ensayo en las mismas condiciones de cultivo y tratamiento salino (100 mM NaCl), con el objetivo de corroborar la alta velocidad de transporte de Na<sup>+</sup> a las hojas jóvenes del mutante y comprobar si la acumulación de Na<sup>+</sup> estaba o no asociada con un mayor flujo de evapotranspiración. Al analizar la concentración de Na<sup>+</sup> en hoja joven a los 0, 1, 2 y 4 días de tratamiento salino (**Figura 33a**), se observó que el mutante duplicaba la concentración de Na<sup>+</sup> respecto al WT tan solo después de un día de tratamiento, y continuó incrementando la acumulación de manera similar a los resultados obtenidos en el experimento anterior (**Figura 30**).



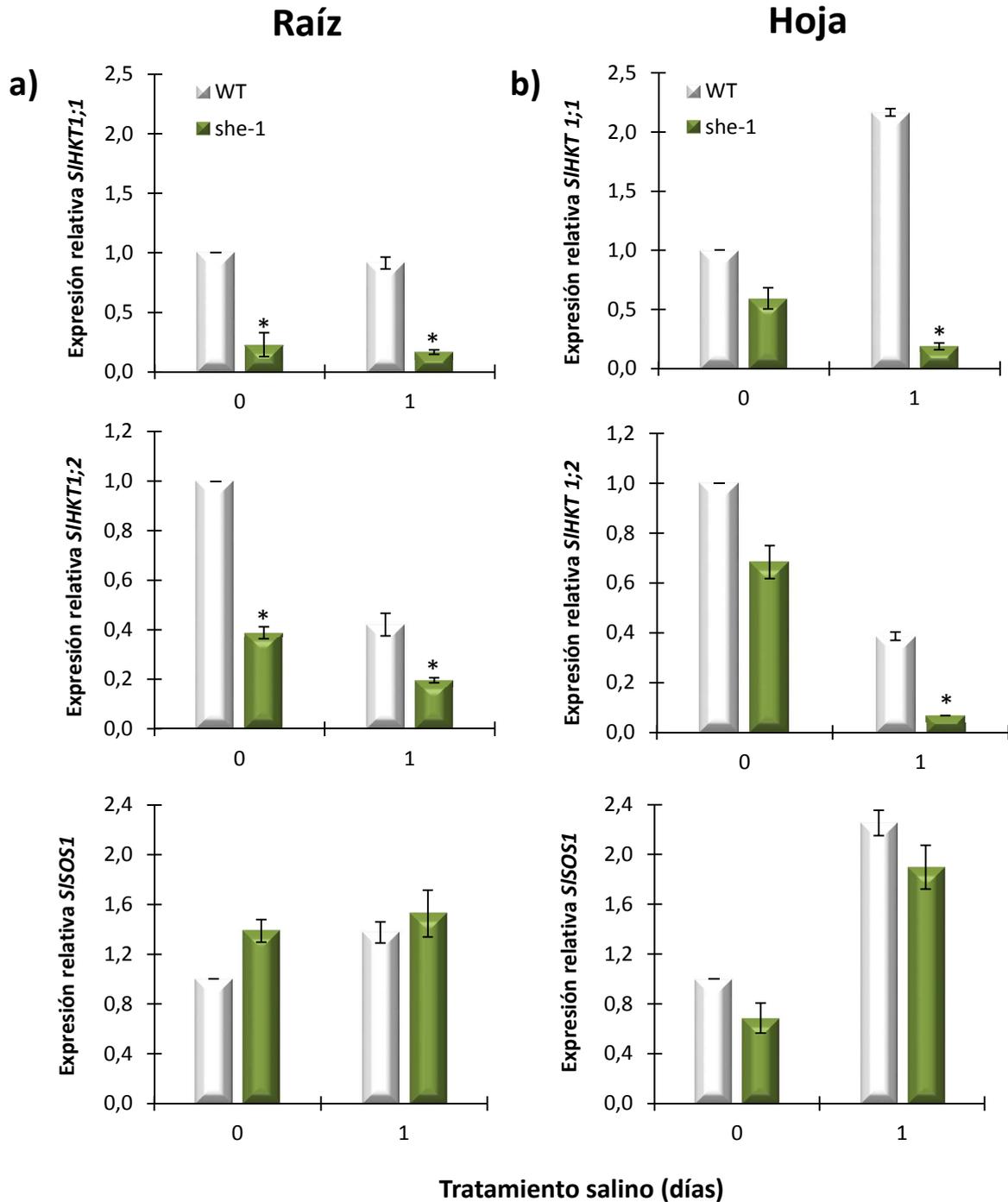
**Figura 33.** Concentración de Na<sup>+</sup> (a) y medidas de conductancia estomática y tasa de transpiración (b) en hoja joven de plantas WT y mutante *she-1* desarrolladas a 100 mM de NaCl (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Tras analizar la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la tasa de transpiración (E) en las mismas hojas jóvenes a los 0, 1, 2 y 3 días de tratamiento (**Figura 33**), se observó que la mayor acumulación de agua junto con la de Na<sup>+</sup> en las hojas del mutante podría ser como consecuencia de un mayor flujo de evapotranspiración. Así, los valores medios de  $g_s$  y transpiración fueron similares en WT y mutante en control (día 0). La salinidad provocó

un marcado descenso de  $g_s$  y transpiración en ambos genotipos, debido probablemente al cierre estomático, sin embargo tras dos días de tratamiento esta disminución fue significativamente menor en el mutante que en WT. Estos resultados ponen de manifiesto que el mutante podría estar perdiendo más agua en hoja por mayor transpiración, lo que induciría un mayor transporte de agua conjuntamente con  $Na^+$  y, por tanto, un rápido estrés iónico.

## 2.2. Expresión de genes implicados en el transporte de $Na^+$

El alto transporte de  $Na^+$  a la parte aérea del mutante también podría ser una consecuencia de la alteración en los niveles de expresión de los genes implicados en el transporte a larga distancia de  $Na^+$ , es decir desde la raíz a la parte aérea. Para ello se analizó en raíz y en la 1ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante la expresión de los principales genes implicados en el transporte a larga distancia de  $Na^+$ , como son *SISOS1* y *SIHKT1s* (**Figura 34**). En este último caso se determinó la expresión de las dos isoformas identificadas en tomate: *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*. La expresión relativa de los genes se calculó utilizando como referencia la expresión génica obtenida en las plantas WT (hoja o raíz en cada caso) a 0 horas del tratamiento salino (condiciones control), a la que se otorgó un valor de 1. En raíz los cambios más significativos se observaron en la expresión de *SIHKT1s*, ya que la expresión de las dos isoformas, principalmente *SIHKT1;1*, estaba inhibida en la raíz del mutante respecto al WT, tanto en control como después de 24 horas de sal (100 mM NaCl). La expresión *SIHKT1;1* no se vio muy afectada por la salinidad, sin embargo la salinidad indujo una disminución en la expresión de la isoforma *SIHKT1;2*, tanto en raíz del WT como del mutante, aunque en el mutante los niveles de expresión eran significativamente menores que los de WT. En el caso de *SISOS1* en raíz, aunque se observó una ligera tendencia a que el mutante presentara mayor expresión en ausencia de estrés (control), las diferencias entre WT y mutante no fueron significativas ni en control ni en sal.



**Figura 34.** Niveles de expresión de los genes *SIHKT1;1*, *SIHKT1;2* y *SISOS1* en raíz y hoja de plantas WT y mutante *she-1* en control (día 0) y después de 1 día de tratamiento salino (100 mM de NaCl) (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

En hoja el papel de estos genes se ha relacionado también con la capacidad para evitar la citotoxicidad del Na<sup>+</sup> en el citoplasma celular (Almeida *et al.*, 2013; Hamamoto *et al.*, 2015). Al igual que en la raíz, en hoja los cambios más significativos se observaron en la expresión de los *SIHKT1s* (**Figura 34**). En WT, la salinidad indujo un

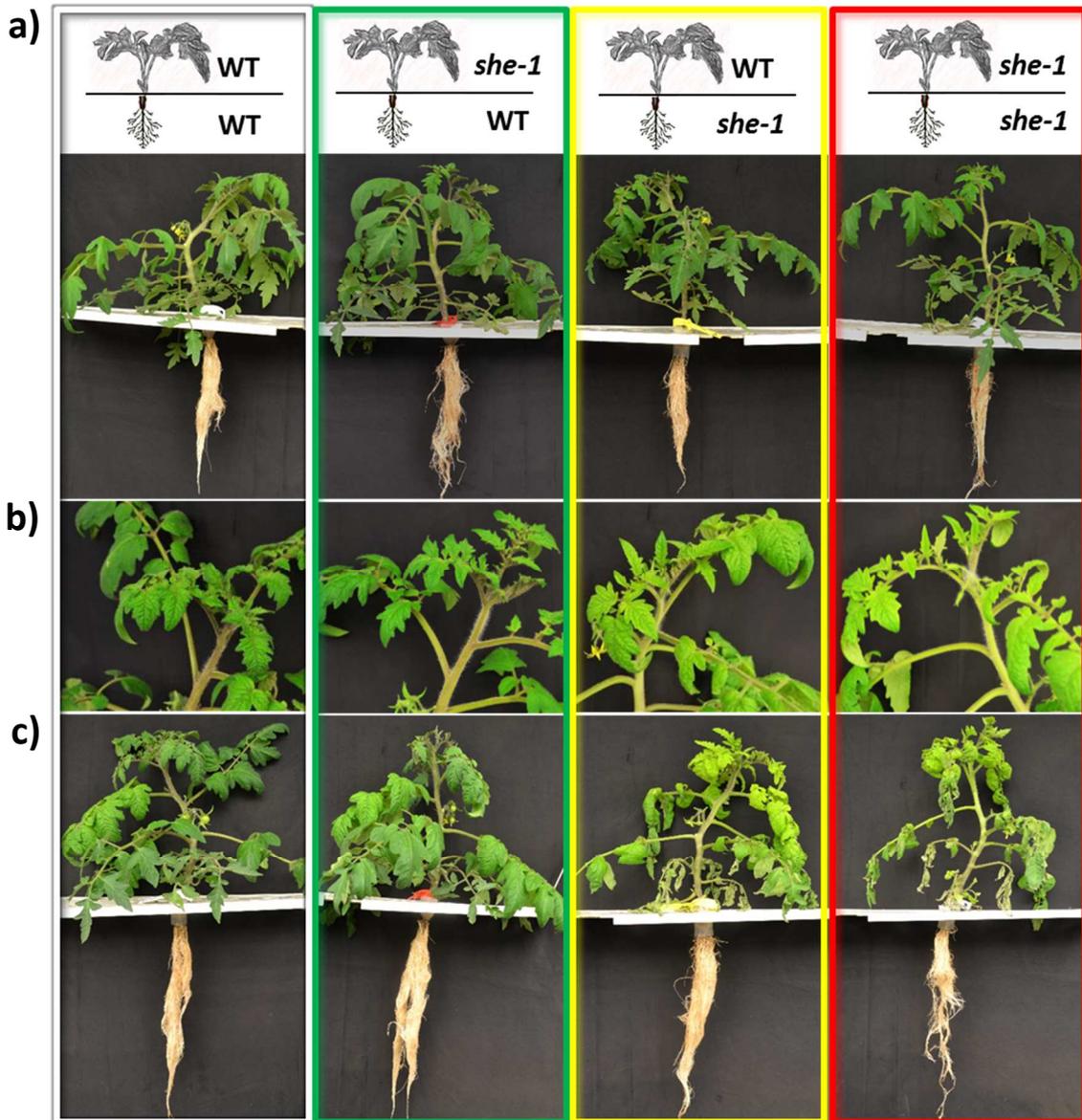
comportamiento opuesto en la expresión de estas isoformas, mientras que aumentaba con la sal la expresión de *SIHKT1;1*, la expresión de *SIHKT1;2* se reducía hasta 0,3, lo que sugiere que ambos genes pueden estar implicadas en diferentes mecanismos de respuesta a la salinidad de la hoja, como ya ha sido sugerido por otros autores (Asins *et al.*, 2013). En el mutante, sin embargo, la expresión de ambas isoformas *SIHKT1;1*, y *SIHKT1;2* estaba fuertemente inhibida por la salinidad. En cuanto a la expresión de *SISOS1* en hoja no se observaron diferencias significativas entre WT y mutante sin y con estrés, aumentando la expresión de *SISOS1* tras 24 horas de tratamiento salino en ambos genotipos por igual. Estos resultados sugieren que la alta acumulación de Na<sup>+</sup> en la parte aérea del mutante *she-1* hipersensible a la sal podría estar relacionada con la alteración en el patrón de expresión de los genes *SIHKT1s*.

### 2.3. Importancia de la raíz y parte aérea en la sensibilidad a la sal del mutante *she-1*

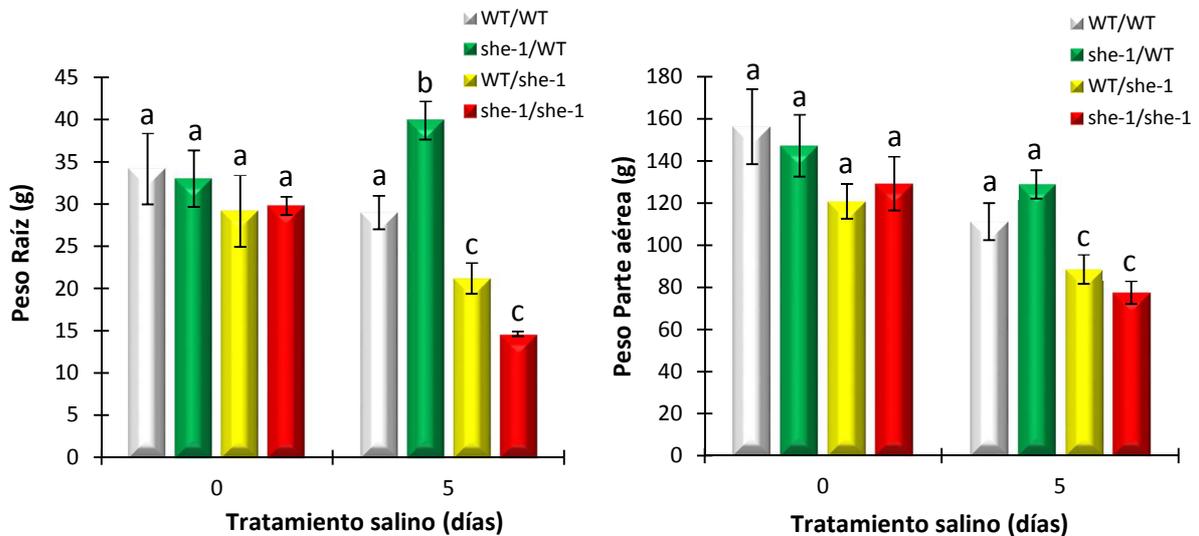
Para completar la caracterización del mutante *she-1* se realizó un experimento intercambiando la raíz y parte aérea de WT y mutante mediante injertos, y comparando la respuesta frente a la salinidad de los injertos recíprocos WT como esqueje y *she-1* como portainjerto (WT/*she-1*) y el recíproco (*she-1*/WT) con la respuesta de las plantas autoinjertadas de WT y mutante (WT/WT y *she-1*/*she-1*). Los injertos recíprocos se compararon con las plantas autoinjertadas debido a que hay un desfase en el desarrollo entre las plantas no injertadas e injertadas, ya que tiene que producirse la unión de los haces vasculares para volver a reanudar el desarrollo (Fernández García, 2003).

Antes de aplicar el tratamiento salino (día 0), el desarrollo de las plantas autoinjertadas y de los injertos recíprocos entre WT y mutante fué similar (**Figura 35a**). Sin embargo, a los 2 días de tratamiento salino (150 mM NaCl) las plantas autoinjertadas del mutante *she-1* (*she-1*/*she-1*) y la combinación WT/*she-1* mostraron clorosis en sus hojas, mientras que las otras dos combinaciones (WT/WT y *she-1*/WT) no mostraron ningún síntoma de estrés por salinidad (**Figura 35b**). Estas diferencias frente a la salinidad se hicieron más evidentes tras 5 días de tratamiento, donde la hipersensibilidad a la sal de la combinación WT/*she-1* siguió siendo similar a la observada en las plantas autoinjertadas del mutante (*she-1*/*she-1*), con hojas basales secas, quemaduras en las hojas completamente desarrolladas y alto grado de clorosis, sobre todo en las hojas

jóvenes (**Figura 35c**). Los valores medios de peso fresco de parte aérea y raíz fueron significativamente más bajos en los injertos WT/*she-1* y *she-1*/*she-1* que en las otras dos combinaciones, lo que demostró que estas plantas redujeron significativamente su desarrollo general tras 5 días de tratamiento. Las plantas autoinjertadas de WT y de la combinación *she-1*/WT, sin embargo, solo vieron afectado su desarrollo en la parte aérea, pero en menor grado que las otras dos combinaciones (**Figura 36**).

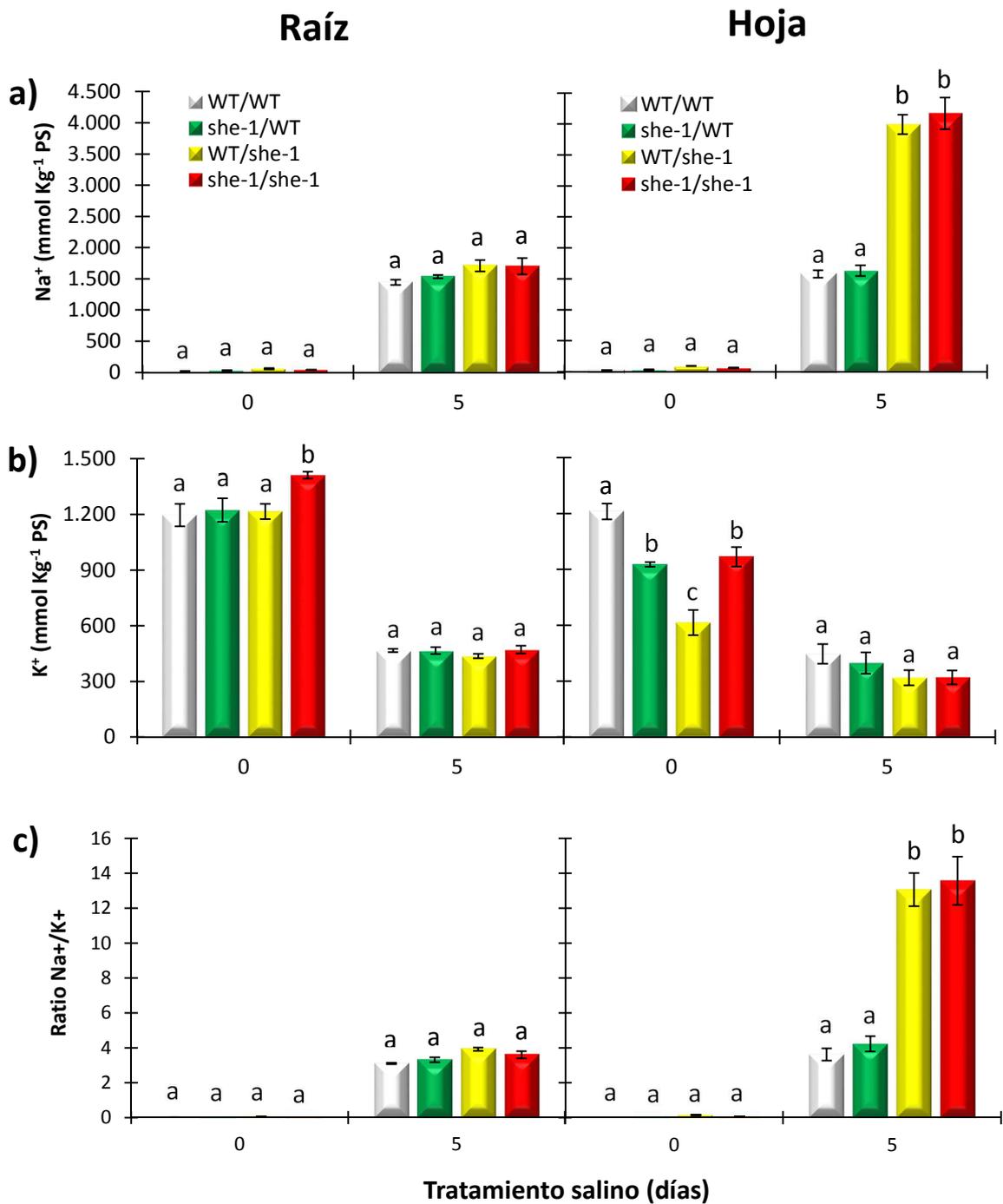


**Figura 35. La raíz es el principal órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante *she-1*.** a) El desarrollo de las plantas autoinjertadas de WT y mutante (WT/WT y *she-1*/*she-1*) y los injertos recíprocos entre WT y mutante (*she-1*/WT y WT/*she-1*) era similar justo antes de aplicar el tratamiento salino (día 0). b) A los 2 días de tratamiento salino (150 mM NaCl) solo las plantas autoinjertadas del mutante *she-1* y la combinación WT/*she-1* mostraban ya síntomas de clorosis en sus hojas. c) Después de 5 días de tratamiento, la hipersensibilidad a la sal del mutante y de WT/*she-1* es muy evidente, con hojas secas y alto grado de clorosis.



**Figura 36.** Cuando el mutante *she-1* actúa como portainjerto (*WT/she-1* y *she-1/she-1*) se reduce el peso de la raíz y parte aérea de los injertos al final del tratamiento salino. Peso de la raíz y parte aérea de las plantas autoinjertadas de WT y mutante (*WT/WT* y *she-1/she-1*) y los injertos recíprocos entre WT y mutante (*she-1/WT* y *WT/she-1*) el día 0 y después de 5 días de tratamiento salino (valores medios  $\pm$  ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas. (Diferencias entre medias,  $LSD_{5\%}$ ).

Las concentraciones de los iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y la relación  $Na^+/K^+$  se analizaron en raíz y hoja antes de aplicar el tratamiento salino (día 0) y tras 2 y 5 días de tratamiento salino (150 mM NaCl). Con este análisis se constató que cuando el portainjerto era el mutante y la parte aérea WT (*WT/she-1*), la homeostasis iónica de  $Na^+$  y  $K^+$  era muy similar a la mostrada por *she-1/she-1*, mientras que cuando el mutante se utilizaba como esqueje, la distribución de iones durante el tratamiento salino fue similar a la mostrada por las plantas WT, tanto autoinjertadas como no injertadas (**Figura 37**). Así, mientras que en raíz solo se observó una tendencia a aumentar la concentración de  $Na^+$  en las dos combinaciones sensibles a sal a los 5 días de tratamiento, en hoja la concentración de  $Na^+$  se duplicó en *WT/she-1* y *she-1/she-1* a los 2 días de tratamiento (datos no mostrados), respecto a las otras combinaciones, y continuó incrementando tras 5 días tratamiento salino (**Figura 37a**). La concentración de  $K^+$  también tendió a reducirse en las hojas de ambas combinaciones a los 5 días de tratamiento, aunque sin diferencias significativas (**Figura 37b**), lo que indujo valores de la relación  $Na^+/K^+$  en hoja mucho más elevados en *WT/she-1* y *she-1/she-1* que en las plantas autoinjertadas de WT y la combinación *she-1/WT* (**Figura 37c**). Así, los valores de la relación  $Na^+/K^+$  fueron próximos a 14 en los injertos que tenía el mutante en la raíz y 4 en los otras dos. Considerados en conjunto, estos resultados muestran la importancia de la raíz en la sensibilidad a la sal del mutante.



**Figura 37. La elevada acumulación de Na<sup>+</sup> y relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en hojas de las plantas autoinjertadas del mutante *she-1* y en las plantas injertadas WT/*she-1* están relacionadas con la hipersensibilidad a la sal. Concentraciones de Na<sup>+</sup> (a), K<sup>+</sup> (b) y relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (c) en raíz y hoja de plantas antes de aplicar el tratamiento salino (día 0) y a los 5 días de tratamiento salino (150 mM NaCl; valores medios ± ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias, LSD<sub>5%</sub>).**



# **CAPÍTULO I. DISCUSIÓN**



## IV. CAPITULO I

### DISCUSIÓN

#### **1. Interés de utilizar la especie silvestre *S. pennellii* para identificar mutantes implicados en tolerancia a salinidad**

Para mantener el desarrollo en condiciones de estrés salino, las plantas deben recuperar la homeostasis iónica y osmótica (Munns y Tester, 2008). Desde un punto de vista agronómico, la primera cuestión que nos planteamos es como llegar a identificar genes y mecanismos que tengan un papel realmente importante en la respuesta al estrés salino a largo plazo (Hirayama y Shinozaki, 2010). Recientemente, Shavrukov (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 los 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 (2011) sugería que entre los cientos de genes de respuesta a estrés hídrico que se identifican a corto plazo, solo una pequeña proporción de ellos pueden ser realmente importantes desde el punto de vista de la productividad. Por ello, la estrategia utilizada en este trabajo para avanzar en el conocimiento de los mecanismos de tolerancia a salinidad en tomate cultivado y silvestre ha sido el fenotipado a medio y largo plazo de mutantes en condiciones de salinidad.

En este contexto, el análisis detallado de un mutante representa uno de los caminos más exitosos para determinar la función de un gen (Kuromori *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010; Atkinson y Urwin, 2012). El empleo de esta aproximación tiene dos ventajas: en primer lugar, la detección de un mutante revela que el gen alterado tiene un efecto clave sobre el carácter, ya que su alteración es capaz de provocar un cambio cualitativo; y, en segundo lugar, el fenotipo del mutante permite inferir la función del gen. Sin embargo, no todos los mutantes identificados son mutantes insercionales, ya que algunas de las líneas que exhiben alteraciones fenotípicas pueden ser variantes epigenéticas debido, entre otras causas, a una alteración en el proceso de metilación del DNA (Mohan Jain, 2001). Algunos de los mutantes que hemos identificado también pueden ser de tipo somaclonal, como consecuencia de la activación de elementos transponibles, y por tanto no insercional. La activación de elementos transponibles *in vitro* tiene los mismos efectos

que una mutación insercional (anulación de función o alteración de expresión de un gen endógeno), pero la diferencia estriba en que el gen endógeno no queda etiquetado por el T-DNA, sino por el transposón.

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. Esta herramienta se ha utilizado sobre todo en *Arabidopsis* para la identificación de genes involucrados en diferentes procesos biológicos (O'Malley y Ecker, 2010; Ghedira *et al.*, 2013; Wilson-Sanchez *et al.*, 2014). El análisis de mutantes de inserción se ha desarrollado también en otras especies de interés agronómico, como arroz, maíz, soja, etc. (Jeon *et al.*, 2000; Mathieu *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). En tomate, la mayoría de las colecciones de mutantes existentes se han obtenido por mutagénesis química con EMS y se han generado principalmente a partir del cultivar Micro-Tom (Carvalho *et al.*, 2011; Okabe *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2011). 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 ni a partir de especies silvestres de tomate con alto nivel de tolerancia a estreses abióticos, como las que se están obteniendo entre los tres grupos de investigación que venimos colaborando desde hace unos años (Atarés *et al.*, 2011; Pineda B., 2012). Esto justifica el interés de llevar a cabo el análisis fenotípico de la colección de líneas T-DNA generadas en tomate cultivado y silvestre.

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 de una accesión tolerante a la sal de *S. pennellii* (Bolarin *et al.*, 1991; Alarcon *et al.*, 1993; Santa-Cruz *et al.*, 1999). 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 respuesta a estrés. 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), tal como hemos observado recientemente en el mutante de desarrollo *res* (*restored cell structure by salinity*); este mutante no solo muestra un mayor desarrollo en medio salino sino que todas las alteraciones morfológicas desaparecen y se reorganiza la estructura celular (García-Abellan *et al.*, 2015). La tolerancia a la sal de *S. pennellii* se ha atribuido a

adaptaciones evolutivas que conducen a recuperar rápidamente la homeostasis iónica y osmótica (Bolarín *et al.*, 1995; Santa-Cruz *et al.*, 1999; Alfocea *et al.*, 2000), así como a una mejor protección frente a las especies reactivas de oxígeno (Frery *et al.*, 2010), aunque la base genética para esas adaptaciones sigue siendo desconocida. El empleo de una especie filogenéticamente relacionada con tomate y que presenta altos niveles de tolerancia a distintos estreses abióticos puede ser la mejor elección si queremos encontrar genes relacionados con estos caracteres y que puedan aportar cierta mejora a la especie cultivada (Bolger *et al.*, 2014).

## **2. Algunas alteraciones en el desarrollo vegetativo de las plantas están relacionadas con una mayor tolerancia al estrés salino**

La especie silvestre *S. pennellii*, al estar adaptada a condiciones climáticas extremas, muestra características morfológicas que contribuyen a la mejor adaptación a estreses abióticos, en comparación con el tomate cultivado. En este sentido, no es descartable que mutantes clasificados *a priori* como de desarrollo puedan tener un gran interés para la mejora de la tolerancia a los estreses abióticos. Al comparar tomate cultivado y silvestre, es indudable que las diferencias fenotípicas son notables (Moyle, 2008; Chitwood *et al.*, 2013; Koenig *et al.*, 2013), y esos cambios en sus órganos vegetativos como hojas, que exhiben diferencias en el tamaño, complejidad y morfología, han permitido a la especie silvestre adaptarse a su entorno desfavorable (Chitwood *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios sobre las características de las hojas de *S. pennellii* son escasos (Kimura *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2011). Recientemente, Chitwood *et al.* (2013) indicaban que la morfología foliar es altamente heredable, siendo *S. pennellii* un recurso valioso para estudiar la variación natural en las hojas. Del mismo modo que el ángulo de las hojas ha sido responsable de la mayoría de los aumentos de rendimiento de maíz en el siglo pasado (Duvick, 2005; Tian *et al.*, 2011), la morfología de las hojas puede ser determinante, en gran parte, de la tolerancia a estreses abióticos, y hasta ahora sólo una pequeña fracción de los genes que regulan la enorme variación de morfología de las hojas han sido identificados (Chitwood *et al.*, 2013). En este sentido, se ha sugerido que la forma y el tamaño de las hojas juegan un papel importantes en la eficiencia del uso del agua (Parkhurst y Loucks, 1972; Givnish y Vermeij, 1976; Poorter *et al.*, 2010; Nicotra *et al.*, 2011; Chitwood *et al.*, 2012).

El mutante *sl-1* (*succulent leaves-1*), de la especie silvestre *S. pennellii*, es un mutante de desarrollo identificado en la población TG1 (dominante), y que muestra un fenotipo compacto. El mayor interés del mutante, desde el punto de vista de la tolerancia a estrés abiótico, es la morfología de sus hojas, de color verde muy intenso, mayor grosor y muy suculentas (**Figura 18**), características que le permite al mutante mantener un mayor nivel de hidratación en sus hojas (**Figura 19b**). Estos cambios morfológicos y fisiológicos observados en el mutante en ausencia de estrés permiten a este responder mejor al estrés iónico inducido por la salinidad (**Figura 20**). Así, el mutante *sl-1* presenta mayor acumulación de  $K^+$  y menor relación  $Na^+/K^+$ , mecanismo opuesto al encontrado normalmente en la especie silvestre, y llega incluso a mostrar menores síntomas de estrés, como clorosis, que la accesión sin transformar de la especie silvestre. Estos resultados ponen de manifiesto que la morfología de las hojas es una característica muy importante en la tolerancia al estrés salino.

### **3. El análisis de mutantes de *S. pennellii* demuestra la importancia de regular la pérdida de agua como mecanismo de tolerancia a la salinidad**

Frente al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía, las plantas utilizan diferentes estrategias que permiten mantener el turgor, bien mediante ajuste osmótico por acumulación de solutos inorgánicos y orgánicos o mediante la regulación de la pérdida de agua a través de las hojas (Verslues y Juenger, 2011; Fang y Xiong, 2015). Aunque el efecto osmótico se ha asociado generalmente a las primeras fases de estrés, en tomate se ha comprobado que puede ser tan importante como el efecto iónico a largo plazo, debido al importante coste energético que supone la utilización de solutos orgánicos para realizar el ajuste osmótico (Muñoz-Mayor *et al.*, 2008; Muñoz-Mayor *et al.*, 2012). Precisamente, uno de los mutantes identificados en tomate que tiene anulada la expresión del gen *SIWAK1* (*WALL-ASSOCIATED KINASE 1*), es tolerante al estrés iónico, ya que reduce la acumulación de  $Na^+$  en hoja y especialmente en las hojas superiores, pero sensible al estrés osmótico debido a su menor capacidad de ajuste osmótico (Meco Martínez, 2015), y esto se refleja en una reducción del rendimiento en fruto del mutante *wak1* en condiciones salinas.

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 *S. pennellii* (Bolger *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a su enorme relevancia es muy poco lo que sabemos en torno a los mecanismos y genes implicados en el control de la pérdida de agua por transpiración y, además, hay discrepancias en la bibliografía a la hora de definir la mejor estrategia para mejorar la eficiencia del uso del agua por la planta (Tanaka *et al.*, 2013; Lawson y Blatt, 2014). Así, una estrategia propuesta es aumentar la conductancia estomática para incrementar la tasa fotosintética, mientras que la estrategia opuesta parece ser más eficaz en las especies tolerantes (Shabala, 2013). Pero en condiciones salinas, la mayor transpiración de la hoja puede incrementar el efecto tóxico, como hemos comprobado recientemente en el mutante de inserción *ars1* (*altered response to salt stress 1*), que tiene anulada la expresión de un factor de transcripción de tipo R1-MYB (Campos Serrano, 2015).

La caracterización fisiológica de los mutantes *succulent leaves-1* (*sl-1*) y *salt hypersensitive pennellii* (*shp-1*) demuestra la importancia que tiene la capacidad de la hoja para regular la pérdida de agua frente a la tolerancia/sensibilidad al estrés salino. En este sentido, el mecanismo predominante en el mutante *sl-1* es evitar la pérdida de agua, bien por modificaciones en la densidad o morfología de los estomas, o bien por cambios en la composición o disposición de las ceras cuticulares de la hoja, ya que, como hemos visto anteriormente, el mutante *sl-1* presenta hojas con folíolos crasos que provoca una mayor tolerancia al estrés salino que WT. Por el contrario, el mutante *shp-1* presenta mayor pérdida de agua por las hojas, provocando una mayor transpiración y transporte de agua y, a su vez, un mayor transporte del ion tóxico Na<sup>+</sup> hasta las hojas en medio salino (**Figura 26a y 25b**). Esta alteración fisiológica del mutante *shp-1* induce elevada clorosis e hipersensibilidad a la salinidad desde los primeros días de aplicar el estrés. El análisis de ambos mutantes demuestra que el control de la pérdida de agua tiene un papel muy importante en la tolerancia de la especie silvestre frente a la salinidad y sequía. Esto ha sido confirmado recientemente al comparar la respuesta del tomate cultivado y silvestre y observar que la mayor tolerancia de *S. pennellii* estaba relacionada con mayor temperatura de la hoja durante el estrés salino, medida por termografía infrarroja, y, por consiguiente, con menor pérdida de agua, lo que le permitía diluir los iones salinos que llegan hasta las hojas (Albaladejo *et al.*, 2015a).

Otra estrategia que puede suponer un importante mecanismo para optimizar la productividad del agua bajo condiciones salinas es la reducción en la densidad estomática,

tal como se ha observado en diferentes halófitas e incluso en algunas glicófitas tolerantes a salinidad (Shabala, 2013), y esta estrategia parece también ser utilizada por *S. pennellii* (Albaladejo *et al.*, 2015b). La razón es que la transpiración cuticular está normalmente concentrada en el área que circunda a los estomas, donde hay más y mayores poros cuticulares, por lo que tener menor número de estomas completamente abiertos puede ser una estrategia más eficaz para evitar la pérdida de agua que tener muchos estomas parcialmente abiertos (Shabala, 2013). Sin embargo, la mayor pérdida de agua en el mutante hipersensible a sal *shp-1* no estaba relacionada con una mayor densidad estomática, ya que el número de estomas no solo no incrementaba sino que incluso había una tendencia a reducirse en el mutante (**Figura 26b**), lo que sugiere que la pérdida de agua en el mutante puede ser a través de la cutícula.

Cuando se habla de pérdida de agua a través de la hoja generalmente se considera el agua perdida por transpiración estomática, pero recientemente se ha empezado a considerar el agua perdida por la cutícula (Wu *et al.*, 2012; Fanourakis *et al.*, 2014). Así, el mayor contenido de ceras en la composición de la cutícula de la especie silvestre *S. pennellii* (hasta un 20% del peso seco de las hojas, respecto a un 0,9% en las hojas de *S. lycopersicum*) puede ser un mecanismo clave para limitar la pérdida de agua (Fobes *et al.*, 1985). Tan marcado aumento en la acumulación de ceras epicuticulares se relaciona con diferencias significativas 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*. Recientemente, hemos realizado un análisis de microarray en hojas procedentes de plantas de tomate cultivado y de la especie silvestre *S. pennellii* en condiciones de sequía y hemos observado diferencias entre ambas especies en el patrón de expresión de genes involucrados en la eficiencia del uso del agua, incluido un gen implicado en la biosíntesis de ceras que incrementa su expresión en *S. pennellii* (Albaladejo *et al.*, 2015a, b). Considerados en conjunto, se puede concluir que el control de la pérdida de agua por la hoja tiene un papel muy importante en la tolerancia del tomate frente a la salinidad y sequía.

#### 4. Relación entre tolerancia a la salinidad y homeostasis de $K^+$

Numerosos estudios han sugerido una relación positiva entre el contenido de  $K^+$  en la planta y la tolerancia a la salinidad (Chen *et al.*, 2005; Garthwaite *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Smethurst *et al.*, 2008; Cuin *et al.*, 2011). Para identificar los mecanismos determinantes de la tolerancia a la salinidad en las especies silvestres, sería de gran interés avanzar en el conocimiento de los mecanismos que operan en las halófitas para ser capaces de discriminar entre  $K^+$  y  $Na^+$  y mantener la homeostasis de  $K^+$  en ambientes salinos. Interesantemente, el mutante *sl-1* de *S. pennellii* mejora la homeostasis de  $K^+$ . Como hemos visto anteriormente, este mutante mostraba una mayor tolerancia al estrés salino que WT y a su vez presentaba un mayor contenido de  $K^+$  tanto en control como en estrés salino (**Figura 20c**), lo que indica que la mutación induce una mayor acumulación de  $K^+$  que puede estar relacionada con la mayor tolerancia del mutante al estrés salino, (Tahal *et al.*, 2000; Rengel y Damon, 2008). Por el contrario, el  $K^+$  disminuye con la salinidad en el mutante *she-1* (**Tabla 20**) y, como consecuencia de esta disminución, junto con la elevada acumulación de  $Na^+$ , la relación  $Na^+/K^+$  es mucho mayor en la parte aérea de las plantas del mutante hipersensible a sal *she-1*. La relación  $Na^+/K^+$  es probablemente el mejor carácter que refleja la homeostasis iónica, de modo que un menor valor de esta relación  $Na^+/K^+$  se puede correlacionar con una mayor tolerancia a la salinidad (Estañ *et al.*, 2005).

#### 5. La regulación del transporte de $Na^+$ a la parte aérea es un mecanismo de tolerancia común en la especie cultivada y silvestre

El efecto específico inducido por la salinidad es la toxicidad iónica provocada por la acumulación de iones salinos, especialmente  $Na^+$  (Hasegawa, 2013; Maathuis, 2014). En tomate, se ha demostrado que la tolerancia a la salinidad está asociada con la capacidad de regulación del transporte de  $Na^+$  desde la raíz a la parte aérea a medio-largo plazo, así como la distribución de  $Na^+$  entre hojas adultas y jóvenes (Estañ *et al.*, 2005; Olias *et al.*, 2009; Cuartero *et al.*, 2010). Las plantas halófitas han desarrollado una serie de adaptaciones para tolerar concentraciones muy altas de sales, tales como compartimentación de iones en las vacuolas celulares, glándulas secretoras de sales y la regulación de la absorción y transporte de iones (Flowers *et al.*, 1986; Colmer *et al.*, 2006; Flowers y Colmer, 2008; Shabala y Mackay, 2011). La capacidad de las plantas halófilas de utilizar  $Na^+$  como un agente osmótico para mantener la turgencia celular, menos

costoso que los solutos orgánicos, implica que el  $\text{Na}^+$  llegue con rapidez a la parte aérea de las plantas a través de la corriente de transpiración después de imponer el estrés (Shabala y Mackay, 2011), mostrando una estrategia que se ha denominado ‘incluidora’, típica de la especie tolerantes a la salinidad (Bolarín *et al.*, 1993; Bolarín *et al.*, 1995; Estañ *et al.*, 2005). Pero la regulación del transporte de  $\text{Na}^+$  a lo largo del periodo de exposición al estrés es un mecanismo que debe operar tanto en la especie cultivada como en la especie silvestre, como se demuestra en el mutante hipersensible a sal *shp-1* de *S. pennellii* (Figura 22 y 25b).

Una respuesta fisiológica similar a la mostrada por el mutante *shp-1* de *S. pennellii* es la que presenta el mutante de tomate hipersensible a sal *she-1*, con elevada clorosis foliar durante el tratamiento salino (figura 28a), la cual parece estar también causada por el alto transporte de  $\text{Na}^+$  hasta las hojas (figura 29). En ambos mutantes, *shp-1* y *she-1*, parece no existir ninguna barrera para transportar  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, acumulándose en gran cantidad en las hojas y tallo de las plantas mutantes, pero no en raíz donde la cantidad de  $\text{Na}^+$  es similar a WT. También la estrategia de ambos mutantes para intentar reducir el efecto tóxico del  $\text{Na}^+$  es incrementar el contenido de agua en las hojas, de este modo no eliminan *per se* el contenido de  $\text{Na}^+$ , pero sí diluyen su concentración a nivel celular (Hasegawa, 2013).

Aunque se ha avanzado en la identificación de genes implicados en la absorción y transporte de  $\text{Na}^+$ , sin embargo aún hay un gran desconocimiento sobre la percepción, señalización y regulación del flujo de  $\text{Na}^+$  en la planta (Hasegawa, 2013; Maathuis, 2014). Además, hay evidencias de que los genes implicados pueden ser diferentes en cada especie. Así, los mecanismos de respuesta a estrés en *Arabidopsis* y arroz son distintos (Nagata *et al.*, 2008), los ortólogos de *SOS1* no cumplen la misma función en *Arabidopsis* y tomate (Olías *et al.*, 2009) y hay una amplia variedad de transportadores de  $\text{K}^+$  (Gomez-Porras *et al.*, 2012). Por lo que respecta a los genes *HKTs*, hay uno en *Arabidopsis*, dos en tomate (Asins *et al.*, 2013) y nueve en arroz, siete funcionales y dos pseudogenes (Garcia-deblás *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta la diversidad de genes *HKTs*, no es de extrañar que los ortólogos de esta familia cumplan papeles diferentes (Huang *et al.*, 2008; Jabnourne *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2013). Con relación al tomate, se ha demostrado que la ruta SOS no solo ejerce un papel en la salida de  $\text{Na}^+$  por la raíz, sino que también interviene en la redistribución dentro de la planta (Olías *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2012). Respecto al papel de *HKT1* en la tolerancia a la salinidad del tomate, recientes resultados

sugieren que ambas isoformas están involucradas en la reducción del transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea (Asins *et al.*, 2013; García-Abellan *et al.*, 2014).

Es interesante señalar que en el mutante hipersensible al estrés iónico *she-1*, la toxicidad de  $\text{Na}^+$  en hoja está relacionada con una alteración en los niveles de expresión de los genes *SIHKTs* (**Figura 34**). Así, en la raíz del mutante se encuentra silenciada la isoforma *SIHKTI;1*, tanto en condiciones control como a las 24 horas de estrés salino (**Figura 34a**). Una mutación disfuncional en el gen *AtHKTI;1* en *A. thaliana* confiere a la planta mutante (*athk1-3*) una hipersensibilidad en hoja en condiciones de estrés salino, reflejado fenotípicamente en una severa clorosis foliar (Mäser *et al.*, 2002; Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005), de manera similar a la respuesta observada en el mutante *she-1*. Moller *et al.* (2009) mostraron que la sobreexpresión de *AtHKTI;1* en raíz de *Arabidopsis* provocó una disminución de  $\text{Na}^+$  en la parte aérea de la planta del 37-64%. En cuanto a la isoforma *SIHKTI;2*, se ha sugerido que juega un papel importante en la recuperación de  $\text{Na}^+$  de xilema evitando que se acumule en las hojas, ya que una mayor expresión de *SIHKTI;2* en *S. lycopersicum* se ha correlacionado con una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en las hojas (Almeida *et al.*, 2014; Garcia-Abellan *et al.*, 2015). En el mutante *she-1*, la expresión de *SIHKTI;2* se encuentra muy reducida en condiciones control y prácticamente inhibida tras 24 horas de tratamiento salino. A nivel de hoja, se detecta una inhibición en la expresión de ambas isoformas de *HKTI* en condiciones de estrés salino, lo que podría ser una consecuencia de la mayor llegada de  $\text{Na}^+$  a las células de la hoja. Así, el mutante *she-1* trataría de evitar o reducir la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  a las células de las hojas mediante la inhibición de los genes *HKTI*s. En resumen, la región alterada del genoma en el mutante *she-1* altera, de manera directa o indirecta, la expresión de los genes *HKTI* y, por tanto, la homeostasis de  $\text{Na}^+$ .

Mediante injertos recíprocos entre WT y mutante se ha comprobado que la raíz es el órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante *she-1* (**Figura 35**). A los 5 días de tratamiento salino (150 mM NaCl), las plantas autoinjertadas del mutante *she-1* y las plantas con el mutante *she-1* como portainjerto (WT/*she-1*) mostraban hojas basales secas, quemaduras en las hojas completamente desarrolladas y alto grado de clorosis en todas las hojas y, especialmente, en las hojas jóvenes. Además, la homeostasis iónica de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las plantas WT/*she-1* era muy similar a la mostrada por el mutante, mientras que cuando el mutante se utilizaba como esqueje, la distribución de iones durante el

tratamiento salino era similar a la mostrada por las plantas WT (**Figura 37**). Estos resultados sugieren que la mutación podría estar alterando de forma directa o indirecta algún mecanismo de respuesta a salinidad en la raíz y esta alteración hace que la planta transporte de forma masiva  $\text{Na}^+$  a la parte aérea. La no observación de fenotipo de sensibilidad en el injerto que tiene como esqueje el mutante sugiere que la sensibilidad del mutante no parece ser debida por un mayor flujo de transpiración por mayor pérdida de agua en la hoja como se ha apuntado anteriormente. Es decir, no es que la mayor transpiración en el mutante aumente el transporte de agua y con ella se arrastre  $\text{Na}^+$  a la parte aérea, sino que más bien parece que la mayor acumulación de agua observada en el mutante podría ser un efecto indirecto, como un intento de la planta por diluir la mayor llegada de  $\text{Na}^+$  a las hojas.

Flowers y Colmer (2008) sugerían que la toxicidad del  $\text{Na}^+$  en el metabolismo de las plantas no difiere en gran medida entre halófitas y glicófitas, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en los mutantes de tomate silvestre y cultivado (*shp-1* y *she-1*). El  $\text{Na}^+$  que es absorbido por la planta desde el medio salino debe ser secuestrado de manera eficiente en las vacuolas para evitar su acumulación en el citosol (Shabala y Mackay, 2011). Pero como la capacidad de almacenaje vacuolar tiene un límite, tanto la especie “incluidora” (*S. pennellii*) como “excluidora” (*S. lycopersicum*) deben ser capaces de regular el transporte de  $\text{Na}^+$  hasta las hojas, aunque ello ocurra a diferentes niveles de estrés o diferentes periodos de tratamiento. Así, a pesar de ser de especies diferentes, los síntomas de sensibilidad a la sal en los mutantes *shp-1* y *she-1* son muy similares, y en ambos casos están causados por una desregulación del transporte de  $\text{Na}^+$  hasta las hojas, aunque este transporte pueda estar provocado por diferentes alteraciones. Estos resultados reflejan la importancia de ambos mutantes en la tolerancia/sensibilidad al estrés salino. Debido a que ambos mutantes no son insercionales, en la actualidad se están utilizando diferentes estrategias para llegar a la clonación del gen alterado en cada mutante.

Debido a la gran complejidad de los mecanismos que emplean el tomate cultivado y, especialmente, las especies silvestres para hacer frente a la salinidad, la identificación y caracterización de estos mutantes puede proporcionar avances importantes en el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la adaptación a las condiciones desfavorables. Dada la alta capacidad de adaptación de la especie silvestre *S. pennellii*, la identificación de mutantes alterados en la pérdida de agua por transpiración y en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es la base para llegar a identificar genes clave en la tolerancia a

la salinidad de esta especie y que pueden ser muy valiosos para la mejora del tomate cultivado.





# **CAPÍTULO II. RESULTADOS**



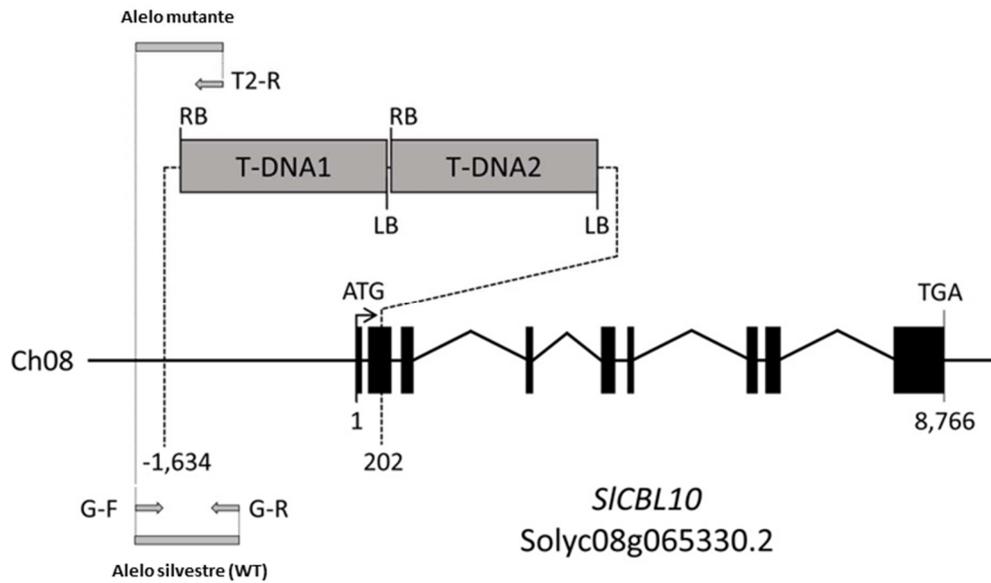
## V. CAPÍTULO II.

### CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DE TOMATE QUE TIENE ANULADA LA EXPRESIÓN DEL GEN *SICBL10*

#### RESULTADOS

En la colección de mutantes T-DNA de tomate generada a partir del cultivar Moneymaker (WT), el grupo del IBMCP identificó un mutante recesivo de tomate (916 ETMM) que era hipersensible al estrés salino tanto en cultivo *in vitro* como *in vivo*. El análisis molecular y genético de este mutante fue realizado conjuntamente por el grupo del IBMCP y el grupo de la UAL. El análisis de las secuencias flanqueantes del T-DNA mostró que había dos copias del T-DNA insertadas en tándem, con el borde izquierdo del T-DNA1 frente al borde derecho del T-DNA2 en el centro del tándem. El tándem de dos copias de T-DNA se localizó en el cromosoma 08, en el gen *SICBL10* (SGN locus Solyc08g065330.2). Este gen codifica para una proteína que actúa como sensor de calcio en el citoplasma de las células (proteínas similares a la Calcineurina-B, del inglés *CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN 10*). El fragmento insertado causó una delección de 1836 pares de bases (pb) entre la base 1634 aguas arriba y la base 202 aguas abajo del codón de inicio de la traducción ATG del gen *SICBL10* (**Figura 38**). Finalmente, se comprobó que había co-segregación genotipo-fenotipo, ya que las plantas hipersensibles al estrés salino portaban el alelo mutante en homocigosis.

Una vez finalizada la caracterización molecular del mutante, el grupo del IBMCP seleccionó una línea homocigota para la mutación, que se ha denominado *cb110*, y con esta línea se han realizado todos los experimentos de caracterización fisiológica y funcional del mutante llevados a cabo en el CEBAS.



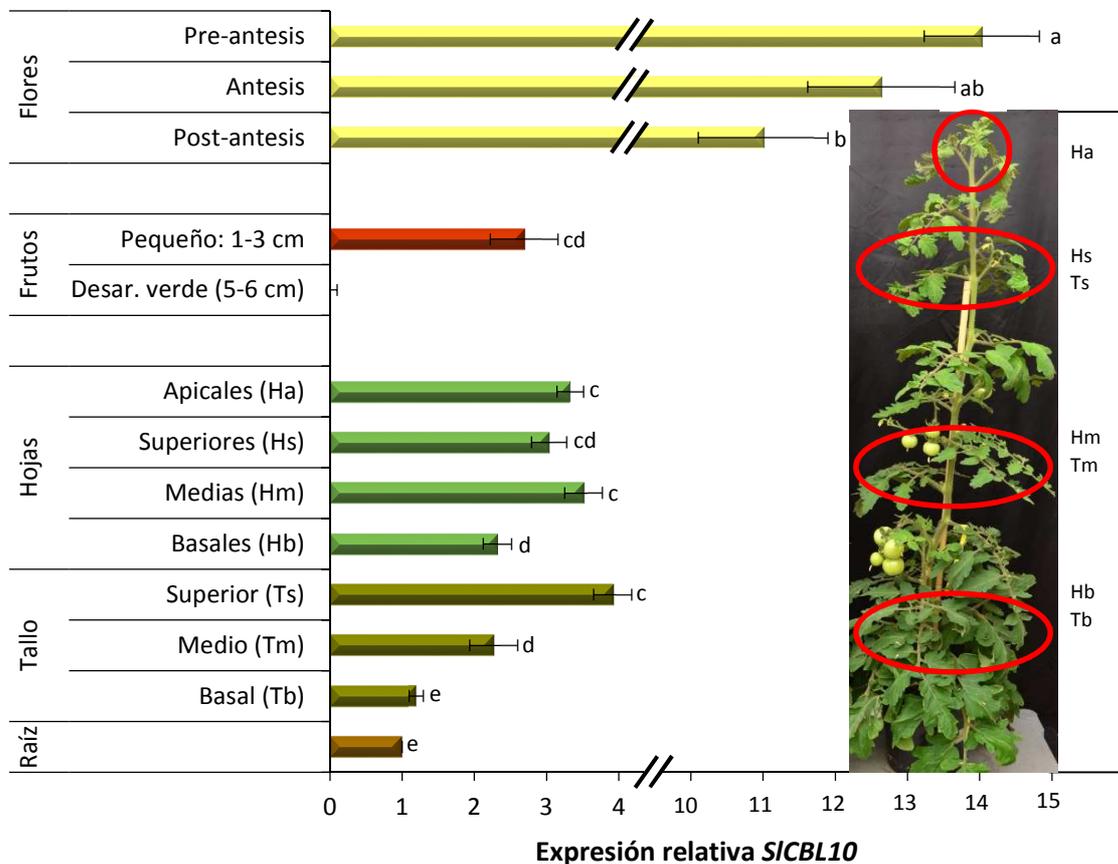
**Figura 38. Organización genómica del gen *SICBL10* y del tándem de dos copias de T-DNA en el mutante de tomate *cbll0* realizado por el grupo de la UAL.** El tándem de inserción de T-DNA dio lugar a una delección de 1836 pb entre la 1634 y 202 pb en el gen *SICBL10*. El número 1 indica el lugar de la traducción de partida, y 8766 indica el último nucleótido de la región codificante. Los exones se representan como cajas negras y las líneas entre cajas negras son intrones. Las líneas de puntos indican la posición donde se encuentra la inserción. Las flechas grises indican los cebadores utilizados para el genotipado de la población TG3. Los cebadores genómicos específicos directo (G-F) e inverso (G-R) para amplificar el alelo silvestre (sin inserción de T-DNA). El cebador genómico específico directo (G-F) y el cebador específico para el T-DNA (T2-R) para amplificar el alelo mutante (lleva la inserción T-DNA)

### 1. Patrón de expresión espacial del gen *SICBL10* en tomate

El análisis del patrón de expresión espacial del gen *SICBL10* por RT-qPCR se realizó en tejidos vegetativos y reproductivos de plantas adultas (con 23-24 hojas completamente desarrolladas) de WT y mutante cultivados en condiciones control (**Figura 39**). El mutante de tomate *cbll0* es un mutante nulo, ya que no se detectó expresión del gen *SICBL10* en ninguno de los órganos analizados. En los órganos vegetativos de las plantas WT, el nivel de expresión más alto de *SICBL10* se detectó en la parte superior de la planta, incluyendo hojas apicales, hojas superiores (3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada), hojas medias (9<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada) y tallo superior (al nivel de inserción de las hojas superiores), con niveles de expresión similares. El nivel de expresión fue disminuyendo conforme bajamos en la planta, tallo medio y hojas basales (17<sup>a</sup> y 18<sup>o</sup> completamente desarrolladas) y finalmente tallo basal y raíz fueron los que mostraron los valores de expresión más bajos en WT.

Los niveles de expresión también se analizaron en flor en 3 fases del desarrollo: pre-antesis, antesis y post-antesis (**Figura 39**). Es interesante destacar los altos niveles de

expresión encontrados en las flores, significativamente mayores que la expresión detectada en los diferentes tejidos vegetativos analizados, y cómo los niveles de expresión del gen *SICBL10* tienden a disminuir a medida que avanza la fase de desarrollo. Además, la expresión de *SICBL10* se analizó en frutos pequeños (diámetro entre 1 a 3 cm) y fruto desarrollado verde (diámetro entre 5 a 6 cm), encontrándose expresión de *SICBL10* solo en frutos en desarrollo, la cual fue similar a los niveles de expresión detectados en las hojas superiores y medias de la planta (**Figura 39**). Se puede concluir que en los órganos vegetativos la mayor expresión del gen *SICBL10* se muestra en la mitad superior de la planta, y en los órganos reproductivos hay un alto nivel de expresión en flores, pero no en frutos.



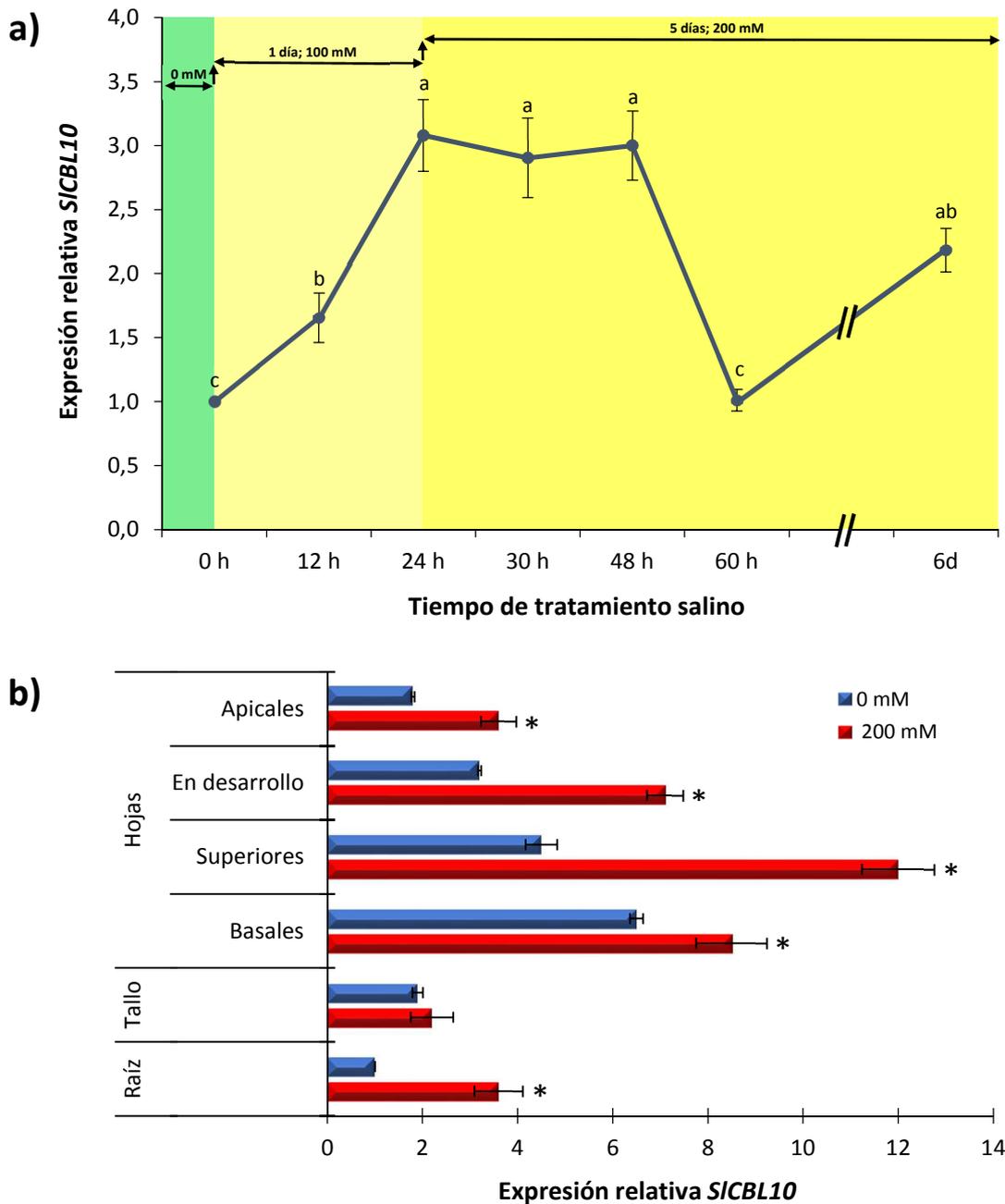
**Figura 39. Patrón de expresión del gen *SICBL10* en plantas adultas (23-24 hojas completamente desarrolladas) de WT cultivadas en ausencia de estrés salino (control).** Los resultados muestran los valores de expresión del gen cuantificados por PCR a tiempo real relativos al valor de expresión de la raíz, al cual se asignó valor 1. Como gen normalizador se utilizó el factor de elongación *SIEf-1a*. Los valores son la media  $\pm$  ES de tres réplicas biológicas (n=3). Valores con letras diferentes son significativamente diferentes. Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

## 2. La expresión del gen *SICBL10* se induce por estrés salino en tomate

Al estado de desarrollo de 6 hojas verdaderas, las plantas fueron expuestas a estrés salino en cultivo hidropónico, primero con 100 mM de NaCl durante 24 horas y luego con 200 mM de NaCl durante los siguientes 5 días de tratamiento. En primer lugar se analizó el patrón de expresión temporal del gen *SICBL10* en hoja superior (1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada) de plantas WT. Para ello, el nivel de transcripción del gen *SICBL10* se analizó en ausencia de sal (tiempo 0) y después de 12, 24, 30, 48, 60 horas y 6 días de tratamiento salino (**Figura 40a**).

La expresión del gen *SICBL10* se indujo significativamente por la sal después de 12 horas y alcanzó el nivel de expresión máximo tras 24 horas de tratamiento salino con 100 mM de NaCl. El posterior aumento de la concentración de sal a 200 mM no produjo un nuevo aumento de la expresión del gen *SICBL10*, que se mantuvo constante durante 24 horas adicionales, y disminuyó a partir de entonces alcanzando niveles basales después de 60 horas de tratamiento salino. Sin embargo, al final del experimento (6 días) se registró un segundo incremento de la expresión génica de *SICBL10*. Es interesante señalar que la inducción de expresión con la salinidad después de varios días de estrés no se había descrito hasta ahora para los homólogos de este gen en otras especies. La segunda inducción tardía por salinidad de la expresión del gen *SICBL10* podría indicar un doble papel de este gen en el mecanismo de respuesta al estrés salino en tomate, uno a corto plazo (horas) probablemente relacionado con la señalización del estrés, y otra a más largo plazo, implicado quizás en los procesos de recuperación y adaptación al estrés.

Una vez conocido el patrón de expresión temporal durante el tratamiento salino, se determinó si la inducción de la expresión del gen *SICBL10* por salinidad se daba al mismo nivel en todos los tejidos (**Figura 3b**). Para ello se analizó la expresión a tiempo 0 (ausencia de estrés) y después de 2 días de tratamiento salino (24 horas 100 mM y 24 horas 200 mM de NaCl). La expresión del gen *SICBL10* se analizó en raíz, hoja basal (5<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada), hoja superior (1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada), tallo superior (en la zona de intersección de la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja completamente desarrollada), hoja en desarrollo y hoja apical (hojas primordiales y meristemo apical). Mientras que la expresión del gen *SICBL10* no se indujo por salinidad en tallo, la cantidad de transcrito incrementó significativamente con la salinidad en raíz y en todas las hojas analizadas (**Figura 40b**). Es interesante señalar que, a pesar de su bajo nivel de expresión



**Figura 40. La expresión del gen *SICBL10* se induce por estrés salino en tomate.** a) Expresión temporal del gen *SICBL10* en la primera hoja completamente desarrollada de plantas WT a las 0, 12, 24, 30, 48, 60 horas y 6 días de tratamiento salino. Los niveles de expresión se normalizaron con el factor de elongación SIEf-1 $\alpha$ . Se ha utilizado como referencia para los valores de expresión génica el obtenido en la hoja superior (1 $^{\circ}$ /2 $^{\circ}$  hoja completamente desarrollada) cultivada en ausencia de estrés salino (tiempo 0 horas), al que se le dio un valor 1. Los valores son la media  $\pm$  ES de tres réplicas (n=3). b) Expresión del gen *SICBL10* inducida por la salinidad en diferentes tejidos de la planta WT tras 2 días de tratamiento salino (1 día con 100 mM de NaCl y 1 día con 200 mM NaCl). Como valor de referencia se utilizó el valor de expresión detectado en raíz en ausencia de estrés salino (0 mM), al que se le dio un valor 1. Los valores son la media  $\pm$  ES de dos ensayos independientes con un tamaño de muestra n=5 cada uno. Valores con letras diferentes son significativamente diferentes. \* Indica diferencias significativas entre medias (LSD $_{5\%}$ ).

en condiciones control, fue en raíz donde se observó el mayor incremento de expresión del gen *SICBL10* con la salinidad (3,6 veces). En las hojas, la mayor inducción de la expresión de *SICBL10* tuvo lugar en las hojas superiores completamente desarrolladas (2,7 veces), seguido por las hojas en desarrollo y apicales (2 veces), y el menor aumento se registró en la hoja basal (1,3 veces). Estos resultados sugieren que el gen *SICBL10* podría desempeñar un papel fundamental no sólo a nivel de parte aérea, fundamentalmente en hojas superiores completamente desarrolladas, sino también a nivel de la raíz.

### **3. La elevada sensibilidad a la sal del mutante *cbll0* está relacionada con una alteración de la distribución de Na<sup>+</sup> en la planta**

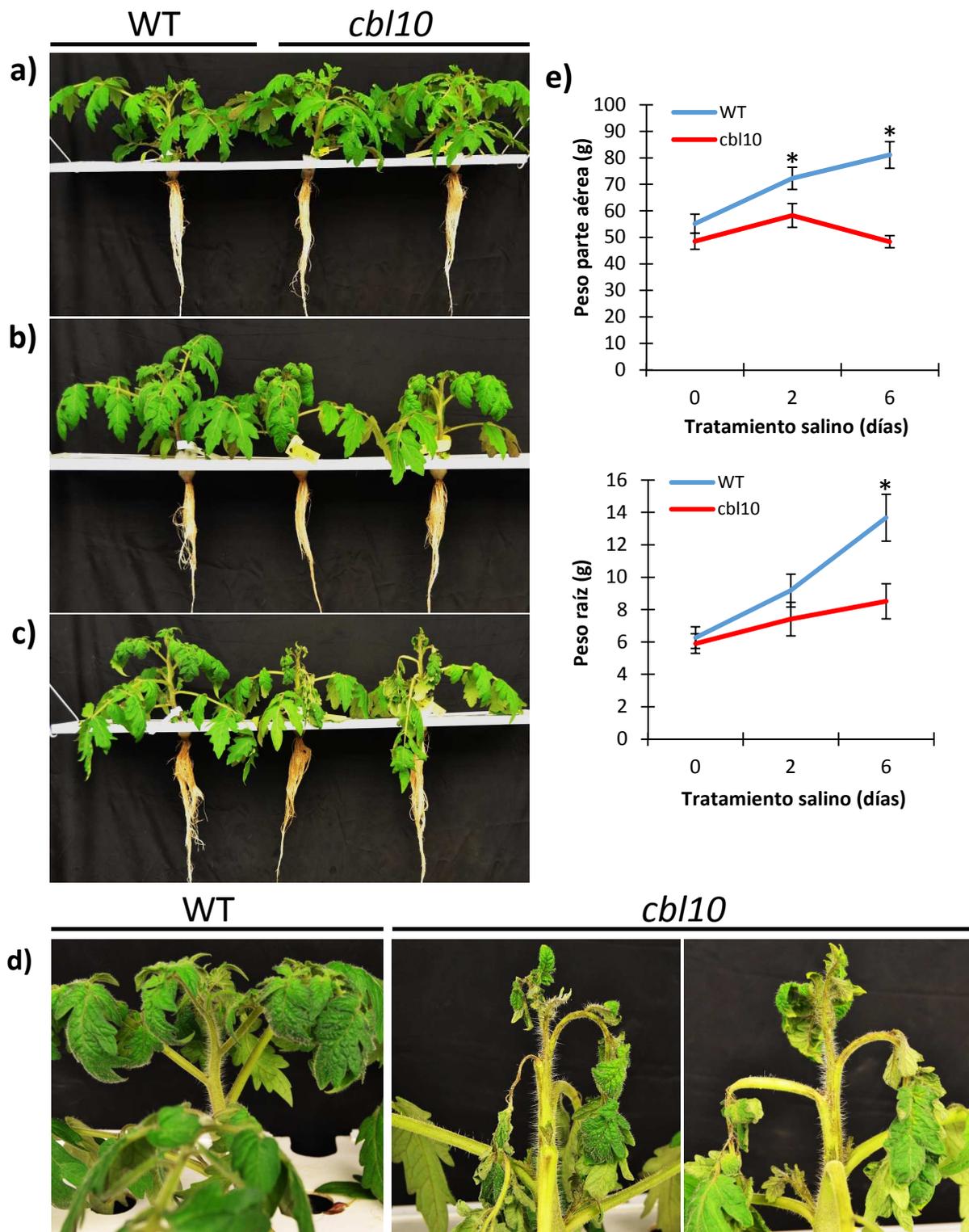
Para realizar la caracterización fenotípica y fisiológica del mutante *cbll0* se realizaron tres ensayos independientes en cultivo hidropónico, donde la tasa de absorción y el transporte de los iones salinos a la parte aérea es mucho mayor que cuando las plantas se cultivan en suelo o sustrato inerte. Para ello, plantas WT y mutante en estado de desarrollo de 5-6 hojas completamente desarrolladas se sometieron a estrés salino durante 6 días (24 horas con 100 mM de NaCl y 5 días adicionales con 200 mM de NaCl). Antes de aplicar el estrés salino, las plantas WT y mutante presentaban un fenotipo similar, con igual desarrollo de parte aérea y raíz (**Figura 41a y e**).

La sensibilidad a la sal del mutante se observó después de tan solo 2 días de tratamiento, con un mayor enrollamiento de las hojas y una mayor reducción significativa del peso de la parte aérea con respecto a WT (**Figura 41b y e**). Después de 6 días de tratamiento, las plantas WT aún no mostraban síntomas visibles de daños por salinidad, mientras que la parte aérea joven de las plantas del mutante, incluyendo el ápice, las hojas en desarrollo y el tallo joven, mostraban marchitamiento y quemaduras y, finalmente, estas plantas morían por colapso apical (**Figura 41c y d**). Sin embargo, la parte aérea inferior del mutante, incluyendo las hojas basales y el tallo basal, así como la raíz no mostraron síntomas evidentes de sensibilidad a la sal, siendo su aspecto similar al de las plantas WT (**Figura 41c y d**). A pesar de la mayor sensibilidad a la sal de las plantas mutantes, estas no presentaron síntomas evidentes de clorosis, síntoma característico que se observa en las plantas sensibles al estrés iónico inducido por salinidad. De hecho, no se detectaron diferencias significativas en el contenido en clorofila entre el mutante y WT a lo largo del tratamiento salino (datos no mostrados). En resumen, el fenotipo del

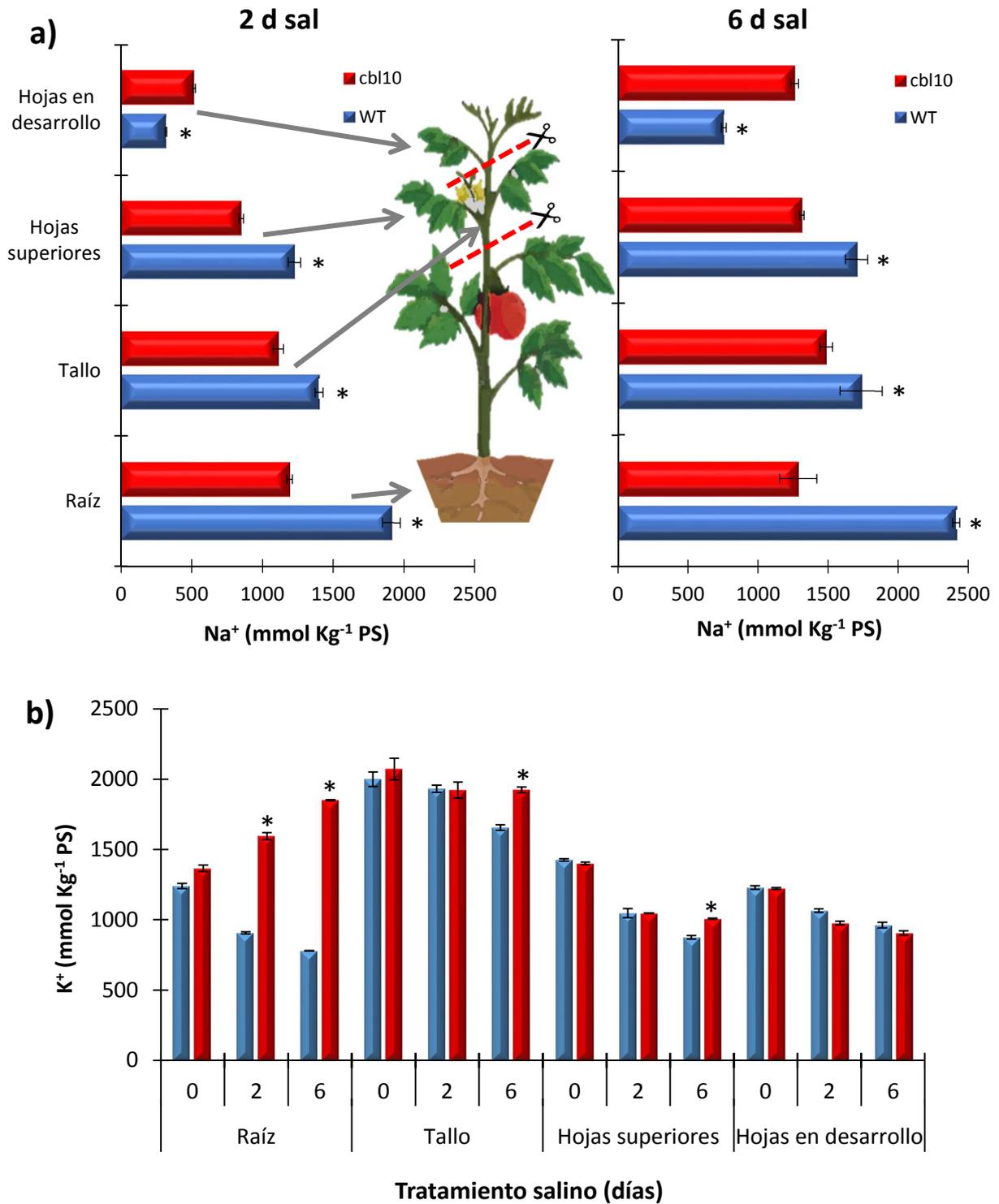
mutante muestra que las mayores lesiones inducidas por la salinidad tienen lugar en la parte aérea superior del mutante, y de forma más acusada en el ápice (hojas primordiales y meristemo) que queda colapsado y hojas en desarrollo, no siendo estos tejidos donde se observó el mayor aumento de expresión del gen *SICBL10* en las plantas WT por salinidad (**Figura 40b**). Este resultado sugiere que el papel del gen *SICBL10*, tanto en raíz como en parte aérea, tiene un papel crítico en la protección frente a la salinidad.

En este experimento se analizaron las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en raíz, hoja completamente desarrollada (1ª y 2ª hoja), tallo (en la zona de inserción entre la 1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) y en las hojas en desarrollo incluyendo hojas apicales. En lo que respecta al contenido de  $\text{Na}^+$  (**Figura 42a**), las plantas WT mostraron el patrón de distribución de  $\text{Na}^+$  esperado para tomate cultivado en condiciones de salinidad. Así, la acumulación de  $\text{Na}^+$  fue mayor en raíz que en parte aérea, y dentro de la parte aérea la mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  tenía lugar en tallo y hojas completamente desarrolladas, mientras que en las hojas en desarrollo el contenido de  $\text{Na}^+$  es mucho menor que en el resto de tejidos, con el fin de evitar alcanzar niveles tóxicos de  $\text{Na}^+$  en citoplasma y proteger los órganos en crecimiento. Este patrón de distribución de  $\text{Na}^+$  se encontró alterado en el mutante ya desde los 2 días de tratamiento, y de forma más marcada a los 6 días, donde los niveles de  $\text{Na}^+$  fueron similares en todos los órganos analizados, desde raíz hasta las hojas en desarrollo, lo que indica que el mutante tenía alterada la capacidad de retención de  $\text{Na}^+$  en raíz y la distribución de  $\text{Na}^+$  entre hojas desarrolladas y hojas en desarrollo. Así, el mutante presentó menores concentraciones de  $\text{Na}^+$  que WT en todos los órganos analizados excepto en las hojas en desarrollo, donde el nivel de  $\text{Na}^+$  fue significativamente mayor en el mutante que en WT (1.260 vs. 756 mmol/Kg PS, respectivamente) al final del ensayo.

El patrón de distribución de  $\text{K}^+$  también se vio alterado en el mutante en condiciones de estrés salino, observando como la concentración de  $\text{K}^+$  en raíz fue significativamente mayor en el mutante que en WT después de 2 días y, especialmente, después de 6 días de tratamiento salino (**Figura 42**). Así, mientras que la concentración de  $\text{K}^+$  en las raíces de las plantas WT disminuye a lo largo del tratamiento salino, la concentración de  $\text{K}^+$  en la raíz de las plantas mutantes aumenta a lo largo del tratamiento salino. En el resto de tejidos analizados, fundamentalmente tallo y hojas desarrolladas superiores, la concentración de  $\text{K}^+$  también fue superior tras 6 días de tratamiento salino, aunque de manera menos evidente que lo observado en raíz.



**Figura 41. Fenotipo de plantas WT y del mutante *cbl10* desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 1 día y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes). Fotografías representativas de plantas WT y mutante antes de aplicar el estrés (a) y después de 2 (b) y 6 días (c) de tratamiento salino. d) Ampliación de la parte superior de las plantas después de 6 días de estrés. e) Evolución del peso de la parte aérea y raíz durante los 6 días de tratamiento salino. Los valores son la media  $\pm$  ES. \* Indica diferencias significativas entre medias (LSD<sub>5%</sub>).**



**Figura 42.** La alta sensibilidad del mutante *cbl10* está relacionada con una alteración en el patrón de distribución de Na<sup>+</sup> en la planta. Concentraciones de Na<sup>+</sup> (a) y K<sup>+</sup> (b) en raíz, tallo (entre 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja), hojas superiores (1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas) y hojas en desarrollo de plantas WT y mutante desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 1 día y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes) a los 2 y 6 días de tratamiento. Los valores son la media  $\pm$  ES. \* Indica diferencias significativas entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Estas alteraciones en la homeostasis de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> indujeron cambios en la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (**Tabla 21**), siendo los valores menores en el mutante que en WT en los diferentes órganos analizados excepto en las hojas en desarrollo donde ocurrió lo contrario, la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> era mayor en el mutante debido a la mayor acumulación de Na<sup>+</sup> en este órgano.

**Tabla 21. Relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en raíz, tallo (entre 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja), hojas superiores (1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas) y hojas en desarrollo de plantas WT y mutante *cb110* desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 24 h y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes) a los 2 y 6 días de tratamiento.** Los valores son la media  $\pm$  ES. \* Indica diferencias significativas entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Tejido	Genotipo	2 días	6 días
Hojas en desarrollo	WT	0,30 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,02
	<i>cb110</i>	0,53 $\pm$ 0,05*	1,40 $\pm$ 0,03*
Hojas superiores	WT	1,17 $\pm$ 0,02	1,95 $\pm$ 0,05
	<i>cb110</i>	0,81 $\pm$ 0,01*	1,30 $\pm$ 0,03*
Tallo	WT	0,73 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,02
	<i>cb110</i>	0,57 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,01*
Raíz	WT	2,11 $\pm$ 0,14	3,10 $\pm$ 0,21
	<i>cb110</i>	0,75 $\pm$ 0,01*	0,70 $\pm$ 0,05*

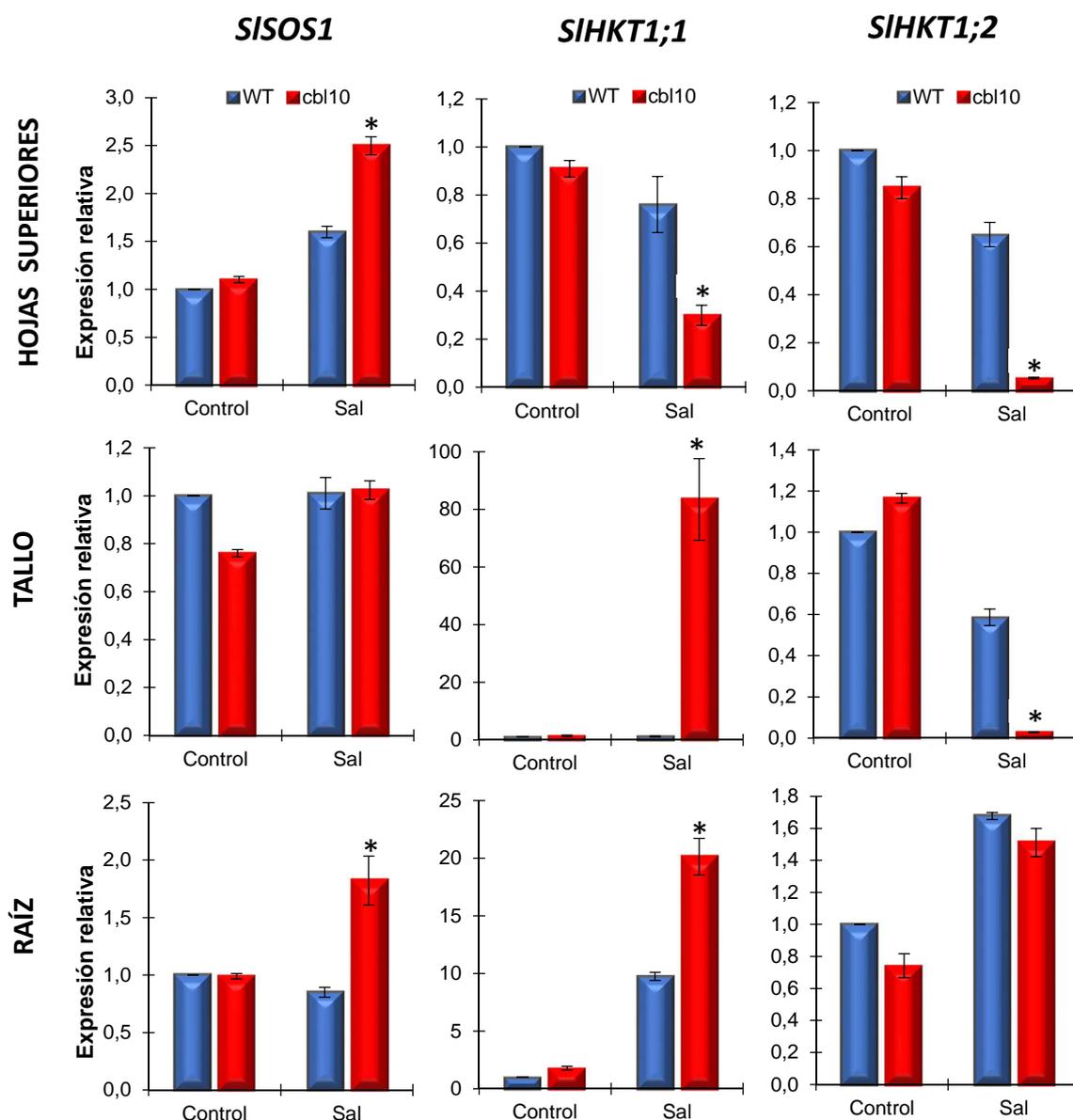
En resumen, la interrupción del gen *SICBL10* provoca una menor absorción de Na<sup>+</sup> en la planta, de hecho el contenido global de Na<sup>+</sup> fue menor en el mutante que en WT, mientras que mantiene mayores niveles de K<sup>+</sup> con la salinidad. Sin embargo, la distribución de Na<sup>+</sup> a lo largo de la planta se ve alterada en el mutante en condiciones de salinidad, ya que el Na<sup>+</sup> se acumula en menor cantidad en raíz y hojas completamente desarrolladas, llegando por tanto en mayor cantidad hasta las hojas jóvenes en desarrollo, lo que provoca un rápido efecto negativo en el desarrollo de la planta.

#### 4. La anulación del gen *SICBL10* altera el patrón de expresión de genes implicados en la homeostasis de Na<sup>+</sup>

Debido a la alteración en el patrón de distribución de Na<sup>+</sup> observada en el mutante, se analizó por RT-qPCR los niveles de expresión del gen *SISOS1* y de las dos isoformas del gen *SIHKT1*, *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2*, ya que estos están descritos hasta la fecha como los

principales genes implicados en la absorción y transporte a larga distancia de  $\text{Na}^+$  en tomate (Olías *et al.*, 2009; Asins *et al.*, 2013). Los niveles de expresión de los genes fueron analizados en raíz, tallo (en la zona de inserción entre la 1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas) y hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) de plantas WT y mutante antes de aplicar el estrés salino y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2º día a 200 mM de NaCl).

La anulación del gen *SICBL10* alteró el patrón de expresión de los genes *SISOS1* y *SIHKT1* en condiciones de salinidad, mientras que en control no hubo diferencias significativas (**Figura 43**). En raíz, el aumento de expresión de los genes *SISOS1* y *SIHKT1;1* fue significativamente mayor en el mutante que en WT, lo que sugiere que el mutante intenta reducir la absorción de  $\text{Na}^+$  por la raíz (papel asignado a *SISOS1*) así como reducir la carga de  $\text{Na}^+$  en el xilema (papel que parece tener *SIHKT1;1*). En cuanto a la isoforma *SIHKT1;2*, los cambios de expresión no eran significativos en raíces de WT y mutante condiciones salinidad, lo que sugiere que esta isoforma no parece tener un papel clave en raíz. En el tallo del mutante se observó un fuerte incremento (90 veces) de la expresión de *SIHKT1;1* y, por el contrario, la expresión de *SIHKT1;2* estaba prácticamente anulada (0,3), lo que indica que ambas isoformas deben desempeñar funciones diferentes frente a la salinidad en tallo, como podría ser por un lado la entrada de  $\text{Na}^+$  desde el xilema al interior celular y por otro lado la carga de  $\text{Na}^+$  hacia el floema para su posible recirculación a la raíz (Olías *et al.*, 2009; Asins *et al.*, 2013). Finalmente, en hoja se observó una mayor reducción de la expresión de las dos isoformas de *SIHKT1*, fundamentalmente de *SIHKT1;2*, en el mutante con respecto a WT, lo que refleja un intento del mutante por reducir la cantidad de  $\text{Na}^+$  que entra al interior celular en hoja, probablemente por una menor capacidad de acomodación del mismo. El hecho de que la expresión de ambos genes *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* esté mucho más inhibida en las hojas superiores desarrolladas del mutante que en las del WT podría ser una de las causas por las que el  $\text{Na}^+$  llega a los tejidos en desarrollo en mayor cantidad en el mutante que en WT, lo que provoca la alta toxicidad de  $\text{Na}^+$  en la parte superior del mutante.

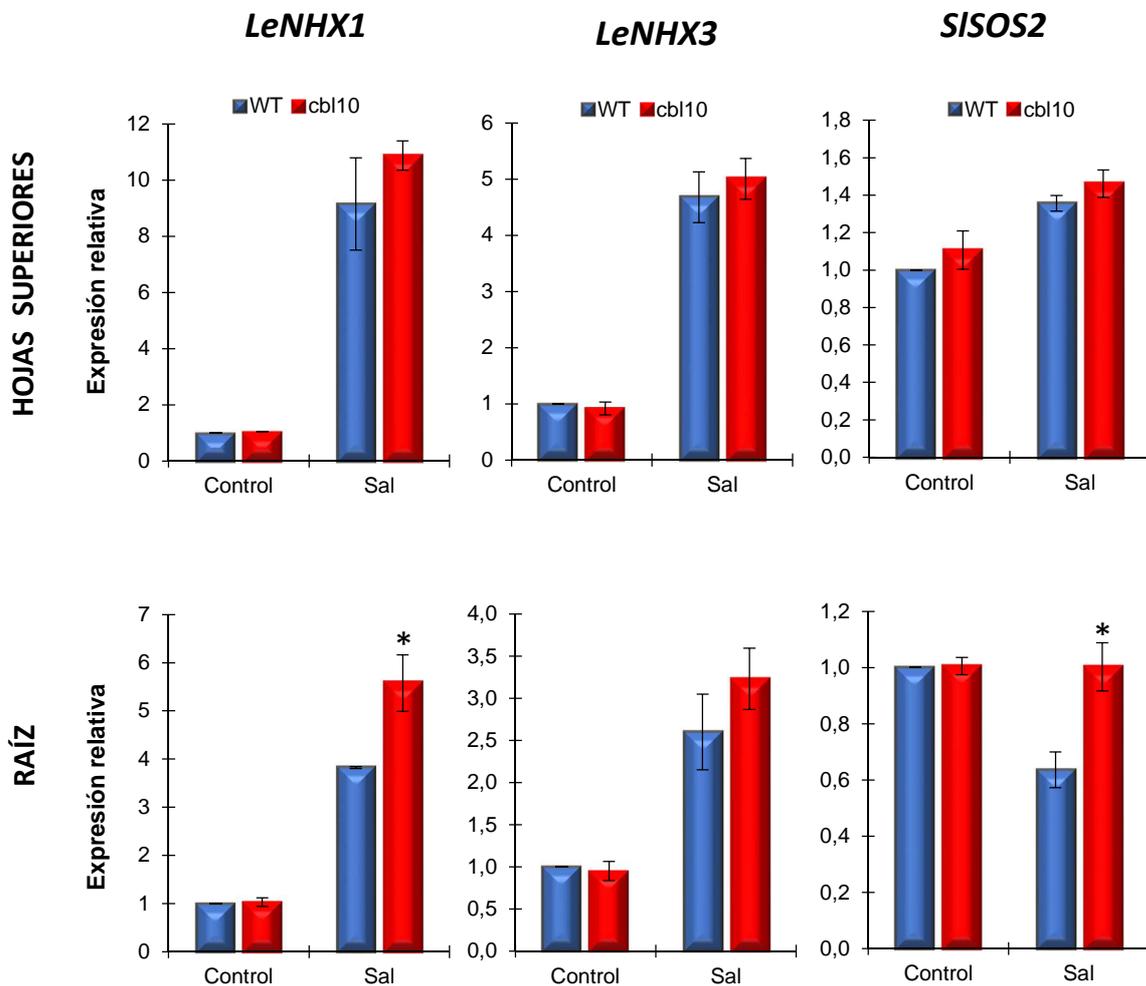


**Figura 43. El mutante *cbl10* tiene alterada la expresión de genes implicados en la absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea.** Niveles de expresión de los genes *SISOS1* y las dos isoformas *SIHKT1;1* y *SIHKT1;2* en raíz, tallo (en la zona de inserción entre la 1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas) y hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) de plantas WT y mutante antes de aplicar el estrés salino (Control) y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2º día a 200 mM de NaCl). Los valores de expresión han sido referenciados al valor obtenido en la raíz de WT en control, al cual se otorgó el valor de 1 (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias ( $\text{LSD}_{5\%}$ ).

Otros genes descritos en la bibliografía por jugar un papel importante en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  son los genes *LeNHXs* y *SISOS2* (Belver *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2013). No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de estos genes en hojas de WT y mutante, mientras que los niveles de expresión de *LeNHX1* y *SISOS2* en raíz fueron significativamente mayores en el mutante que en WT tras dos días de sal.

El mayor aumento de expresión de *LeNHX1* en raíz sugiere que el mutante intenta almacenar  $\text{Na}^+$  en la vacuola para evitar que suba a la parte aérea (**Figura 44**).

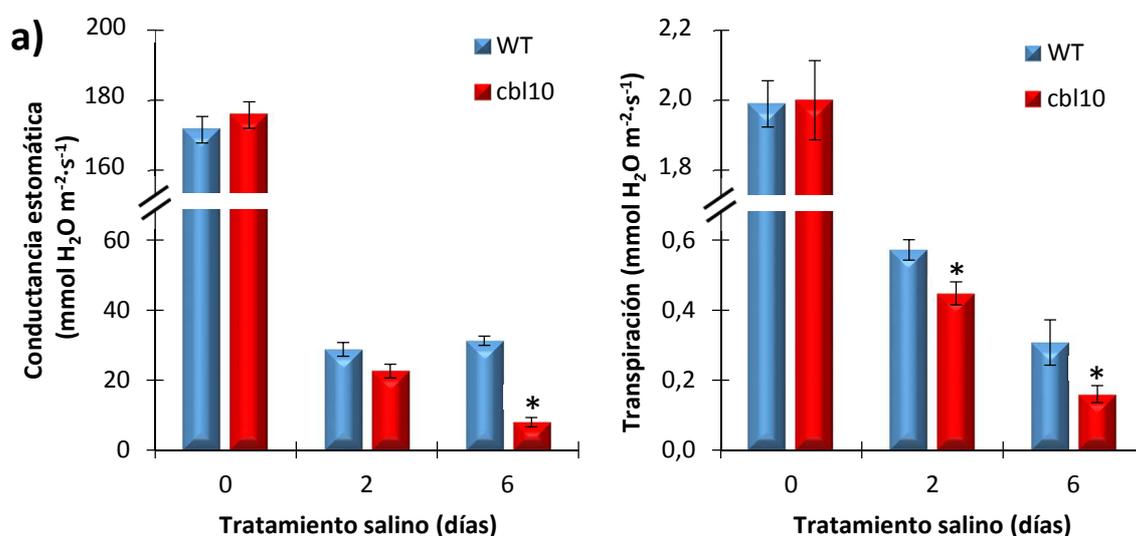
En conjunto todos estos resultados sugieren que el gen *SICBL10* parece estar implicado en la distribución de  $\text{Na}^+$  en el interior celular, probablemente dentro de vacuolas; su papel podría ser importante no solo en hojas completamente desarrolladas, como se ha descrito en *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2007; Weintl y Kudla, 2009), sino también en raíz, no descrito hasta la fecha, estando involucrado en la retención de  $\text{Na}^+$  en estos tejidos para proteger el ápice y tejidos en desarrollo del estrés salino. Por otro lado, no parece que esta función la realice interactuando con las proteínas de la familia NHXs.



**Figura 44.** Niveles de expresión de los genes *LeNHX1*, *LeNHX3* y *SISOS2* en raíz y hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) de plantas WT y mutante *cbl10* antes de aplicar el estrés salino (Control) y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2º día a 200 mM de NaCl). Se ha utilizado como referencia (valor 1) el obtenido en la raíz de WT en control (valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

### 5. La anulación del gen *SICBL10* reduce la pérdida de agua vía transpiración en condiciones salinas

La menor absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  a la parte aérea observada en el mutante podría estar asociada no sólo a las alteraciones en la expresión de los genes relacionados con la homeostasis de  $\text{Na}^+$ , sino también con una ralentización del flujo evapotranspiracional. Para comprobar esto, se midió la conductancia estomática ( $g_s$ ) y tasa de transpiración ( $E$ ) en la 1ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutantes antes de aplicar el estrés (día 0) y después de 2 y 6 días de tratamiento (**Figura 45a**). No se han observado diferencias significativas en ambos parámetros entre las plantas WT y mutante el día 0, mientras que si hubo diferencias durante el tratamiento salino. Aunque  $g_s$  y  $E$  se reducían por la salinidad en WT y mutante, las reducciones fueron significativamente mayores en el mutante que en WT, especialmente tras 6 días de tratamiento salino.



b)	Genotipo	Número de estomas	Porcentaje de estomas cerrados (%)	Apertura estomática ( $\mu\text{m}$ )
0 días	WT	18,86 $\pm$ 1,32	6,2 %	12,87 $\pm$ 0,38 *
	<i>cbl10</i>	16,94 $\pm$ 0,87	6,9 %	10,37 $\pm$ 0,47
2 días	WT	18,92 $\pm$ 1,39	35,5 % *	4,86 $\pm$ 0,29 *
	<i>cbl10</i>	16,31 $\pm$ 0,86	52,9 %	3,00 $\pm$ 0,22

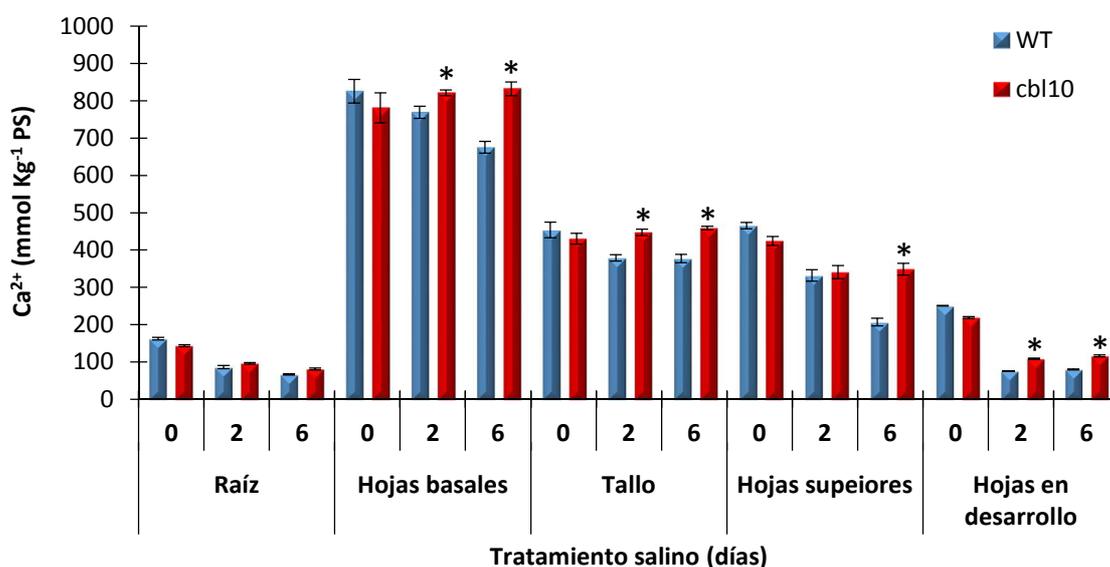
**Figura 45. La anulación de *SICBL10* provoca un mayor cierre estomático en condiciones de salinidad.** a) Conductancia estomática y tasa de transpiración en la primera hoja completamente desarrollada antes de aplicar el estrés salino (0) y después de 2 y 6 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y 5 días a 200 mM de NaCl) y b) número de estomas, porcentaje de estomas cerrados y apertura estomática ( $\mu\text{m}$ ) en la primera hoja completamente desarrollada antes de aplicar el estrés salino (0) y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2º día a 200 mM de NaCl) de plantas WT y mutante. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Para saber si esta respuesta del mutante podría estar relacionada con una alteración en la densidad estomática o en la apertura estomática, se midieron ambos parámetros así como el porcentaje de estomas cerrados (**Figura 45b**) en la 1ª hoja completamente desarrollada. Las medidas se realizaron antes del estrés (día 0) y tras 2 días de tratamiento salino (24h a 100 mM de NaCl y otras 24h a 200 mM de NaCl). En control, no se observaron diferencias significativas entre el número de estomas y porcentaje de estomas cerrados de WT y mutante, mientras que la apertura estomática fue significativamente menor en el mutante que en WT. Después de 2 días de tratamiento salino, el número de estomas se mantiene similar en WT y mutante, pero el porcentaje de estomas cerrados ya fue significativamente mayor en el mutante (52,9%) que en WT (35,5%), y la apertura estomática menor, con una reducción próxima al 40%. Estos resultados pueden ser de gran interés, ya que la falta de funcionalidad del gen *CBL10* no se había relacionado hasta ahora con cambios en la apertura de los estomas bajo condiciones de estrés salino, y sugieren que la funcionalidad de *SICBL10* podría estar de forma indirecta implicada en el cierre estomático en condiciones de salinidad.

#### **6. La anulación del gen *SICBL10* altera la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$ en condiciones de estrés salino**

Dada la implicación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de la apertura estomática, se decidió analizar si la disrupción de *SICBL10* estaba provocando alteraciones en la homeostasis de este ion en tomate. Para ello se analizó el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en raíz, hojas basales (5ª hoja completamente desarrollada), tallo (en la zona de inserción entre la 1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas), hojas superiores (1ª y 2ª hojas completamente desarrolladas) y hojas en desarrollo (incluyendo ápice) de plantas WT y mutante, en ausencia de sal (0 d) y tras 2 y 6 días de tratamiento salino (**Figura 46**). Los resultados muestran diferencias significativas en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea entre el mutante y WT en condiciones de salinidad. Así, el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas WT disminuyó a lo largo del periodo de tratamiento salino en todos los tejidos analizados. Como es sabido, la presencia excesiva de iones  $\text{Na}^+$  dificulta la correcta absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por la raíces (el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  son iones antagonistas), lo que provoca que la planta haga uso de sus depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  (generalmente en las vacuolas de las hojas desarrolladas superiores de la planta) para poder hacer frente a los procesos donde este ion es imprescindible, como son el desarrollo de meristemos, crecimiento y expansión celular,

entre otros (Sanders *et al.*, 2002; White y Broadley, 2003). Sin embargo, la respuesta del mutante fue diferente, ya que el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de las hojas basales, el tallo y las hojas superiores del mutante se mantuvo prácticamente constante a lo largo del tratamiento salino, y solo en las hojas en desarrollo se detectó una disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque esta disminución fue menor que en WT. La no disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la alteración morfológica y colapso de los meristemas observados en el mutante en condiciones de salinidad podría reflejar la mayor dificultad del mutante para hacer uso de sus depósitos vacuolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el correcto desarrollo de zonas en crecimiento de la planta.



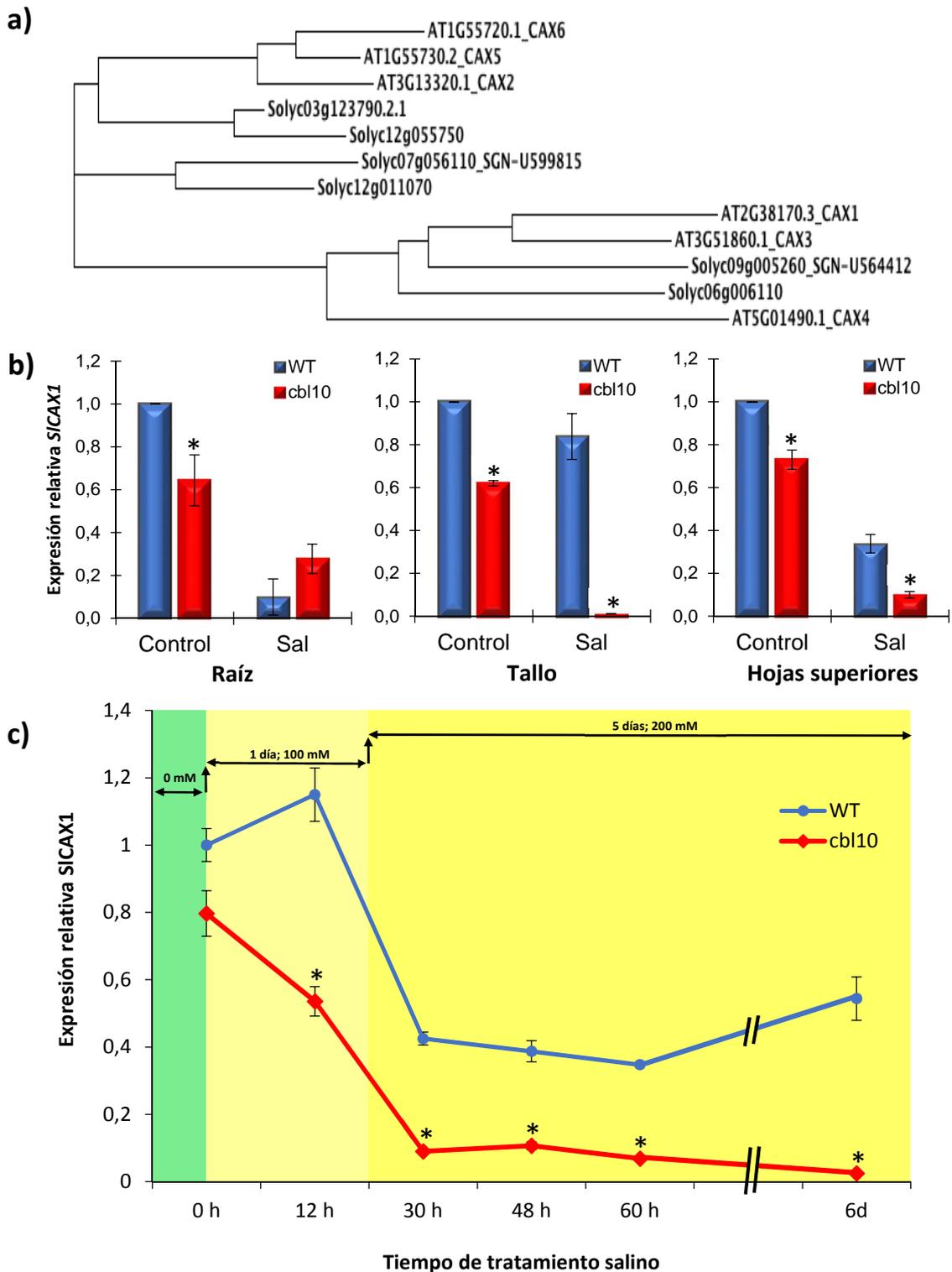
**Figura 46. El mutante *cbl10* acumula mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea.** Las medidas se han realizado en raíz, hojas basales, tallo (entre 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja desarrollada), hojas superiores (1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas y hojas en desarrollo de plantas WT y mutante desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (100 mM de NaCl durante 24 h y 200 mM de NaCl durante 5 días restantes). Los valores son la media  $\pm$  ES. \* Diferencias significativas entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Entre los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  identificados, sólo los transportadores localizados en el tonoplasto capaces de catalizar la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en vacuolas en contra de su gradiente electroquímico podrían desempeñar el papel de acumulación preferencial de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo diferentes condiciones fisiológicas (Pottosin y Schönknecht, 2007; McAinsh y Pittman, 2009). El primer antiportador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  identificado fue la isoforma *AtCAX1*, localizada en la membrana vacuolar de *Arabidopsis thaliana* (Hirschi *et al.*, 1996), cuya función es la de introducir  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la vacuolas para su almacenamiento y, por tanto, crucial en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la planta así como en los procesos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  por estrés. El homólogo más cercano a *AtCAX1*

identificado en *Arabidopsis* es *AtCAX3* y ha sido propuesto por desempeñar un papel similar en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao *et al.*, 2008). El grupo de Almería realizó un análisis filogenético para identificar el gen de tomate más cercano a los genes *AtCAX1* y *AtCAX3* de *Arabidopsis*, al cual hemos denominado *SICAX1* (Solyc09g005260) (**Figura 47a**).

Para comprobar si la alteración en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  detectada en el mutante podría deberse a una implicación del gen *SICBL10* en la funcionalidad de los transportadores de la familia CAXs, se analizó el nivel de expresión del gen *SICAX1* por RT-qPCR en raíz, tallo (entre las zona de inserción de la 1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) y hoja superior (1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas) en condiciones control y después de 2 días de tratamiento salino (**Figura 47b**). En condiciones control (ausencia de sal) la expresión de *SICAX1* fue significativamente menor en el mutante que en WT en todos los tejidos analizados. Durante el tratamiento salino los niveles de transcritos de este gen se redujeron en todos los tejidos tanto del mutante como de WT, pero esta disminución fue mucho mayor en el mutante, tanto en tallo como en hoja superior, llegando casi a la nulidad después de 2 días de tratamiento (**Figura 47b**). Señalar que estos tejidos se han descrito en la bibliografía como los principales depósitos intercambiables de  $\text{Ca}^{2+}$  en función de las necesidades fisiológicas de la planta o condiciones de estrés (Monge *et al.*, 1995; Conn y Gilliam, 2010).

Dado que en WT el mayor nivel de expresión del gen *SICAX1* se detectó en hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas), unas 600 veces mayor que en raíz (datos no mostrados), se decidió analizar en este tejido el patrón de expresión temporal del gen durante el tratamiento salino (**Figura 47c**). En WT, la expresión de *SICAX1* se redujo alrededor del 50% desde las 30 h de tratamiento, y se mantuvo en estos niveles a lo largo de todo el tratamiento (6 días). En el mutante, la expresión de *SICAX1* se redujo antes que en WT (a las 12 h de tratamiento) y en mayor grado, ya que la expresión estaba prácticamente anulada en el mutante desde las 30 h hasta el final del tratamiento. Estos resultados sugieren una posible implicación del gen *SICBL10* en la regulación del transportador *SICAX1* tanto en condiciones de salinidad como en ausencia de la misma, ya que su expresión en el mutante se ve alterada ya desde la situación control.

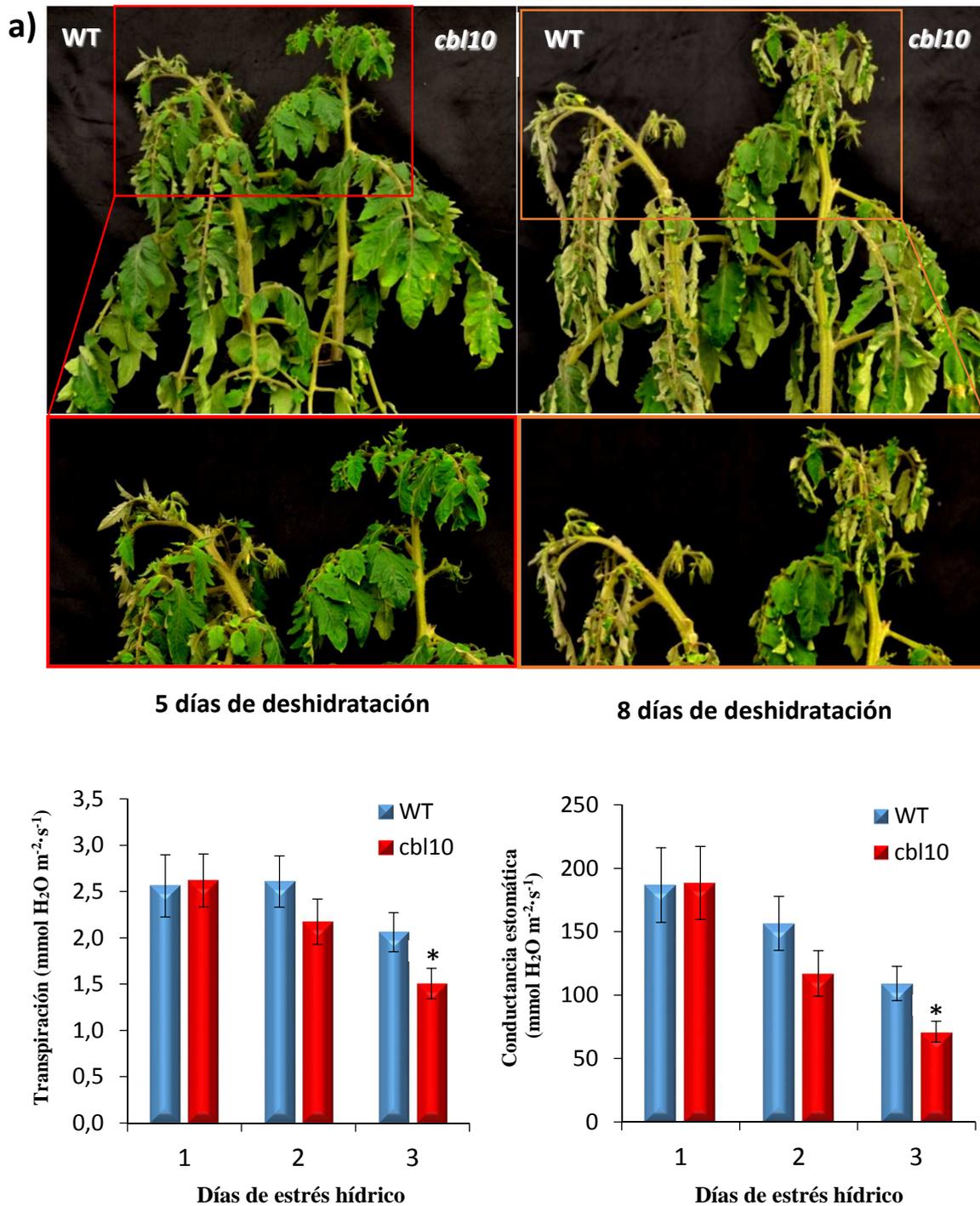


**Figura 47. El mutante *cbl10* tiene alterada la expresión del gen *SICAX1* implicado en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .** a) Análisis filogenético del gen de tomate *SICAX1* cercano a los genes *AtCAX1* y *AtCAX3* de *Arabidopsis*. b) Expresión de *SICAX1* en raíz, tallo (en la zona de inserción entre la 1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas) y hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrollada) de plantas WT y mutante antes de aplicar el estrés salino (Control) y después de 2 días de tratamiento (el primer día a 100 mM de NaCl y el 2º día a 200 mM de NaCl). c) Expresión temporal de *SICAX1* medida en la 1ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante (Valores medios  $\pm$  ES). \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

## 7. La anulación del gen *SICBL10* también reduce la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de deshidratación

En las especies donde se ha identificado el gen *CBL10*, como *Arabidopsis*, no se ha relacionado la función de este gen con cambios en la pérdida de agua por transpiración en condiciones de estrés abiótico. Los resultados obtenidos demuestran que la anulación del gen *SICBL10* en tomate indujo un mayor cierre estomático en condiciones de salinidad, lo que se reflejó en menores valores de conductancia estomática ( $g_s$ ) y transpiración (E). La cuestión que se planteó tras esta observación fue saber si el gen, además de estar implicado en la regulación de la homeostasis iónica frente al estrés salino, podría estar implicado también de forma directa o indirecta en la regulación del estrés osmótico causado por salinidad a través de la regulación estomática. Con el fin de responder a esta pregunta, se realizó un ensayo de estrés hídrico en condiciones controladas, el cual comparte la componente osmótica con el estrés salino sin que interfiera en este caso la componente iónica. Para ello, las plantas WT y mutante fueron sometidas a dos ciclos sucesivos de deshidratación (cese en el riego). En la misma maceta se colocó una planta WT y otra mutante con objetivo de que el grado de deshidratación del sustrato fuese idéntico para ambas plantas. Cuando las plantas tenían un desarrollo de 7-8 hojas completamente desarrolladas, se aplicó un primer ciclo de deshidratación de 10 días de duración seguido por 3 días de rehidratación, y cuando las plantas estuvieron totalmente recuperadas del estrés se volvió a aplicar un segundo ciclo de deshidratación de la misma duración.

Durante los 3 primeros días de cese del riego no se observaron síntomas evidentes de deshidratación ni en plantas WT ni mutantes. Los primeros síntomas de deshidratación empezaron a mostrarse a los 4 días del cese del riego, pero fue a los 5 días cuando se observaron diferencias significativas en el estado de deshidratación de las plantas WT y mutante (**Figura 48a**). Así, las plantas WT mostraron síntomas evidentes de pérdida de turgencia generalizada en toda la planta, mientras que el mutante mantuvo mayor grado de hidratación sobre todo en la parte aérea superior. Estas diferencias en el grado de deshidratación de las plantas se mantuvieron a los 8 días de deshidratación, donde el porcentaje de pérdida de peso de las macetas ya era del 65%. Este rasgo fenotípico se volvió a repetir en el segundo ciclo de deshidratación, lo que sugiere que el mutante *cb110* tolera mejor la deshidratación que el WT, contrariamente a la respuesta observada en condiciones de estrés salino.

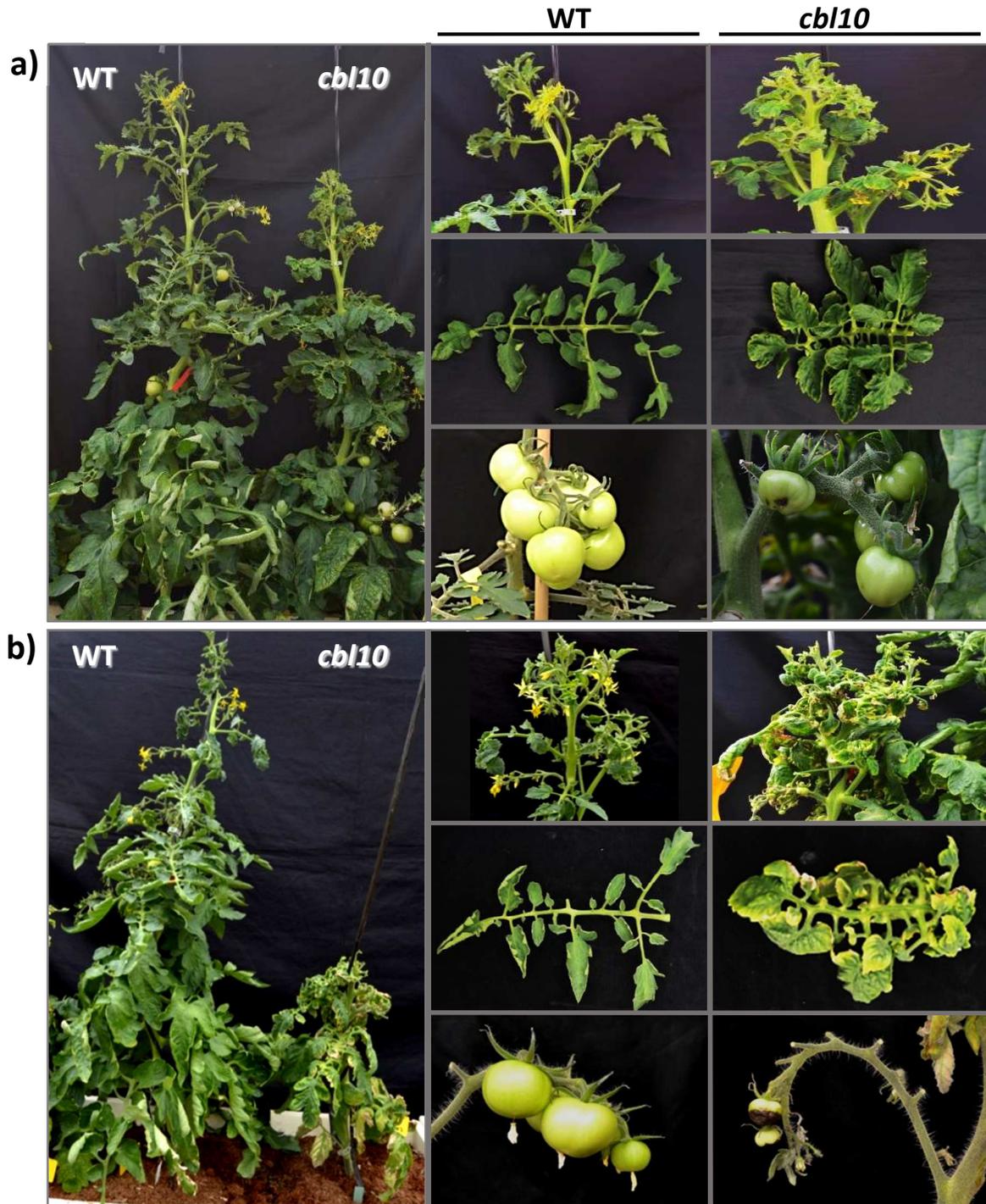


**Figura 48.** El menor grado de deshidratación del mutante *cbl10* está asociado a mayor reducción de la conductancia estomática y tasa de transpiración en condiciones de estrés hídrico. a) Fotografías representativas de plantas WT y del mutante *cbl10* después de 5 y 8 días de deshidratación, donde se observa el menor grado de deshidratación del mutante, especialmente en la parte superior de la parte aérea. b) Tasa de transpiración y conductancia estomática en la primera hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante durante los 3 primeros días de deshidratación. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias ( $\text{LSD}_{5\%}$ ).

En este ensayo se cuantificó la conductancia estomática y la tasa de transpiración en la 1ª hoja completamente desarrollada durante los primeros 4 días de deshidratación del 2º ciclo (**Figura 48b**). Durante los dos primeros días de deshidratación no se observaron diferencias significativas entre WT y mutante, aunque  $g_s$  y E ya mostraban una tendencia a reducirse más en el mutante después de 2 días de deshidratación que en WT. Sin embargo, a los 3 días del cese del riego la reducción de  $g_s$  y E ya fue significativamente mayor en el mutante con respecto a WT, cuando aún los síntomas de deshidratación no eran evidentes ni en WT ni mutante. Sin embargo, las diferencias en  $g_s$  y E desaparecen a mayor tiempo de deshidratación (datos no mostrados) debido probablemente a los bajos valores que se alcanzaron en ambos parámetros como consecuencia del mal estado de las plantas. Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que el gen *SICBL10* de tomate podría estar implicado, de forma directa o indirecta, en el cierre estomático bajo condiciones de estrés osmótico inducido por los estreses salino (**Figura 45**) e hídrico (**Figura 48b**).

#### **8. El mutante *cbll0* muestra importantes alteraciones morfológicas así como síntomas de deficiencia de $Ca^{2+}$ cuando se cultiva en invernadero**

Dadas las alteraciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  detectadas en el mutante en los ensayos de salinidad a corto plazo en cámara de cultivo de condiciones controladas, y debido a la importancia del  $Ca^{2+}$  en el desarrollo de la planta, se quiso observar el fenotipo del mutante *cbll0* a lo largo de su ciclo de cultivo en condiciones naturales (invernadero), tanto en condiciones de estrés salino como en ausencia del mismo. Para ello se realizó un ensayo en invernadero en cultivo de primavera-verano, donde la tasa de transpiración es muy alta debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante ese periodo (con  $T^a$  máxima próxima a 40°C). Cuando las plantas tenían 10 hojas completamente desarrolladas (40 días de desarrollo en cámara de cultivo de condiciones controladas más 21 días de aclimatación en invernadero), fueron tratadas con 0 mM (ausencia de salinidad) y 100 mM de NaCl durante 50 días adicionales. Sorprendentemente, en estas condiciones de cultivo se observaron importantes diferencias fenotípicas en el mutante respecto al WT incluso en ausencia de sal (**Figura 49a**). Así, la morfología de la zona apical de las plantas mutantes se mostró completamente alterada, con menor distancia entrenudos, engrosamiento del tallo y enrollamiento de las hojas en desarrollo. También se detectaron cambios morfológicos en las hojas superiores completamente desarrolladas del mutante,



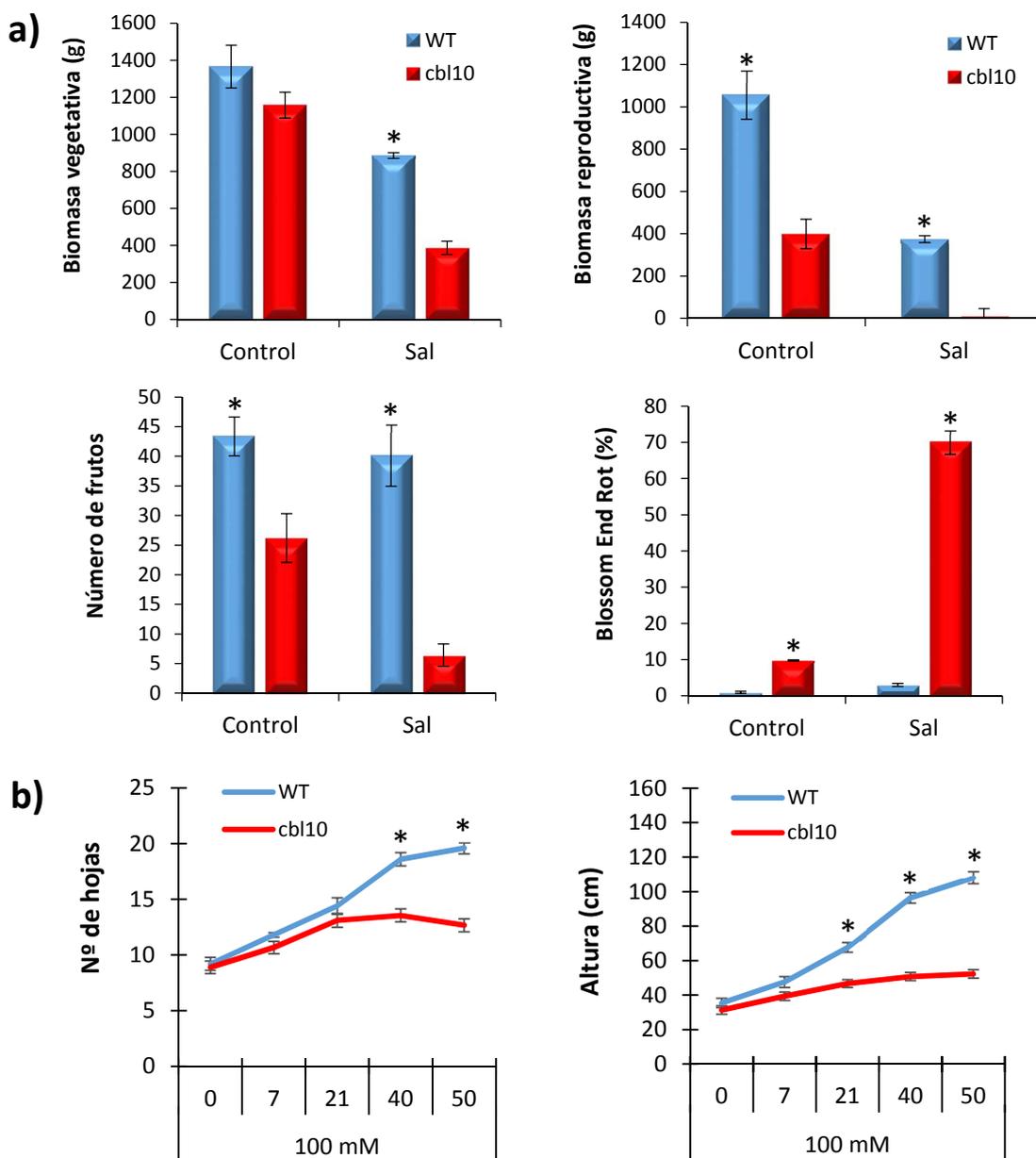
**Figura 49.** El mutante *cbl10* muestra importantes alteraciones morfológicas cuando se cultiva en invernadero en condiciones de alta transpiración. Fenotipo de plantas WT y mutante regadas con solución no salina (a) y con 100 mM NaCl durante 50 días (b). A la derecha se muestra en detalle la zona apical, la 3ª hoja completamente desarrollada de las plantas y los frutos de plantas WT y mutante.

tales como folíolos engrosados y con el borde clorótico, engrosamiento del peciolo de las hojas y una menor longitud de la hoja. Sin embargo, las hojas basales no mostraban grandes diferencias con respecto a las de WT, como se observó en los ensayos a corto plazo. El mutante presentó además, una biomasa reproductiva significativamente menor que WT, así como una significativa mayor incidencia de blossom end rot (BER) en sus frutos en comparación con WT (**Figura 50a**). En conjunto los rasgos fenotípicos observados en el mutante son bastante similares a los síntomas mostrados por la deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  descritos en tomate, tales como menor desarrollo vegetativo, necrosis apical, quemado de hojas, clorosis marginal y, fundamentalmente, poca biomasa reproductiva con alta incidencia de BER en los frutos (White y Broadley, 2003; Uozumi *et al.*, 2012; Robertson, 2013).

En medio salino (100 mM de NaCl), los cambios morfológicos del mutante fueron más acentuados, llegando a mostrar quemaduras y necrosis apical, con las hojas y tallos muy engrosadas (**Figura 49b**). El efecto negativo inducido por la salinidad se reflejaba en menor biomasa tanto vegetativa como reproductiva y los pocos frutos desarrollados en el mutante tenían BER (**Figura 50a**). Además, mientras que el número de hojas no estuvo afectado en el mutante en condiciones no salinas, estas se redujeron significativamente en condiciones salinas, mostrando el mutante una altura significativamente inferior que WT a partir de los 21 días de tratamiento salino (**Figura 50b**).

En este ensayo, se midió  $g_s$ , E y fotosíntesis neta y contenido de agua en las hojas superiores (1ª y 2ª hoja completamente desarrolladas) tanto en condiciones no salinas como en las plantas sometidas a estrés salino durante 50 días (**Figura 51**). Mientras que en condiciones no salinas no hubo diferencias significativas entre WT y mutante en estos parámetros, las reducciones de  $g_s$  y E inducidas por la salinidad fueron significativamente mayores en el mutante que en WT, un 70 y 54% en el mutante y un 44% y 23%, respectivamente, en el WT. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos a corto plazo y en condiciones controladas (**Figura 45**). La menor pérdida de agua vía transpiración del mutante en medio salino explicaría el mayor contenido de agua en sus hojas (24% mayor que en WT). En cuanto a la fotosíntesis neta, se observó como la salinidad dañó en mayor medida el aparato fotosintético del mutante, con una reducción del 56% al final del tratamiento frente a una reducción del 19% en el WT. La reiteración de la alteración en la conductancia y evapotranspiración en los diferentes ensayos llevados a cabo en esta tesis, tanto en condiciones controladas como en condiciones

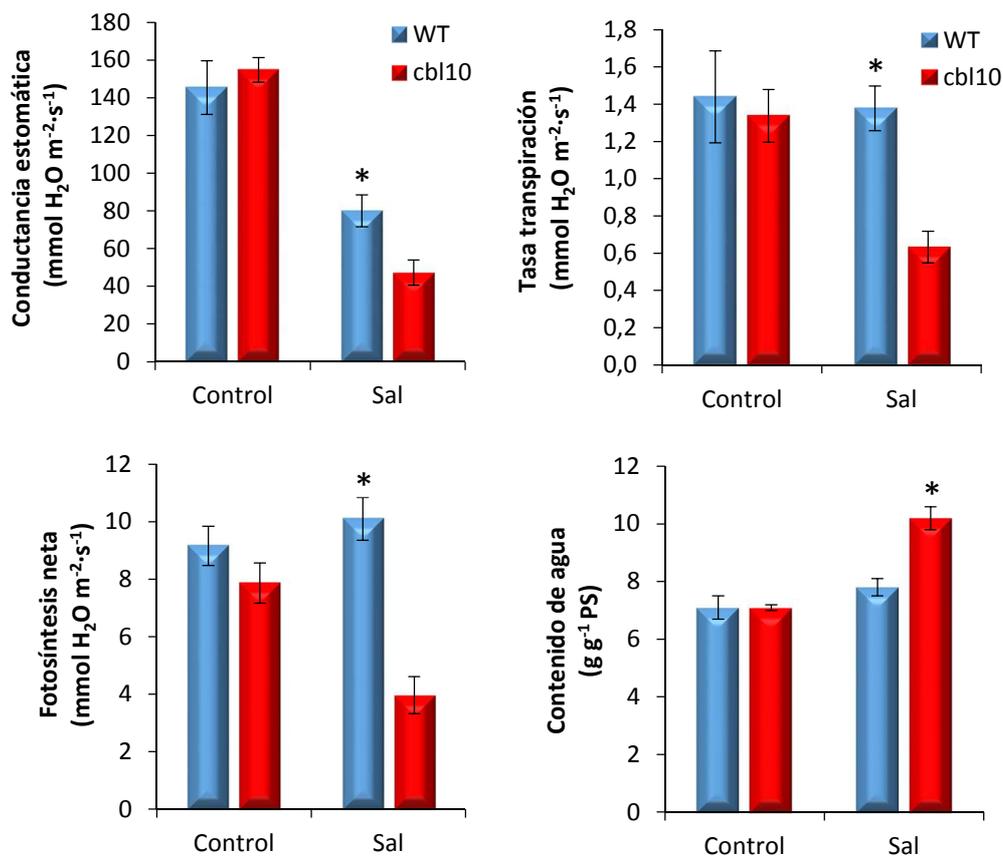
próximas a las naturales en invernadero, indica que el gen *SICBL10* puede estar implicado en la regulación, de la apertura y cierre estomático en condiciones de estrés.



**Figura 50.** El mutante *cbl10* muestra alteraciones morfológicas tanto en condiciones no salinas como salinas (100 mM NaCl durante 50 días) cuando se cultiva en invernadero en condiciones de alta transpiración. a) Biomasa vegetativa y reproductiva de plantas WT y mutante, así como el grado de incidencia de Blossom End Rot al final del ensayo. b) Evolución del nº de hojas y altura de las plantas desarrolladas en medio salino. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

Con el objetivo de asociar los aparentes síntomas de deficiencia de Ca<sup>2+</sup> detectados en el fenotipo del mutante con una alteración en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, así como corroborar los datos obtenidos en los ensayos a corto plazo en hidropónico, el contenido

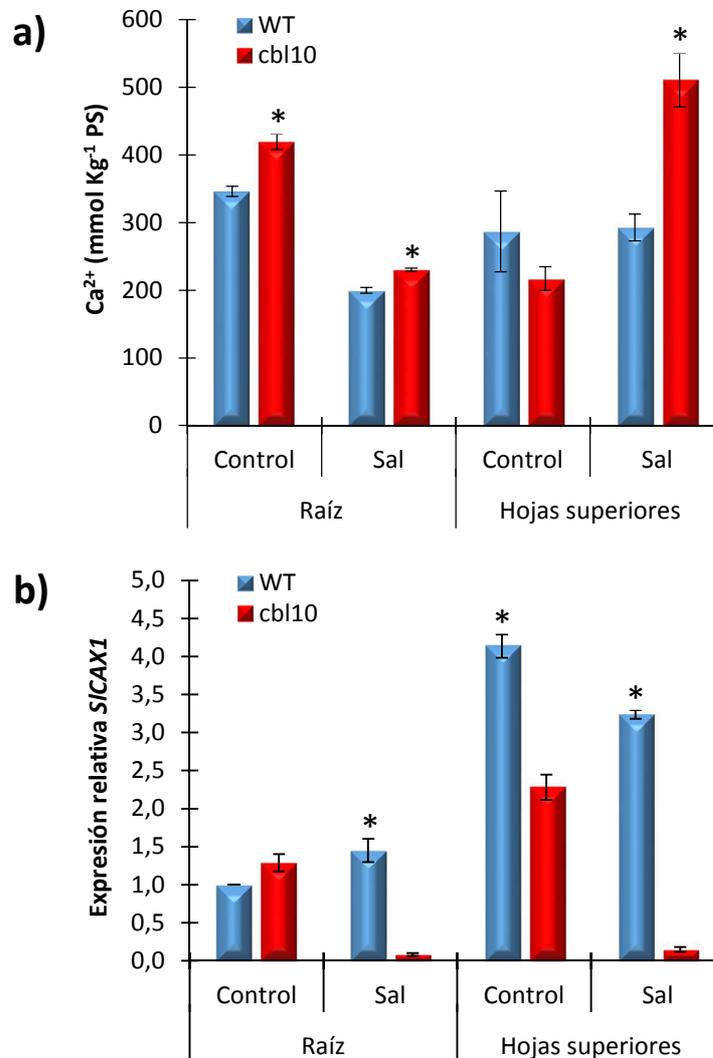
en  $\text{Ca}^{2+}$  fue analizado en el mutante y en WT tanto en raíz como en hojas superiores (1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas) después de 50 días de cultivo en ausencia de estrés (0 mM) o en estrés salino (100 mM). El mutante mostró también en este caso una homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  alterada (**Figura 52a**). Así, el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  fue significativamente mayor en raíz y en las hojas superiores del mutante que en WT, tanto en condiciones de estrés salino como en ausencia del mismo, de manera similar a la respuesta observada en los ensayos a corto plazo.



**Figura 51.** El mutante *cbl10* muestra una menor conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis neta, así como un mayor contenido de agua en estrés salino cuando se cultiva en invernadero (100 mM NaCl durante 50 días). Conductancia estomática, tasa de transpiración, fotosíntesis neta y contenido de agua en la 1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hojas completamente desarrolladas en plantas WT y mutante. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

El análisis de la expresión del gen *SICAX1* en este ensayo mostró nuevamente que la anulación de gen *SICBL10* en tomate provoca una importante disminución en la expresión del gen *SICAX1* (**Figura 52b**). En condiciones no salinas ya se observó una menor expresión del gen *SICAX1* en hoja del mutante (45% menor) con respecto a WT, y en condiciones salinas la expresión del gen fue prácticamente nula tanto en raíz como

en hoja del mutante. Se podría sugerir por tanto que el fenotipo de deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  observado en el mutante tanto en condiciones no salinas como salinas está relacionado con la alteración de la expresión del gen *SICAXI*.



**Figura 52. El mutante *cbl10* tiene alterada la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (a) y niveles de expresión del gen *SICAXI* (b) en raíz y hojas superiores (1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> hoja completamente desarrolladas) de plantas WT y mutante cultivadas en el invernadero en condiciones no salinas y a 100 mM de NaCl durante 50 días. Valores medios  $\pm$  ES. \* Diferencias entre medias (LSD<sub>5%</sub>).

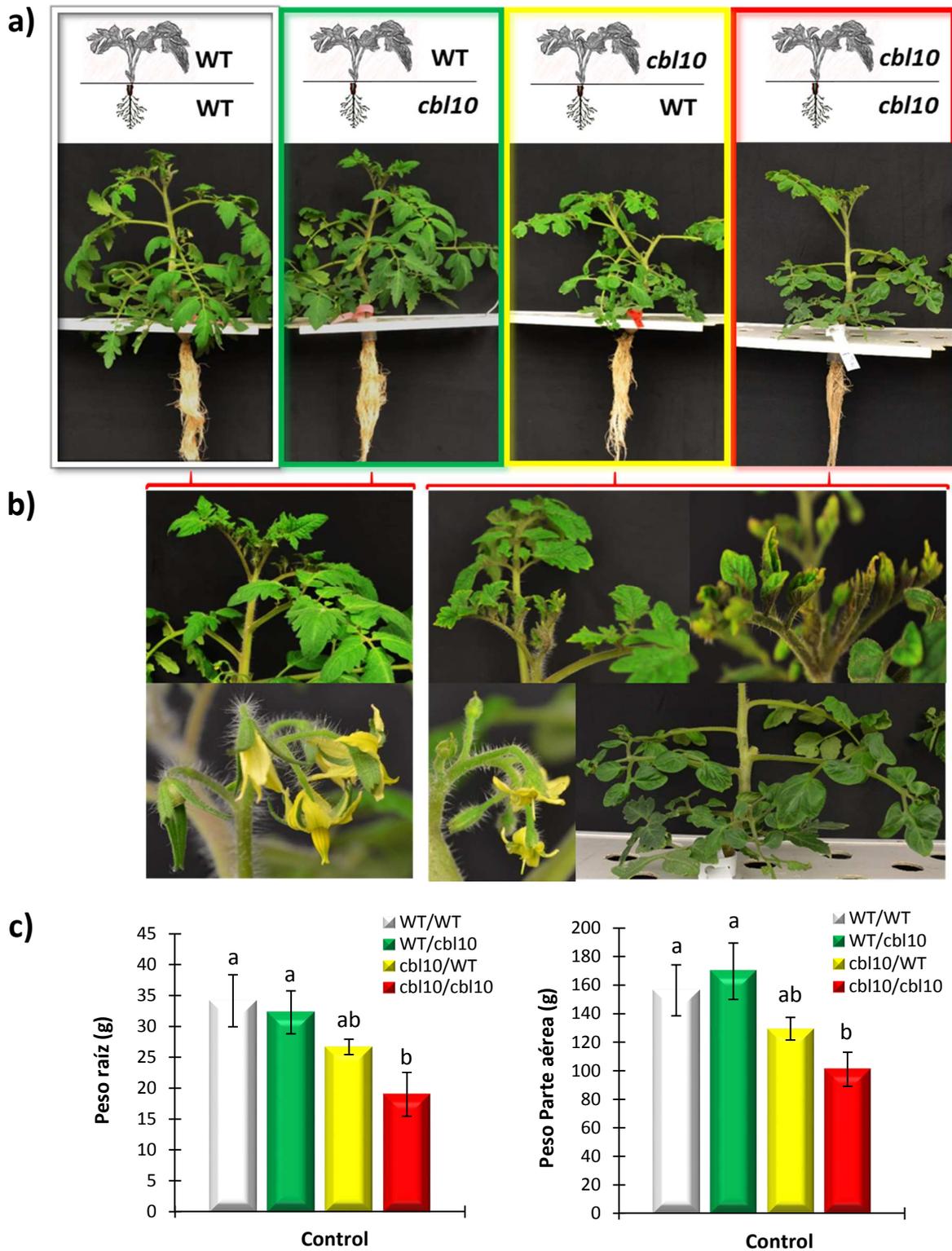
### 9. Importancia de la raíz y parte aérea en la sensibilidad a la sal del mutante *cbl10*

La anulación del gen *SICBL10* provocó una alta sensibilidad a la sal que se manifestó especialmente en la parte aérea, aunque la expresión del gen *SICBL10* se inducía por la salinidad principalmente en raíz seguida de las primeras hojas completamente desarrolladas (**Figura 40b**). Con el fin de dilucidar cuál es el principal órgano responsable

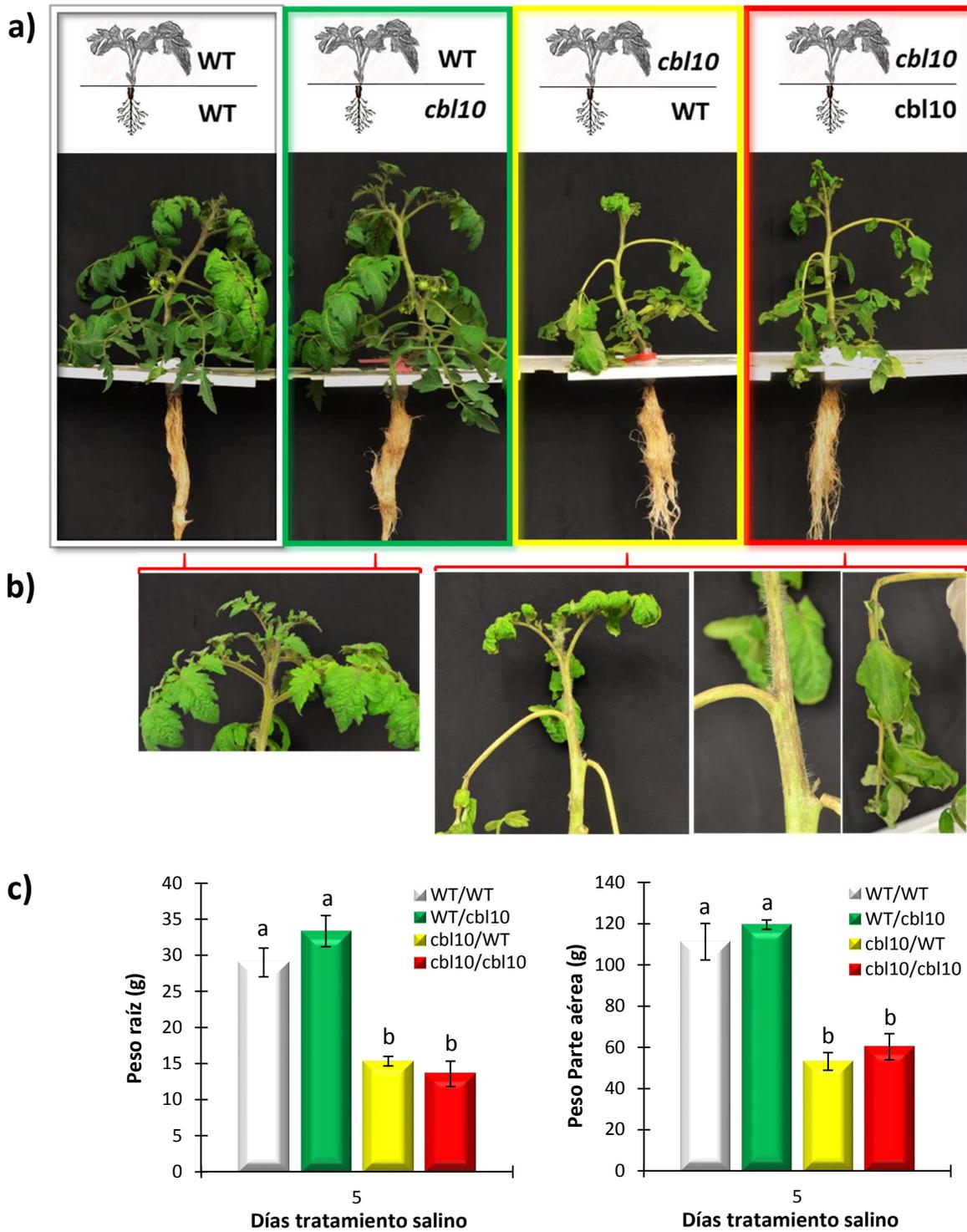
de la sensibilidad a la sal del mutante *cb110*, raíz o parte aérea, o bien si contribuyen ambos órganos, se realizó un experimento comparando la respuesta a sal de injertos recíprocos entre WT y el mutante *cb110*. Puesto que hay un desfase en el desarrollo entre las plantas no injertadas e injertadas, ya que tiene que producirse la unión de los haces vasculares para volver a reanudar el desarrollo, los injertos recíprocos se compararon con los autoinjertos, denominados WT/WT y *cb110/cb110*.

El primer resultado sorprendente fue que la técnica del injerto provocó una alteración morfológica en la parte aérea de las plantas cuando se utilizaba el mutante *cb110* como esqueje (**Figura 53a y 53b**). Así, las plantas autoinjertadas del mutante (*cb110/cb110*) y el injerto recíproco *cb110*/WT mostraron alteraciones morfológicas en la parte aérea similares, hojas más pequeñas y acogolladas con clorosis marginal, mientras que la combinación opuesta (WT/*cb110*) mostró un fenotipo similar al de las plantas autoinjertadas del WT, donde la técnica del injerto no provocó alteraciones morfológicas aparentes. Los injertos con el mutante como esqueje tuvieron además un desarrollo más lento, siendo los pesos de las plantas WT/*cb110* y WT/WT similares, y mayores que los pesos de las plantas *cb110*/WT y *cb110/cb110*, en ausencia de estrés (**Figura 53c**).

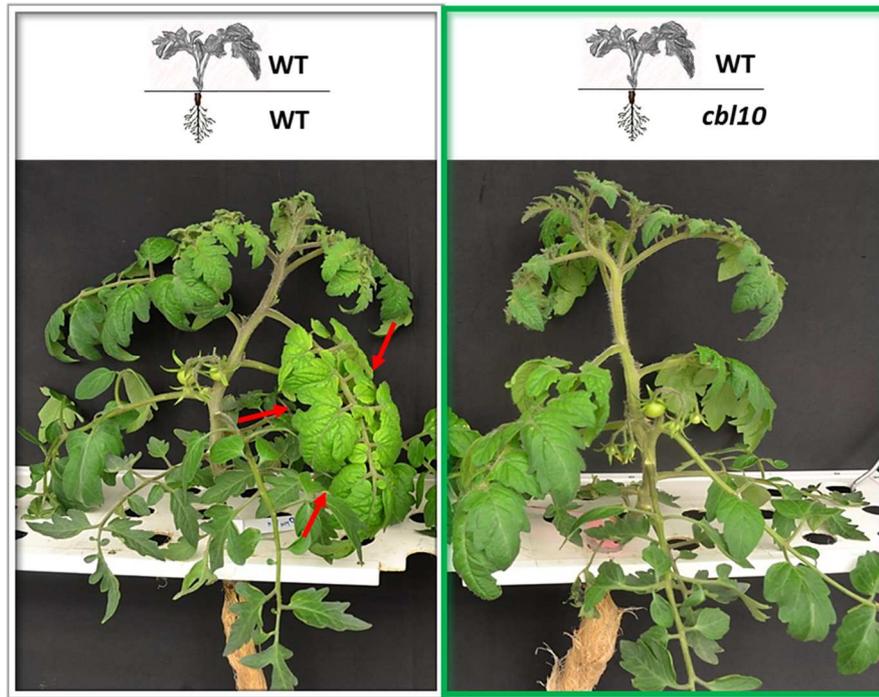
Respecto a la respuesta a la salinidad, las plantas del injerto recíproco *cb110*/WT, donde el mutante es el esqueje, mostraron un fenotipo de hipersensibilidad a la sal similar al mostrado por las plantas autoinjertadas del mutante *cb110* (**Figura 54a y 54b**). Estos injertos mostraron los síntomas característicos del mutante en salinidad, tales como ápices quemados y colapsados, clorosis marginal y tallos jóvenes estrechados y necrotizados, así como una importante reducción del peso fresco (50%) tras 5 días de tratamiento salino (1 día a 100 mM y 4 días a 150 mM). Sin embargo, cuando el mutante *cb110* se utilizó solo como portainjerto y WT como esqueje (WT/*cb110*) no se detectaron síntomas de mayor sensibilidad, sino que sorprendentemente lo que parecía observarse era una ligera mejora de la tolerancia al estrés salino. Así, tras cinco días de tratamiento salino las plantas de estos injertos presentaron una aparente menor clorosis en hojas que el autoinjerto de WT/WT (**Figura 54a**), así como una ligera tendencia a mantener mejor su peso fresco total (**Figura 54c**). Este hecho indica que la función del gen *SICBL10* es diferente e independiente en raíz y en parte aérea, siendo la funcionalidad del gen en la parte aérea la implicada directamente en los mecanismos de repuesta o tolerancia al estrés salino en tomate.



**Figura 53. El injerto provoca una alteración morfológica en la parte aérea cuando se utiliza el mutante *cbl10* como esqueje.** a) El fenotipo de las plantas autoinjertadas de WT (WT/WT) y del injerto recíproco cuando el mutante *cbl10* es el portainjerto y WT es el esqueje (WT/*cbl10*) era similar antes de aplicar el estrés, mientras que un menor desarrollo e importantes alteraciones morfológicas eran observadas en las plantas autoinjertadas del mutante (*cbl10/cbl10*) y en el injerto recíproco entre mutante y WT (*cbl10*/WT). b) Detalle de las alteraciones morfológicas en *cbl10*/WT y *cbl10*/*cbl10*. c) Peso de raíz y parte aérea de las 4 combinaciones de injertos el día antes de aplicar el estrés (valores medios  $\pm$  ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias, LSD<sub>5%</sub>).



**Figura 54. La parte aérea es el principal órgano responsable de la sensibilidad a la sal del mutante *cbl10*.** a) A los 5 días de tratamiento salino (1 día a 100 mM NaCl y 4 días a 150 mM NaCl), las plantas autoinjertadas de WT (WT/WT) y del injerto recíproco entre el mutante WT y *cbl10* (WT/*cbl10*) no muestran síntomas evidentes de clorosis en sus hojas, mientras que las plantas autoinjertadas del mutante (*cbl10/cbl10*) y en el injerto recíproco entre mutante y WT (*cbl10*/WT) están muy afectadas por la salinidad, como se observa en detalle en (b). c) Peso de raíz y parte aérea de las 4 combinaciones de injertos después de 5 días de tratamiento salino (valores medios  $\pm$  ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias,  $LSD_{5\%}$ ).



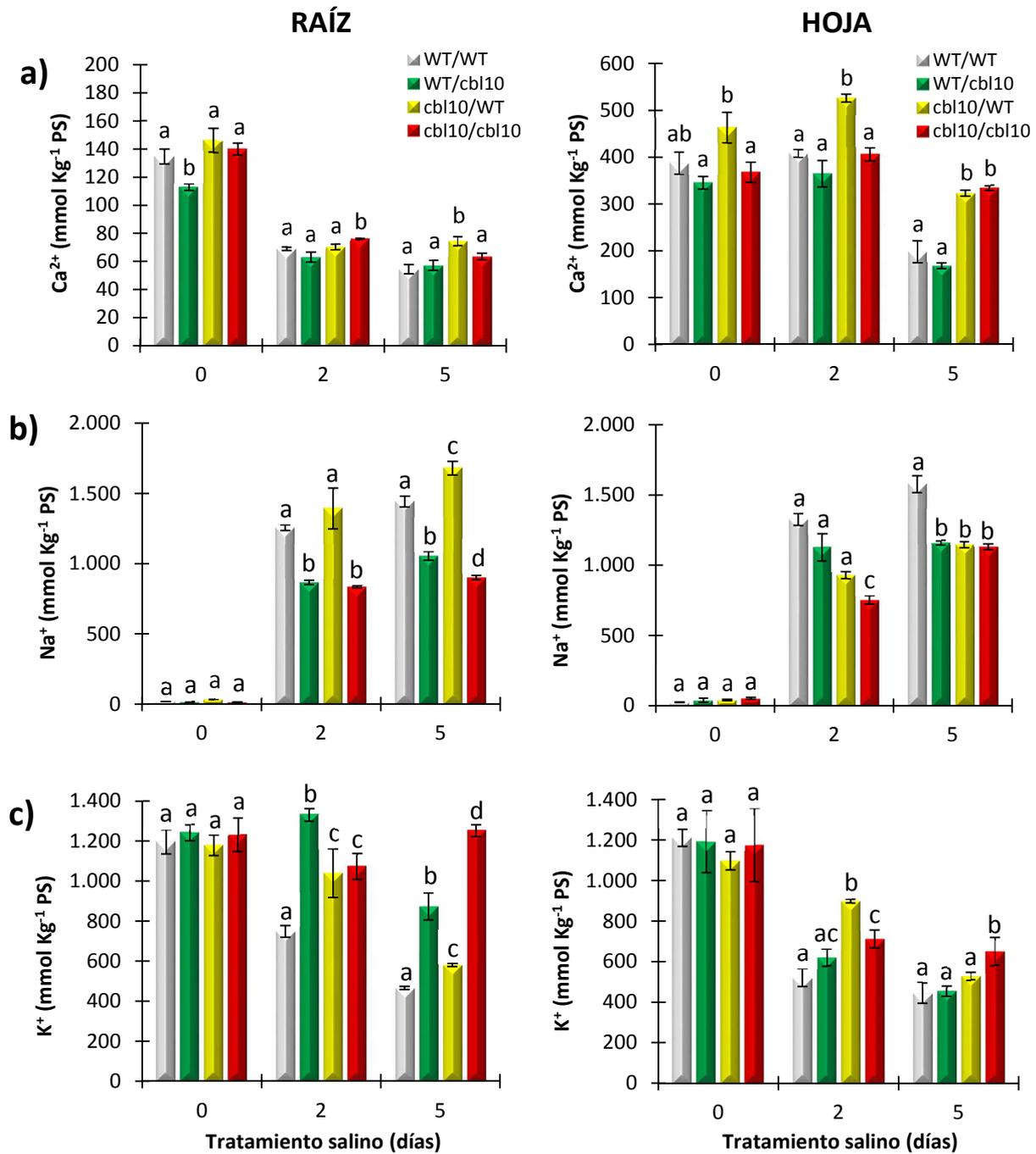
**Ampliación figura 54a:** Sin embargo, cuando el mutante *cbl10* se utilizó solo como portainjerto y WT como esqueje (WT/*cbl10*) no se detectaron síntomas de mayor sensibilidad, sino que sorprendentemente lo que parecía observarse una ligera mejora de la tolerancia al estrés salino. Así tras 5 días de tratamiento salino las plantas de estos injertos presentaron una aparente menor clorosis en hojas que el autoinjerto de WT/WT (flechas rojas en el autoinjerto WT/WT indican una mayor clorosis en esta hoja al final del tratamiento salino que el injerto recíproco WT/*cbl10*).

En el mutante *cbl10* una de las alteraciones fisiológicas observadas fue una alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  que se mantuvo a lo largo del ciclo de cultivo (**Figura 46 y 52a**). En las 4 combinaciones de injertos, se analizó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en raíz y hoja joven completamente desarrollada, antes de aplicar el estrés (día 0) y a los 2 y 5 días de tratamiento salino. Los injertos que tenían el mutante como esqueje, autoinjerto *cbl10/cbl10* y *cbl10*/WT, presentaron al final del ensayo una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en hoja significativamente mayor que en las otras dos combinaciones con WT como esqueje. Esto fue debido, como se puede observar en la figura 55a, a que en estos injertos la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el tratamiento salino fue menor que en las hojas de los injertos que utilizaban WT como esqueje. Así, durante el tratamiento salino la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  en los injertos WT/WT y WT/*cbl10* fue de un 49% y 51%, respectivamente, mientras que en los injertos *cbl10*/WT y *cbl10/cbl10* la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  fue tan sólo de un 30% y un 9%, respectivamente. En la raíz, por el contrario, no se detectaron grandes alteraciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  para ninguna de las combinaciones de injertos. Este resultado sugiere que el gen *SICBL10* está implicado en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en parte aérea.

Otra característica fisiológica detectada en el mutante *cbll10* de tomate fue que el mutante acumuló menos  $\text{Na}^+$  que WT al considerar el conjunto de la planta, principalmente en raíz y hoja completamente desarrollada (**Figura 42a**). En las cuatro combinaciones de injertos se analizó la concentración de  $\text{Na}^+$  tanto en hoja joven completamente desarrollada como en raíz (**Figura 55b**). En raíz, se observó que al final del tratamiento salino el contenido en  $\text{Na}^+$  era siempre menor (un 40% menor de media) en aquellos injertos que utilizaban como portainjerto el mutante independientemente del esqueje utilizado. No hubo sin embargo, menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en la raíz en el injerto que tenía el mutante como esqueje y WT como portainjerto (*cbll10*/WT). Este hecho indica por un lado que la función del gen *SICBL10* en la raíz de tomate parece ser crucial para la absorción y acumulación de  $\text{Na}^+$  en condiciones de salinidad. En cuanto a la hoja, todos los injertos realizados con una parte del mutante, independientemente de si fué raíz (portainjerto) o parte aérea (esqueje), presentaron una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en hoja al final del tratamiento salino, lo que indica en este caso que tanto la función del gen en raíz como en hoja, aunque probablemente diferentes, influyen en la menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en hoja en condiciones de salinidad. En conjunto los resultados indican que el gen *SICBL10* está implicado en la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  tanto en parte aérea como en raíz, pero a través de dos funciones independiente y probablemente diferentes en cada uno de estos tejidos.

El contenido en  $\text{K}^+$  también fue analizado en las cuatro combinaciones de injertos realizadas (**Figura 55c**) y, similar a lo que ocurría en el mutante *cbll10*, los principales cambios en este ion se detectaron en la raíz, siendo similar el contenido de  $\text{K}^+$  en hoja en todas las combinaciones de injertos durante el tratamiento salino. En raíz, se observa un mayor contenido de  $\text{K}^+$  al final del tratamiento salino en todos aquellos injertos que tenían el mutante *cbll10* como portainjerto (WT/*cbll10*, *cbll10*/*cbll10*), debido a una menor pérdida de  $\text{K}^+$  en la raíz de estas combinaciones durante el tratamiento salino. Así, las combinaciones WT/WT y *cbll10*/WT perdieron un 60% y 50% de la concentración inicial de  $\text{K}^+$  mientras que en *cbll10*/*cbll10* no se registró ninguna pérdida de  $\text{K}^+$  en raíz durante el tratamiento y en WT/*cbll10* las pérdidas fueron más lentas y menores (30%). Esta observación indica que el gen *SICBL10* parece regular la homeostasis de  $\text{K}^+$  en la raíz de tomate en condiciones de salinidad, de forma independiente a la función que este gen ejerce en parte aérea. La menor pérdida de  $\text{K}^+$  en raíz podría estar relacionada con la

menor asimilación de  $\text{Na}^+$  en las plantas de los injertos WT/*cbl10*, así como con la mayor tolerancia a la salinidad observada en estos injertos.



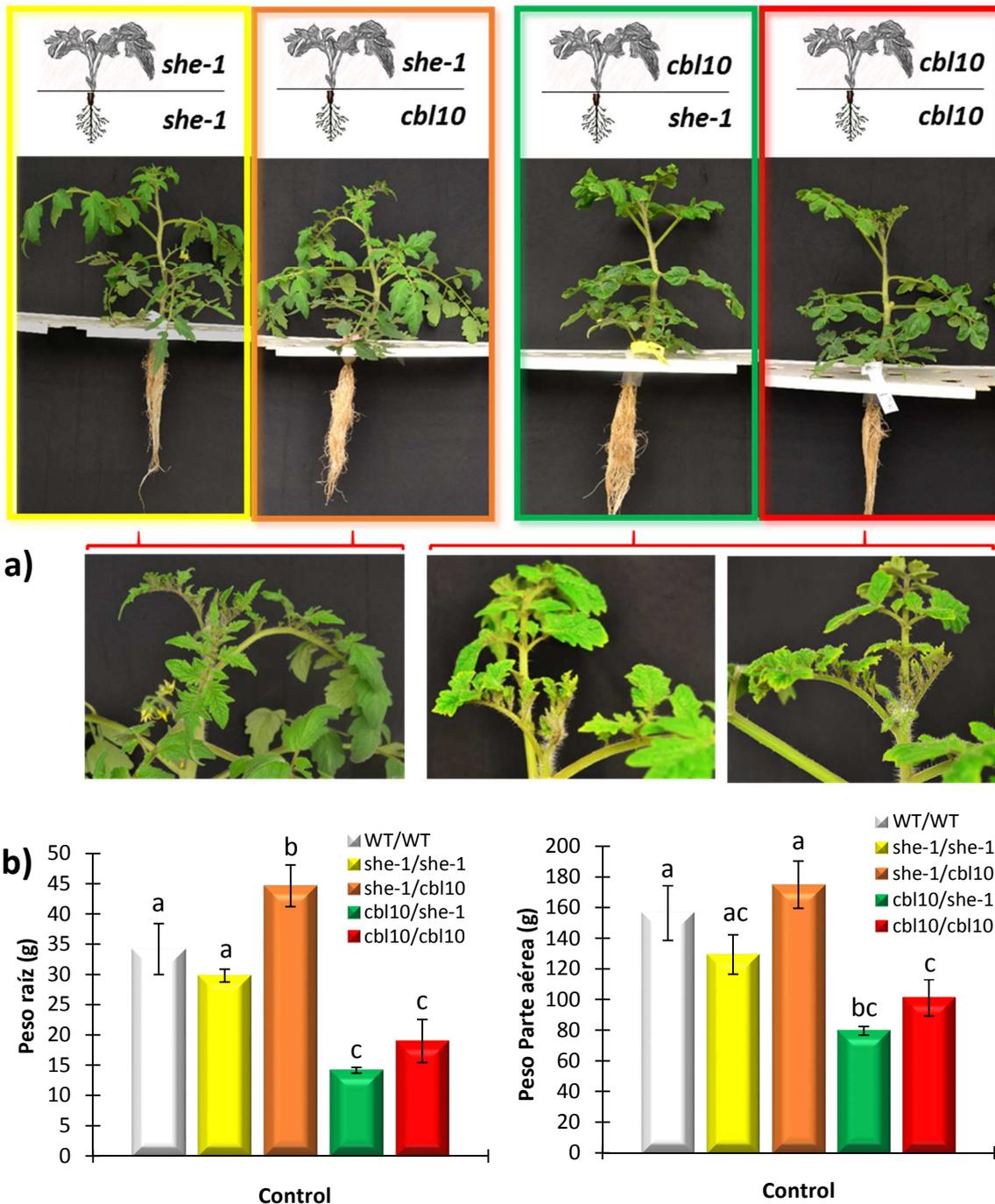
**Figura 55.** El similar grado de sensibilidad a la sal del mutante (*cbl10/cbl10*) y del injerto recíproco *cbl10*/WT está principalmente asociado a la alteración que provoca el mutante en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  de la parte aérea. Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (a),  $\text{Na}^+$  (b) y  $\text{K}^+$  (c) en raíz y hoja completamente desarrollada de plantas autoinjertadas de WT (WT/WT) y mutante (*cbl10/cbl10*) y los injertos recíprocos entre WT y mutante (*cbl10*/WT y WT/*cbl10*). Las combinaciones de injertos eran desarrolladas en cultivo hidropónico bajo estrés salino durante 5 días (1 día a 100 mM de NaCl y 4 días a 150 mM de NaCl). Los valores son la media  $\pm$  ES. Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias,  $\text{LSD}_{5\%}$ ).

Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que la parte aérea es el principal órgano responsable de la sensibilidad del mutante al estrés salino, y la función del gen *SICBL10* en la parte aérea está implicada en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . En raíz, el gen no parece participar, al menos directamente, en la respuesta a la sal (no hay mayor sensibilidad al estrés cuando solo se usa la raíz del mutante) pareciendo tener en este órgano una mayor implicación en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

#### **10. El injerto entre la parte aérea del mutante *cbll10* y la raíz del mutante *she-1* revela un efecto sinérgico para la sensibilidad a la sal**

En este punto de la investigación nos encontramos frente a dos mutantes de tomate hipersensibles a la salinidad, *she-1* y *cbll10*, cuya mayor sensibilidad al estrés parece estar motivada por causas completamente antagónicas. Así, la sensibilidad del mutante *she-1* estaba relacionada con un mayor transporte y acumulación de  $\text{Na}^+$  en hoja, siendo la pérdida de función en la raíz del gen mutado la causa del alto transporte del ion hasta concentraciones tóxicas a la parte aérea. Por el contrario, la acumulación de  $\text{Na}^+$  en el mutante *cbll10* fue menor que en WT, y es la pérdida de función del gen en la parte aérea la que confiere la hipersensibilidad a la sal del mutante. Con el fin de comprobar si las funciones de los genes mutados en *she-1* y *cbll10* podría complementarse revirtiendo el fenotipo de sensibilidad, se realizaron injertos recíprocos con ambos mutantes, comparando la respuesta a sal (100 mM 24 h más 5 días a 150 mM) de los injertos recíproco con los autoinjertos de WT (WT/WT) y de los mutantes *she-1* (*she-1/she-1*) y *cbll10* (*cbll10/cbll10*).

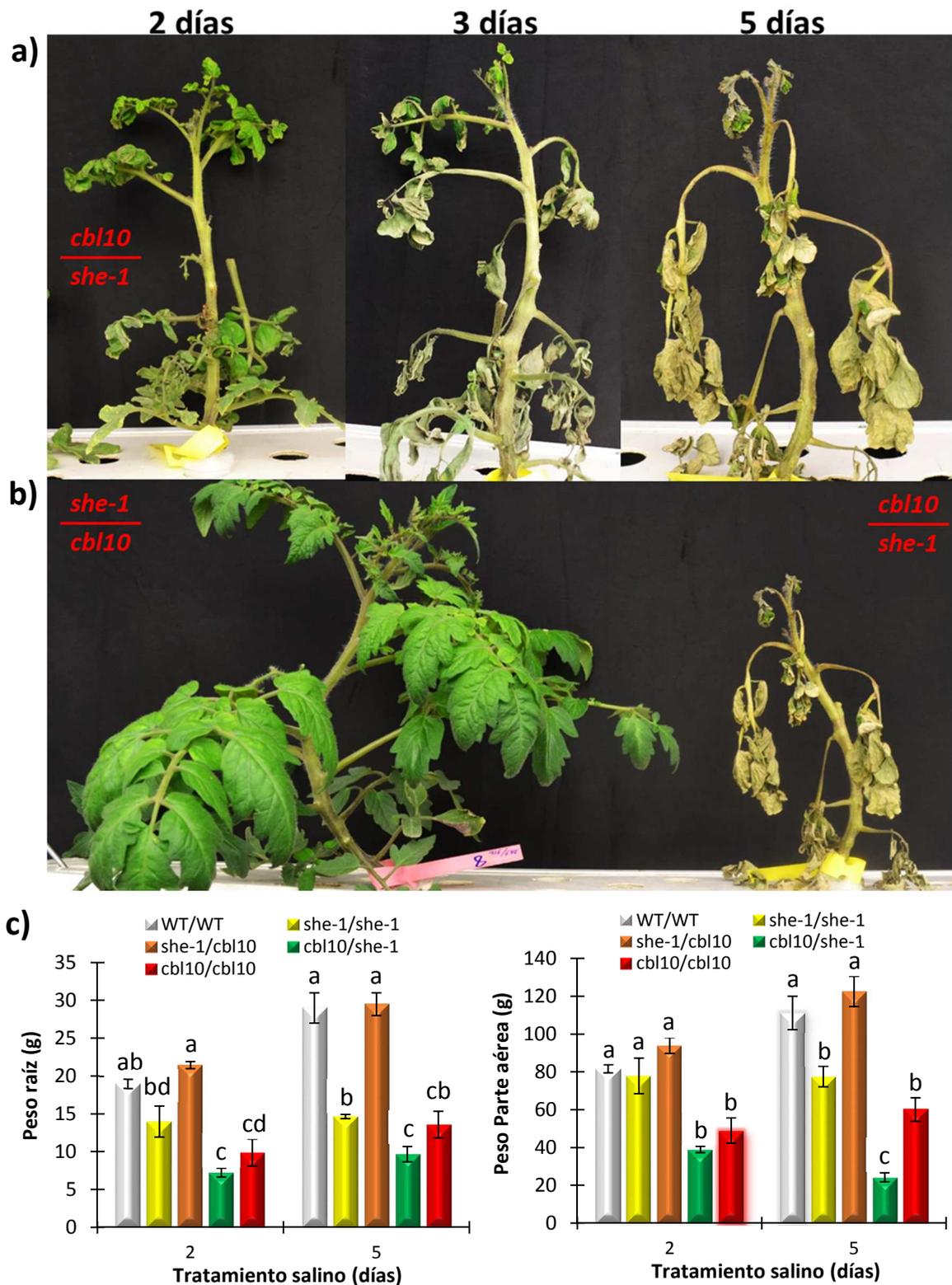
Una vez más, se comprobó que cuando el mutante *cbll10* se usa como esqueje el injerto provocaba alteraciones morfológicas en la parte aérea, presentando el injerto recíproco *cbll10/she-1* un fenotipo alterado similar al descrito en el apartado anterior para los injertos *cbll10/cbll10* y *cbll10*/WT. Sin embargo, la combinación opuesta (*she-1/cbll10*) mostró un fenotipo normal similar a las plantas autoinjertadas del mutante *she-1* (*she-1/she-1*) y las autoinjertadas de WT (**Figura 56a**).



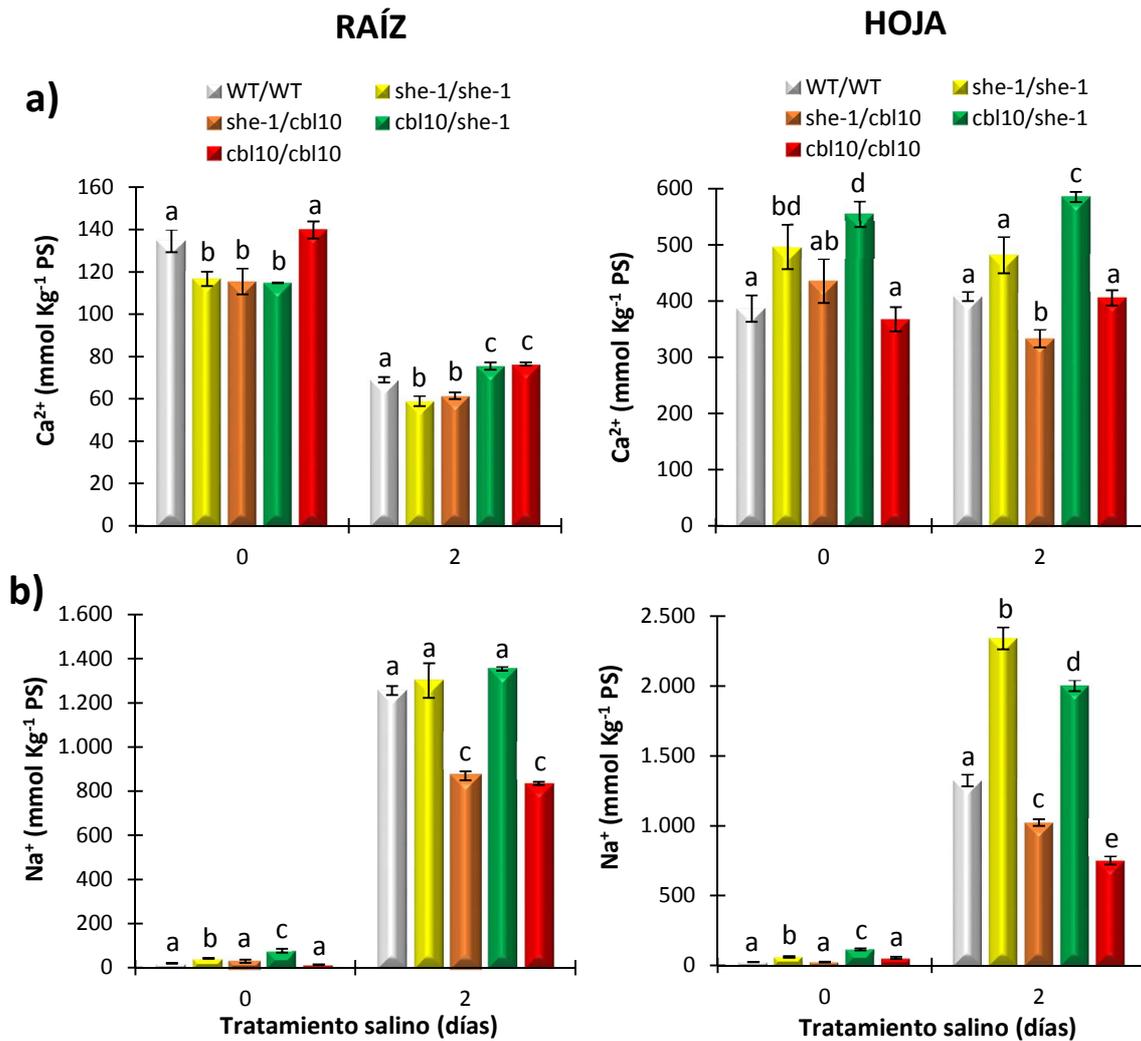
**Figura 56.** El fenotipo de las plantas autoinjertadas de *she-1* (*she-1/she-1*) y del injerto recíproco cuando el mutante *she-1* es el esqueje y el mutante *cbl10* es el portainjerto (*she-1/cbl10*) era similar antes de aplicar el estrés, mientras que las plantas injertadas con el mutante *she-1* como portainjerto y el mutante *cbl10* como parte aérea muestran un menor desarrollo y alteraciones morfológicas similares a aquellas observadas en las plantas autoinjertadas del mutante (*cbl10/cbl10*). a) Alteraciones morfológicas en las plantas injertadas donde *cbl10* es el esqueje. b) Peso de raíz y parte aérea de las 4 combinaciones de injertos el día antes de aplicar el estrés (valores medios  $\pm$  ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias, LSD<sub>5%</sub>).

En cuanto a la respuesta a la salinidad los resultados obtenidos fueron bastante sorprendentes. Así, mientras que la combinación *cbl10/she-1* mostró un fenotipo de hipersensibilidad a la sal muy superior al mostrado por los autoinjertos de cada mutante, las plantas del injerto recíproco inverso *she-1/cbl10* no solo no mostraron una mayor sensibilidad a la sal, sino que parecían presentar una mayor tolerancia al estrés con respecto al autoinjerto de WT (**Figura 57a**). A los 2 días de tratamiento salino las plantas *cbl10/she-1* ya mostraban graves síntomas de sensibilidad al estrés salino, con folíolos necróticos y abscisión de hojas, y tras 5 días de tratamiento las plantas estaban completamente quemadas y muertas. Sin embargo, cuando la parte aérea del mutante *she-1* se injertaba sobre el mutante *cbl10* (*she-1/cbl10*) se observaba una mayor tolerancia, sin síntomas evidentes de clorosis en sus hojas, similar al fenotipo mostrado por las plantas autoinjertadas de WT (**Figura 57b**). Además, a los 5 días de tratamiento salino, el peso de la parte aérea de las plantas injertadas *cbl10/she-1* se reducía alrededor de un 70%, mientras que esta reducción apenas llegaba al 30% en *she-1/cbl10*, mostrando un peso similar al autoinjerto WT/WT (**Figura 57c**). Sin embargo, la reducción del peso de la raíz en ambas combinaciones de injertos fue similar durante el tratamiento salino, pues *cbl10/she-1* muestra un menor peso de la raíz desde el primer día de tratamiento y se mantiene después de 5 días de sal.

En este ensayo también se analizó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na}^+$  en la raíz y en las hojas completamente desarrolladas antes de aplicar el estrés (día 0) y a los 2 días de tratamiento salino en las dos combinaciones de injertos recíprocos entre los mutantes *cbl10* y *she-1*, así como en los autoinjertos de WT y de ambos mutantes. Respecto a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 58a**), el injerto hipersensible a la salinidad *cbl10/she-1* muestra una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las hojas desarrolladas de  $585 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ PS}$  a los 2 días de tratamiento salino, siendo esta prácticamente el doble de la concentración mostrada por la combinación opuesta *she-1/cbl10* ( $333 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ PS}$ ). Estos resultados demuestran una vez más que el gen *SICBL10* estaría implicado en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea del tomate en condiciones de salinidad.



**Figura 57.** La unión del mutante *she-1* como portainjerto y del mutante *cbl10* como parte aérea incrementa el grado de sensibilidad a la sal respecto a las plantas autoinjertadas de ambos mutantes, mientras que la respuesta opuesta es observada en la combinación *she-1/cbl10*. a) La hipersensibilidad a la sal de *cbl10/she-1* se muestra claramente desde los 2 días de tratamiento salino (1 día a 100 mM NaCl y 1 día a 150 mM NaCl). b) A los 5 días de tratamiento (1 día a 100 mM NaCl y 4 días a 150 mM NaCl), la combinación *she-1/cbl10* muestra un alto nivel de tolerancia mientras que las plantas de la combinación inversa estaban muertas. c) Peso de raíz y parte aérea de las 4 combinaciones de injertos después de 2 y 5 días de tratamiento salino (valores medios  $\pm$  ES). Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias, LSD<sub>5%</sub>).



**Figura 58.** Alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  cuando se une mediante injerto un mutante cuyo órgano responsable de la sensibilidad a sal es la parte aérea (*cbl10*) y otro que es la raíz (*she-1*). Concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (a) y  $\text{Na}^{+}$  (b) en raíz y hoja completamente desarrollada de plantas autoinjertadas de WT (WT/WT), del mutante *cbl10* (*cbl10/cbl10*) y del mutante *she1* (*she-1/she-1*), así como los injertos recíprocos. Las medidas eran hechas antes de aplicar el estrés y después de 2 días de tratamiento salino (1 día a 100 mM de NaCl y 1 día a 150 mM de NaCl). Los valores son la media  $\pm$  ES. Letras diferentes para el mismo día de tratamiento indica diferencias significativas (Diferencias entre medias,  $\text{LSD}_{5\%}$ ).

Respecto al contenido de  $\text{Na}^{+}$ , el injerto *she-1/cbl10* muestra una concentración de  $\text{Na}^{+}$  en raíz y parte aérea similar al autoinjerto del mutante *cbl10* (*cbl10/cbl10*), siendo esta muy inferior a la concentración de  $\text{Na}^{+}$  del injerto recíproco *cbl10/she-1* y de los autoinjertos de WT y del mutante *she-1* (Figura 58b). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el mutante *cbl10* podría absorber menos  $\text{Na}^{+}$  por su raíz y de esta manera transportar menos  $\text{Na}^{+}$  a la parte aérea, ya que como hemos visto anteriormente, tanto el injerto recíproco WT/*cbl10* (Figura 55b), como los injertos *she-1/cbl10* y *cbl10/cbl10* muestran menor contenido de  $\text{Na}^{+}$  en la raíz durante el tratamiento salino, que el resto de injertos estudiados. Por el contrario, el injerto *cbl10/she-1* llega a acumular en hoja

superior el doble contenido de Na<sup>+</sup> que la combinación opuesta *she-1/cbl10* y el autoinjerto de WT (WT/WT) a los 2 días de tratamiento salino, y que es similar a los niveles de Na<sup>+</sup> en hoja de *she-1/she-1*. Estos resultados indican que la combinación *cbl10/she-1* absorbe y transporta una elevada cantidad de Na<sup>+</sup> a la parte aérea al estar el mutante *she-1* como portainjerto, que unido a la característica de que la mutación del gen *SICBL10* en la parte aérea altera la distribución de Na<sup>+</sup> entre hojas jóvenes y adultas hace que la salinidad sea letal para estas plantas en pocos días.



## **CAPÍTULO II. DISCUSIÓN**



## V. CAPITULO II

### DISCUSIÓN

#### 1. El gen *SICBL10* es clave en la tolerancia del tomate a la salinidad

En el segundo capítulo de esta tesis doctoral se ha presentado la caracterización funcional del mutante *cbll0*, identificado por el grupo del IBMCP a partir de un cribado genético realizado *in vitro* en la colección de líneas T-DNA de tomate generada a partir del cv. Moneymaker (Pineda B., 2012). El mutante tiene anulado el gen *SICBL10*. Este gen codifica para una proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de la familia de las Calcineurinas tipo B (CBL: *Calcineurin B-Like protein*), las cuales no poseen dominio enzimático, pero bajo la unión al  $\text{Ca}^{2+}$  sufren cambios conformacionales que las predisponen a unirse a unas proteínas quinasas (*CBL interacting protein kinases*, CIPKs) formando módulos funcionales los cuales según numerosos estudios realizados fundamentalmente en *Arabidopsis*, participan en la mediación de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  suscitada por diversos estímulos (Kim, 2013).

El gen *SICBL10* fue identificado recientemente en tomate (de la Torre *et al.*, 2013), habiéndole otorgado un papel clave en la respuesta al estrés causado por el ataque de patógenos, pero su papel en la tolerancia/sensibilidad a estreses abióticos no se ha estudiado hasta la fecha en esta especie. Estudios anteriores mostraron que el gen *CBL10* es crítico para la tolerancia a la salinidad en especies como *Arabidopsis* y *Pópulus* (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014), observando que la alteración de este gen causó hipersensibilidad a la sal principalmente en la parte aérea de esas especies. En tomate, nuestros resultados también muestran que el gen *SICBL10* juega un papel crucial en la tolerancia a la sal de las plantas protegiendo principalmente tejidos jóvenes apicales de la parte aérea. De hecho, en condiciones de estrés salino, mientras que las hojas más viejas y el tallo basal de las plantas mutantes *cbll0* no mostraron síntomas evidentes de sensibilidad a la sal, la parte superior de la planta, incluyendo el ápice, hojas en desarrollo y las partes jóvenes del tallo, mostró quemaduras y marchitamiento y, finalmente, las plantas murieron por el colapso apical (**Figura 41**). Esta sensibilidad a la sal mayormente focalizada en los tejidos jóvenes de la parte aérea del mutante no se había descrito hasta ahora, y su detección en tomate ha sido posible porque, al contrario que en *Arabidopsis*, la estructura anatómica de tomate con un tallo largo ha permitido una disección más

precisa de los diferentes niveles de daños. Las raíces del mutante *cbll10* de tomate también se vieron afectados por la salinidad tanto *in vitro* como en ensayos *in vivo*, como anteriormente también fué observado en el mutante *cbll10* de *Arabidopsis* por Quan *et al.* (2007). Curiosamente, cuando analizamos la inducción de la expresión del gen *SICBL10* por estrés salino en plantas sin transformar (WT), se detectó que la mayor inducción en la expresión del gen sucedía en las primera hojas completamente desarrolladas (hojas superiores) y en la raíz, en lugar de en los tejidos en desarrollo que fueron los más afectados por los salinidad (**Figura 41**). Esto sugiere que la función ejercida por el gen *SICBL10* en las primeras hojas desarrolladas y en raíz es necesaria para la protección de la zona apical de la planta en condiciones de estrés salino.

El patrón de expresión temporal del gen *SICBL10* durante el tratamiento salino (**Figura 40a**) mostró dos picos de inducción de la expresión, lo que sugiere una posible doble función de este gen en respuesta al estrés salino, uno temprano (después de 24 h de tratamiento salino), que podría estar implicado en procesos de señalización del estrés, seguido de una bajada a niveles basales de la expresión, y otro pico más tardío (después de 6 días de tratamiento salino) cuyo papel en este caso podría estar implicado en los mecanismo de adaptación a dicho estrés. En estudios previos se había observado que los transcritos de *CBL10* aumentaban después de pocas horas de aplicación del estrés salino (6-12 horas) y posteriormente disminuían después de 24-48 horas de tratamiento (Quan *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014), pero la segunda fase de inducción observada en este estudio no se había descrito hasta ahora, probablemente debido a que en los ensayos previos se han utilizado tiempos más cortos de aplicación del tratamiento salino.

## 2. El gen *SICBL10* está implicado en la homeostasis de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$

Otra característica importante observada en el mutante *cbll10* es la alteración en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  durante condiciones de estrés salino. Así, la acumulación total de  $\text{Na}^+$  por la planta era inferior en el mutante *cbll10* que en WT (**Figura 42a**), lo que resultaba en una inusual baja relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para un mutante sensible al estrés salino (Cuartero *et al.*, 2010). Estudios previos sobre el efecto de la mutación de este gen en *Arabidopsis* observaron que el mutante *Atcbll10* mostraba también una menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en condiciones de estrés salino en comparación con las plantas WT (Kim *et al.*, 2007), siendo *Atcbll10* el primer mutante hipersensible al estrés salino identificado con un menor relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Kim *et al.*, 2007). En el caso del mutante

*cbl10* de tomate, las plantas mutantes no solo no perdían  $K^+$  en raíz y parte aérea como consecuencia del tratamiento salino, sino que la concentración de este ion aumentaba considerablemente durante el tratamiento salino (**Figura 42b**). En relación a esta observación, Ren *et al.* (2013) han demostrado que en *Arabidopsis* CBL10 modula negativamente la actividad de un transportador de  $K^+$  de membrana plasmática en raíz, AKT1, uniéndose directamente a él sin necesidad de formar módulo funcional con ninguna CIPK. Si esta funcionalidad descrita para *Arabidopsis* se conservara también en tomate y *SICBL10* inactivara a *AKT1* en raíz, lo cual sería necesario e interesante corroborar después de los resultados obtenidos, la falta de funcionalidad del gen *SICBL10* en el mutante *cbl10* podría estar provocando una inactivación defectuosa del transportador de  $K^+$ , permitiendo una mayor entrada de  $K^+$  y como consecuencia un mayor contenido de  $K^+$  en la raíz y en la parte aérea del mutante.

Por otro lado, en cuanto a la homeostasis de  $Na^+$  en las plantas mutantes *cbl10*, nosotros hemos realizado una nueva observación no descrita hasta la fecha para ningún mutante de *cbl10*, y es que aunque las plantas presentaban una menor acumulación de  $Na^+$  que WT, la distribución del mismo a lo largo de la planta mutante estaba alterada (**Figura 42a**), una de las principales características que determinan la tolerancia a la sal en tomate (Cuartero *et al.*, 2010). En este contexto, las plantas WT adoptaron frente a la salinidad el mecanismo típico de tolerancia de plantas glicófitas (Craig Plett y Møller, 2010; Horie *et al.*, 2012), con una mayor acumulación de  $Na^+$  en la raíz, evitando el transporte de iones  $Na^+$  a niveles tóxicos a través del xilema a los tejidos verdes fotosintéticamente activos, y dentro de los tejidos verdes el  $Na^+$  se acumuló preferentemente en hojas adultas y el tallo, con el fin de proteger los tejidos jóvenes en desarrollo de la toxicidad por  $Na^+$ . Sin embargo, el mutante *cbl10* de tomate no mostró capacidad de retención de  $Na^+$  en la raíz, siendo el contenido de  $Na^+$  similar o incluso inferior que en la parte aérea, que también presentó deficiencia en la acumulación del ion en las hojas adultas, lo que permitió un mayor transporte de  $Na^+$  a los tejidos en desarrollo, en comparación con las plantas sin transformar (WT) (**Figura 42a**). Este hecho pudo ser el causante del colapso apical detectado en las plantas mutantes a los pocos días de exposición a condiciones de salinidad.

### 3. La expresión de genes implicados en la homeostasis de Na<sup>+</sup> está alterada por la disrupción de *SICBL10*

Al estudiar la expresión de los genes implicados en la absorción y el transporte a larga distancia de Na<sup>+</sup> en condiciones de salinidad, se observó un patrón alterado de expresión en el mutante que parecía reflejar una capacidad defectuosa del mismo para acumular Na<sup>+</sup> tanto en raíz como en hojas superiores desarrolladas, que se correspondía perfectamente con el patrón alterado en la distribución de Na<sup>+</sup> observado en el mutante de tomate *cbl10*. Las evidencias acumuladas indican que las funciones de transporte a través de las vías SOS (Salt Overly Sensitive) y HKT (High-Affinity Potassium Transporter) están coordinadas para mantener la homeostasis de Na<sup>+</sup> bajo condiciones de estrés salino (Kronzucker y Britto, 2011; Hasegawa, 2013; Maathuis, 2013; Deinlein *et al.*, 2014). De hecho, la disfunción de cualquier gen de la familia SOS o HKT altera el transporte a larga distancia y la adecuada distribución de Na<sup>+</sup> en la planta, lo que resulta en fenotipos sensibles a la sal (Olias *et al.*, 2009; Huertas *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2013). El antiportador H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> SOS1, situado en la membrana plasmática, está implicado en la salida de Na<sup>+</sup> desde el citoplasma al exterior celular, ya sea al medio exterior llevado a cabo por las células epidérmicas de la raíz, o hacía el xilema, llevado a cabo por las células parenquimáticas tanto de hoja como de raíz, evitando de esta manera una acumulación excesiva de Na<sup>+</sup> en el citoplasma celular (Huertas *et al.*, 2012).

La principal función de la familia de genes *HKT1* descrita hasta la fecha es el transporte a larga distancia de Na<sup>+</sup>. En *Arabidopsis*, donde más se ha avanzado en el conocimiento de esa familia de transportadores, se ha descrito concretamente que la principal función de la isoforma *AtHKT1;1* es la de retirar Na<sup>+</sup> del xilema, favoreciendo preferentemente su acumulación dentro de las vacuolas de las células tanto en raíz como parte aérea, tallo y hojas desarrolladas (provistos de vacuolas), para evitar que el Na<sup>+</sup> llegue vía xilema a las zonas de apicales de crecimiento, donde su efecto es muy tóxico (Berthomieu *et al.*, 2003; Sunarpi *et al.*, 2005; Rus *et al.*, 2006; Davenport *et al.*, 2007; Moller *et al.*, 2009; Olias *et al.*, 2009; Craig Plett y Møller, 2010). Un estudio reciente de Asins *et al.* (2013) sugiere que en tomate la isoforma *SlHKT1;2* podría desarrollar una función similar a la descrita para *AtHKT1;1*. Como hemos mencionado anteriormente, la alteración en los patrones de expresión de los genes detectados en el mutante (**Figura 43**) parece señalar que la disrupción del gen *SICBL10* alteró la capacidad de retención de Na<sup>+</sup> en las células vacuoladas (células de la raíz, tallo y hojas completamente desarrolladas).

Así, lo observado en la raíz del mutante fue un aumento de la salida de  $\text{Na}^+$  hacia el exterior de la planta mediante un aumento de la expresión de *SIHKT1;1*, que retira  $\text{Na}^+$  del xilema hacia el interior de las células de la raíz, y un aumento de la expresión de *SISOS1* que probablemente expulsa el  $\text{Na}^+$  de nuevo al medio (Oliás *et al.*, 2009). Este mecanismo de salida hacia el medio exterior no fue detectado en las plantas WT (**Figura 43**).

A nivel de parte aérea, el mutante intenta minimizar el contenido en  $\text{Na}^+$  en el interior celular de las hojas desarrolladas, aumentando para ello la expresión de *SISOS1*, que lo saca al exterior, y casi anulando la expresión de *SIHKT1;1* y 2, disminuyendo con ello su entrada a la célula (**Figura 43**). En las hojas de WT no se observó por el contrario grandes cambios en la expresión de estos genes durante el tratamiento salino. Por último, se observó un curioso patrón de expresión de las isoformas de *SIHKT1* en el tallo del mutante, ya que *SIHKT1;1* aumenta su expresión en sal hasta 80 veces mientras que la expresión de la otra isoforma se anula por completo (**Figura 43**), lo que sugiere un papel diferente para los *SIHKT1s* en función del órgano, tejido y hasta la etapa de desarrollo de las plantas (Asins *et al.*, 2013). Debido al menor contenido de  $\text{Na}^+$  también en el tallo de las plantas mutantes con respecto a WT, el aumento de la expresión de *SIHKT1;1* en el tallo no creemos que este aumentando la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular, sino que podría estar promoviendo la entrada de  $\text{Na}^+$  al floema para su recirculación hasta la raíz, una de las funciones que se ha sugerido podría tener alguna de las isoformas de esta familia de transportadores, pero que aún no ha sido demostrada (Berthomieu *et al.*, 2003; Oliás *et al.*, 2009; Asins *et al.*, 2015). Por lo tanto, *CBL10* podría desempeñar un papel crucial en la homeostasis de iones bajo estrés salino mediante la regulación tanto en de la absorción como la translocación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Ren *et al.*, 2013).

#### 4. La anulación de *SICBL10* no altera el nivel de expresión de *SISOS2*

Estudios previos han descrito que CBL10 interactúa con la proteína quinasa CIPK24 (*SOS2*), localizando este complejo en la membrana vacuolar donde podría ejercer su función en condiciones de estrés salino (Kim *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007; Waadt *et al.*, 2008). Así, estudios en *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2007), pero también en otras especies como *Pópulus* (Tang *et al.*, 2014), han sugerido que en condiciones de salinidad se forma el modulo funcional CBL10-CIPK24 que se dirige al tonoplasto donde fosforila una proteína, probablemente un antiportador  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ , para la acumulación no tóxica de  $\text{Na}^+$

en el interior de las vacuolas celulares de la parte aérea. También se ha sugerido que *CBL10* puede tener en parte aérea una función homóloga a la que ejerce *SOS3* (*CBL4*) en raíz (Quan *et al.*, 2007). *SOS3* es uno de los componentes de la ruta SOS, el cual en condiciones de salinidad forma módulo funcional con *SOS2* (CIPK24) y se dirigen a la membrana plasmática donde fosforilan a *SOS1*, que como ya hemos mencionado anteriormente es un antiporter  $H^+/Na^+$  encargado de la salida de  $Na^+$  (Olías *et al.*, 2009). El fenotipo observado en el mutante de tomate *cbll0* no secundaría esta hipótesis, ya que de ser así la disrupción de *SICBL10* debería alterar la capacidad de las células de parte aérea para sacar  $Na^+$  al exterior a través de *SOS1*, observando un mayor contenido de  $Na^+$ . Sin embargo, lo que los análisis fisiológicos y moleculares nos muestran es justo lo contrario, estando por tanto mucho más cerca de la hipótesis planteada por Kim *et al.*, (2007) y apoyada por otros autores (Waadt *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2014) en cuanto al papel de *CBL10* en la acumulación de  $Na^+$  en el interior de las vacuolas celulares en condiciones de salinidad. Aunque en nuestro caso, la anulación del gen *SICBL10* no afectó al nivel de expresión de *SISOS2* en la parte aérea de las plantas mutantes; registrándose solamente una expresión ligeramente mayor en la raíz de las plantas mutantes en comparación con las WT (**Figura 44**), que junto al aumento de la expresión de *SOS1* apoya la mayor salida de  $Na^+$  en el mutante.

Aún no se ha identificado la proteína diana en el tonoplasto para el módulo funcional CBL10-CIPK24. Los primeros estudios sugirieron que podría ser un antiporter catión/protón de la familia NHXs (Kim *et al.*, 2007), pero esta hipótesis no ha sido confirmada por ningún estudio posterior sobre la función de *CBL10*. Cuatro isoformas de *NHX* han sido identificadas en tomate (Gálvez *et al.*, 2012; Huertas *et al.*, 2013), en nuestro estudio sólo las isoformas *LeNHX1* y *LeNHX3* mostraron un aumento significativo de su expresión bajo estrés salino. A nivel de la raíz, el aumento en la expresión de *LeNHX1* fue significativamente mayor en las plantas mutantes que en las plantas WT (**Figura 44**), pero el contenido de  $Na^+$  en las raíces de WT fue superior al del mutante al final del tratamiento salino (**Figura 42a**). En cambio, el contenido de  $K^+$  en las raíces del mutante *cbll0* fue muy superior al de WT al final del ensayo (**Figura 42b**). Algunos autores han demostrado que las proteínas *NHX1* y *NHX2* desempeñan un papel más importante en la homeostasis de  $K^+$  que en la de  $Na^+$  (Bassil *et al.*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que el incremento en la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan *AtNHX1* está fundamentalmente asociado al control de la homeostasis del

$K^+$  (Leidi *et al.*, 2010). Como hemos visto anteriormente, la falta de funcionalidad del gen *SICBL10* en el mutante podría estar provocando una inactivación defectuosa del transportador de  $K^+$ , permitiendo una mayor entrada de  $K^+$  por la raíz del mutante. Por tanto, la mayor expresión de *LeNHX1* observada durante el tratamiento salino en las raíces del mutante *cbll10* podría ser como consecuencia de esta mayor llegada de  $K^+$ , acumulando el exceso de  $K^+$  en las vacuolas de las raíces. Sin embargo, no se ha observado cambios importantes en la expresión para ninguna de las dos isoformas de *LeNHX* en las hojas, lo que sugiere, de acuerdo con Tang *et al.* (2014), que la proteína diana para la función de *CBL10* en la homeostasis de  $Na^+$  no es una proteína de la familia de las NHXs.

### 5. El gen *SICBL10* está implicado en la homeostasis de $Ca^{2+}$

Otra característica fenotípica interesante y que no se ha descrito hasta la fecha para ningún mutante del gen *CBL10*, es la mayor reducción en la conductancia estomática y la tasa de transpiración en hojas del mutante *cbll10* bajo condiciones de estrés salino, lo que estaba asociado con una menor apertura estomática y un mayor porcentaje de estomas cerrados en el mutante (**Figura 45**). Nosotros en este estudio sugerimos que esta alteración fisiológica causada por la mutación del gen *SICBL10* en tomate podría estar relacionada, entre otros, con la alteración de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  detectada en el mutante bajo condiciones de estrés salino. De hecho, el contenido de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  es un factor clave en la regulación de los movimientos de los estomas (Allen *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2008; Roelfsema y Hedrich, 2010), habiéndose demostrado que después del cierre estomático inducido por un estrés se debe producir una salida de  $Ca^{2+}$  desde la vacuola, donde se encuentra almacenado principalmente, hacia el apoplasto para que se produzca la reapertura estomática (Gilliham *et al.*, 2011).

El  $Ca^{2+}$  es absorbido por las raíces y se transporta principalmente vía extracelular a través del apoplasto hacia el xilema, donde el  $Ca^{2+}$  alcanza la parte aérea de la planta en función de la tasa de transpiración y de la velocidad de su acumulación en las vacuolas (McAinsh y Pittman, 2009). En los tejidos basales (raíces, hojas y tallo adultos) el  $Ca^{2+}$  se encuentra principalmente formando parte de la estructura de la pared celular, no constituyendo estos depósitos una reserva de  $Ca^{2+}$  para la planta, dado que el  $Ca^{2+}$  de la pared celular no es intercambiable. La reserva de  $Ca^{2+}$  en la planta se encuentra en las hojas superiores desarrolladas y el tallo superior, donde el  $Ca^{2+}$  que llega y no es utilizado

por la planta entra al interior celular y se acumula en las vacuolas. En el interior celular, el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra casi en su totalidad almacenado en vacuolas, manteniendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico rigurosamente controlada en niveles muy bajos (entre 100-200 nM) a fin de evitar, entre otros efectos indeseables, la precipitación de fosfato inorgánico (Sanders *et al.*, 1999). Este  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en las vacuolas es intercambiable según las necesidades fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la planta o bajo situación de déficit (Bush, 1995). En lo que respecta a la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , la salinidad indujo una disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plantas sin transformar, principalmente en las hojas en desarrollo y en las hojas superiores completamente desarrolladas (**Figura 46**), debido a que condiciones de salinidad la planta absorbe menos  $\text{Ca}^{2+}$  ya que  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son iones antagonista (Maathuis, 2014). Por el contrario, en el mutante *cb110* no se detectó disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  con la salinidad, siendo el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea superior significativamente mayor en el mutante que en WT al final del tratamiento salino (**Figura 46**), lo que sugiere que el mutante *cb110* no hace uso de su reserva de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pero si no se produce este intercambio, el mutante no dispone del  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para seguir desarrollando sus tejidos y meristemas en condiciones de salinidad, lo que junto con la mayor llegada de  $\text{Na}^+$  podría estar provocando el colapso apical observado.

Hasta donde sabemos, estos son los primeros resultados que apuntan una clara funcionalidad del gen *CBL10* en la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas. En lo que respecta al  $\text{K}^+$ , también se ha comprobado que la entrada y salida de  $\text{K}^+$  del interior de las células oclusivas afecta a la apertura y cierre de los estomas (Lebaudy *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012), y como hemos visto anteriormente el mutante *cb110* muestra mayor contenido de  $\text{K}^+$  en raíces, tallo y hojas superiores (hojas jóvenes desarrolladas) al final del tratamiento salino. Como *CBL10* parece que regula negativamente a *AKT1* (Ren *et al.*, 2013), y se ha visto que *AKT1* es importante para la entrada de  $\text{K}^+$  en las células oclusivas (Kim *et al.*, 2007), la falta de funcionalidad del gen *SICBL10* en el mutante podría afectar a la entrada de  $\text{K}^+$  en las células oclusivas, afectando a la apertura y cierre de los estomas.

## **6. Posible relación entre el gen *SICBL10* y *SICAX1* para el control de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$**

Entre los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  identificados en plantas, solo los transportadores localizados en el tonoplasto son capaces de catalizar la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su

gradiente electroquímico en vacuola, y podrían desempeñar la función de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones fisiológicas (Pottosin y Schönknecht, 2007; McAinsh y Pittman, 2009). Entre estos transportadores, la primera isoforma de antiporter  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  identificada fue *AtCAX1*, localizada en la membrana vacuolar de *Arabidopsis* (Hirschi *et al.*, 1996). *CAX3* es el homólogo más cercano a *CAX1* y ha sido propuesto para desempeñar un papel similar en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhao *et al.*, 2008). Con el fin de conocer si la alteración en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  detectada en el mutante en condiciones de salinidad podría deberse a una posible relación del gen *SICBL10* con los genes CAX, el grupo de la UAL realizó un análisis filogenético mediante el cual se obtuvo la secuencia de un gen de tomate cercano a *AtCAX1* y a *AtCAX3* de *Arabidopsis*, que nombramos como *SICAX1* (**Figura 47a**). La salinidad indujo la inhibición de la expresión de *SICAX1*, y esta inhibición fue significativamente mayor en las plantas mutantes (99% y 93% de inhibición de la expresión en tallo y hoja superior, respectivamente) que en las plantas sin transformar (20% y 60% de inhibición de la expresión en tallo y hoja superior, respectivamente) (**Figura 47b**). Además, el análisis de los patrones de expresión temporal mostraron que el estrés salino indujo la inhibición de la expresión de *SICAX1* antes en el mutante (después de 12 horas de tratamiento salino) que en las plantas WT (después de 30 horas de tratamiento salino), y se mantenía en niveles muy bajos e inferiores a WT durante todo el tratamiento (98 % de inhibición después de 6 días de tratamiento salino; **Figura 47c**).

La inhibición de la expresión de *SICAX1* inducida por la salinidad podría ser debida a la necesidad de la planta de movilizar sus reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  vacuolar con el fin de compensar la menor absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  por la raíz en condiciones de salinidad, así como para contribuir al aumento temporal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma con el objeto de señalar la situación de estrés (Conn y Gilliam, 2010). La inhibición de la expresión de *SICAX1* observada en condiciones de salinidad en WT estaría, por tanto, indicando el uso de las reservas vacuolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se correlacionaría perfectamente con la pérdida de  $\text{Ca}^{2+}$  observada en este tejido durante el tratamiento salino (**Figura 46**). Sin embargo, en el mutante *cbl10* la mayor inhibición de la expresión *SICAX1* no dio lugar a una mayor disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en hojas superiores desarrolladas ni en tallo, sino que más bien el  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser retenido en estos tejidos durante el tratamiento. Estudios previos han demostrado que la actividad de CAX está regulada por una región reguladora N-terminal (NRR) (Pittman y Hirschi, 2001; Pittman *et al.*, 2002). Esta región se ha visto

que esta inhibida o autoinhibida, y para que CAX este activo y se produzca el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la vacuola sería necesario eliminar esa inhibición. Así, se ha comprobado que el truncamiento de la región NRR de la proteína causa la activación constitutiva de CAX tanto en levadura como en plantas (Manohar *et al.*, 2011). Otros estudios han demostrado que la expresión de una forma N-terminal truncada de *AtCAXI* (constitutivamente activa) en tabaco (Hirschi, 1999) y en tomate (Park *et al.*, 2005) causó un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en hojas superiores de las plantas, siendo esta acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en vacuola irreversible, lo que disminuyó la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el apoplasto (Park *et al.*, 2005) y causó fenotipos de sensibilidad al estrés salino asociados con deficiencias de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hirschi, 1999; Hirschi, 2001; Manohar *et al.*, 2011). Estos fenotipos tienen ciertas similitudes al detectado en nuestro caso para el mutante de tomate *cbll10*. Así, en los ensayos a largo plazo se detectó la mayor retención de  $\text{Ca}^{2+}$  en las hojas superiores del mutante (**Figura 52a**), lo que podría ser la causa de que *cbll10* mostrara un fenotipo de deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que las plantas en condiciones no estresantes tenían menor altura, clorosis marginal en las hojas apicales, menor masa vegetativa, así como un menor número de frutos, siendo estos más pequeños y con mayor incidencia de Blosson end rot (BER) que en las plantas WT (**Figura 49 y 50a**), situación que se agravó con el tratamiento salino llegando a provocar el colapso apical de las plantas. La salinidad generalmente produce una deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en los frutos, debido a que se reduce la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y su distribución hacía la parte distal del fruto (Guichard *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta el conjunto global de resultados junto con las evidencias recopiladas de estudios previos, el gen *SICBLL10* parece estar implicado en la vía CAX, probablemente en la regulación negativa de éstos antiportadores vacuolares  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ , por lo que la falta de función daría lugar a una activación constitutiva de *SICAXI* en el mutante y, por lo tanto, a una retención irreversible de  $\text{Ca}^{2+}$  en vacuola. Aunque sin duda alguna esta hipótesis necesita ser confirmada con estudios posteriores más profundos, de serlo daría explicación a muchos de los rasgos fenotípicos observados en el mutante, como son los síntomas de deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mutante, más acusados en salinidad, a pesar de que su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  es superior al de las plantas WT.

Esta hipótesis también podría dar explicación al rasgo fenotípico más característico observado en el mutante *cbll10* como es la hipersensibilidad a sal. De hecho, en la bibliografía existen indicios suficientes que indican que una alteración en la homeostasis

de  $\text{Ca}^{2+}$  causa mayor sensibilidad a la sal. Así, plantas transgénicas del mutante *cax1* de *Arabidopsis* sobreexpresando *CAX1* mostraron una mayor sensibilidad a la salinidad, que se relacionó con un incremento descontrolado de la compartimentación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la vacuola debido a la desregulación de *CAX1*, impidiendo desencadenar respuestas de adaptación como la ruta SOS de halotolerancia (Cheng *et al.*, 2003). Por otro lado, también se podría justificar la menor acumulación de  $\text{Na}^+$  en el mutante, ya que se ha demostrado que los genes *CAX* juegan un papel crucial en la generación del gradiente de protones entre vacuola, citoplasma y apoplasto, a través de la regulación de las bombas de  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática (V-type ATPase) y tonoplasto (V-type ATPase) (Cheng *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2008). El deterioro en el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  a través de la membrana plasmática y del tonoplasto causa sensibilidad a la sal (Young *et al.*, 1998; Vitart *et al.*, 2001; Zhang y Blumwald, 2001; Zhu, 2002), por lo que la generación de un gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) adecuado es fundamental para compartimentalizar el  $\text{Na}^+$  en las vacuolas (Blumwald *et al.*, 2000). En este sentido, líneas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente *CAX1* o *CAX3* mostraron fenotipos de sensibilidad a la salinidad y una compartimentación alterada de diferentes nutrientes, incluyendo la compartimentación de  $\text{Na}^+$ . Por tanto, la alteración de la expresión de *SICAX1* así como la mayor retención de  $\text{Ca}^{2+}$  observada en el mutante podría estar alterando el gradiente de protones necesario para el funcionamiento de los antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y dificultando la entrada de  $\text{Na}^+$  en la vacuola (Kronzucker y Britto, 2011; Hasegawa, 2013; Maathuis, 2014). Otro rasgo fenotípico que tendría cabida en esta hipótesis es la alteración de la conductancia estomática observada en el mutante *cbl10* en condiciones de salinidad, ya que los genes de la familia *CAX* se ha demostrado que juegan un papel muy importante en el movimiento estomático. De hecho, se ha detectado que estos genes se expresan de forma muy elevada en las células guardas de *Arabidopsis* (Cho *et al.*, 2012).

En apoyo a la hipótesis del posible papel de *SICBL10* en la regulación negativa de *SICAX1*, mediante un ensayo de dobles híbridos en levadura se demostró que *SOS2* interactúa con el dominio regulador N-terminal de *CAX1*, y además lo hace de forma independiente a *SOS3* (Cheng *et al.*, 2004). Esto sugiere que podría ser otra proteína de la familia CBL la que formara módulo funcional con *SOS2* para esta interacción, que además podría estar regulando negativamente la actividad de *CAX1*. Otra posibilidad es que *SICBL10* interactúe directamente con el N-terminal de *SICAX1* de una manera

independiente a CIPK, de esta manera en *Arabidopsis* se ha demostrado que CBL10 era capaz de interactuar directamente e inhibir la actividad del transportador AKT1 de K<sup>+</sup> en raíz (Ren *et al.*, 2013). En resumen, el gen *SICBL10* parece tener un papel crítico en los mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas de tomate, en la regulación de la homeostasis de Na<sup>+</sup>, no sólo a nivel de la parte aérea como se describió anteriormente, sino también a nivel de raíz. Además, nuestros resultados parecen indicar que el efecto de la interrupción de *SICBL10* sobre la homeostasis de Na<sup>+</sup> en tomate podría ser indirecta. Esta podría ser la causa de que hasta la fecha no se haya llegado a identificar la proteína diana de CBL10 en la membrana vacuolar, puesto que todos los esfuerzos se han dirigido hacia la búsqueda de un transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, a pesar de que a algunas proteínas de la familia CAX también se les ha relacionado con un actividad transportadora Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Zhao *et al.*, 2009). Con nuestros resultados, una nueva vía de estudio se abre en referencia a la función de *SICBL10* en los mecanismos de respuesta a la salinidad en tomate. Esta nueva vía a investigar implica una interacción entre CBL10 y CAX para la regulación del secuestro/compartimentación de Ca<sup>2+</sup> en la vacuola, participando por tanto en los mecanismos de señalización por Ca<sup>2+</sup> del estrés, así como en los mecanismos de adaptación mediante la generación del gradiente de H<sup>+</sup> necesario para la compartimentalización vacuolar del Na<sup>+</sup> (**Figura 59**). Sin embargo, a fin de demostrar definitivamente esta nueva hipótesis serían necesarios análisis adicionales acerca de la interacción y la posible regulación negativa de SICAX1 por la interacción con SICBL10, de una manera dependiente o independiente con SOS2.



### **7. Las plantas injertadas muestran alteraciones morfológicas y sensibilidad a la sal cuando el mutante *cbll10* actúa como esqueje pero no como portainjerto**

Debido a los diferentes procesos fisiológicos afectados por la anulación del gen *SICBL10* tanto en parte aérea como en raíz, se ha considerado interesante dilucidar que función, la que ejerce en raíz o en parte aérea, es la responsable del fenotipo de sensibilidad a la sal del mutante. Para ello, se realizaron injertos recíprocos entre WT y mutante (*cbll10*/WT y WT/*cbll10*), e incluso se realizaron injertos recíprocos con el mutante hiperacumulador de Na<sup>+</sup> *she-1* (*cbll10/she-1* y *she-1/cbll10*), con el fin de comprobar la respuesta del mutante *cbll10* actuando como esqueje sobre el portainjertos del mutante *she-1*, que transporta una elevada cantidad de Na<sup>+</sup> desde la raíz a la parte aérea.

Sorprendentemente, en ausencia de estrés salino el injerto *per se* provocó una alteración morfológica en la parte aérea de las plantas cuando se utilizaba el mutante *cbll10* como esqueje (*cbll10*/WT, *cbll10/she-1*) y en las plantas autoinjertadas del mutante (*cbll10/cbll10*), siendo los folíolos de las hojas generalmente más redondeados y de menor tamaño que WT, así como flores con longistilia y de menor tamaño (**Figura 53a y b**). Además, los pesos de las plantas también mostraban una tendencia a ser menores cuando el mutante *cbll10* actuaba como esqueje. Estas alteraciones pueden ser debidas al proceso de corte y unión de los nuevos tejidos, que incluye la reparación y el refuerzo de la pared celular, la activación de vías de señalización de la herida que inducen la producción de proteínas relacionadas con la defensa, así como polisacáridos, incluyendo pectinas que se depositan en la unión del injerto y proporcionan resistencia a la zona de corte (Bostock y Stermer, 1989; León *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, la división celular produce una masa de células pluripotentes denominadas callo cuya diferenciación da lugar a los dos tipos principales de tejido vascular, floema y xilema (Melnik y Meyerowitz, 2015) y la participación de fitohormonas, tales como auxina, citoquininas y giberelinas, que se ha sugerido que intervienen en la formación del xilema y del floema (Roberts, 1988; Mattsson *et al.*, 1999; Sachs, 2000; Ye, 2002; Asahina y Satoh, 2015). La cuestión que nos podemos plantear es porqué las alteraciones morfológicas solo se producen cuando se utiliza el mutante en la parte aérea y no en la raíz.

El Ca<sup>2+</sup> es un nutriente esencial para las plantas. Hoy en día nadie pone en duda la afirmación de que el Ca<sup>2+</sup> es un regulador crucial del crecimiento y desarrollo de las plantas. Aunque los procesos en los que participa este ion son numerosos, aumentan a

medida que avanza la investigación e involucran a casi todos los aspectos del desarrollo de la planta (Harper *et al.*, 2004; Hetherington y Brownlee, 2004; Hirschi, 2004; Reddy y Reddy, 2004; Bothwell y Ng, 2005; Roelfsema y Hedrich, 2010). Las alteraciones morfológicas de las plantas injertadas donde el mutante *cbll10* actúa como esqueje pueden ser debidas a la dificultad del mutante *cbll10* para hacer uso de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  de las vacuolas, y que afectarían a la unión del injerto y a la formación del callo y los tejidos vasculares. Una de las alteraciones fisiológicas que más nos había llamado la atención respecto al mutante *cbll10* es el inusual mayor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en hoja durante el tratamiento salino (**Figura 46 y 52a**), respuesta que se ha corroborado en las diferentes combinaciones de injertos que tenían el mutante como esqueje (**Figura 55a y 58a**). Por el contrario, en la raíz no se observan grandes diferencias en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que en este órgano el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra principalmente formando parte de la estructura de la pared celular y ligeramente en el interior de las células, por lo que no es intercambiable (Bush, 1995), y su acumulación es muy inferior al del resto de la planta (**Figura 46**). Este resultado nos demuestra que el gen *SICBL10* está implicado en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en parte aérea, lo que explica que solo las combinaciones con el mutante como esqueje muestren alteraciones morfológicas. Así es sabido que en las plantas injertadas la formación del puente calloso entre la parte aérea y la parte radicular y la diferenciación del nuevo tejido vascular, junto con la producción de xilema y floema secundarios, son cruciales para una adecuada interacción parte aérea-parte radicular, permitiendo el paso de agua y nutrientes entre ambas partes (Hatman *et al.*, 2002). Algunos autores tras la observación de la estructura de unión en el injerto en plantas de tomate han concluido que la formación del xilema y del floema ocurre 8 días después de la realización del injerto, observando que la conductancia hídrica y por tanto el injerto eran completamente funcional a los ocho días (Rodríguez, 2013). En este tiempo de regeneración de tejido vascular, la parte aérea deberá sobrevivir de sus propias reservas intercambiables de nutrientes, generalmente acumulados en vacuolas de hojas y tallo jóvenes totalmente desarrolladas. Como se ha indicado anteriormente, tenemos indicios de que el mutante *cbll10* tiene alterada su capacidad para hacer uso de estas reservas de nutrientes, así se ha podido comprobar con el  $\text{Ca}^{2+}$  que además es un elemento fundamental para el desarrollo de nuevo tejido. Este hecho podría ser entre otras, una de las posibles causas de las alteraciones morfológicas detectadas en los injertos en los que el mutante se utilizó como esqueje (*cbll10/cbll10* y *cbll10/WT*).

En relación con la respuesta a la salinidad, solo las plantas injertadas con el mutante *cbll10* como esqueje mostraban sensibilidad a sal, pero no cuando el mutante era utilizado como portainjerto (**Figura 54a y 56**), lo que sugiere que la función del gen en la parte aérea y no en la raíz es la responsable de la sensibilidad del mutante al estrés salino. Este resultado junto con la alteración de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  solo en la parte aérea lleva a proponer como papel del gen *SICBL10* su participación en la regulación de la homeostasis de  $Ca^{2+}$ , siendo esta función crucial para la tolerancia del tomate al estrés salino.

Sin embargo, las plantas injertadas entre el mutante *cbll10* como portainjerto y WT como esqueje, no solo no mostraron mayor sensibilidad a la salinidad sino que presentaron incluso menor clorosis en hojas que el autoinjerto de WT (**Ampliación figura 54a**), es decir la raíz del mutante hipersensible a sal *cbll10* parece ser capaz de inducir tolerancia al genotipo parte aérea. Este efecto positivo de la tolerancia se volvió a repetir y por tanto corroborar en las plantas injertadas con el mutante hipersensible *she-1* como esqueje y *cbll10* como portainjerto. Es interesante señalar que cuando el mutante *cbll10* actúa como portainjerto, el contenido de  $Na^+$  tanto en la raíz como en la parte aérea es muy inferior al de las plantas WT y, sorprendentemente, la combinación *she-1/cbll10* muestra una concentración de  $Na^+$  en raíz y parte aérea similar al autoinjerto del mutante *cbll10*. Estos resultados evidencian que el mutante *cbll10* absorbe menos  $Na^+$  por la raíz y de esta manera transporta menos  $Na^+$  a la parte aérea, lo que explicaría la menor sensibilidad a la salinidad del genotipo parte aérea cuando el mutante *cbll10* actúa como portainjerto, como se ha observado en *she-1/cbll10*. A ello se une la menor reducción del contenido de  $K^+$  durante el tratamiento salino en las combinaciones donde *cbll10* actúa como portainjerto. En resumen, el uso del mutante *cbll10* como portainjerto podría ser de gran interés ya que recupera la homeostasis iónica en condiciones de salinidad. Aunque más estudios son necesarios, existe la posibilidad de poder usar el mutante *cbll10* como portainjerto de tomate capaz de inducir tolerancia al estrés salino en el genotipo parte aérea.



# **CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

### CAPITULO I. Identificación y caracterización de mutantes

1. La identificación y caracterización de un mutante de desarrollo y de dos mutantes que muestran alta sensibilidad al estrés salino en la especie silvestre *S. pennellii*, con un alto grado de tolerancia a salinidad en relación con el tomate cultivado, puede permitir la identificación de genes clave en la tolerancia.
2. El mutante *sl-1* (*succulent leaves-1*) presenta hojas de color verde intenso y mayor grosor y pierde menos agua por transpiración en ausencia de estrés, como se refleja en los menores valores de conductancia estomática y transpiración. Estos cambios fenotípicos conducen a una mayor tolerancia y a modificar su respuesta fisiológica frente al estrés salino, ya que el mutante *sl-1* presenta mayor concentración de  $K^+$  en hoja y reduce la relación  $Na^+/K^+$ , mecanismo opuesto al observado generalmente en la especie silvestre *S. pennellii*.
3. La respuesta a la salinidad del mutante hipersensible a sal *shp-1* (*salt hypersensitive pennellii-1*) es opuesta a la observada en *sl-1*, ya que experimenta una mayor pérdida de agua de las hojas por transpiración y una elevada acumulación de  $Na^+$  en las hojas durante el periodo de exposición a la sal. Estos resultados sugieren la importancia que tiene el control de la pérdida de agua en la tolerancia a la salinidad de la especie silvestre.
4. Los cambios fisiológicos inducidos por la salinidad en el mutante de tomate *she-1* (*salt hypersensitive esculentum-1*) son bastante similares a los observados en el mutante *shp-1* de *S. pennellii*, en relación con el alto transporte a la parte aérea de agua y  $Na^+$  en condiciones de salinidad. Sin embargo, el análisis de expresión de genes implicados en el transporte de  $Na^+$  sugiere que la alta acumulación de  $Na^+$  en la parte aérea del mutante hipersensible a la sal *she-1* está relacionada con la alteración en el patrón de expresión de los genes *SIHKT1s*.
5. Mediante injertos recíprocos entre WT y mutante se ha demostrado que el gen alterado, responsable de la sensibilidad a la sal del mutante *she-1*, tiene su función principal en la raíz. Así, el grado de sensibilidad a sal y el transporte a la parte aérea y acumulación de  $Na^+$  en hojas es similar en las plantas del mutante y en las plantas injertadas con WT como esqueje y el mutante como portainjerto.

## **CAPITULO II. Caracterización de un mutante de tomate que tiene anulada la expresión del gen *SICBL10***

6. La disrupción del gen *SICBL10* en tomate confirió una elevada sensibilidad a la salinidad, manifestada en mayor grado en la parte aérea apical. Interesantemente, la expresión del gen *SICBL10* en WT se induce por la salinidad en toda la planta, incluyendo raíz, menos afectada por la salinidad, aunque en mayor grado en las hojas superiores completamente desarrolladas.

7. El gen *SICBL10* tiene una función clave en la regulación de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en tomate en condiciones de salinidad. Así el mutante *cb110* acumula menos  $\text{Na}^+$  en la planta, mientras que mantiene mayores niveles de  $\text{K}^+$  con la salinidad. Sin embargo, la distribución de  $\text{Na}^+$  entre parte aérea y raíz, y dentro de parte aérea entre hojas jóvenes (en desarrollo) y adultas (completamente desarrolladas) está alterada en el mutante en condiciones de salinidad.

8. La disrupción del gen *SICBL10* alteró el patrón de expresión de los genes implicados en la absorción y transporte de  $\text{Na}^+$  (*SISOS1* y *SIHKT1s*) indicando por un lado una menor asimilación de  $\text{Na}^+$  a nivel de raíz, y por otro lado una menor acumulación del mismo en parte aérea desarrollada del mutante, permitiendo este último hecho una mayor llegada de  $\text{Na}^+$  a los tejidos en crecimiento.

9. En este trabajo se ha indicado por primera vez que el gen *SICBL10* está implicado también en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de salinidad. Así, la menor pérdida de agua vía transpiración en el mutante *cb110* en condiciones salinas, debido a la reducción de la apertura estomática y mayor número de estomas cerrados, podría estar relacionado con la alteración en homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , ion implicado precisamente en la regulación de la apertura estomática. La menor pérdida de agua vía transpiración también se observó en el mutante en condiciones de deshidratación.

10. Las alteraciones morfológicas y colapso de los meristemos junto con las mayores concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  encontradas en el mutante *cb110* en condiciones de salinidad podría reflejar la dificultad de utilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  para mantener el desarrollo de las zonas en crecimiento de la planta. Además, la expresión del transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  *SICAX1* se ve alterada en el mutante tanto en condiciones de salinidad como en ausencia de la misma, pudiendo haber una interrelación entre *SICBL10* y *SICAX* para la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

11. El ensayo de injertos demostró que el gen *SICBL10* presenta una función diferente en raíz y en parte aérea, siendo la función que desempeña en la parte aérea clave para la tolerancia a la salinidad. Así solo los injertos que utilizaron el mutante *cb110* como esqueje muestran alteraciones morfológicas en la parte aérea y sensibilidad a la sal. Además, la sensibilidad a la sal estuvo siempre ligada a una alteración de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la parte aérea, pero no siempre a una alteración de  $\text{Na}^+$ , lo que demuestra que el papel del gen *SICBL10* en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  es una función crucial para la tolerancia del tomate al estrés salino, pudiendo ser la alteración de la homeostasis de  $\text{Na}^+$  una consecuencia indirecta de esta.

12. Por el contrario, cuando el mutante *cb110* actúa como portainjerto, desaparece la sensibilidad a sal del genotipo parte aérea, por lo que la función del gen *CBL10* en raíz debe no estar al menos directamente implicada en los mecanismos tolerancia a la salinidad. Interesantemente, las plantas que utilizaron como portainjerto en mutante *cb110* muestran incluso menos síntomas de clorosis que las injertadas sobre WT. Este efecto positivo del portainjerto *cb110* en la tolerancia podría estar asociado a la mayor salida de  $\text{Na}^+$  al exterior así como la mayor absorción de  $\text{K}^+$  detectado a nivel de raíz en el mutante. Según estos resultados, el mutante *cb110* podría ser utilizado como portainjerto para mejorar la homeostasis iónica del genotipo parte aérea en condiciones de salinidad.





# **BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aflitos, S., Schijlen, E., de Jong, H., de Ridder, D., Smit, S., Finkers, R., Wang, J., Zhang, G., Li, N., Mao, L., Bakker, F., Dirks, R., Breit, T., Gravendeel, B., Huits, H., Struss, D., Swanson-Wagner, R., van Leeuwen, H., van Ham, R.C., Fito, L., Guignier, L., Sevilla, M., Ellul, P., Ganko, E., Kapur, A., Reclus, E., de Geus, B., van de Geest, H., Te Lintel Hekkert, B., van Haarst, J., Smits, L., Koops, A., Sanchez-Perez, G., van Heusden, A.W., Visser, R., Quan, Z., Min, J., Liao, L., Wang, X., Wang, G., Yue, Z., Yang, X., Xu, N., Schranz, E., Smets, E., Vos, R., Rauwerda, J., Ursem, R., Schuit, C., Kerns, M., van den Berg, J., Vriezen, W., Janssen, A., Datema, E., Jahrman, T., Moquet, F., Bonnet, J., y Peters, S. (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80, 136-148.
- Aghdam, M.S., Hassanpouraghdam, M.B., Paliyath, G., y Farmani, B. (2012). The language of calcium in postharvest life of fruits, vegetables and flowers. *Scientia Horticulturae* 144, 102-115.
- Ahuja, I., de Vos, R.C., Bones, A.M., y Hall, R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci* 15, 664-674.
- Alarcon, J., Sánchez-Blanco, M., Bolarin, M., y Torrecillas, A. (1993). Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum* 89, 441-447.
- Albaladejo, I., Plasencia, F., Meco, V., Egea, M., Bolarin, M., y Flores, F. (2015a). Different Strategies Used by Domesticated Tomato and Wild-related Species to Confront Salt Stress. *Procedia Environmental Sciences* 29, 91-92.
- Albaladejo, I., Garrido, M.V., Plasencia, F., Meco, V., Egea, I., Flores, F.B., Bolarin, M.C. (2015b). Control of transpirational water loss as a determinant mechanism for salinity and drought tolerance in tomato.
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., y Kudla, J. (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $Ca^{2+}$ -regulated kinases. *The EMBO journal* 20, 1051-1063.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batistic, O., Kolukisaoglu, Ü., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., y Kudla, J. (2003). The calcium sensor *CBL1* integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal* 36, 457-470.
- Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., y Tiburcio, A.F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231, 1237-1249.
- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V., y Rubio, F. (2009). Differential regulation of the *HAK5* genes encoding the high-affinity  $K^+$  transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and experimental botany* 65, 263-269.
- Alfocea, F.P., Balibrea, M.E., Alarcón, J.J., y Bolarín, M.C. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *Journal of plant physiology* 156, 367-374.

- 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., y Yun, D.J.** (2012). *TsHKT1;2*, a *HKT1* homolog from the extremophile *Arabidopsis* relative *Thellungiella salsuginea*, shows  $K^+$  specificity in the presence of NaCl. *Plant Physiol* 158, 1463-1474.
- Almeida, P., Katschnig, D., y de Boer, A.H.** (2013). HKT Transporters—State of the Art. *International journal of molecular sciences* 14, 20359-20385.
- Almeida, P.M., de Boer, G.J., y de Boer, A.H.** (2014). Assessment of natural variation in the first pore domain of the tomato *HKT1;2* transporter and characterization of mutated versions of *SlHKT1;2* expressed in *Xenopus laevis* oocytes and via complementation of the salt sensitive *athkt1;1* mutant. *Frontiers in plant science* 5, 600.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., y Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411, 1053-1057.
- Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., y Valpuesta, V.** (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *Febs Letters* 457, 80-84.
- Apse, M.P., y Blumwald, E.** (2007).  $Na^+$  transport in plants. *FEBS letters* 581, 2247-2254.
- Araújo, W.L., Fernie, A.R., y Nunes-Nesi, A.** (2011). Control of stomatal aperture: a renaissance of the old guard. *Plant signaling & behavior* 6, 1305-1311.
- Asahina, M., y Satoh, S.** (2015). Molecular and physiological mechanisms regulating tissue reunion in incised plant tissues. *Journal of plant research* 128, 381-388.
- Asins, M.J., Raga, V., Roca, D., Belver, A., y Carbonell, E.A.** (2015). Genetic dissection of tomato rootstock effects on scion traits under moderate salinity. *Theoretical and Applied Genetics* 128, 667-679.
- Asins, M.J., Villalta, I., Aly, M.M., Olias, R., Alvarez De Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., y Raga, V.** (2013). Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in  $Na^+/K^+$  homeostasis. *Plant, cell & environment* 36, 1171-1191.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., y Salekdeh, G.H.** (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics* 6, 2542-2554.
- Atares, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., Garcia-Abellan, J.O., Anton, T., Garcia-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., Flores, F.B., Moreno, V., Bolarin Mdel, C., y 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.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J.O., Antón, T., García-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., y Flores, F.B.** (2011). An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification

- and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant cell reports* 30, 1865-1879.
- Atkinson, C., Mansfield, T., Kean, A., y Davies, W.** (1989). Control of stomatal aperture by calcium in isolated epidermal tissue and whole leaves of *Commelina communis* L. *New phytologist*, 9-17.
- Atkinson, N.J., y Urwin, P.E.** (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany* 63, 3523-3543.
- Azaizeh, H., y Steudle, E.** (1991). Effects of Salinity on Water Transport of Excised Maize (*Zea mays* L.) Roots. *Plant Physiol* 97, 1136-1145.
- Azpiroz-Leehan, R., y Feldmann, K.A.** (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* 13, 152-156.
- Bai, Y., y Lindhout, P.** (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100, 1085-1094.
- Ballesteros, Y., Zúñiga, M.d.C., Rojas, A., Holzenthal, R., y Flint, O.J.** (1997). Distribution and structure of the order Trichoptera in various drainages of the Cauca River basin, Colombia, and their relationship to water quality. In *Proceedings of the 8th International Symposium on Trichoptera* (Ohio Biological Survey Columbus^ eOhio Ohio), pp. 19-23.
- Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., Cubero, B., y 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.
- Bartels, D., y Sunkar, R.** (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences* 24, 23-58.
- Bartels, D., y Dinakar, C.** (2013). Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: a comparison between *Thellungiella* and *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology* 40, 819-831.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.C., Ohto, M.A., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., y Blumwald, E.** (2011). The *Arabidopsis*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and  $\text{K}^+$  homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *The Plant cell* 23, 3482-3497.
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S., y Zhu, J.-K.** (2007). *SOS2* promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase and upregulating its transport activity. *Molecular and Cellular Biology* 27, 7781-7790.
- Batistič, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., y Kudla, J.** (2010). CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *The Plant Journal* 61, 211-222.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcíarrubio, A., Campos, F., y Covarrubias, A.A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* 148, 6-24.
- Bauchet, G., y Causse, M.** (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. (Intech Open Access Publisher).

- Bayer, E., Thomas, C., y Maule, A.** (2004). Plasmodesmata in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma* 223, 93-102.
- Bedinger, P.A., Chetelat, R.T., McClure, B., Moyle, L.C., Rose, J.K., 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., y Royer, S.** (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sex Plant Reprod* 24, 171-187.
- Belver, A., Olías, R., Huertas, R., y Rodríguez-Rosales, M.P.** (2012). Involvement of *SISOS2* in tomato salt tolerance. *Bioengineered* 3, 298-302.
- Bergougnoux, V.** (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnol Adv* 32, 170-189.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., y Cellier, F.** (2003). Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal* 22, 2004-2014.
- Bertl, A., Reid, J.D., Sentenac, H., y Slayman, C.L.** (1997). Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *J Exp Bot* 48 Spec No, 405-413.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., y Delseny, M.** (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 67, 107-124.
- Blackford, S., Rea, P.A., y Sanders, D.** (1990). Voltage sensitivity of H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *Journal of Biological Chemistry* 265, 9617-9620.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M.J., y Nuez, F.** (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PloS one* 7, e48198.
- Blum, A.** (2011). Drought resistance—is it really a complex trait? *Functional Plant Biology* 38, 753-757.
- Blumwald, E., y Poole, R.J.** (1986). Kinetics of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant physiology* 80, 727-731.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., y Apse, M.P.** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465, 140-151.
- Bohnert, H.J., y Sheveleva, E.** (1998). Plant stress adaptations--making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1, 267-274.
- Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P., y Ma, S.** (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms—getting genomics going. *Current opinion in plant biology* 9, 180-188.
- Bolarin, M., Fernandez, F., Cruz, V., y Cuartero, J.** (1991). Salinity tolerance in four wild tomato species using vegetative yield-salinity response curves. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116, 286-290.
- Bolarín, M.C., Alarcón, J.J., Pérez-Alfocea, F., Sánchez-Blanco, M.J. & Torrecillas, A.** (1993). Inorganic and organic solute accumulation in plants of wild and

- cultivated tomato species at two different stages of growth in response to saline stress. In PF Martínez, ed. Environmental constraints in protected cultivation: possibilities for new 164 growing techniques and crops. Office for Official Publications of the European Communities, Brussels. pp 75-87.
- Bolarín, M., y Caro, M.** (1995). Aguas de riego. La calidad de las aguas continentales españolas: Estado actual e investigación. Alvarez-Cobelas, M. and Cabrera, F. Eds. Geofoma Ediciones. Logroño, 307.
- Bolarin, M.C., Estan, M.T., Caro, M., Romero-Aranda, R., y Cuartero, J.** (2001). Relationship between tomato fruit growth and fruit osmotic potential under salinity. *Plant Sci* 160, 1153-1159.
- Bolarín, M.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E., y Perez-Alfocea, F.** (1995). Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *Journal of plant physiology* 147, 463-468.
- 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., Rynagajlo, M., Kimura, S., Kumar, R., Koenig, D., Headland, L.R., Maloof, J.N., Sinha, N., van Ham, R.C., Lankhorst, R.K., Mao, L., Vogel, A., Arsova, B., Panstruga, R., Fei, Z., Rose, J.K., Zamir, D., Carrari, F., Giovannoni, J.J., Weigel, D., Usadel, B., y Fernie, A.R.** (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nat Genet* 46, 1034-1038.
- Bombarely, A., Menda, N., Tecle, I.Y., Buels, R.M., Strickler, S., Fischer-York, T., Pujar, A., Leto, J., Gosselin, J., y Mueller, L.A.** (2011). The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic acids research* 39, D1149-1155.
- Bonner, L.J., y Dickinson, H.** (1989). Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* Mill. I. Structural aspects. *New Phytologist* 113, 97-115.
- Borsani, O., Cuartero, J., Fernandez, J.A., Valpuesta, V., y Botella, M.A.** (2001). Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *The Plant cell* 13, 873-887.
- Bose, J., Pottosin, I.I., Shabala, S.S., Palmgren, M.G., y Shabala, S.** (2011). Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants. *Frontiers in plant science* 2.
- Bostock, R., y Stermer, B.** (1989). Perspectives on wound healing in resistance to pathogens. *Annual review of phytopathology* 27, 343-371.
- Bothwell, J.H., y Ng, C.K.** (2005). The evolution of Ca<sup>2+</sup> signalling in photosynthetic eukaryotes. *The New phytologist* 166, 21-38.
- Bournival, B.L., Vallejos, C.E., y Scott, J.W.** (1990). Genetic analysis of resistances to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the wild tomato *Lycopersicon pennellii*. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik* 79, 641-645.
- Boursiac, Y., Boudet, J., Postaire, O., Luu, D.T., Tournaire-Roux, C., y 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.

**Boursiac, Y., Lee, S.M., Romanowsky, S., Blank, R., Sladek, C., Chung, W.S., y Harper, J.F.** (2010). Disruption of the vacuolar calcium-ATPases in *Arabidopsis* results in the activation of a salicylic acid-dependent programmed cell death pathway. *Plant physiology* 154, 1158-1171.

**Bush, D.S.** (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual review of plant biology* 46, 95-122.

**Bustin, S.A., y Nolan, T.** (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 15, 155-166.

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

**Campbell, S.A., y Close, T.J.** (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist* 137, 61-74.

**Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A.J., Allen, D.W., Xiang, H., y Jack, T.** (1999). Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *The Plant Journal* 17, 699-707.

**Campos Serrano, J.F.** (2015). 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

**Cano, E.A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V., y Bolarin, M.C.** (1996). Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Rep* 15, 791-794.

**Caro, M., Cruz, V., Cuartero, J., Estan, M., y Bolarin, M.** (1991). Salinity tolerance of normal-fruited and cherry tomato cultivars. *Plant and Soil* 136, 249-255.

**Carvalho, R.F., Campos, M.L., Pino, L.E., Crestana, S.L., Zsögön, A., Lima, J.E., Benedito, V.A., y 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.

**Casals Missio, J.** (2012). Filogènia i variabilitat genètica de les varietats tradicionals de tomàquet (*Solanum lycopersicum* L.) Montserrat/Pera de Girona i Penjar: estratègies per a la millora de la seva qualitat organolèptica.

**Casson, S., y Gray, J.E.** (2008). Influence of environmental factors on stomatal development. *The New phytologist* 178, 9-23.

**Claeys, H., y Inzé, D.** (2013). The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162, 1768-1779.

**Colmer, T., Munns, R., y Flowers, T.** (2006). Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Animal Production Science* 45, 1425-1443.

**Conn, S., y Gilliam, M.** (2010). Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany* 105, 1081-1102.

**Conn, S.J., Gilliam, M., Athman, A., Schreiber, A.W., Baumann, U., Moller, I., Cheng, N.-H., Stancombe, M.A., Hirschi, K.D., y Webb, A.A.** (2011). Cell-

- specific vacuolar calcium storage mediated by *CAX1* regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23, 240-257.
- Contreras-Angulo, L.A., Heredia, J.B., Sánchez-Álvarez, C.E., Angulo-Escalante, M.Á., y Villarreal-Romero, M.** (2011). Efecto del genotipo y sales de calcio en la calidad de tomates frescos cortados. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 17, 39-45.
- Cosgrove, D.J., y Hedrich, R.** (1991). Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 186, 143-153.
- Covington, M.F., y Harmer, S.L.** (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5, e222.
- Craig Plett, D., y Møller, I.S.** (2010). Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, cell & environment* 33, 612-626.
- Cramer, G.R.** (2002). Sodium-calcium interactions under salinity stress. In *Salinity: Environment-plants-molecules* (Springer), pp. 205-227.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R, González-Fernández J** (1995). Estreses abióticos. In: F Nuez (ed) *El cultivo del tomate*, Mundi-Prensa, Madrid, España, pp 351-384.
- Cuartero, J., Bolarin, M.C., Asins, M.J., y Moreno, V.** (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *J Exp Bot* 57, 1045-1058.
- Cuartero, J., Bolarín, M.C., Moreno, V., Pineda, B.** (2008). Tolerancia a la salinidad. En: *La adaptación al ambiente y los estreses abióticos en mejora vegetal*. Eds. Ávila CM, Atienza SG, Moreno M.T. y Cubero J.I. Junta de Andalucía). pp 233-261.
- Cuartero, J., Bolarin, M.C., Moreno, V., y Pineda, B.** (2009). Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In *Molecular Techniques in Crop Improvement* (Springer), pp. 373-405.
- Cuartero, J. Bolarín, M.C., Moreno, V. & Pineda, B.** (2010). Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants. In: Jain SM, Brar DS (eds) *Molecular techniques in crop improvement*. pp 373-405.
- Cui, L.-G., Shan, J.-X., Shi, M., Gao, J.-P., y 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.
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., y Leigh, R.A.** (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 657-661.
- Cuin, T.A., Bose, J., Stefano, G., Jha, D., Tester, M., Mancuso, S., y Shabala, S.** (2011). Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in salinity tolerance in wheat: in planta quantification methods. *Plant Cell Environ* 34, 947-961.
- Cushman, J.C., y Bohnert, H.J.** (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3, 117-124.

- Cvetkovska, M., Rampitsch, C., Bykova, N., y Xing, T.** (2005). Genomic analysis of MAP kinase cascades in *Arabidopsis* defense responses. *Plant Molecular Biology Reporter* 23, 331-343.
- Chamarro, J.** (1995). Anatomía y fisiología de la planta. El cultivo del tomate. Madrid: Mundi-Prensa, 43-91.
- Chanson, A.** (1991). A  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiport system driven by the tonoplast pyrophosphate-dependent proton pump from maize roots. *Journal of plant physiology* 137, 471-476.
- Chater, C.C., Oliver, J., Casson, S., y Gray, J.E.** (2014). Putting the brakes on: abscisic acid as a central environmental regulator of stomatal development. *New Phytologist* 202, 376-391.
- Chaves, M.M., Flexas, J., y Pinheiro, C.** (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551-560.
- Cheeseman, J.M.** (1988). Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant physiology* 87, 547-550.
- Chen, T.H., y Murata, N.** (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* 34, 1-20.
- Chen, X.-Y., y Kim, J.-Y.** (2006). Transport of macromolecules through plasmodesmata and the phloem. *Physiologia Plantarum* 126, 560-571.
- Chen, Y.-L., Lee, C.-Y., Cheng, K.-T., Chang, W.-H., Huang, R.-N., Nam, H.G., y Chen, Y.-R.** (2014). Quantitative peptidomics study reveals that a wound-induced peptide from PR-1 regulates immune signaling in tomato. *The Plant cell* 26, 4135-4148.
- Chen, Z., Newman, I., Zhou, M., Mendham, N., Zhang, G., y Shabala, S.** (2005). Screening plants for salt tolerance by measuring  $\text{K}^{+}$  flux: a case study for barley. *Plant, Cell & Environment* 28, 1230-1246.
- Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., y Newman, I.A.** (2007). Root plasma membrane transporters controlling  $\text{K}^{+}/\text{Na}^{+}$  homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* 145, 1714-1725.
- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Zhu, J.-K., y Hirschi, K.D.** (2004). The protein kinase *SOS2* activates the *Arabidopsis*  $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  antiporter *CAX1* to integrate calcium transport and salt tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 279, 2922-2926.
- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Barkla, B.J., Shigaki, T., y Hirschi, K.D.** (2003). The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell Online* 15, 347-364.
- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., LeClere, S., Lahner, B., Salt, D.E., y Hirschi, K.D.** (2005). Functional association of *Arabidopsis CAX1* and *CAX3* is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiology* 138, 2048-2060.
- Cheong, Y.H., Sung, S.J., Kim, B.-G., Pandey, G.K., Cho, J.-S., Kim, K.-N., y Luan, S.** (2010). Constitutive overexpression of the calcium sensor *CBL5* confers

- osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecules and cells* 29, 159-165.
- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li, L., Kim, B.G., Lee, S.C., Kudla, J., y Luan, S.** (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 52, 223-239.
- Chitwood, D.H., Headland, L.R., Filiault, D.L., Kumar, R., Jiménez-Gómez, J.M., Schrager, A.V., Park, D.S., Peng, J., Sinha, N.R., y Maloof, J.N.** (2012). Native environment modulates leaf size and response to simulated foliar shade across wild tomato species. *PLoS one* 7, e29570.
- Chitwood, D.H., Kumar, R., Headland, L.R., Ranjan, A., Covington, M.F., Ichihashi, Y., Fulop, D., Jiménez-Gómez, J.M., Peng, J., y Maloof, J.N.** (2013). A quantitative genetic basis for leaf morphology in a set of precisely defined tomato introgression lines. *The Plant Cell Online* 25, 2465-2481.
- Cho, D., Villiers, F., Kroniewicz, L., Lee, S., Seo, Y.J., Hirschi, K.D., Leonhardt, N., y Kwak, J.M.** (2012). Vacuolar *CAX1* and *CAX3* influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. *Plant physiology* 160, 1293-1302.
- Cholewa, E., y Peterson, C.A.** (2004). Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant Physiol* 134, 1793-1802.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schültke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., y Harter, K.** (2006). Alternative complex formation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 48, 857-872.
- Dajic, Z.** (2006). Salt stress. In *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants* (Springer), pp. 41-99.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., y Bansal, K.C.** (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotechnol* 139, 137-145.
- Davenport, R.J., MUÑOZ-MAYOR, A., Jha, D., Essah, P.A., Rus, A., y Tester, M.** (2007). The  $\text{Na}^+$  transporter *AtHKT1;1* controls retrieval of  $\text{Na}^+$  from the xylem in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 30, 497-507.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J., Thomine, S., Gambale, F., y Barbier-Brygoo, H.** (2006). The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442, 939-942.
- De Freitas, S.T., Padda, M., Wu, Q., Park, S., y Mitcham, E.J.** (2011). Dynamic alternations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing *sCAX1*, a constitutively active  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter from *Arabidopsis*. *Plant physiology* 156, 844-855.
- de la Torre, F., Gutiérrez-Beltrán, E., Pareja-Jaime, Y., Chakravarthy, S., Martín, G.B., y del Pozo, O.** (2013). The tomato calcium sensor *Cb110* and its interacting protein kinase *Cipk6* define a signaling pathway in plant immunity. *The Plant Cell Online* 25, 2748-2764.
- Dehan, K., y Tal, M.** (1978). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of *Solanum pennellii* to high salinity. *Irrig Sci* 1, 71-76.

- Deinlein, U., Stephan, A.B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., y Schroeder, J.I.** (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci* 19, 371-379.
- Demidchik, V., y Tester, M.** (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant physiology* 128, 379-387.
- Demidchik, V., y Maathuis, F.J.** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 175, 387-404.
- Demidchik, V., Davenport, R.J., y Tester, M.** (2002). Nonselective cation channels in plants. *Annual review of plant biology* 53, 67-107.
- Deng, W., Mayford, M., y Gage, F.H.** (2013). Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *Elife* 2, e00312.
- Dennison, K.L., Robertson, W.R., Lewis, B.D., Hirsch, R.E., Sussman, M.R., y Spalding, E.P.** (2001). Functions of *AKT1* and *AKT2* potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127, 1012-1019.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., y Neill, S.** (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 16314-16318.
- Dietz, K.-J., Schramm, M., Lang, B., Lanzl-Schramm, A., Dürr, C., y Martinoia, E.** (1992). Characterization of the epidermis from barley primary leaves. *Planta* 187, 431-437.
- Ding, L., y Zhu, J.-K.** (1997). Reduced Na<sup>+</sup> uptake in the NaCl hypersensitive *sos1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 113, 795-799.
- dit Frey, N.F., Mbengue, M., Kwaaitaal, M., Nitsch, L., Altenbach, D., Häweker, H., Lozano-Duran, R., Njo, M.F., Beeckman, T., y Huettel, B.** (2012). Plasma membrane calcium ATPases are important components of receptor-mediated signaling in plant immune responses and development. *Plant physiology* 159, 798-809.
- Driscoll, S., Prins, A., Olmos, E., Kunert, K., y 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.
- Duvick, D.** (2005). Genetic progress in yield of United States maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 50, 193.
- Dvorak, J., Noaman, M.M., Goyal, S., y Gorham, J.** (1994). Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turgidum* L. by the *Kna1* locus transferred from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 87, 872-877.
- Ehsanzadeh, P., Nekoonam, M.S., Azhar, J.N., Pourhadian, H., y Shaydaee, S.** (2009). Growth, chlorophyll, and cation concentration of tetraploid wheat on a solution high in sodium chloride salt: Hulled versus free-threshing genotypes. *Journal of plant nutrition* 32, 58-70.

- Esquinas-Alcázar, J., y Nuez, F.** (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. El cultivo del tomate. Madrid, Mundi-Prensa, 15-43.
- Esquinas-Alcázar, J.T., y Resources, I.B.f.P.G.** (1981). Genetic Resources of Tomatoes and Wild Relatives: A Global Report. (IBPGR Secretariat).
- Essah, P.A., Davenport, R., y Tester, M.** (2003). Sodium influx and accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 307-318.
- Estañ, M.T., Martínez-Rodríguez, M.M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T.J., y 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.
- Evans, A., Hall, D., Pritchard, J., y 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., y Xiong, L.** (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 673-689.
- FAO.** (2013) Statistics division of the food and agriculture organization of the united nations. Disponible en: <http://faostat3.fao.org>
- Fanourakis, D., Giday, H., Milla, R., Pieruschka, R., Kjaer, K.H., Bolger, M., Vasilevski, A., Nunes-Nesi, A., Fiorani, F., y Ottosen, C.-O.** (2014). Pore size regulates operating stomatal conductance, while stomatal densities drive the partitioning of conductance between leaf sides. *Annals of botany*, mcu247.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., y Basra, S.M.A.** (2009). Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. In *Sustainable Agriculture*, E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, y C. Alberola, eds (Springer Netherlands), pp. 153-188.
- Fernandez-Garcia, N., Carvajal, M., y Olmos, E.** (2004). Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Ann Bot* 93, 53-60.
- Fernández García, N.** (2003). Influencia de la técnica del injerto en plantas de tomate ("*Lycopersicon esculentum*", Mill.)/Nieves Fernández García; dirección Micaela Carvajal Alcaraz, Vicente Martínez López.
- Fiebig, A., Mayfield, J.A., Miley, N.L., Chau, S., Fischer, R.L., y 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., y Bao Fundora, L.** (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales* 35, 70-88.
- Flowers, T., y Yeo, A.** (1988). Ion relations of salt tolerance. Solute transport in plant cells and tissues, 392-416.
- Flowers, T., Hajibagheri, M., y Clipson, N.** (1986). Halophytes. *Quarterly Review of Biology*, 313-337.
- Flowers, T.J., y Colmer, T.D.** (2008). Salinity tolerance in halophytes\*. *New Phytologist* 179, 945-963.

- Fobes, J.F., Mudd, J.B., y Marsden, M.P.** (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. *Int J Plant Genomics* 2007, 64358.
- Franceschi, V.R., y Nakata, P.A.** (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 41-71.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., y Valè, G.** (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82, 317-342.
- Frary, A., Gol, D., Keles, D., Okmen, B., Pinar, H., Sigva, H.O., Yemenicioglu, A., y Doganlar, S.** (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biol* 10, 58.
- Fricke, W., y Peters, W.S.** (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology* 129, 374-388.
- Fricke, W., Hinde, P.S., Leigh, R.A., y Tomos, A.D.** (1995). Vacuolar solutes in the upper epidermis of barley leaves. *Planta* 196, 40-49.
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexandersson, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G., y Volkov, V.** (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J Exp Bot* 57, 1079-1095.
- Fu, F.-F., Ye, R., Xu, S.-P., y Xue, H.-W.** (2009). Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population. *Cell research* 19, 380-391.
- Fu, H.H., y Luan, S.** (1998). AtKup1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis*. *The Plant cell* 10, 63-73.
- Fukada-Tanaka, S., Inagaki, Y., Yamaguchi, T., Saito, N., y Iida, S.** (2000). Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407, 581.
- Gálvez, F.J., Baghour, M., Hao, G., Cagnac, O., Rodríguez-Rosales, M.P., y Venema, K.** (2012). Expression of *LeNHX* isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry* 51, 109-115.
- García-Abellan, J.O., Fernández-García, N., López-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F.B., Angosto, T., Capel, J., Lozano, R., Pineda, B., Moreno, V., Olmos, E., y Bolarin, M.C.** (2015). The tomato res mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity. *Physiol Plant*.
- García-Abellan, J.O., Egea, I., Pineda, B., Sanchez-Bel, P., Belver, A., García-Sogo, B., Flores, F.B., Atares, A., Moreno, V., y 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* 152, 700-713.
- García, A., Rizzo, C., Ud-Din, J., Bartos, S., Senadhira, D., Flowers, T., y Yeo, A.** (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant, Cell & Environment* 20, 1167-1174.

- García Abellán, J.O.** (2011). Análisis de mutantes como herramienta genómica para la identificación de genes implicados en la tolerancia a la salinidad del tomate.
- Garciadeblás, B., Senn, M.E., Bañuelos, M.A., y Rodríguez-Navarro, A.** (2003). Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *The Plant Journal* 34, 788-801.
- Garthwaite, A.J., von Bothmer, R., y Colmer, T.D.** (2005). Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> into the shoots. *J Exp Bot* 56, 2365-2378.
- Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villalba, J., y Serrano, R.** (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *The EMBO journal* 11, 3157.
- Gaxiola, R.A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J., Alper, S.L., y Fink, G.R.** (2001). Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11444-11449.
- George, L., Romanowsky, S.M., Harper, J.F., y Sharrock, R.A.** (2008). The ACA10 Ca<sup>2+</sup>-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 146, 716-728.
- Gerke, V., Creutz, C.E., y Moss, S.E.** (2005). Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 449-461.
- Ghedira, R., De Buck, S., Van Ex, F., Angenon, G., y 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.
- Gilroy, S., Bethke, P.C., y Jones, R.L.** (1993). Calcium homeostasis in plants. *Journal of Cell Science* 106, 453-453.
- Gill, D., Waldron, R., Rys-Sikora, K., Ufret-Vincenty, C., Graber, M., Favre, C., y Alfonso, A.** (1996). Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Bioscience reports* 16, 139-157.
- Gill, S.S., y Tuteja, N.** (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav* 5, 26-33.
- Gilliam, M., Dayod, M., Hocking, B.J., Xu, B., Conn, S.J., Kaiser, B.N., Leigh, R.A., y Tyerman, S.D.** (2011). Calcium delivery and storage in plant leaves: exploring the link with water flow. *Journal of experimental botany* 62, 2233-2250.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M.T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., García-Sogo, B., Angosto, T., Moreno, V., y 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.
- Givnish, T.J., y Vermeij, G.J.** (1976). Sizes and shapes of liane leaves. *American Naturalist*, 743-778.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., y Maathuis, F.J.** (2007). The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 10726-10731.

- Goffreda, J.C., y Mutschler, M.A.** (1989). Inheritance of potato aphid resistance in hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 78, 210-216.
- Gomez-Porras, J.L., Riaño-Pachón, D.M., Benito, B., Haro, R., Sklodowski, K., Rodríguez-Navarro, A., y Dreyer, I.** (2012). Phylogenetic Analysis of K<sup>+</sup> Transporters in Bryophytes, Lycophytes, and Flowering Plants Indicates a Specialization of Vascular Plants. *Frontiers in plant science* 3, 167.
- Gorham, J., Bristol, A., Young, E., y Jones, R.W.** (1991). The presence of the enhanced K/Na discrimination trait in diploid *Triticum* species. *Theoretical and Applied Genetics* 82, 729-236.
- Goyal, K., Walton, L.J., y Tunnacliffe, A.** (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* 388, 151-157.
- Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., y Blatt, M.R.** (1997). Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *The Plant Journal* 12, 203-213.
- Greenway, H., y Munns, R.** (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology* 31, 149-190.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., y Macherel, D.** (2005). Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying. *Plant Physiology* 137, 157-167.
- Groppa, M.D., y Benavides, M.P.** (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35-45.
- Guichard, S., Bertin, N., Leonardi, G., y Gary, C.** (2001). Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement* 21, 385-392.
- Guo, X.-l., Liu, Z.-h., y Liu, B.-h.** (2008). Effects of exterior abscisic acid on calcium distribution of mesophyll cells and calcium concentration of guard cells in maize seedlings. *Agricultural Sciences in China* 7, 438-446.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., y Zhu, J.-K.** (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase *SOS2* that is required for plant salt tolerance. *The Plant cell* 13, 1383-1400.
- Gupta, B., y Huang, B.** (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics* 2014.
- Hafke, J.B., Hafke, Y., Smith, J.A.C., Lüttge, U., y Thiel, G.** (2003). Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier. *The Plant Journal* 35, 116-128.
- Halfter, U., Ishitani, M., y 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., Newbury, H., y Pritchard, J.** (2006). Functional analysis of *CHX21*: a putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 57, 1201-1210.

- Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., y Uozumi, N.** (2015). HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 113-120.
- Harper, J.F., Breton, G., y Harmon, A.** (2004). Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 55, 263-288.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies, Jr. y R.L. Geneve.** (2002). *Plant propagation: principles and practices*. 7a ed. Prentice Hall, Saddle River, NJ.
- 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., y Bohnert, H.J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 463-499.
- He, L., Yang, X., Wang, L., Zhu, L., Zhou, T., Deng, J., y Zhang, X.** (2013). Molecular cloning and functional characterization of a novel cotton CBL-interacting protein kinase gene (*GhCIPK6*) reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Biochemical and biophysical research communications* 435, 209-215.
- Hedrich, R., y Marten, I.** (2011). TPC1–SV channels gain shape. *Molecular Plant* 4, 428-441.
- Hedrich, R., Busch, H., y Raschke, K.** (1990). Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO journal* 9, 3889.
- Hedrich, R., Neimanis, S., Savchenko, G., Felle, H.H., Kaiser, W.M., y Heber, U.** (2001). Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO<sub>2</sub>, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta* 213, 594-601.
- Heidari, M., y Mesri, F.** (2008). Salinity effects on compatible solutes, antioxidants enzymes and ion content in three wheat cultivars. *Pak J Biol Sci* 11, 1385-1389.
- Heinlein, M.** (2002). Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Current opinion in plant biology* 5, 543-552.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratgé-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., y Thibaud, J.-B.** (2011). Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the *AKT2* potassium channel by the *CBL4/CIPK6* calcium sensor/protein kinase complex. *Cell research* 21, 1116-1130.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., y Sevilla, F.** (2001). Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/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.
- Hetherington, A.M., y Brownlee, C.** (2004). The generation of Ca<sup>2+</sup> signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 55, 401-427.
- Higinbotham, N.** (1973). Electropotentials of plant cells. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 25-46.

- Hill, C.B., Jha, D., Bacic, A., Tester, M., y Roessner, U.** (2013). Characterization of ion contents and metabolic responses to salt stress of different *Arabidopsis AtHKT1;1* genotypes and their parental strains. *Mol Plant* 6, 350-368.
- Hirayama, T., y Shinozaki, K.** (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal* 61, 1041-1052.
- Hirschi, K.** (2001). Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transport: who's directing the traffic? *Trends in plant science* 6, 100-104.
- Hirschi, K.D.** (1999). Expression of *Arabidopsis CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *The Plant Cell Online* 11, 2113-2122.
- Hirschi, K.D.** (2004). The Calcium Conundrum. Both Versatile Nutrient and Specific Signal. *Plant Physiology* 136, 2438-2442.
- Hirschi, K.D., Zhen, R.-G., Cunningham, K.W., Rea, P.A., y Fink, G.R.** (1996). *CAX1*, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 8782-8786.
- Hoagland, D.R., Arnon, D. I.** (1950). The water-culture method for growing plants without Soil. *Agricultural Experiment Station* 39 p. ill.
- Hoel, B.O., y Solhaug, K.A.** (1998). Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany* 82, 389-392.
- Horie, T., y Schroeder, J.I.** (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol* 136, 2457-2462.
- Horie, T., Hauser, F., y Schroeder, J.I.** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in plant science* 14, 660-668.
- Horie, T., Karahara, I., y Katsuhara, M.** (2012). Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. *Rice* 5, 11.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., y Véry, A.-A.** (2003). The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 5549-5554.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., y Sussman, M.R.** (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology* 132, 666-680.
- Hu, Y., Fricke, W., y Schmidhalter, U.** (2005). Salinity and the growth of non-halophytic grass leaves: the role of mineral nutrient distribution. *Functional Plant Biology* 32, 973-985.
- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., y Munns, R.** (2008). Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na<sup>+</sup> transport, and salt tolerance. *Journal of experimental botany* 59, 927-937.
- Huang, Y., Komoto, J., Konishi, K., Takata, Y., Ogawa, H., Gomi, T., Fujioka, M., y Takusagawa, F.** (2000). Mechanisms for auto-inhibition and forced product release in glycine N-methyltransferase: crystal structures of wild-type, mutant R175K and S-adenosylhomocysteine-bound R175K enzymes. *J Mol Biol* 298, 149-162.

- Huda, K.M.K., Banu, M.S.A., Tuteja, R., y Tuteja, N.** (2013). Global calcium transducer P-type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *Journal of experimental botany* 64, 3099-3109.
- Huertas, R., Olias, R., Eljakaoui, Z., Galvez, F.J., Li, J., De Morales, P.A., Belver, A., y Rodriguez-Rosales, M.P.** (2012). Overexpression of *SISOS2* (*SICIPK24*) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant Cell Environ* 35, 1467-1482.
- Huertas, R., Rubio, L., Cagnac, O., Garcia-Sanchez, M.J., Alche Jde, D., Venema, K., Fernandez, J.A., y Rodriguez-Rosales, M.P.** (2013). The  $\text{K}^+/\text{H}^+$  antiporter *LeNHX2* increases salt tolerance by improving  $\text{K}^+$  homeostasis in transgenic tomato. *Plant Cell Environ* 36, 2135-2149.
- Hwang, Y.-s., Bethke, P.C., Cheong, Y.H., Chang, H.-S., Zhu, T., y Jones, R.L.** (2005). A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant physiology* 138, 1347-1358.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.-S., Shi, W., y Zhu, J.-K.** (2000). *SOS3* function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant cell* 12, 1667-1677.
- Jabnoute, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.L., Conejero, G., Rodriguez-Navarro, A., Sentenac, H., Guiderdoni, E., Abdely, C., y Very, A.A.** (2009). Diversity in expression patterns and functional properties in the rice HKT transporter family. *Plant Physiol* 150, 1955-1971.
- Janicka-Russak, M., Kabala, K., Mlodzinska, E., y Klobus, G.** (2010). The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and the tonoplast proton pumps under salt stress. *Journal of plant physiology* 167, 261-269.
- Jaunin, F., y Hofer, R.** (1988). Calcium and rhizodermal differentiation in primary maize roots. *Journal of experimental botany* 39, 587-593.
- Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H., Jun, S.H., Jeong, D.H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Lee, S., y Yang, K.** (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* 22, 561-570.
- Jeschke, W.** (1984).  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance.
- Julenius, K., Robblee, J., Thulin, E., Finn, B.E., Fairman, R., y Linse, S.** (2002). Coupling of ligand binding and dimerization of helix-loop-helix peptides: Spectroscopic and sedimentation analyses of calbindin D9k EF-hands. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47, 323-333.
- Kader, M.A., y Lindberg, S.** (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signaling & behavior* 5, 233-238.
- Kalir, A., y Poljakoff-Mayber, A.** (1975). Malic dehydrogenase from tamarix roots: effects of sodium chloride in vivo and in vitro. *Plant Physiol* 55, 155-162.
- Kaplan, B., Sherman, T., y Fromm, H.** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS letters* 581, 2237-2246.
- Karley, A.J., Leigh, R.A., y Sanders, D.** (2000). Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in plant science* 5, 465-470.

- Kennelly, M., O'Mara, J., Rinard, C., Miller, G.L., y Smith, C.** (2012). Introduction to abiotic disorders in plants. The Plant Health. University of Wisconsin-Madison.
- Kim, B.G., Waadt, R., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Dominguez-Solis, J.R., Schültke, S., Lee, S.C., Kudla, J., y Luan, S.** (2007). The calcium sensor *CBL10* mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 52, 473-484.
- Kim, K.-N.** (2013). Stress responses mediated by the CBL calcium sensors in plants. *Plant Biotechnology Reports* 7, 1-8.
- Kim, K.-N., Cheong, Y.H., Gupta, R., y Luan, S.** (2000). Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiology* 124, 1844-1853.
- Kim, T.-W., y Wang, Z.-Y.** (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual review of plant biology* 61, 681-704.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F.Y., y Sinha, N.** (2008). Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Current Biology* 18, 672-677.
- Kinoshita, T., Nishimura, M., y Shimazaki, K.** (1995). Cytosolic concentration of  $Ca^{2+}$  regulates the plasma membrane  $H^{+}$ -ATPase in guard cells of fava bean. *The Plant cell* 7, 1333-1342.
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology* 7, 235-246.
- Koenig, D., Jiménez-Gómez, J.M., Kimura, S., Fulop, D., Chitwood, D.H., Headland, L.R., Kumar, R., Covington, M.F., Devisetty, U.K., y Tat, A.V.** (2013). Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E2655-E2662.
- Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., y Kudla, J.** (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology* 134, 43-58.
- Kostman, T.A., Franceschi, V.R., y Nakata, P.A.** (2003). Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Science* 165, 205-212.
- Kovermann, P., Meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., y Martinoia, E.** (2007). The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal* 52, 1169-1180.
- Kronzucker, H.J., y Britto, D.T.** (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189, 54-81.
- Kudla, J., Batistič, O., y Hashimoto, K.** (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *The Plant cell* 22, 541-563.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Gruissem, W., y Luan, S.** (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4718-4723.

- Kuromori, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K., y Matsui, M.** (2009). Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant and cell physiology* 50, 1215-1231.
- Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G., y Schroeder, J.I.** (2001). Dominant negative guard cell K<sup>+</sup> channel mutants reduce inward-rectifying K<sup>+</sup> currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127, 473-485.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., y Thibaud, J.-B.** (2000). A shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *The Plant cell* 12, 837-851.
- Lacombe, B., Becker, D., Hedrich, R., DeSalle, R., Hollmann, M., Kwak, J.M., Schroeder, J.I., Le Novère, N., Nam, H.G., y Spalding, E.P.** (2001). The identity of plant glutamate receptors. *Science (New York, NY)* 292, 1486.
- Ladizinsky, G.** (1985). Founder effect in crop-plant evolution. *Economic Botany* 39, 191-199.
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., y Grignon, C.** (1996). Tissue-specific expression of *Arabidopsis AKT1* gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *The Plant Journal* 9, 195-203.
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T.A., Véry, A.-A., Wang, A., Mortimer, J.C., Macpherson, N., Coxon, K.M., y Battey, N.H.** (2012). *Arabidopsis* annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-and K<sup>+</sup>-permeable conductance in root cells. *The Plant cell* 24, 1522-1533.
- Lawson, T., y Blatt, M.R.** (2014). Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology* 164, 1556-1570.
- Lebaudy, A., Véry, A.-A., y Sentenac, H.** (2007). K<sup>+</sup> channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS letters* 581, 2357-2366.
- Lee, J., Park, I., Lee, Z.-W., Kim, S.W., Baek, N., Park, H.-S., Park, S.U., Kwon, S., y Kim, H.** (2013). Regulation of the major vacuolar Ca<sup>2+</sup> transporter genes, by intercellular Ca<sup>2+</sup> concentration and abiotic stresses, in tip-burn resistant Brassica oleracea. *Molecular biology reports* 40, 177-188.
- Lee, S.C., Lan, W.-Z., Kim, B.-G., Li, L., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Lu, G., Buchanan, B.B., y Luan, S.** (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 15959-15964.
- Leidi, E.O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M.T., Cubero, B., Fernández, J.A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., y Quintero, F.J.** (2010). The *AtNHX1* exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal* 61, 495-506.
- Leng, Q., Mercier, R.W., Hua, B.-G., Fromm, H., y Berkowitz, G.A.** (2002). Electrophysiological analysis of cloned cyclic nucleotide-gated ion channels. *Plant Physiology* 128, 400-410.
- León, J., Rojo, E., y Sánchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 52, 1-9.

- Li, D.D., Xia, X.L., Yin, W.L., y Zhang, H.C.** (2013). Two poplar calcineurin B-like proteins confer enhanced tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant* 57, 70-78.
- Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., y Luan, S.** (2006). A Ca<sup>2+</sup> signaling pathway regulates a K<sup>+</sup> channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12625-12630.
- Li, Y., Wang, G.-X., Xin, M., Yang, H.-M., Wu, X.-J., y Li, T.** (2004). The parameters of guard cell calcium oscillation encodes stomatal oscillation and closure in *Vicia faba*. *Plant Science* 166, 415-421.
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K.S., Pardo, J.M., y Guo, Y.** (2009). Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 21, 1607-1619.
- Ling, Q., Huang, W., y Jarvis, P.** (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis research* 107, 209-214.
- Linnaeus, C.v.** (1753). *Species plantarum*, vol. 1. Laurentii Salvii, Stockholm.
- Liu, C., Li, C., Liang, D., Wei, Z., Zhou, S., Wang, R., y Ma, F.** (2012). Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 159-165.
- Liu, J., y Zhu, J.-K.** (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science (New York, N.Y.)* 280, 1943-1945.
- Liu, L.-L., Ren, H.-M., Chen, L.-Q., Wang, Y., y Wu, W.-H.** (2013). A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 161, 266-277.
- Logan, D.C., y Knight, M.R.** (2003). Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiology* 133, 21-24.
- Lolle, S.J., Berlyn, G.P., Engstrom, E.M., Krolkowski, K.A., Reiter, W.D., y Pruitt, R.E.** (1997). Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis* fiddlehead-1 mutant: a role for the epidermal cell wall and cuticle. *Dev Biol* 189, 311-321.
- Luan, S.** (2009). The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in plant science* 14, 37-42.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S., y Grissem, W.** (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *The Plant cell* 14 Suppl, S389-400.
- Lugan, R., Niogret, M.F., Lepout, L., Guégan, J.P., Larher, F.R., Savouré, A., Kopka, J., y Bouchereau, A.** (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of *Theillungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal* 64, 215-229.
- Luu, D.-T., y Maurel, C.** (2005). Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell & Environment* 28, 85-96.

- Maathuis, F.J.** (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology* 12, 250-258.
- Maathuis, F.J.** (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of experimental botany* 65, 849-858.
- Maathuis, F.J., y Amtmann, A.** (1999). K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. *Annals of Botany* 84, 123-133.
- Maathuis, F.J.M.** (2006). The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity. *Journal of Experimental Botany* 57, 1137-1147.
- Maathuis, F.J.M.** (2013). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*.
- MacRobbie, E.** (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353, 1475-1488.
- MAGRAMA** (2014) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., y Tuteja, N.** (2008). Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of biochemistry and biophysics* 471, 146-158.
- Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., Al-Rasheid, K.A., Luan, S., Kudla, J., y Geiger, D.** (2014). Site-and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science signaling* 7, ra86-ra86.
- Manohar, M., Shigaki, T., y Hirschi, K.** (2011). Plant cation/H<sup>+</sup> exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations. *Plant Biology* 13, 561-569.
- Marschner, H.** (1995). Functions of mineral nutrients: macronutrients. *Mineral nutrition of higher plants* 2, 379-396.
- Marschner, H.** (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants.* (Academic press).
- Marschner, H., y Marschner, P.** (2012). *Marschner's mineral nutrition of higher plants.* (Academic press).
- Martiensen, R.A.** (1998). Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 2021-2026.
- Martinez-Cordero, M.A., Martinez, V., y Rubio, F.** (2005). High-affinity K<sup>+</sup> uptake in pepper plants. *J Exp Bot* 56, 1553-1562.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V., y Rubio, F.** (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K<sup>+</sup> transporter *HAK1* of pepper. *Plant Molecular Biology* 56, 413-421.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., y Sanders, D.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126, 1646-1667.
- Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D.J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., y Uozumi, N.** (2002). Altered

- shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in *Arabidopsis* by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter *AtHKT1*. FEBS letters 531, 157-161.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D., Wagoner, W., y Lightner, J.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. The Plant Cell Online 15, 1689-1703.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Murdter, F., Kuttner, F., y Schmid, M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. PLoS biology 7, 1626.
- Mattsson, J., Sung, Z.R., y Berleth, T.** (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. Development 126, 2979-2991.
- Maurel, C., y Chrispeels, M.J.** (2001). Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. Plant Physiology 125, 135-138.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T., y Santoni, V.** (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. Annu Rev Plant Biol 59, 595-624.
- McAinsh, M.R., y Pittman, J.K.** (2009). Shaping the calcium signature. New Phytologist 181, 275-294.
- Meco Martínez, V.** (2015). Identificación y caracterización de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en el desarrollo reproductivo y en la tolerancia a estreses abióticos. Proyecto de investigación:.
- Mei, H., Cheng, N.H., Zhao, J., Park, S., Escareno, R.A., Pittman, J.K., y Hirschi, K.D.** (2009). Root development under metal stress in *Arabidopsis thaliana* requires the H<sup>+</sup>/cation antiporter *CAX4*. New Phytologist 183, 95-105.
- Melnyk, C.W., y Meyerowitz, E.M.** (2015). Plant grafting. Current Biology 25, R183-R188.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Jones, A.M., y Ellis, B.E.** (2004). Mastoparan rapidly activates plant MAP kinase signaling independent of heterotrimeric G proteins. Plant physiology 134, 1332-1336.
- Millar, A.A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E.M., Taylor, D.C., y 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., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., y Mittler, R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ 33, 453-467.
- Miller, J., y Tanksley, S.** (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. Theoretical and applied genetics 80, 437-448.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., y 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.
- Mohan Jain, S.** (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118, 153-166.

- Moller, I.S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G.M., Roy, S.J., Coates, J.C., Haseloff, J., y 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.
- Monge, E., Val, J., Sanz, M., Blanco, A., y Montanes, L.** (1995). Calcium as a nutrient for plants. The bitter pit in apple. *Anales de la Estacion Experimental de Aula Dei (Espana)*.
- Moran, M., Clarke, T., Inoue, Y., y Vidal, A.** (1994). Estimating crop water deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote sensing of environment* 49, 246-263.
- Morgan, R.O., Martin-Almedina, S., Garcia, M., Jhoncon-Kooyip, J., y Fernandez, M.-P.** (2006). Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1763, 1238-1249.
- Moyano Solera, E.** (2014). Sobreexpresión de genes en tomate y generación de líneas T-DNA en la especie silvestre *solanum pennellii* para identificar determinantes de la tolerancia al estrés hídrico y la salinidad. Proyecto de investigación:.
- Moyle, L.C.** (2008). Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution* 62, 2995-3013.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* 25, 239-250.
- Munns, R.** (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist* 167, 645-663.
- Munns, R., y Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651-681.
- Munns, R., Schachtman, D.P., y Condon, A.G.** (1995). The Significance of a Two-Phase Growth Response to Salinity in Wheat and Barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 561-569.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J.O., Anton, T., Garcia-Sogo, B., Sanchez-Bel, P., Flores, F.B., Atares, A., Angosto, T., Pintor-Toro, J.A., Moreno, V., y Bolarin, M.C.** (2012). Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of plant physiology* 169, 459-468.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J.O., Garcia-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V., y 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., y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473-497.
- Nagata, T., Iizumi, S., Satoh, K., y Kikuchi, S.** (2008). Comparative molecular biological analysis of membrane transport genes in organisms. *Plant molecular biology* 66, 565-585.

- Nemchinov, L.G., Shabala, L., y Shabala, S.** (2008). Calcium efflux as a component of the hypersensitive response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant and Cell Physiology* 49, 40-46.
- Nesbitt, T.C., y Tanksley, S.D.** (2002). Comparative Sequencing in the Genus *Lycopersicon*: Implications for the Evolution of Fruit Size in the Domestication of Cultivated Tomatoes. *Genetics* 162, 365-379.
- Nevo, E., y Chen, G.** (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, cell & environment* 33, 670-685.
- Nicotra, A.B., Leigh, A., Boyce, C.K., Jones, C.S., Niklas, K.J., Royer, D.L., y Tsukaya, H.** (2011). The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology* 38, 535-552.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martínez, V., y Rubio, F.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* *HAK5* K<sup>+</sup> transporter is required for plant growth and K<sup>+</sup> acquisition from low K<sup>+</sup> solutions under saline conditions. *Mol Plant* 3, 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Caballero, F., Martínez, V., y Rubio, F.** (2012). Disruption of the *Arabidopsis thaliana* inward-rectifier K<sup>+</sup> channel *AKT1* improves plant responses to water stress. *Plant and Cell Physiology* 53, 423-432.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A.J., Alemán, F., Martínez, V., y 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 molecular biology* 68, 521-532.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., y Pardo, J.M.** (1995). Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiology* 109, 735-742.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., y Hanson, A.D.** (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr Opin Plant Biol* 2, 128-134.
- Nuez, F., Diez, M.T., y Pico, B.** (1996). Catálogo de semillas de tomate. P. imprenta: Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria. Madrid.(ES) 1996. 177 p., il., fot.
- O'Malley, R.C., y Ecker, J.R.** (2010). Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *The Plant Journal* 61, 928-940.
- Okabe, Y., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Bres, C., Rothan, C., Mizoguchi, T., y Ezura, H.** (2011). Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant & cell physiology* 52, 1994-2005.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., De Morales, P.A., Marin-Manzano, M.C., Pardo, J.M., y Belver, A.** (2009). The plasma membrane 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 Environ* 32, 904-916.
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Pardo, J.M., y Belver, A.** (2009). The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger *SOS1* controls extrusion and distribution of Na<sup>+</sup> in tomato plants under salinity conditions. *Plant Signal Behav* 4, 973-976.
- Olmstead, R.G., y Bohs, L.** (2006). A summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. In VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity 745, pp. 255-268.

- Osmond, C.B.** (1976). Ion Absorption and Carbon Metabolism in Cells of Higher Plants. In *Transport in Plants II*, U. Lüttge y M.G. Pitman, eds (Springer Berlin Heidelberg), pp. 347-372.
- Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.-G., y Luan, S.** (2008). Calcineurin-B-like protein *CBL9* interacts with target kinase *CIPK3* in the regulation of ABA response in seed germination. *Molecular Plant* 1, 238-248.
- Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Kim, K.-N., Grant, J.J., Li, L., Hung, W., D'Angelo, C., Weinl, S., Kudla, J., y Luan, S.** (2004). The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16, 1912-1924.
- Pandey, S.K., Nookaraju, A., Upadhyaya, C.P., Gururani, M.A., Venkatesh, J., Kim, D.-H., y Park, S.W.** (2011). An Update on Biotechnological Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Crop Science* 51, 2303.
- Pang, C.-H., y Wang, B.-S.** (2008). Oxidative stress and salt tolerance in plants. In *Progress in botany* (Springer), pp. 231-245.
- Pardo, J.M.** (2010). Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 185-196.
- Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., y Quintero, F.J.** (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57, 1181-1199.
- Park, S., Cheng, N.H., Pittman, J.K., Yoo, K.S., Park, J., Smith, R.H., y Hirschi, K.D.** (2005). Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis*  $H^+/Ca^{2+}$  transporters. *Plant Physiol* 139, 1194-1206.
- Parkhurst, D.F., y Loucks, O.** (1972). Optimal leaf size in relation to environment. *The Journal of Ecology*, 505-537.
- Passioura, J.B., y Munns, R.** (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Functional Plant Biology* 27, 941-948.
- Pei, Z., Kuchitsu, K., Ward, J., Schwarz, M., y Schroeder, J.** (1997). A network of early events in ABA signaling in guard cells. In *Plant Physiology* (Amer Soc Plant Physiologists 15501 Monoma Drive, Rockville, MD 20855), pp. 40004-40004.
- Peiter, E.** (2011). The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals. *Cell calcium* 50, 120-128.
- Peleg, Z., Apse, M.P., y Blumwald, E.** (2011). Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. *Adv Bot Res* 57, 405-443.
- Peralta, I.E., y Spooner, D.M.** (2006). History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). *Genetic improvement of Solanaceous crops* 2, 1-27.
- Peralta, I.E., Knapp, S., y Spooner, D.M.** (2005). New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: *Solanaceae*) from Northern Peru. *Systematic Botany* 30, 424-434.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., y Knapp, S.** (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*).

- Pérez, A.R., y Quintero, E.M.** (2015). Funciones del calcio en la calidad poscosecha de frutas y hortalizas: una revisión. *Alimentos Hoy* 23, 13-25.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I., y Sentenac, H.** (2003). Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant molecular biology* 51, 773-787.
- Pillitteri, L.J., y Torii, K.U.** (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* 63, 591-614.
- Pineda B., G.-A.J.O., Antón T., Pérez F., Moyano E., García-Sogo B., Campos J.F., Angosto T., Morales B., Capel J., Flores F.B., Moreno V., Bolarin M.C., Lozano R. and Atarés A.** (2012). Genomics approaches for salt and drought stress tolerance. In *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*.
- Pinheiro, C., y Chaves, M.M.** (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J Exp Bot* 62, 869-882.
- Pittman, J.K., y Hirschi, K.D.** (2001). Regulation of *CAX1*, an *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Identification of an N-terminal autoinhibitory domain. *Plant physiology* 127, 1020-1029.
- Pittman, J.K., Shigaki, T., Cheng, N.-H., y Hirschi, K.D.** (2002). Mechanism of N-terminal Autoinhibition in the *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter *CAX1*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26452-26459.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Walter, A., Fiorani, F., y Schurr, U.** (2010). A method to construct dose–response curves for a wide range of environmental factors and plant traits by means of a meta-analysis of phenotypic data. *Journal of Experimental Botany* 61, 2043-2055.
- Pottosin, I., y Schönknecht, G.** (2007). Vacuolar calcium channels. *Journal of experimental botany* 58, 1559-1569.
- Prohens, J., Nuez, F., y Carena, M.J.** (2008). *Handbook of plant breeding*. (Springer).
- Qi, Z., y Spalding, E.P.** (2004). Protection of plasma membrane K<sup>+</sup> transport by the salt overly sensitive1 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter during salinity stress. *Plant Physiology* 136, 2548-2555.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., y 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.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Schumaker, K.S., y Zhu, J.-K.** (2004). Regulation of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279, 207-215.
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J.M., y Guo, Y.** (2007). *SCABP8/CBL10*, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase *SOS2* to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell Online* 19, 1415-1431.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.-K., y 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.

- Radhamony, R.N., Mohan Prasad, A., y Srinivasan, R.** (2005). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology* 8, 82-106.
- Rathinasabapathi, B.** (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany* 86, 709-716.
- Raven, J.A.** (1985). Tansley Review No. 2. Regulation of pH and Generation of Osmolarity in Vascular Plants: A Cost-Benefit Analysis in Relation to Efficiency of Use of Energy, Nitrogen and Water. *New Phytologist* 101, 25-77.
- Raven, J.A.** (2014). Speedy small stomata? *Journal of Experimental Botany* 65, 1415-1424.
- Reddy, M., Sanish, S., y Iyengar, E.** (1992). Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* under saline conditions. *Photosynthetica (CSFR)*.
- Reddy, V.S., y Reddy, A.S.** (2004). Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* 65, 1745-1776.
- Ren, X.L., Qi, G.N., Feng, H.Q., Zhao, S., Zhao, S.S., Wang, Y., y Wu, W.H.** (2013). Calcineurin B-like protein *CBL10* directly interacts with *AKT1* and modulates K<sup>+</sup> homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 74, 258-266.
- 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., y Lin, H.-X.** (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature genetics* 37, 1141-1146.
- Rengel, Z., y Damon, P.M.** (2008). Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiologia Plantarum* 133, 624-636.
- Reyes, J.L., Rodrigo, M.-J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.-V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D., y Covarrubias, A.A.** (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment* 28, 709-718.
- Rhodes, D., y Hanson, A.** (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology* 44, 357-384.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., y Rich, P.J.** (2002). Salinity, Osmolytes and Compatible Solutes. In *Salinity: Environment - Plants - Molecules*, A. Läuchli y U. Lüttge, eds (Springer Netherlands), pp. 181-204.
- Rick, C.** (1973). Potential Genetic Resources in Tomato Species: Clues from Observations in Native Habitats. In *Genes, Enzymes, and Populations*, A. Srb, ed (Springer US), pp. 255-269.
- Rick, C.** (1982). Genetic-relationships between self-incompatibility and floral traits in the tomato species. *Biologisches Zentralblatt* 101, 185-198.
- Roberts, L.W.** (1988). Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In *Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 22-38.
- Robertson, D.N.** (2013). Modulating plant calcium for better nutrition and stress tolerance. *ISRN Botany* 2013.

- Rodriguez-Rosales, M.P., Jiang, X., Galvez, F.J., Aranda, M.N., Cubero, B., y Venema, K.** (2008). Overexpression of the tomato  $K^+/H^+$  antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *The New phytologist* 179, 366-377.
- Rodriguez-Rosales, M.P., Galvez, F.J., Huertas, R., Aranda, M.N., Baghour, M., Cagnac, O., y Venema, K.** (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav* 4, 265-276.
- Rodríguez, E.S.** (2013). Efecto de la técnica agrícola del injerto en las respuestas fisiológicas de resistencia ante un estrés hídrico moderado en plantas de tomate cherry. (Editorial de la Universidad de Granada).
- Roelfsema, M.R., y Hedrich, R.** (2010). Making sense out of  $Ca^{2+}$  signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant Cell Environ* 33, 305-321.
- Rorat, T.** (2006). Plant dehydrins--tissue location, structure and function. *Cell Mol Biol Lett* 11, 536-556.
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., y Allen, R.D.** (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature biotechnology* 15, 988-991.
- Roy, S.J., Huang, W., Wang, X.J., Evrard, A., Schmockel, S.M., Zafar, Z.U., y Tester, M.** (2013). A novel protein kinase involved in  $Na^+$  exclusion revealed from positional cloning. *Plant Cell Environ* 36, 553-568.
- Rozema, J., y Schat, H.** (2013). Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 92, 83-95.
- Rubio, F., Santa-María, G.E., y Rodríguez-Navarro, A.** (2000). Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding *HAK* potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum* 109, 34-43.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., y Martínez, V.** (2008). Relative contribution of *AtHAK5* and *AtAKT1* to  $K^+$  uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia plantarum* 134, 598-608.
- Rubio, F., Aleman, F., Nieves-Cordones, M., y Martinez, V.** (2010). Studies on *Arabidopsis athak5, atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which *AtHAK5*, *AtAKT1* and unknown systems mediate K uptake. *Physiol Plant* 139, 220-228.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.-i., y Moir, D.T.** (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a  $Ca^{2+}$  ATPase family. *Cell* 58, 133-145.
- Rus, A., Baxter, I., Muthukumar, B., Gustin, J., Lahner, B., Yakubova, E., y Salt, D.E.** (2006). Natural variants of *AtHKT1* enhance  $Na^+$  accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 2, e210.
- Rus, A., Lee, B.-h., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (2004). *AtHKT1* facilitates  $Na^+$  homeostasis and  $K^+$  nutrition in planta. *Plant Physiology* 136, 2500-2511.

- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B.-h., Matsumoto, T.K., Koiwa, H., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., y Hasegawa, P.M.** (2001). *AtHKT1* is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. Proceedings of the national academy of sciences 98, 14150-14155.
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., y Vidal, S.** (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. The Plant journal : for cell and molecular biology 45, 237-249.
- Sachs, T.** (2000). Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. Plant & cell physiology 41, 649-656.
- Saibo, N.J., Lourenco, T., y Oliveira, M.M.** (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. Ann Bot 103, 609-623.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K., y Ezura, H.** (2011). TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. Plant & cell physiology 52, 283-296.
- Saleem, A., Ashraf, M., Akram, N., y Al-Qurainy, F.** (2012). Salinity-induced changes in the composition of some key enzymatic and non-enzymatic antioxidants, osmoprotectants, chlorophyll pigments and some inorganic elements in okra (*Abelmoschus esculentus* L.) fruit. J Hort Sci Biotechnol 87, 271-277.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M.T., Martínez-Madrid, C., Fernández-García, N., Romojaro, F., Olmos, E., Estrella, E., Bolarín, M.C., y Flores, F.B.** (2012). Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach. Journal of proteomics 75, 5463-5478.
- Sanders, D., Brownlee, C., y Harper, J.F.** (1999). Communicating with calcium. The Plant cell 11, 691-706.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., y Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. The Plant Cell Online 14, S401-S417.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Rus, A., y Bolarin, M.C.** (1999). Short-term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species. Plant Physiology and Biochemistry 37, 65-71.
- Santa-Maria, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., y Rodríguez-Navarro, A.** (1997). The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. The Plant cell 9, 2281-2289.
- Saranga, Y., Zamir, D., Marani, A., y Rudich, J.** (1991). Breeding tomatoes for salt tolerance: field evaluation of *Lycopersicon* germplasm for yield and dry-matter production. Journal of the American Society for Horticultural Science 116, 1067-1071.
- Sasaki, K., Hiraga, S., Ito, H., Seo, S., Matsui, H., y Ohashi, Y.** (2002). A Wound-Inducible Tobacco Peroxidase Gene Expresses Preferentially in the Vascular System. Plant and Cell Physiology 43, 108-117.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.-J., y Schroeder, J.I.** (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 9535-9539.

- Scholander, P.F., Hammel, H., Hemmingsen, E., y Bradstreet, E.** (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, 119.
- Schönknecht, G.** (2013). Calcium signals from the vacuole. *Plants* 2, 589-614.
- Schroeder, J., Hedrich, R., y Fernandez, J.** (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 312, 361-362.
- Schroeder, J.I., y Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells.
- Schroeder, J.I., y Keller, B.U.** (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5025-5029.
- Schroeder, J.I., Raschke, K., y Neher, E.** (1987). Voltage dependence of K<sup>+</sup> channels in guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 4108-4112.
- Schroeder, J.I., Ward, J.M., y Gassmann, W.** (1994). Perspectives on the Physiology and Structure of Inwardrectifying K Channels in Higher Plants: Biophysical Implications for K Uptake. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 23, 441-471.
- Schwarz, D., Thompson, A.J., y Klaring, H.P.** (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in plant science* 5, 625.
- Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G., y Venema, J.H.** (2010). Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae* 127, 162-171.
- Shabala, L., Cuin, T.A., Newman, I.A., y Shabala, S.** (2005). Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* 222, 1041-1050.
- Shabala, S.** (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot* 112, 1209-1221.
- Shabala, S., y Cuin, T.A.** (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133, 651-669.
- Shabala, S., y Mackay, A.** (2011). Ion transport in halophytes. *Advances in botanical research* 57, 151-187.
- Shabala, S., y Pottosin, I.** (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant* 151, 257-279.
- Shabala, S., Babourina, O., y Newman, I.** (2000). Ion-specific mechanisms of osmoregulation in bean mesophyll cells. *Journal of Experimental Botany* 51, 1243-1253.
- Shabala, S., Bækgaard, L., Shabala, L., Fuglsang, A.T., Cuin, T.A., Nemchinov, L.G., y Palmgren, M.G.** (2011). Endomembrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases play a significant role in virus-induced adaptation to oxidative stress. *Plant signaling & behavior* 6, 1053-1056.

- Shaheen, S., Naseer, S., Ashraf, M., y Akram, N.A.** (2012). Salt stress affects water relations, photosynthesis, and oxidative defense mechanisms in *Solanum melongena* L. *Journal of Plant Interactions* 8, 85-96.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., y 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.
- Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C., y Pathmanabhan, G.** (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science* 166, 1035-1043.
- Shao, H.-B., Song, W.-Y., y Chu, L.-Y.** (2008). Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *Comptes rendus biologiques* 331, 587-596.
- Shavrukov, Y.** (2013). Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of experimental botany* 64, 119-127.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., y 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., y 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* 14, 465-477.
- Shirasawa, K., Isobe, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Fukuoka, H., Just, D., Rothan, C., Sasamoto, S., Fujishiro, T., Kishida, Y., Kohara, M., Tsuruoka, H., Wada, T., Nakamura, Y., Sato, S., y Tabata, S.** (2010). SNP discovery and linkage map construction in cultivated tomato. *DNA Res* 17, 381-391.
- Shoji, T., Suzuki, K., Abe, T., Kaneko, Y., Shi, H., Zhu, J.-K., Rus, A., Hasegawa, P.M., y Hashimoto, T.** (2006). Salt stress affects cortical microtubule organization and helical growth in *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology* 47, 1158-1168.
- Sickler, C.M., Edwards, G.E., Kiirats, O., Gao, Z., y Loescher, W.** (2007). Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology* 34, 382-391.
- Siegel, R.S., Xue, S., Murata, Y., Yang, Y., Nishimura, N., Wang, A., y Schroeder, J.I.** (2009). Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 59, 207-220.
- Singh, U.M., Chandra, M., Shankhdhar, S.C., y Kumar, A.** (2014). Transcriptome wide identification and validation of calcium sensor gene family in the developing spikes of finger millet genotypes for elucidating its role in grain calcium accumulation. *PLoS One* 9, e103963.
- Smethurst, C.F., Rix, K., Garnett, T., Auricht, G., Bayart, A., Lane, P., Wilson, S.J., y Shabala, S.** (2008). Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne:

- revealing the underlying cellular mechanisms. *Functional Plant Biology* 35, 640-650.
- Smirnoff, N.** (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58.
- Smulders, M., Rus-Kortekaas, W., y Gilissen, L.** (1994). Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* 97, 53-60.
- Song, W.-Y., Choi, K.-S., Martinoia, E., y Lee, Y.** (2011). Brassica juncea plant cadmium resistance 1 protein (BjPCR1) facilitates the radial transport of calcium in the root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19808-19813.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E., y Knapp, S.** (2005). Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, 43-61.
- Springer, P.S.** (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant cell* 12, 1007-1020.
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U.C., y Teige, M.** (2011). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of experimental botany*, err394.
- Stelzer, R., y Läuchli, A.** (1977). Salz-und überflutungstoleranz von *Puccinellia peisonis*: I. Der einfluß von NaCl<sup>-</sup> und KCl<sup>-</sup> salinität auf das wachstum bei variiertes sauerstoffversorgung der wurzel. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 83, 35-42.
- Su, H., Gollack, D., Zhao, C., y Bohnert, H.J.** (2002). The expression of HAK-type K<sup>(+)</sup> transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant. *Plant Physiol* 129, 1482-1493.
- Su, Y., Luo, W., Lin, W., Ma, L., y Kabir, M.H.** (2015). Model of Cation Transportation Mediated by High-Affinity Potassium Transporters (HKTs) in Higher Plants. *Biol Proced Online* 17.
- Sun, J.-B., Flach, C.-F., Czerkinsky, C., y Holmgren, J.** (2008). B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *The Journal of Immunology* 181, 8278-8287.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.-Y., Leung, H.-Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J.I., y Uozumi, N.** (2005). Enhanced salt tolerance mediated by *AtHKT1* transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal* 44, 928-938.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., y Martienssen, R.** (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & development* 9, 1797-1810.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., y Steinmeyer, R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2917-2921.

- Tahal, R., Mills, D., Heimer, Y., y Tal, M.** (2000). The relation between low  $K^+/Na^+$  ratio and salt-tolerance in the wild tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of plant physiology* 157, 59-64.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K., y Shinozaki, K.** (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* 135, 1697-1709.
- Tal, M., y Shannon, M.** (1983). Salt Tolerance in the Wild Relatives of the Cultivated Tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. cheesmanii*, *L. peruvianum*, *Solanum pennellii* and F1 Hybrids to High Salinity. *Functional Plant Biology* 10, 109-117.
- Talebi, R., Fayaz, F., y Najj, A.** (2009). Effective selection criteria for assessing drought stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *General and applied plant physiology* 35, 64-74.
- Taleisnik, E.L.** (1987). Salinity effects on growth and carbon balance in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Physiologia Plantarum* 71, 213-218.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2007). *Fisiología vegetal*. Edita la Universidad Jaume I. Castellón de la Plana.
- Tanaka, Y., Sugano, S.S., Shimada, T., y Hara-Nishimura, I.** (2013). Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 198, 757-764.
- Tang, R.J., Yang, Y., Yang, L., Liu, H., Wang, C.T., Yu, M.M., Gao, X.S., y Zhang, H.X.** (2014). Poplar calcineurin B-like proteins *PtCBL10A* and *PtCBL10B* regulate shoot salt tolerance through interaction with *PtSOS2* in the vacuolar membrane. *Plant Cell Environ* 37, 573-588.
- Tavakkoli, E., Fatehi, F., Coventry, S., Rengasamy, P., y McDonald, G.K.** (2011). Additive effects of  $Na^+$  and  $Cl^-$  ions on barley growth under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 62, 2189-2203.
- Taylor, I.** (1986). Biosystematics of the tomato. In *The tomato crop* (Springer), pp. 1-34.
- Tester, M., y Davenport, R.** (2003).  $Na^+$  tolerance and  $Na^+$  transport in higher plants. *Annals of botany* 91, 503-527.
- Thiel, G., MacRobbie, E., y Blatt, M.** (1992). Membrane transport in stomatal guard cells: the importance of voltage control. *The Journal of membrane biology* 126, 1-18.
- Thoday-Kennedy, E., Jacobs, A., y Roy, S.** (2015). The role of the CBL–CIPK calcium signalling network in regulating ion transport in response to abiotic stress. *Plant Growth Regul* 76, 3-12.
- Tian, F., Bradbury, P.J., Brown, P.J., Hung, H., Sun, Q., Flint-Garcia, S., Rocheford, T.R., McMullen, M.D., Holland, J.B., y Buckler, E.S.** (2011). Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. *Nature genetics* 43, 159-162.
- Tracy, F.E., Gilliam, M., Dodd, A.N., Webb, A.A., y Tester, M.** (2008).  $NaCl$  induced changes in cytosolic free  $Ca^{2+}$  in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ* 31, 1063-1073.

- Tripathi, V., Parasuraman, B., Laxmi, A., y Chattopadhyay, D.** (2009). *CIPK6*, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants. *The Plant Journal* 58, 778-790.
- Tuberosa, R., y Salvi, S.** (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in plant science* 11, 405-412.
- Tuteja, N.** (2007). Chapter Twenty-Four-Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in enzymology* 428, 419-438.
- Ueoka-Nakanishi, H., Tsuchiya, T., Sasaki, M., Nakanishi, Y., Cunningham, K.W., y Maeshima, M.** (2000). Functional expression of mung bean  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter in yeast and its intracellular localization in the hypocotyl and tobacco cells. *European Journal of Biochemistry* 267, 3090-3098.
- Uozumi, A., Ikeda, H., Hiraga, M., Kanno, H., Nanzyo, M., Nishiyama, M., Kanahama, K., y Kanayama, Y.** (2012). Tolerance to salt stress and blossom-end rot in an introgression line, IL8-3, of tomato. *Scientia Horticulturae* 138, 1-6.
- Uozumi, N., Kim, E.J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E.P., Nakamura, T., y Schroeder, J.I.** (2000). The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward  $\text{Na}^{+}$  currents in *Xenopus laevis* oocytes and  $\text{Na}^{+}$  uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* 122, 1249-1260.
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., y Vieira, L.G.E.** (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of plant physiology* 164, 1367-1376.
- Venema, K., Belver, A., Marín-Manzano, M.C., Rodríguez-Rosales, M.P., y Donaire, J.P.** (2003). A novel intracellular  $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporter related to  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  antiporters is important for  $\text{K}^{+}$  ion homeostasis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22453-22459.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., y Pantoja, O.** (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiology* 135, 2318-2329.
- Verslues, P.E., y Juenger, T.E.** (2011). Drought, metabolites, and *Arabidopsis* natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Current opinion in plant biology* 14, 240-245.
- Vij, S., y Tyagi, A.K.** (2007). Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant biotechnology journal* 5, 361-380.
- Vitart, V., Baxter, I., Doerner, P., y Harper, J.F.** (2001). Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase in the root endodermis. *The Plant Journal* 27, 191-201.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., y Kudla, J.** (2008). Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant Journal* 56, 505-516.
- Wang, M., Gu, D., Liu, T., Wang, Z., Guo, X., Hou, W., Bai, Y., Chen, X., y Wang, G.** (2007). Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance. *Plant molecular biology* 65, 733-746.

- Wang, W.-H., Yi, X.-Q., Han, A.-D., Liu, T.-W., Chen, J., Wu, F.-H., Dong, X.-J., He, J.-X., Pei, Z.-M., y Zheng, H.-L.** (2012). Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 63, 177-190.
- Wang, W., Vinocur, B., y Altman, A.** (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Wang, Y., Itaya, A., Zhong, X., Wu, Y., Zhang, J., van der Knaap, E., Olmstead, R., Qi, Y., y Ding, B.** (2011). Function and evolution of a microRNA that regulates a Ca<sup>2+</sup>-ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth. *The Plant cell* 23, 3185-3203.
- Ward, J.M., y Schroeder, J.I.** (1994). Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *The Plant cell* 6, 669-683.
- Waters, S., Gilliam, M., y Hrmova, M.** (2013). Plant high-affinity potassium (HKT) transporters involved in salinity tolerance: structural insights to probe differences in ion selectivity. *International journal of molecular sciences* 14, 7660-7680.
- Weese, T.L., y Bohs, L.** (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany* 32, 445-463.
- Weinl, S., y Kudla, J.** (2009). The CBL–CIPK Ca<sup>2+</sup>-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist* 184, 517-528.
- White, P.J.** (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465, 171-189.
- White, P.J., y Broadley, M.R.** (2003). Calcium in plants. *Annals of botany* 92, 487-511.
- White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., y Davies, J.M.** (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1564, 299-309.
- Wilson-Sanchez, D., Rubio-Diaz, S., Munoz-Viana, R., Perez-Perez, J.M., Jover-Gil, S., Ponce, M.R., y Micol, J.L.** (2014). Leaf phenomics: a systematic reverse genetic screen for *Arabidopsis* leaf mutants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79, 878-891.
- Winicov, I.** (1998). New Molecular Approaches to Improving Salt Tolerance in Crop Plants. *Annals of Botany* 82, 703-710.
- Wu, S.-J., Ding, L., y Zhu, J.-K.** (1996). *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *The Plant cell* 8, 617-627.
- Wu, Y., Liu, X., Wang, W., Zhang, S., y Xu, B.** (2012). Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions. *Plant physiology and biochemistry* 58, 212-219.
- Xiang, Y., Huang, Y., y Xiong, L.** (2007). Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant physiology* 144, 1416-1428.
- Xiong, L., y Zhu, J.K.** (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment* 25, 131-139.

- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L., y Wu, W.-H.** (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter *AKT1* in *Arabidopsis*. *Cell* 125, 1347-1360.
- Xue, S., Yao, X., Luo, W., Jha, D., Tester, M., Horie, T., y Schroeder, J.I.** (2011). *AtHKT1;1* mediates nernstian sodium channel transport properties in *Arabidopsis* root stelar cells. *PLoS One* 6, e24725-e24725.
- Xue, Z.-Y., Zhi, D.-Y., Xue, G.-P., Zhang, H., Zhao, Y.-X., y 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.
- Yadav, A., Balyan, R., Garg, V., y Malik, R.** (1996). Resistance against isoproturon in different biotypes of littleseed canary grass. *Annals of Applied Biology* 128, 34-35.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., y Somero, G.N.** (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science (New York, N.Y.)* 217, 1214-1222.
- Yang, H.-M., Zhang, X.-Y., y Wang, G.-X.** (2004). Cytosolic calcium oscillation signaling in guard cell. *Plant science* 166, 549-556.
- Yang, T., y Poovaiah, B.** (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in plant science* 8, 505-512.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.Y., Katsuhara, M., Brodsky, D.E., Wu, Y., y Schroeder, J.I.** (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice *OsHKT2;1* and *OsHKT2;2* transporters in plant cells. *Plant Physiol* 152, 341-355.
- Ye, Z.-H.** (2002). Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 183-202.
- Yeo, A.** (2007). Salinity. *Plant solute transport*, 340-370.
- Yeo, A., Izard, P., Boursier, P., y Flowers, T.** (1991). Short-and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 42, 881-889.
- Yeo, A.R.** (1983). Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiologia Plantarum* 58, 214-222.
- Yi, G., Luth, D., Goodman, T.D., Lawrence, C.J., y Becraft, P.W.** (2009). High-throughput linkage analysis of Mutator insertion sites in maize. *The Plant Journal* 58, 883-892.
- Young, J.C., DeWitt, N.D., y Sussman, M.R.** (1998). A transgene encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149, 501-507.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., Sun, G., y Dai, S.** (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of proteome research* 10, 3852-3870.
- Yu, S., Wang, W., y Wang, B.** (2012). Recent progress of salinity tolerance research in plants. *Russian Journal of Genetics* 48, 497-505.

- Zhang, H.-X., y Blumwald, E.** (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature biotechnology* 19, 765-768.
- Zhang, J., Xie, P., Lascoux, M., Meagher, T.R., y Liu, J.** (2013). Rapidly evolving genes and stress adaptation of two desert poplars, *Populus euphratica* and *P. pruinosa*.
- Zhang, K., Guo, N., Lian, L., Wang, J., Lv, S., y Zhang, J.** (2011). Improved salt tolerance and seed cotton yield in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by transformation with betA gene for glycinebetaine synthesis. *Euphytica* 181, 1-16.
- Zhao, J., Barkla, B.J., Marshall, J., Pittman, J.K., y Hirschi, K.D.** (2008). The *Arabidopsis cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Planta* 227, 659-669.
- Zhao, J., Shigaki, T., Mei, H., Guo, Y.Q., Cheng, N.H., y Hirschi, K.D.** (2009). Interaction between *Arabidopsis* Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers *CAX1* and *CAX3*. *The Journal of biological chemistry* 284, 4605-4615.
- Zhu, J.-K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science* 6, 66-71.
- 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. *Curr Opin Plant Biol* 6, 441-445.
- Zhu, J.K., Liu, J., y Xiong, L.** (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant cell* 10, 1181-1191.
- Zhu, X., Caplan, J., Mamillapalli, P., Czymmek, K., y Dinesh-Kumar, S.P.** (2010). Function of endoplasmic reticulum calcium ATPase in innate immunity-mediated programmed cell death. *The EMBO journal* 29, 1007-1018.
- Zushi, K., y Matsuzoe, N.** (2009). Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia horticultrae* 120, 181-187.

